

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

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt durch Jessica Becker
aus Düsseldorf
(geb. in Dinslaken)

Düsseldorf 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

1. Koreferent: Prof. Dr. H. Bünemann

2. Koreferent: Prof. Dr. E. Boles

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Bestandteile lignozellulosischer Biomasse	8
1.2	L-Arabinoseverwertung durch Mikroorganismen	9
1.3	Pentoseverwertung durch rekombinante Bakterien	13
1.4	Pentoseverwertung durch rekombinante <i>S. cerevisiae</i> Stämme	16
1.5	Transport von Pentosen in <i>S. cerevisiae</i>	19
1.6	Ziel der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Stämme und Medien.....	22
2.1.1	Bakterienstämme.....	22
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	22
2.1.3	Medien und Anzucht von <i>B. subtilis</i>	23
2.1.4	Medien und Anzucht von <i>M. smegmatis</i>	23
2.1.5	Hefestämme	23
2.1.6	Medien und Anzucht von Hefestämmen.....	25
2.2	Plasmide	26
2.3	Synthetische Oligonukleotide.....	28
2.4	Antikörper	32
2.5	Chemikalien, Material	32
2.6	Enzyme.....	34
2.7	Transformationen.....	34
2.7.1	Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.7.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	34
2.8	Präparation von DNA oder RNA	34
2.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	35
2.8.3	Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	35
2.8.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	35

2.9	Enzymatische Modifikationen von DNA oder RNA	36
2.9.1	DNA-Restriktion	36
2.9.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	36
2.9.3	Ligation	36
2.9.4	DNase-Behandlung von RNA	36
2.10	PCR-Amplifikation von DNA	37
2.11	Reverse Transkriptase (RT)-PCR (cDNA-Synthese für „Microarray“-Analysen).....	38
2.12	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	38
2.13	MOPS-Agarose-Gelelektrophorese	38
2.14	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	39
2.15	DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten	39
2.16	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA oder RNA.....	39
2.17	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	39
2.18	Sequenzierung von DNA	39
2.19	Herstellung einer Genbank	40
2.20	Klonierung von DNA-Fragmenten durch <i>in vivo</i> -Rekombination.....	40
2.21	Fusionierung der <i>E. coli</i> L-Arabinose Isomerase und der <i>E. coli</i> L-Ribulokinase mit einem His ₆ -Epitop.....	40
2.22	Promotordeletion bzw. -austausch in <i>S. cerevisiae</i>	41
2.23	Kreuzung von Hefestämmen und Tetradenanalyse.....	42
2.24	Aufreinigung eines 6x His-markierten Proteins über Nickelsäulen.....	43
2.25	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
2.26	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	44
2.27	Nachweis von Proteinen über Coomassie-Blau Färbung	44
2.28	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse.....	44
2.29	Bestimmung der Fermentationsrate.....	45
2.29.1	Bestimmung der Ethanolkonzentration.....	45
2.30	Bestimmung der Aufnahme von [1- ¹⁴ C] L-Arabinose in <i>S. cerevisiae</i>	46

2.31	Messung von Enzymaktivitäten in <i>S. cerevisiae</i>	47
2.31.1	Herstellung von Rohextrakten	47
2.31.2	Messung der L-Arabinose Isomerase Aktivität	47
2.31.3	Messung der L-Ribulokinase Aktivität.....	48
2.31.4	Messung der L-Ribulose 5-Phosphat 4-Epimerase Aktivität.....	49
2.31.5	Messung der Transaldolase Aktivität.....	49
2.32	Genomweite Transkriptionsanalyse („Microarray“-Analyse)	50
2.33	Mikroskopische Untersuchungen.....	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Einführung eines Stoffwechselweges zur Verwertung der Pentose L-Arabinose in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	52
3.1.1	Konstruktion eines Sets von Überexpressionsvektoren mit verschiedenen Auxotrophie-Markern.....	52
3.1.2	Überexpression endogener Hefe-Gene, die für Proteine mit Ähnlichkeit zu L-Ribulokinase bzw. L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerasen kodieren.....	54
3.1.3	Expression der Gene des L-Arabinose Katabolismus aus <i>E. coli</i> in Hefe	55
3.1.4	Western-Blot-Analyse zur Expression einer 6x His-fusionierten L-Arabinose Isomerase aus <i>E. coli</i> in Hefe.....	57
3.1.5	Expression der L-Arabinose Isomerasen aus <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Mycobacterium smegmatis</i> in Hefe.....	59
3.1.6	Selektion eines L-Arabinose verwertenden Hefestammes	60
3.2	Charakterisierung des Stammes JBY25-4M und seiner Mutationen	63
3.2.1	Notwendigkeit der einzelnen Plasmide für den L-Arabinose Katabolismus	65
3.2.1.1	Einfluß der Gal2-Überexpression auf die L-Arabinose Aufnahme	65
3.2.1.2	Einfluß der Expression der einzelnen reisolierten Plasmide auf das Wachstum in L-Arabinose Medium.....	67
3.2.2	Analyse der reisolierten Plasmide aus Stamm JBY25-4M.....	68
3.2.3	Mutation der L-Ribulokinase	70

3.2.3.1	Expression der Wildtyp- und der mutierten L-Ribulokinase von einem Centromer-Plasmid.....	71
3.2.3.2	Aufreinigung und Kinetik der mutierten und der Wildtyp L-Ribulokinase.....	73
3.2.4	Charakterisierung der genomischen Mutationen des Stammes JBY25.....	76
3.2.4.1	Kreuzungsanalyse.....	76
3.2.4.2	Tetradenanalyse.....	77
3.2.4.3	Suche nach dominanten mutanten Allelen mit einer Genbank des Stammes JBY25.....	78
3.2.5	Effekt einer zusätzlichen Kopie von <i>TAL1</i> auf einem Centromer-Plasmid.....	80
3.3	Überexpression von <i>TAL1</i>	82
3.3.1	Effekt einer starken Überexpression von <i>TAL1</i>	82
3.4	Genomweite Transkriptions Analyse („Microarray-Analyse“).....	84
3.5	Fermentationen mit Stamm JBY25-4M.....	87
3.5.1	Fermentation von L-Arabinose ohne überexprimiertes <i>GAL2</i>	89
3.6	Konstruktion einer „Expressionskassette“ für den L-Arabinose Katabolismus.....	90
3.6.1	Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus in das Genom des Wildtypstammes.....	91
3.6.2	Konstruktion eines Plasmides mit drei Genen für den L-Arabinose Katabolismus.....	93
4	Diskussion.....	98
4.1	Funktionelle Expression von Enzymen für den L-Arabinose Katabolismus in <i>S. cerevisiae</i>	98
4.1.1	Endogene Hefegene.....	98
4.1.2	Heterolog exprimierte Enzyme.....	99
4.2	Zufällige Mutagenese durch Selektion.....	101
4.3	Notwendigkeit eines zusätzlichen L-Arabinose Transporters.....	102
4.4	Plasmidkodierte Mutationen von JBY25-4M.....	103

4.4.1	Auswirkungen der Mutation der L-Ribulokinase.....	104
4.5	Genomische Mutationen von JBY25-4M	107
4.5.1	Einfluß der Transaldolase-Aktivität auf das Wachstum in L-Arabinose Medium.....	107
4.6	Problematik der genomweiten Expressionsanalyse durch DNA-„Microarrays“	110
4.7	L-Arabinose Fermentation	111
4.8	Möglichkeiten zur stabileren Expression der Gene des L-Arabinose Katabolismus	112
4.9	Entscheidende Faktoren der L-Arabinose Verwertung in <i>S. cerevisiae</i>	114
4.10	Biotechnologische Aspekte der Arbeit	115
5	Zusammenfassung	117
6	Literaturverzeichnis	118
7	Abkürzungsverzeichnis.....	128

1 EINLEITUNG

Die Bier-, Wein- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird schon seit Jahrhunderten und bis in die heutige Zeit für die Herstellung von Nahrungs- und Genußmitteln, wie alkoholischen Getränken und Backwaren, genutzt. Neben diesen ursprünglichen Anwendungsgebieten findet die Hefe in jüngerer Zeit allerdings auch immer größere Verwendung in anderen Bereichen. So wird sie in der Forschung häufig als Modellorganismus betrachtet, da viele Mechanismen der Kontrolle der Genexpression, der Signaltransduktion oder des Metabolismus auf die Zellen höherer Eukaryonten übertragbar sind (Tamkun *et al.*, 1992, Peterson und Herskowitz, 1992). Auch in biotechnologischen Prozessen, wie zum Beispiel der heterologen Produktion von Fremdproteinen, wird sie eingesetzt. Einer der größten biotechnologischen Anwendungsbereiche für *S. cerevisiae* ist jedoch die Herstellung von Ethanol durch Fermentationsprozesse in großtechnischem Maßstab. Ethanol seinerseits ist in vielen Industriezweigen unentbehrlich. So wird es zum Beispiel, neben seiner Verwendung in der Lebensmittel- und der pharmazeutischen Industrie, als Grundstoff für die Herstellung einer Vielzahl von Chemikalien wie Essigsäure, Acetaldehyd, Butanol oder Ethylen eingesetzt (Glazer und Nikaido, 1995), und auch als Lösungsmittel genutzt. In Anbetracht des weltweit wachsenden Benzinverbrauchs und der damit verbundenen Gefahr einer möglichen globalen Erwärmung, verursacht durch die vermehrte Verbrennung fossiler Brennstoffe (Hall *et al.*, 1991; Lynd *et al.*, 1991; Brown, 1999), gewinnt vor allem der Einsatz von Bioethanol als Treibstoff oder Treibstoffzusatz an Gewicht. Während Ethanol in Brasilien seit den 70er Jahren aus Zuckerrohr gewonnen wird und dort als reiner Treibstoff dient, wird in den USA zur Zeit ein Gemisch aus 10% Ethanol und 90% Benzin als Kraftstoff verwendet (Wyman und Goodman, 1993). Durch seinen Sauerstoffanteil verbessert Ethanol die Verbrennung des Benzins und reduziert so die Emission von Kohlenmonoxid und unverbrannten Kohlenwasserstoffen, die zur Bildung von Smog führen (Wyman und Goodman, 1993; van Wyk, 2001). Auch die niedrigere Flüchtigkeit und die geringere photochemische Reaktivität von Ethanol im Vergleich zu Benzin verringern die Tendenz zur Smogbildung (Lynd *et al.*, 1991; Aristidou und Penttilä, 2000; van Wyk, 2001). Außerdem kann aufgrund seines hohen Octanwertes auf andere Antiklopffmittel verzichtet werden (Gong *et al.* 1981; Wyman und Goodman, 1993; Wartenberg, 1989).

Viele verschiedene Arten von pflanzlicher Biomasse können für die Produktion von Ethanol als Bioalkohol genutzt werden. Zur Zeit wird Ethanol hauptsächlich durch die Fermentation von stärkehaltigem Mais und Getreide oder von Saccharose aus Zuckerrohr, Zuckerrüben und Melasse gewonnen (Wartenberg, 1989;

Weinberg und Williams, 1990). Da diese Rohstoffe jedoch auch von der Nahrungsmittelindustrie genutzt werden und somit die Produktionskosten steigern, müssen alternative, kostengünstige Gärungssubstrate gefunden und neue Bioprozessierungs-Technologien entwickelt werden, um die Wettbewerbsfähigkeit des Ethanols zu verbessern (van Wyk, 2001; Wyman, 2001). Ein attraktiver, da in großen Mengen überall verfügbarer und sich stets selbst erneuernder Ausgangsstoff für Fermentationen ist lignozellulosische Biomasse. Dazu gehören zum Beispiel land- und forstwirtschaftliche Pflanzenabfälle, kommunale Abfälle, Abfälle der Papierindustrie und andere industrielle Abfälle oder sogar Altpapier (Parisi, 1989, Schell und Harwood, 1994; Boynton und McMillan, 1994, van Wyk, 2001), die zudem auf diese Weise nutzbringend entsorgt werden können. Solange nicht mehr dieser Biomasse verbraucht wird, als in der entsprechenden Zeit nachwachsen kann, würde die Verbrennung des Ethanols dabei nicht zu einem Anstieg der Netto-CO₂-Konzentration in der Atmosphäre führen, die eine der Ursachen für die globale Erwärmung darstellt (van Wyk, 2001).

1.1 Bestandteile lignozellulosischer Biomasse

Lignozellulose, die die pflanzlichen Zellwände bildet, besteht aus drei Hauptbestandteilen: Zellulose mit einem Anteil von 28-50%, Hemizellulose mit 20-30% und dem Lignin, das etwa 18-30% ausmacht (Breznak und Brune, 1994). Zellulose ist ein Homopolysaccharid, das aus β -1,4 verknüpften D-Glukosemolekülen besteht. In der Natur sind eine Vielzahl anderer Polysaccharide (so wie Hemizellulose, Stärke und Pektin), sowie Lignin, mit der Zellulose assoziiert. Hemizellulose ist ein Heteropolymer, das aus verschiedenen Kohlenhydrat-Monomeren, wie Xylose, Galaktose, Mannose, Glukose und Arabinose, sowie Uronsäuren, zusammengesetzt ist. Diese sind mit verschiedenen Bindungen untereinander verknüpft. Der Hauptbestandteil der Hemizellulose ist die Pentose Xylose, die neben Glukose den zweithäufigst vorkommenden Zucker in pflanzlicher Biomasse darstellt (Chandrakant und Bisaria, 1998, Hahn-Hägerdal *et al.* 2001). Aber auch die Menge an Arabinose (in Arabinoxylan oder Arabinogalactan mit Xylose oder Galaktose verknüpft) kann in einigen pflanzlichen Materialien und Hydrolysaten dieser Materialien signifikant sein. In vielen Kräutern macht Arabinan 10-20% der gesamten Nichtglucan Kohlenhydrate aus. (McMillan und Boynton, 1994). Lignin ist ein komplexes aromatisches Polymer aus Phenylpropaneinheiten, das nicht fermentiert werden kann, aber zum Beispiel für die Produktion von Chemikalien genutzt wird.

Um Hemizellulose und Zellulose zu Ethanol umwandeln zu können, müssen zunächst die Polysaccharide enzymatisch oder durch saure Hydrolyse zu den entsprechenden Monomeren verzuckert werden, bevor Mikroorganismen sie weiter verwerten können. Die Anteile der Monosaccharide in solchen Hydrolysaten sind variabel, abhängig vom verwendeten Rohmaterial und der Art der Hydrolyse. Allgemein enthalten Hydrolysate aus Hartholz einen hohen Anteil der Pentosen Xylose und Arabinose, wogegen Weichholz-Hydrolysate eher reich an Mannose sind (Taherzadeh *et al.*, 1997). Insgesamt entstehen bei der Hydrolyse lignozellulosischer Biomasse sowohl Hexosen (Glukose, Galaktose und Mannose), als auch Pentosen (Xylose, Arabinose). Das Fehlen von Mikroorganismen, die beide Zuckerarten effizient zu Ethanol metabolisieren können, steht allerdings einer ökonomischen Umwandlung der pflanzlichen Biomasse entgegen.

1.2 L-Arabinoseverwertung durch Mikroorganismen

Da die D-Xylose den weitaus größeren Anteil der Pentosen in pflanzlichen Hydrolysaten ausmacht, ist die Metabolisierung dieses Zuckers durch Mikroorganismen sehr gut untersucht. Aber auch L-Arabinose kann in einigen Arten lignozellulosischer Biomasse, wie zum Beispiel Getreiden oder Kräutern, einen signifikanten Anteil der Zucker ausmachen (McMillan und Boynton, 1994, Hespell, 1998). Deshalb wurden viele verschiedene Bakterien, Hefen und Pilze auf ihre Fähigkeit L-Arabinose zu fermentieren untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Metabolisierung der Pentose in Pro- und in Eukaryonten im wesentlichen über die gleichen Stoffwechselwege abläuft. Ebenso wie bei der Umsetzung der D-Xylose unterscheiden sich lediglich die ersten Schritte des Katabolismus bis hin zum D-Xylulose-5-Phosphat. In Bakterien, wie zum Beispiel *E. coli*, *B. subtilis* oder *Yersinia pestis*, wird L-Arabinose zunächst durch die L-Arabinose Isomerase zu L-Ribulose umgesetzt. Diese wird durch die L-Ribulokinase zu L-Ribulose-5-Phosphat phosphoryliert, aus dem schließlich D-Xylulose-5-Phosphat gebildet wird. Die letzte Reaktion wird dabei katalysiert durch die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase (Lee *et al.*, 1986). Auch Xylose wird in Prokaryonten über eine Isomerase (Xylose Isomerase), gefolgt von einer Kinase (Xylulokinase) zu D-Xylulose-5-Phosphat metabolisiert.

Die drei L-Arabinose umsetzenden Enzyme werden durch ein Operon kodiert, das aus den Genen *araA* (L-Arabinose Isomerase), *araB* (L-Ribulokinase) und *araD* (L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase) besteht. Die Reihenfolge dieser Gene innerhalb des Operons kann variieren. Während in dem wohl am besten erforschten Organismus *E. coli* ein *araBAD*-Operon vorliegt, dessen Genprodukte

araA aus 566 Aminosäureresten bzw. araB aus 500 Aminosäureresten und araD aus 231 Aminosäuren bestehen (Lee et al., 1986), folgen bei *B. subtilis* araABD aufeinander (Sá-Nogueira und Lencastre, 1989). Das Operon ist jeweils Teil eines großen Genkomplexes, dem weitere Gene angehören, deren Produkte zum Beispiel für die Regulation des Operons, den Transport der Arabinose in die Zelle oder für die initiale Verzuckerung von Arabinofuranosen zuständig sind (Lee et al., 1986, Sá-Nogueira und Lencastre, 1989, Sá-Nogueira et al., 1997).

In Eukaryonten (filamentöse Pilze, Hefen) hingegen verläuft die Metabolisierung der L-Arabinose zum D-Xylulose-5-Phosphat über einen komplexen Weg, bestehend aus zwei reduzierenden (Reduktase-katalysierten) und zwei oxidierenden (Dehydrogenase-katalysierten) Schritten, sowie einer Kinase-katalysierten Reaktion (Chiang und Knight, 1961, Witteveen et al., 1989). Bei der Metabolisierung der D-Xylose durch Eukaryonten treten dagegen nur jeweils eine Reduktion und eine Oxidationsreaktion auf. In Abb. 1 ist die Umwandlung der L-Arabinose zu D-Xylulose-5-Phosphat in Pro- und in Eukaryonten im Vergleich dargestellt.

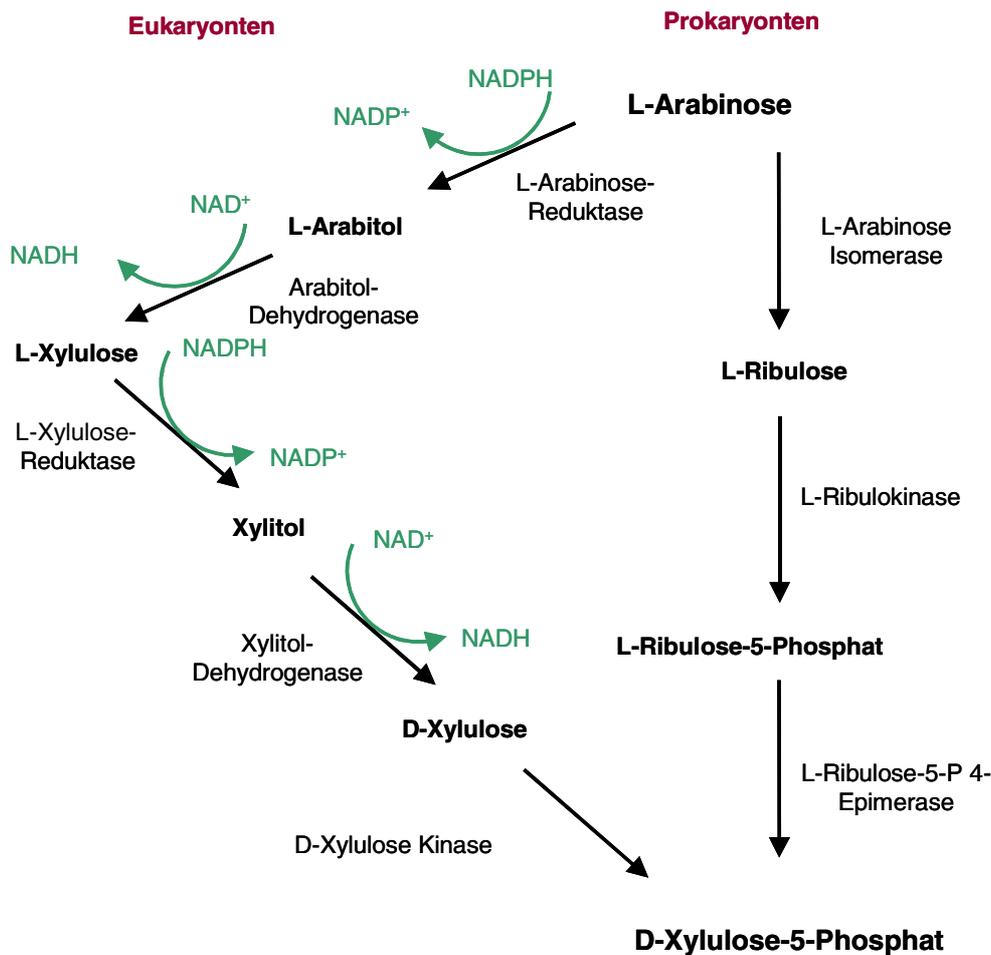


Abb. 1: Reaktionsschritte der Umwandlung von L-Arabinose zu D-Xylulose-5-Phosphat in L-Arabinose verwertenden Pro- und Eukaryonten.

D-Xylulose-5-Phosphat wiederum ist ein Intermediat des Pentosephosphatweges. Dieser besteht aus einem oxidativen, irreversiblen Teil, in dem Glukose-6-Phosphat zu Ribulose-5-Phosphat und Kohlendioxid oxidiert wird, während NADP durch zwei Dehydrogenasen zu NADPH reduziert wird, und einem nicht-oxidativen, reversiblen Teil. Dort wird Ribulose-5-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat metabolisiert. Diese Intermediate gelangen in die Glykolyse und werden weiter zu Pyruvat umgesetzt (Schaaff-Gerstenschläger und Miosga, 1997).

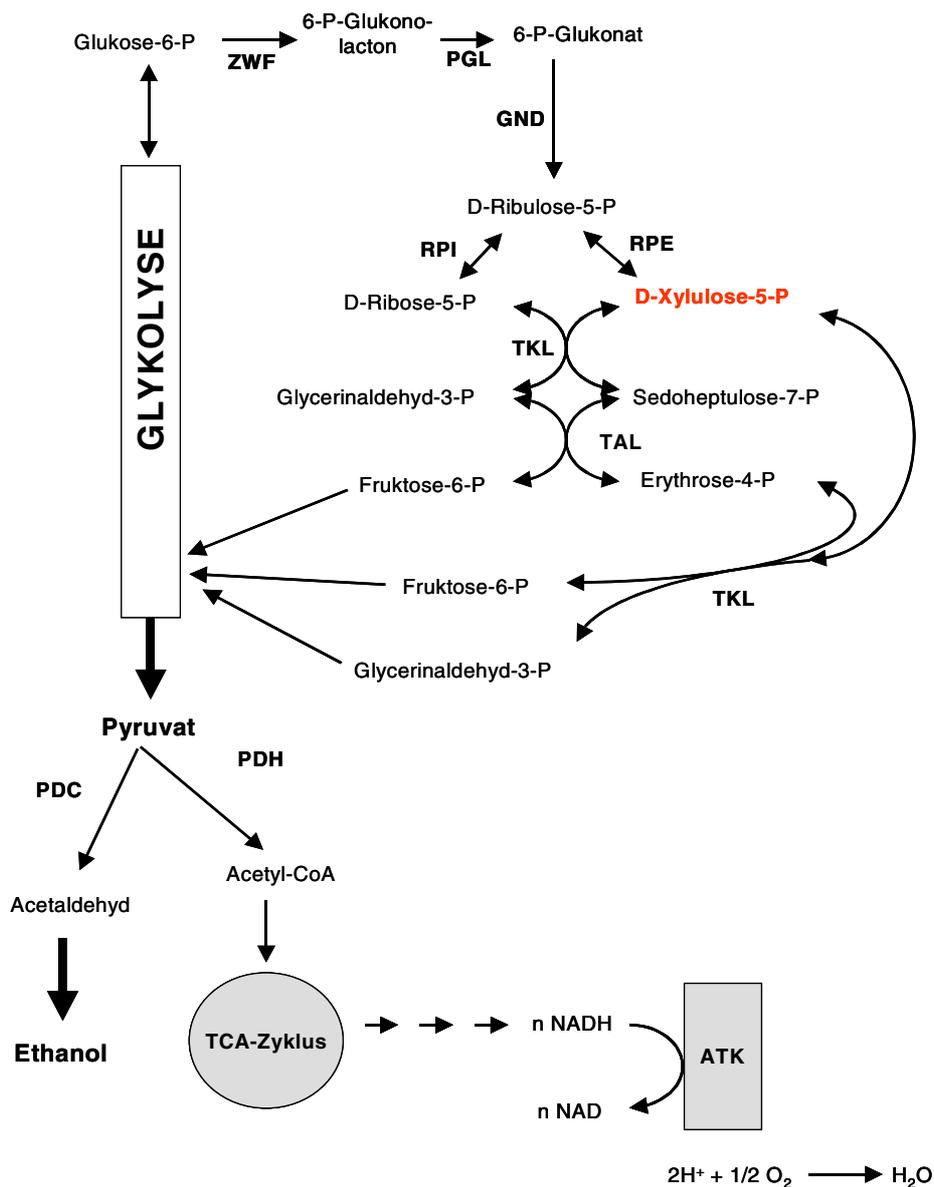


Abb. 2: Schematische Darstellung der Metabolisierung von D-Xylulose-5-Phosphat in Hefen. Der Kreis stellt den Tricarbonsäurezyklus (TCA) dar, das Rechteck kennzeichnet die Atmungskette (ATK). Abkürzungen: **ZWF** = Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; **PGL** = 6-Phospho-Gluconolactonase; **GND** = 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase; **RPI** = Ribose-5-Phosphat-Isomerase; **RPE** = Ribulose-5-Phosphat-Epimerase; **TKL** = Transketolase; **TAL** = Transaldolase; **PDC** = Pyruvat-Decarboxylase; **PDH** = Pyruvat-Dehydrogenase

Pyruvat wird schließlich in Hefen unter anaeroben Bedingungen durch die Pyruvat-Decarboxylase und über die Alkoholdehydrogenase zu Ethanol fermentiert. Für einige Hefen ist auch von einer Phosphoketolase-katalysierten Reaktion berichtet worden, in der Xylulose-5-Phosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Acetylphosphat umgewandelt wird (Evans und Ratledge, 1984). Das Vorkommen dieses Enzyms ist jedoch nicht bestätigt worden. Desweiteren wird der Pentosephosphatweg dazu benötigt, die Zelle mit cytosolischem NADPH (aus dem oxidativen Teil des Pentosephosphatweges, Nogae und Johnston, 1990), Ribose-5-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat für die Biosynthese von Nucleotiden und Aminosäuren zu versorgen (Schaaff-Gerstenschläger und Miosga, 1997). Abb. 2 zeigt die Reaktionen, über die D-Xylulose-5-Phosphat in Hefen metabolisiert werden kann.

L-Arabinose kann von verschiedenen Bakterien verwertet werden. Eine Bildung von signifikanten Ethanolmengen durch L-Arabinose-Fermentation ist dabei in Wildtypstämmen von *Sarcina ventriculi* und *Bacillus macerans* beobachtet worden (Rosenberg, 1980, McMillan und Boynton, 1994). Generell ist jedoch eine Verwendung von Bakterien in industriellen L-Arabinose-Fermentationsprozessen aufgrund der geringen Ethanoltoleranz und dem Auftreten von diversen Nebenprodukten (CO₂, Essigsäure, Succinat, Milchsäure und Formiat, 2,3-Butandiol), bei der in vielen Bakterien ablaufenden gemischten Säuregärung, wenig sinnvoll. Erfolgreicher waren hingegen L-Arabinose Fermentationen mit rekombinanten Bakterienstämmen (siehe 1.3). Weitere Nachteile bei der Verwendung von Bakterien für industrielle Fermentationsprozesse, die auch rekombinante Bakterienstämme betreffen, sind die generell im Vergleich zu Hefen niedrigere Toleranz gegenüber hohen Ethanolkonzentrationen und Inhibitoren im Hydrolysat, sowie die relativ große Kontaminationsgefahr. Hefen erzeugen während der Fermentation einen deutlich sauren pH-Wert. Da die Hefen selber tolerant gegen niedrige pH-Werte sind, wird die Fermentation davon nicht beeinträchtigt. Eventuell vorhandene Keime werden jedoch sofort abgetötet. Das pH-Optimum von Bakterien dagegen liegt im neutralen Bereich, bei dem auch unerwünschte Kontaminanten überleben können, so dass häufig eine vorherige Sterilisation des Substrates notwendig wird.

Einige Hefen (*Candida tropicalis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*) und Pilze (*Mucor sp.*, *Fusarium oxysporum*) können L-Arabinose aerob assimilieren, den meisten von ihnen fehlt jedoch entweder die Fähigkeit sie zu Ethanol zu fermentieren komplett, oder sie zeigen nur sehr geringe Ethanol-Produktionsraten und –ausbeuten (Rosenberg, 1980, McMillan und Boynton, 1994; Dien *et al.*, 1996). Eine Fermentation von L-Arabinose zu Ethanol durch

Pilze ist von einer *Paecilomyces*-Art berichtet worden (Wu *et al.*, 1986). Eine Bildung geringer Mengen Ethanol aus L-Arabinose wurde von der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* beobachtet. Die in einer Studie von McMillan und Boynton (1994) getesteten Pilze bildeten sämtlich nur Zellmasse aus L-Arabinose, während das Hauptprodukt der Hefen Arabitol war. In einer größer angelegten Suche nach L-Arabinose fermentierenden Hefen konnten Dien *et al.* (1996) Hefen der Arten *Candida aurangiensis*, *Candida succiphila*, *Ambrosiozyma monospora* und *Candida sp.* identifizieren, die unter Sauerstofflimitierung geringe Mengen Ethanol aus L-Arabinose bildeten. Jedoch fermentierten diese Hefen L-Arabinose nur sehr langsam (7-9 Tage). Auch in dieser Studie zeigte sich, dass das Hauptprodukt der meisten Hefen aus L-Arabinose Arabitol war. Die Anreicherung von Arabitol läßt sich bei einer Betrachtung des L-Arabinose Stoffwechselweges erklären. Ebenso wie die Reaktionen, die in Eukaryonten zur Bildung von D-Xylulose-5-Phosphat aus D-Xylose führen, verursacht auch die Verstoffwechslung der L-Arabinose in Eukaryonten ein Redoxungleichgewicht. Dies entsteht durch die Produktion von NADP in den zwei Reduktionen, während in den Oxidationsschritten NAD verbraucht wird (McMillan und Boynton, 1994; Dien *et al.*, 1996, Richard *et al.*, 2002). Da *S. cerevisiae* jedoch keine signifikante cytoplasmatische Transhydrogenase- oder NAD(H)-Kinase-Aktivität besitzt (Lagunas und Gancedo, 1973, Bruinenberg *et al.*, 1983), beides Enzyme, die NADH in NADPH umwandeln, entsteht ein Kofaktorungleichgewicht. Während bei Anwesenheit von Sauerstoff das gebildete NADH über die Atmungskette wieder zu NAD oxidiert werden kann (s. Abb. 2), kommt es unter anaeroben Bedingungen bei fehlender Atmung zu einem Anstau von NADH und der Stoffwechsel kommt zum Erliegen (Bruinenberg *et al.*, 1983). Im Fall der L-Arabinose ist dieses Problem besonders stark ausgeprägt, da jeweils zwei Schritte davon betroffen sind, im Vergleich zu jeweils einer Reaktion im Fall der D-Xylose.

1.3 Pentoseverwertung durch rekombinante Bakterien

Es existieren keine natürlich vorkommenden Organismen, die alle Anforderungen für eine effiziente Umsetzung der Zucker in Hydrolysaten aus zellulosischer Biomasse zu Ethanol in industriellen Prozessen erfüllen (z. B. gute Ausbeute, hohe Produktivität, breites Substratspektrum, Ethanol-Toleranz, Toleranz gegenüber Inhibitoren im Hydrolysat etc.). Da jedoch das Ausgangsmaterial einen großen Anteil der gesamten Prozesskosten ausmacht, hängt die Wirtschaftlichkeit des Fermentationsprozesses von der schnellen und effizienten Umsetzung aller im Hydrolysat vorhandenen Zucker ab (von Sivers und Zacchi, 1995). Deshalb wurde in den letzten Jahren mit Hilfe moderner, gentechnischer Methoden

versucht solche Organismen zu optimieren, die schon von Natur aus viele für Bioprozesse vorteilhafte Eigenschaften vereinen. Dabei kann nach zwei Strategien vorgegangen werden. Zum einen kann von Organismen ausgegangen werden, die von Natur aus viele der in pflanzlicher Biomasse vorkommenden Substrate, also Hexosen und Pentosen, verwerten können (z. B. *E. coli*) und dort können Stoffwechselwege zur Produktion von Ethanol etabliert werden. Auf der anderen Seite können solche Organismen, die effektiv Ethanol produzieren und demzufolge in der Lage sind hohe Ethanolkonzentrationen zu tolerieren (so wie *Zymomonas mobilis* oder Hefen), mit einem erweiterten Substratspektrum, also der zusätzlichen Fähigkeit D-Xylose und L-Arabinose zu metabolisieren, ausgestattet werden.

Für den ersten Ansatz wurden verschiedene Bakterien genetisch modifiziert. Anfängliche Studien, bei denen zunächst nur das für die Pyruvat-Decarboxylase kodierende *pdc*-Gen von *Z. mobilis* in *E. coli* (Brau und Sahm, 1986), *Erwinia chrysanthemi* (Tolan und Finn, 1987a) und *Klebsiella planticola* (Tolan und Finn, 1987b), alles Organismen mit einem breiten Substratspektrum, kloniert wurde, waren nicht sehr erfolgreich. Hierbei wurde nur die Pyruvat-Decarboxylase heterolog exprimiert, während für die weitere Reduktion von Acetaldehyd und die Oxidation von NADH die endogene Alkohol-Dehydrogenase (*adh*) benötigt wurde. Die Ethanol-Produktion war zwar in den rekombinanten Stämmen deutlich gesteigert, aber die Wachstumsraten und die Ethanoltoleranz waren stark beeinträchtigt. Für *K. planticola* war das nicht der Fall, jedoch produzierten alle Stämme diverse nicht erwünschte Nebenprodukte.

Die meisten aktuelleren Arbeiten auf diesem Gebiet beschäftigen sich mit *E. coli*. Dies ist aus verschiedenen Gründen ein interessanter Organismus für die Umwandlung erneuerbarer Ressourcen zu Ethanol: er kann alle Zucker-Bestandteile lignozellulosischer Materialien, nämlich Glukose, Xylose, Mannose, Arabinose und Galaktose zu Ethanol und anderen Produkten fermentieren, er kann aerob und anaerob einen hohen glykolytischen Fluß aufrechterhalten und er weist eine annehmbare Ethanol-Toleranz auf. Eine effizientere Umleitung des glykolytischen Flusses hin zu Ethanol wurde erreicht, indem dieser Organismus mit einem Plasmid transformiert wurde, das sowohl das *pdc*-, als auch das *adh*-Gen aus *Z. mobilis* in einem künstlichen Operon (PET-Operon) vereint (Ingram *et al.* 1987, Ingram und Conway, 1988, Beall *et al.*, 1991). Eine Integration der heterologen Gene in das Genom von *E. coli* konnte die Ethanol-Ausbeuten zusätzlich steigern (Ohta *et al.*, 1991a). Solche rekombinanten *E. coli* Stämme sind in der Lage auch aus Hydrolysaten mit gemischten Zuckern in großen Mengen Ethanol zu produzieren (Ingram *et al.*, 1999, Dien *et al.*, 2000). Allerdings

erfolgt die Verwertung der Xylose und Arabinose in Hydrolysaten oft verspätet. Zudem ist sie langsamer als die Fermentation der Zucker alleine und unvollständig. Da dies der Katabolit-Repression durch Glukose zugeschrieben wurde, haben Nichols *et al.* (2001) Mutanten mit einer Glukose-Phosphotransferase Mutation hergestellt, die defekt in der Glukose-Repression sind. In diesen Stämmen war zwar die Ethanol-Ausbeute nicht gesteigert, aber die Zucker wurden gleichzeitig verwertet, so dass das Auftreten restlicher, nicht metabolisierter Pentosen vermieden wurde.

Ohta *et al.* (1991b) untersuchten außerdem die Expression der *pdc*- und *adh*-Gene von *Z. mobilis* in einem weiteren Enterobakterium, nämlich *Klebsiella oxytoca*. Der native Organismus zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, Zellobiose transportieren und metabolisieren zu können, so dass bei einer Prozessierung keine zusätzliche Zellobiase zugegeben werden muß. Wie bei *E. coli* konnten mehr als 90% des beim Zucker-Katabolismus auftretenden Kohlenstoff-Flusses von den natürlichen Fermentationsreaktionen zur Produktion von Ethanol umgelenkt werden. Die Ethanol-Produktion war dabei sowohl sehr schnell, als auch sehr effizient.

Die genetische Modifikation ethanologener Organismen, um ihr Substratspektrum zu erweitern, wurde intensiv an dem Bakterium *Z. mobilis* angewandt. Dieses Bakterium wird zum Beispiel für die Produktion alkoholischer Getränke, wie Pulque, verwendet und zeigt von Natur aus eine große Toleranz gegenüber hohen Alkoholkonzentrationen, sowie eine Ethanol-Produktivität, die der von Hefen überlegen ist (5-10% höhere Ausbeuten). Insgesamt betrachtet vereint es viele weitere wünschenswerte Eigenschaften, die ein idealer Biokatalyst für die Produktion von Ethanol aufweisen sollte: es erzielt hohe Ethanol-Ausbeuten, zeigt eine ausgeprägte Produktspezifität und ist tolerant gegenüber niedrigen pH-Werten. Die außergewöhnlich hohen Ausbeuten, die dieser Organismus erzielt, werden einer reduzierten Bildung von Biomasse während der Fermentation zugeschrieben, die vermutlich durch eine Limitierung von ATP zustande kommt. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass *Zymomonas* der einzige bekannte Mikroorganismus ist, der unter anaeroben Bedingungen ausschließlich den Entner-Doudoroff-Weg nutzt, um eine effiziente Fermentation von Glukose zu Ethanol zu erreichen (Swings und De Ley, 1977). Der große Nachteil dieses Organismus ist, dass er keine Pentose-Zucker verwerten kann. Erste Versuche einen Stoffwechselweg für Xylose in *Z. mobilis* zu etablieren, indem die *xylA*- und *xylB*-Gene aus *Klebsiella* oder *Xanthomonas* heterolog exprimiert wurden, waren trotz funktioneller Expression der Enzyme nicht sehr erfolgreich, da, wie sich herausstellte, kein vollständiger Pentosephosphatweg vorhanden war

(Chandrakant und Bisaria, 1998). Daraufhin konstruierten Zhang *et al.* (1995) zunächst einen rekombinanten Stamm, der die vier Gene *xyIA* (Xylose-Isomerase), *xyIB* (Xylulokinase), *talB* (Transaldolase) und *tktA* (Transketolase) aus *E. coli*, in Form von zwei unabhängigen Operons, exprimiert. Dieser Stamm war in der Lage, schnell mit Xylose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen und wandelte Glukose und Xylose mit 94% bzw. 86% der theoretischen Ausbeute zu Ethanol um. Nach demselben Prinzip wurde später ein *Z. mobilis* Stamm konstruiert, der auch L-Arabinose zu Ethanol fermentieren konnte. Dafür wurden die fünf *E. coli* Gene *araA*, *araB*, *araD*, *talB* und *tktA*, unter der Kontrolle von konstitutiven Promotoren, heterolog exprimiert. Der rekombinante Stamm wuchs mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle und produzierte Ethanol daraus mit einer Ausbeute von 98% der theoretischen Ausbeute, was ein Zeichen dafür war, dass die L-Arabinose beinahe ausschließlich zu Ethanol als Fermentationsprodukt umgesetzt wurde. Zusammen mit dem vorher konstruierten Xylose metabolisierenden Stamm kann dieser Stamm in gemischten Kulturen für Fermentationsprozesse eingesetzt werden (Deanda *et al.*, 1996). Mohagheghi *et al.* (2002) haben in einem weiteren Schritt alle sieben Gene, die für die Metabolisierung beider Pentosen (Arabinose und Xylose) benötigt werden, in das *Zymomonas*-Genom integriert und ausgewählte Integrierte, die sich als besonders stabil erwiesen, weiter analysiert. Obwohl mit einem solchen Stamm eine Kofermentation von Glukose, Xylose und Arabinose erreicht werden konnte, wurden die Zucker trotzdem bevorzugt in der oben genannten Reihenfolge verwertet. Die Ethanol-Ausbeuten entsprachen denjenigen, die mit plasmidtransformierten Stämmen erzielt wurden.

1.4 Pentoseverwertung durch rekombinante *S. cerevisiae* Stämme

Für die meisten industriellen Fermentationsprozesse zur Produktion von Ethanol wird jedoch zur Zeit die Hefe *S. cerevisiae* eingesetzt, da sie in der Lage ist, Zucker schnell und mit hohen Ausbeuten umzusetzen, eine große Toleranz gegenüber hohen Ethanol-Konzentrationen aufweist und sehr resistent gegenüber in den Hydrolysaten vorkommenden inhibitorischen Stoffen ist. Außerdem gilt *S. cerevisiae* als ein GRAS (generally regarded as safe) Mikroorganismus. Während die in den Hydrolysaten enthaltenen Hexosen von *S. cerevisiae* mit hohen Fermentationsraten und hohen Produktausbeuten zu Ethanol fermentiert werden können, ist diese weder in der Lage die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose zu Ethanol umzusetzen noch sie für Wachstum zu nutzen (Barnett, 1976). Aus diesem Grund ist in den letzten Jahren intensive Forschung darauf

verwendet worden einen rekombinanten *S. cerevisiae* Stamm zu konstruieren, der in der Lage ist auch die Pentosen zu metabolisieren.

D-Xylose ist die hauptsächlich in pflanzlicher Biomasse auftretende Pentose. Demzufolge galt das größte Interesse der Umsetzung dieses Zuckers. Mit Hilfe von gentechnischen Methoden konnte ein funktioneller Stoffwechselweg für D-Xylose in *S. cerevisiae* etabliert werden. Dafür wurden für D-Xylose Reduktase (*XYL1*) und Xylitol Dehydrogenase (*XYL2*) kodierende Gene der Hefe *Pichia stipitis* heterolog in der Hefe exprimiert und später auch die endogene Xylulokinase (*XKS1*) überexprimiert (Kötter und Ciriacy, 1993, Tantirungkij *et al.*, 1993, Ho *et al.*, 1998, Eliasson *et al.*, 2000). Die daraus resultierenden Hefestämme waren in der Lage die Pentose D-Xylose für Wachstum zu nutzen und sie zu Ethanol zu fermentieren. Allerdings waren die erzielten Ethanol-Ausbeuten vergleichsweise gering, da ein großer Teil der Xylose zu dem unerwünschten Nebenprodukt Xylitol umgesetzt wurde. Dies wurde zum einen den ungünstigen thermodynamischen Bedingungen der Reaktionen zugeschrieben (Rizzi *et al.*, 1989) und zum anderen einem Kofaktor-Ungleichgewicht aufgrund der Tatsache, dass die zuerst ablaufende Reaktion bevorzugt NADPH verbraucht, während die zweite Reaktion ausschließlich NADH produziert (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Um dieses Problem zu umgehen wurde außerdem versucht die Metabolisierung der Xylose mit Hilfe der prokaryontischen Enzyme des D-Xylose-Katabolismus zu erreichen. Da *S. cerevisiae* bereits eine endogene Xylulokinase besitzt, wäre für diesen Weg nur die zusätzliche Expression einer Xylose-Isomerase notwendig. Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren versucht Xylose-Isomerasen verschiedener Organismen heterolog in Hefe zu exprimieren. Es stellte sich jedoch heraus, dass die meisten dieser Enzyme entweder nicht funktionell in Hefe waren, oder es nicht zu einer Synthese des entsprechenden Proteins kam (Sarchy *et al.*, 1987, Amore *et al.*, 1989, Hallborn, 1995, Moes *et al.*, 1996). Lediglich die Xylose-Isomerasen zweier Organismen konnten bisher aktiv in Hefe exprimiert werden. Dies war zum einen das Enzym aus *Streptomyces rubiginosus*, das jedoch nur eine sehr geringe Aktivität in Hefe aufwies (Schründer *et al.*, 1996) und zum anderen das Enzym aus *Thermus thermophilus* (Walfridsson *et al.*, 1996). Dieses konnte mit hoher Aktivität exprimiert werden und zeigte eine ähnliche Temperatur- und pH-Abhängigkeit wie das native Enzym. Da das Enzym allerdings aus einem thermophilen Bakterium stammte, wies es ein sehr hohes Temperaturoptimum auf (85°C), während die optimale Temperatur für eine Kultivierung der Hefe bei 30°C liegt. Durch zufällige Mutagenese konnten inzwischen Mutanten mit einer höheren Enzymaktivität bei dieser physiologischen Temperatur isoliert werden (Lönn *et al.*, 2002).

In Bezug auf die weitere Metabolisierung der Pentosen durch rekombinante Hefestämme über den Pentosephosphatweg scheinen die von der Transaldolase und der Transketolase katalysierten Reaktionen einen Engpaß darzustellen. Darauf deutet eine signifikante Anhäufung von Sedoheptulose-7-Phosphat hin, die bei der Fermentation von D-Xylose durch solche Stämme beobachtet wurde (Senac und Hahn-Hägerdal, 1991, Kötter und Ciriacy, 1993). Transaldolase katalysiert die Reaktion von Sedoheptulose-7-Phosphat mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat (siehe Abb. 2). Da Glycerinaldehyd-3-Phosphat auch ein wichtiges Intermediat der Glykolyse ist, könnte die schnelle Umsetzung dieses Stoffes über die Glykolyse dazu führen, dass keine ausreichende Menge mehr für die Reaktionen des Pentosephosphatweges zur Verfügung steht. Eine Überexpression des *TAL1*-Gens in Xylose-verwertenden rekombinanten Hefen führte zu einem verbesserten Wachstum mit diesem Zucker als einziger Kohlenstoffquelle (Walfridsson *et al.*, 1995).

Auch für die zweite Pentose, L-Arabinose, wurden in jüngster Zeit Bemühungen unternommen einen L-Arabinose-fermentierenden und Ethanol produzierenden *S. cerevisiae* Hefestamm zu erhalten. Der eukaryontische Stoffwechselweg zur Metabolisierung von L-Arabinose bringt ebenso wie der eukaryontische Weg zur Xylose-Verwertung wiederum das oben beschriebene Problem des entstehenden Kofaktorungleichgewichtes mit sich. Zudem waren viele der eukaryontischen Enzyme weder isoliert, noch die entsprechenden Gene kloniert und sequenziert. Aus diesem Grund wurde zunächst von Sedlak und Ho (2001) der Versuch unternommen die Enzyme des L-Arabinose Katabolismus aus *E. coli*, dem am besten charakterisierten prokaryontischen Organismus, der in der Lage ist L-Arabinose zu metabolisieren, heterolog in *S. cerevisiae* zu exprimieren. Dafür wurden die Gene *araA*, *araB* und *araD* unter der Kontrolle von starken, konstitutiv exprimierenden Hefe-Promotoren (*PYK1*, *PGI1* und *PGK1*) auf ein Plasmid kloniert und in Hefe transformiert. Der rekombinante Hefestamm zeigte relativ hohe Enzymaktivitäten für die L-Ribulokinase und die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase, mit mehr als 70% der Aktivität in *E. coli*. Die Aktivität der L-Arabinose Isomerase dagegen betrug nur ca. 10% derjenigen in *E. coli*, obwohl die Transkription des Genes sehr effektiv war. Außerdem produzierte der rekombinante Stamm kein Ethanol aus L-Arabinose. Ein Hauptprodukt der L-Arabinose Fermentation stellte schon bei Verwendung eines Wildtypstammes, aber auch mit dem modifizierten Stamm Arabitol dar. Dies ist vermutlich begründet im Vorhandensein endogener Enzyme (L-Arabinose-Reduktasen), welche L-Arabinose zu Arabitol umwandeln können. Als solche L-Arabinose reduzierenden Enzyme wurden beispielsweise von Traff *et al.* (2002) kürzlich

Gre3, Ypr1 und das von dem ORF *YJR096w* kodierte Protein identifiziert. Es wurde vermutet, dass das entstandene Arabitol die L-Arabinose Isomerase hemmt, wie es für L-Arabitol und andere Pentitole berichtet wurde (Patrick und Lee, 1968). Als weitere negativ wirkende Faktoren wurden das unterschiedliche Temperaturoptimum, sowie der verschiedene interne pH-Wert der Organismen (*S. cerevisiae* pH 6-6,5; *E. coli* pH 7,5-7,8 (Slavik, 1982; Shechter *et al.*, 1982)), angeführt.

Eine weitere Arbeitsgruppe beschäftigte sich unterdessen mit der Etablierung eines eukaryontischen L-Arabinose Stoffwechselweges in *S. cerevisiae*. Hier wurden die L-Arabinose umwandelnden Enzyme des filamentösen Pilzes *Trichoderma reesei* kloniert und heterolog in Hefe exprimiert (Richard *et al.*, 2001, Richard *et al.*, 2002). Die so entstandenen rekombinanten Hefen waren zwar in der Lage mit L-Arabinose Medium zu wachsen, jedoch mit einer Verdopplungszeit von ca. 5 Tagen. Das langsame Wachstum wurde zurückgeführt auf das bereits beschriebene Kofaktorungleichgewicht, das bei den eukaryontischen Reaktionen zur Umwandlung von L-Arabinose entsteht. Ein weiterer Faktor, den die Autoren in betracht ziehen ist die langsame Aufnahme der Arabinose in die Zelle, die einen limitierenden Schritt für die Metabolisierung des Zuckers darstellen könnte.

1.5 Transport von Pentosen in *S. cerevisiae*

Der erste metabolische Schritt für die Verwertung eines Zuckers ist seine Aufnahme über die Plasmamembran. Wie andere polare Substanzen können Zucker die Zellmembran dabei nicht durch Diffusion überqueren, sondern müssen durch spezielle Membranproteine, die als Zuckertransporter bezeichnet werden, in die Zelle transportiert werden. In Bakterienzellen findet der Transport von Zuckern (Glukose, Fruktose, Mannose) häufig als primärer Transport über das sogenannte Phosphotransferase-System statt, bei dem die Aufnahme des Zuckers direkt mit seiner Phosphorylierung gekoppelt ist. Eine weitere weit verbreitete Möglichkeit der bakteriellen Zuckeraufnahme ist der Transport über Protonensymporter, der zum Beispiel bei Lactose, Galactose und bei den Pentosen D-Xylose und L-Arabinose Anwendung findet. Diese Transportproteine weisen mit ihren 12 Transmembrandomänen eine sehr ähnliche Struktur zu Zuckertransportern anderer Organismen auf, wie zum Beispiel den Hexosetransportern in Hefe. Außerdem wird zum Beispiel Maltose über ATP-abhängige Bindeprotein-Systeme in die Zelle transportiert.

In Hefen erfolgt der Zuckertransport über zwei verschiedene Systeme, nämlich über Facilitatoren oder über Protonensymporter. Die sogenannte erleichterte Diffusion durch Facilitatoren ist ein Energie-unabhängiger Prozess, wogegen der Transport durch Symporter Energie benötigt, aber bei geringen Zuckerkonzentrationen einen effektiveren Transport vermittelt (Jeffries und Shi, 1999). Beide Vorgänge gehören zu den sekundären Transportprozessen. Hexosen können in *S. cerevisiae* durch erleichterte Diffusion über eine Vielzahl verschiedener Transportproteine in die Zelle transportiert werden. Die Hefe besitzt 18 Gene, die für Hexosetransporter-verbundene Proteine kodieren, nämlich *HXT1-17* und *GAL2* (Kruckeberg, 1996, Boles und Hollenberg, 1997). Die für das Wachstum der Zelle physiologisch relevante Glukoseaufnahme erfolgt jedoch nur durch die Hexosetransporter Hxt1-4, sowie 6 und 7 (Reifenberger *et al.*, 1995). Daneben existieren Protonen-Symporter, die für die Aufnahme von Disacchariden, wie Maltose, zuständig sind (Lagunas, 1993).

Da *S. cerevisiae* von Natur aus nicht in der Lage ist die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose zu verwerten, existieren keine spezifischen Transportproteine, die die Aufnahme dieser Zucker in die Zelle vermitteln. Von D-Xylose ist bekannt, dass sie in *S. cerevisiae* über die Glukosetransporter aufgenommen werden kann (Busturia und Lagunas, 1986, Hamacher *et al.*, 2002). Allerdings ist die Affinität der Transporter zu D-Xylose deutlich niedriger als zu Glukose (Kötter und Ciriacy, 1993), so dass es zu einer Verdrängung der Xylose durch Glukose an den Transportproteinen kommt. Die Aufnahme der Zucker in die Zelle könnte aber auch dann einen großen Einfluß auf die Wachstums- und Fermentationsraten der Hefen haben, wenn die Pentosen die einzigen vorhandenen Kohlenstoffquellen sind. Hamacher *et al.* (2002) untersuchten die D-Xylose-Aufnahme durch konstitutiv überexprimierte Hexosetransporter in einem ansonsten Hexosetransporter defizienten Hefestamm, der jedoch integrierte Enzyme zur Metabolisierung von D-Xylose besaß. Die Aufnahme von D-Xylose in die Zelle konnte dabei durch die Transportproteine Hxt4, Hxt5, Hxt7 und Gal2 vermittelt werden. Allerdings konnten diese Xylose-transportierenden Transporter, wenn sie in einem Stamm, der auf schnelleres Wachstum auf Xylulose Medium selektioniert worden war (Porep, 1987, Kötter und Ciriacy, 1993) und noch sämtliche endogenen Transporter besaß, zusätzlich überexprimiert wurden, weder das Wachstum des Stammes in D-Xylose Medium verbessern, noch die Ethanol-Produktionsrate unter semi-anaeroben Bedingungen steigern. Heterolog exprimierte Transporter anderer Organismen, wie *E. coli* xylE, *Chlorella kessleri* Hup1 oder *Arabidopsis thaliana* Stp2 und Stp3 konnten kein Wachstum des ansonsten Monosaccharidtransporter defizienten Stammes in Xylose-Medium vermitteln. Auch Lee *et al.* (2002) konnten

D-Xylose-Aufnahme über das hoch- und das niederaffine Glukose-Aufnahmesystem nachweisen.

Für L-Arabinose selber ist bisher lediglich bekannt, dass die *S. cerevisiae* Galaktosepermease Gal2 in der Lage ist diese Pentose zu transportieren. Aufnahmemessungen in Mutanten mit deletiertem Gal2 und in nicht durch Galaktose induzierten Wildtyp-Zellen, die ebenfalls wenig bzw. kein Gal2 exprimieren sollten, zeigten jedoch ebenfalls eine geringe Aufnahme von L-Arabinose in Hefe (Kuo *et al.*, 1970). Aufgrund dessen kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass auch L-Arabinose zusätzlich über die oben genannten Hexosetransporter in die Zelle aufgenommen werden kann. In Bakterien wird L-Arabinose über Protonen-Symporter, wie *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* oder *B. subtilis* araE aufgenommen (MacPherson *et al.*, 1981, Maiden *et al.*, 1988, Shatwell *et al.*, 1995, Sá-Nogueira und Ramos, 1997). Bakterielle Transport-Proteine, die heterolog in Hefe exprimiert werden, können jedoch unter Umständen in diesem Organismus nicht funktionell sein, so wie der von Hamacher *et al.* (2002) heterolog exprimierte Xylosetransporter *E. coli* xylE. Um also den Transport von L-Arabinose in Hefe durch einen spezifischen Transporter zu steigern, bietet sich demnach eher eine Überexpression der hefeeigenen Galaktose-Permease an.

1.6 Ziel der Arbeit

Da bisherige Versuche, einen effizient L-Arabinose verwertenden *S. cerevisiae* Hefestamm zu konstruieren, gescheitert sind (siehe 1.4), sollte in dieser Arbeit ein solcher Stamm mit Hilfe gentechnischer Methoden und klassischer Selektion entwickelt werden. Dieser Stamm sollte dabei vor allem in der Lage sein, Ethanol aus L-Arabinose zu produzieren. Um das Problem des Redox-Ungleichgewichtes, das mit den Reaktionen des eukaryontischen L-Arabinose Katabolismus verbunden ist, zu umgehen, wurden die prokaryontischen Gene des L-Arabinose-Katabolismus eingesetzt, da die von den resultierenden Enzymen katalysierten Reaktionen redoxneutral sind. Desweiteren sollte die Notwendigkeit eines zusätzlich überexprimierten Transporters für die L-Arabinose Verwertung untersucht werden. Außerdem sollten die genetischen und physiologischen Eigenschaften des neu konstruierten Stammes charakterisiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme und Medien

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 1: *Escherichia coli* (*E. coli*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 α F'	<i>F'</i> , $\Phi(80dlacZ\Delta M15)\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44Δ⁻ gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco BRL Gaithersburg, USA
DH10B	<i>F'</i> , <i>mcrA</i> Δ -(<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ <i>deoR recA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ⁻ rpsL endA1 nupG</i>	Gibco BRL Gaithersburg, USA
JM101	<i>F'</i> <i>traD36 proA⁺B⁺ lacI Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB)glnVthi</i>	New England Biolabs
SURE	<i>e14⁻(McrA⁻)Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F'<i>proAB lac^fZΔM15 Tn10(Tet^r)</i>]</i>	Stratagene

Tab. 2: sonstige Bakterien

Stamm	Quelle	Referenz
DSM 1092 (<i>Bacillus subtilis</i>)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Seki <i>et al.</i> (1975)
DSM 43078 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Gordon, R.E. und Mihm, J.M. (1959)

2.1.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5

Zur Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 40 μ g/ml Ampicillin zugesetzt.

Minimalmedium (M9): 20% M9 Salz-Lösung (6,4% Na₂HPO₄ x 7H₂O, 1,5% KH₂PO₄, 0,25% NaCl, 1% NH₄Cl), 2% Kohlenstoffquelle (Glucose oder Arabinose), 0,043% Thiamin

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,5% Agar, die Anzucht erfolgte bei 37°C.

2.1.3 Medien und Anzucht von *B. subtilis*

Nutrient Agar: 5% Pepton, 0,3% Trypton, 1,5% Agar, pH 7

Die Anzucht erfolgte bei 30°C.

2.1.4 Medien und Anzucht von *M. smegmatis*

GYM Streptomyces Medium: 0,4% Glukose, 0,4% Hefeextrakt, 1% Malzextrakt, 0,2% CaCO₃, pH 7,2

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,5% Agar, die Anzucht erfolgte bei 37°C.

2.1.5 Hefestämme

Tab. 3: Verwendete Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
CEN.PK2-1C	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2</i>	K.-D. Entian, Frankfurt
EBY.VW5000	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP ydl247wΔ::loxP yjr160cΔ::loxP snf3Δ::loxP rgt2Δ::loxP</i>	Wieczorke et al., 1999
EBY139	<i>MATa</i>	E. Boles, Düsseldorf
EBY159B	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 rgt2Δ::loxP::kanMX::loxP</i>	E. Boles, Düsseldorf

Tab. 4: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hefestämme

Stamm	Genotyp	Plasmide
JBY24	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2</i>	p423HXT7-His, p424HXT7-His, p425HXT7-His, p426HXT7-His
JBY24-4P	siehe oben	p423H7araABs, p424H7araB, p425H7araD, pHL125
JBY24-4EP	siehe oben	p423H7araA, p424H7araB, p425H7araD, pHL125
JBY24-4M	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , pHL125 ^{re}
JBY24-3M/426	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , p426HXT7-His

JBY24-3T	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , YCpTAL1
JBY25	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 + unbekannte Mutationen für besseres Wachstum auf L-Arabinose</i>	-
JBY25-2M/CB	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424HXT7- His, p425H7araD ^{re} , YCparaB
JBY25-2M/CB ^{mut}	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424HXT7- His, p425H7araD ^{re} , YCparaB ^{mut}
JBY25-3M/TP ^{ori}	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , pHL125
JBY25-3M/I ^{ori}	siehe oben	p423H7araABs, p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , pHL125 ^{re}
JBY25-3M/K ^{ori}	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424H7araB, p425H7araD ^{re} , pHL125 ^{re}
JBY25-3M/E ^{ori}	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD, pHL125 ^{re}
JBY25-4M	siehe oben	p423H7araABs ^{re} , p424H7araB ^{re} , p425H7araD ^{re} , pHL125 ^{re}
JBY25-4P	siehe oben	p423H7araABs, p424H7araB, p425H7araD, pHL125
JBY28	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 pTAL1Δ : :pkHXT7</i>	-
JBY29	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 pTAL1Δ : :pkHXT7 + unbekannte Mutationen für besseres Wachstum auf L-Arabinose</i>	-
JBY30	<i>MATa leu2-3,112 : :YIplacaraD ura3- 52 : :YIplacgal2 trp1-289 : :YIplacaraB his3- Δ1 MAL2-8^c SUC2</i>	-
JBY31	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 + unbekannte Mutationen für besseres Wachstum auf L-Arabinose</i>	p423H7araApAaraB ^{mut} , p424HXT7-His, p425H7araD, p426HXT7-His
JBY32	siehe oben	p423H7araB ^{mut} pAaraA, p424HXT7-His, p425H7araD, p426HXT7-His
JBY33	siehe oben	p423H7araABsH7araB ^{mut} , p424HXT7-His, p425H7araD, pHL125

2.1.6 Medien und Anzucht von Hefestämmen

Vollmedium (YEP):	1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration
Synthetisches Minimalmedium (YNB):	0,67% Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, pH 6,3, Aminosäure-/Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration
Synthetisches Komplett-Selektivmedium:	0,67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino-acids, pH 6,3, Aminosäure-/Nukleobase-Lösung ohne Uracil, Leucin, Histidin und Tryptophan, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration

Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im Medium (nach Zimmermann, 1975):

Adenin (0,08 mM), Arginin (0,22 mM), Histidin (0,25 mM), Isoleucin (0,44 mM), Leucin (0,44 mM), Lysin (0,35 mM), Methionin (0,26 mM), Phenylalanin (0,29 mM), Tryptophan (0,19 mM), Threonin (0,48 mM), Tyrosin (0,34 mM), Uracil (0,44 mM), Valin (0,49 mM)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Kohlenstoffquellen eingesetzt:

L-Arabinose, D-Glukose, D-Galaktose, Kaliumacetat, Maltose und D-Xylose. L-Arabinose und D-Xylose wurden zur Herstellung von festen Nährböden getrennt autoklaviert. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,8% Agar. Zur Selektion auf plasmidtransformierte Zellen wurde Minimalmedium ohne die Aminosäure oder Base, deren Synthese durch das auf dem Plasmid kodierte Markergen gewährleistet wurde, verwendet. Zur Selektion auf den Verlust eines Plasmides mit dem *URA3*-Markergen wurden YNB-Agarplatten eingesetzt, die neben Uracil 1 mg/ml 5`-FOA enthielten (Boeke et al., 1984). Die Selektion auf Geneticinresistenz erfolgte auf Vollmediumsplatten mit 200 µg/ml G418.

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C

2.2 Plasmide

Tab. 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
pHL125	Liang & Gaber, 1996	2 μ Plasmid mit dem <i>GAL2</i> -Gen exprimiert hinter dem <i>ADH1</i> -Promotor, <i>URA3</i> -Markergen
p423MET25	Mumberg <i>et al.</i> , 1994	Ausgangsvektor für die Konstruktion von p423HXT7-His; <i>MET25</i> -Promotor; <i>CYC1</i> -Terminationsbereich; <i>HIS3</i> -Markergen
p424MET25	Mumberg <i>et al.</i> , 1994	Ausgangsvektor für die Konstruktion von p424HXT7-His; <i>MET25</i> -Promotor; <i>CYC1</i> -Terminationsbereich; <i>TRP1</i> -Markergen
p425MET25	Mumberg <i>et al.</i> , 1994	Ausgangsvektor für die Konstruktion von p425HXT7-His; <i>MET25</i> -Promotor; <i>CYC1</i> -Terminationsbereich; <i>LEU2</i> -Markergen
p426HXT7-His	Hamacher <i>et al.</i> , 2002	2 μ Plasmid zur Überexpression von Genen und zur Herstellung von Fusionsproteinen mit 6xHis-Epitop; <i>URA3</i> -Markergen
pSH47	Güldener <i>et al.</i> , 1996	Cre-Rekombinase hinter dem <i>GAL1</i> -Promotor der Hefe; <i>URA3</i> -Markergen
pUG6	Güldener <i>et al.</i> , 1996	DNA-Vorlage für die Amplifizierung des <i>kanMX</i> -Selektionsmarkergens zur Deletion von Zielgenen
pUG6-kpHXT7	E. Boles, Düsseldorf	DNA-Vorlage für die Amplifizierung des <i>kanMX</i> -Selektionsmarkergens und des <i>HXT7</i> -Promotorfragmentes zum Austausch der Promotorbereiche von Zielgenen gegen den verkürzten HXT7-Promotor
YCplac33	Gietz und Sugino, 1988	CEN/ARS-Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarkergen
YIplac211	Gietz und Sugino, 1988	Integrationsvektor mit <i>URA3</i> -Markergen
YIplac128	Gietz und Sugino, 1988	Integrationsvektor mit <i>LEU2</i> -Markergen
YIplac204	Gietz und Sugino, 1988	Integrationsvektor mit <i>TRP1</i> -Markergen

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
p423HXT7-His	2 μ -Expressionsvektor für die Überexpression verschiedener Gene und für die Fusionierung der <i>E. coli</i> L-Arabinose Isomerase mit einem 6xHis-Epitop; <i>HIS3</i> -Marker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor; <i>CYC1</i> -Terminationsbereich (Hamacher <i>et al.</i> , 2002)
p424HXT7-His	2 μ -Expressionsvektor für die Überexpression verschiedener Gene und für die Fusionierung der mutierten und der Wildtyp <i>E. coli</i> L-Ribulokinase mit einem 6xHis-Epitop; <i>TRP1</i> -Marker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor; <i>CYC1</i> -Terminationsbereich (Hamacher <i>et al.</i> , 2002)
p425HXT7-His	2 μ -Expressionsvektor für die Überexpression verschiedener Gene; <i>LEU2</i> -Marker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor; <i>CYC1</i> -Terminationsbereich (Hamacher <i>et al.</i> , 2002)
p423H7araA	<i>E. coli araA</i> in p423HXT7-His
p423H7araABs	<i>B. subtilis araA</i> in p423HXT7-His
p423H7araAMs	<i>M. smegmatis araA</i> in p423HXT7-His
p423H7araB	<i>E. coli araB</i> in p423HXT7-His
p424H7araB	<i>E. coli araB</i> in p424HXT7-His
p424H7YDR109c	<i>YDR109c</i> -Gen in p424HXT7-His
p424H7araB-His	<i>E. coli araB</i> in p424HXT7-His, fusioniert mit dem 6x His-Epitop
p424H7araB ^{mut} -His	<i>E. coli araB^{mut}</i> in p424HXT7-His, fusioniert mit dem 6x His-Epitop
p425H7YJR024c	<i>YJR024c</i> -Gen in p425HXT7-His
p425H7araD	<i>E. coli araD</i> in p425HXT7-His
p426H7YNL249c	<i>YNL249c</i> -Gen in p426HXT7-His
p423H7araABsADH	<i>B. subtilis araA</i> in p423HXT7-His, hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor und <i>ADH1</i> hinter seinem endogenen Promotor
p423H7araApAaraB ^{mut}	<i>E. coli araB^{mut}</i> in p423H7araABsADH, hinter dem <i>ADH1</i> -Promotor, ohne <i>ADH1</i> -ORF
p423H7araB ^{mut} pAaraA	<i>E. coli araB^{mut}</i> in p423HXT7-His, hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor, <i>B. subtilis araA</i> hinter dem <i>ADH1</i> -Promotor
p423H7araABsH7araB ^{mut}	<i>B. subtilis araA</i> in p423HXT7-His, hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor und <i>araB^{mut}</i> ebenfalls hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor
YCparaB	<i>E. coli araB</i> hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in YCplac33, kein Terminationsbereich
YCparaB ^{mut}	<i>E. coli araB^{mut}</i> hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in YCplac33, kein Terminationsbereich

YCpTAL1	<i>S. cerevisiae. TAL1</i> hinter seinem endogenen Promotor und mit seinem endogenen Terminationsbereich in YCPlac33
YlplacaraB	<i>E. coli araB</i> hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor und mit dem <i>CYC1</i> -Terminationsbereich in Ylplac204
YlplacaraD	<i>E. coli araD</i> hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor und mit dem <i>CYC1</i> -Terminationsbereich in Ylplac128
YlplacGAL2	<i>S. cerevisiae. GAL2</i> hinter dem <i>ADH1</i> -Promotor und mit dem <i>ADH1</i> -Terminationsbereich in Ylplac211

2.3 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung/ Verwendung
T71-ORFs	ACAAAGAATAAACACAAAAACAAA AAGTTTTTTTAATTTTAATCAAAAA	Aufwärtsprimer für die Klonierung von DNA-Fragmenten hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor
T2-ORF	GGGGGAGGGCGTGAATGTAAGC GTGACATAACTAATTACATGACTC GAGGATCCCCGGGAATTGCCAT G	Abwärtsprimer für die Klonierung von DNA-Fragmenten vor den <i>CYC1</i> -Terminationsbereich
araA-F7	TAATTTTAATCAAAAAATGACGAT TTTTGATAATT	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>E. coli araA</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p423HXT7-His unter Aussparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
araA-R	CCCCGGGAATTGCCATGTTAGCG ACGAAATCCGTA	Abwärtsprimer zu araA-F7 und zu AF7HIS mit überlappenden Bereichen zu T2-ORF
araB-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGGCGA TTGCAATTGGC	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>E. coli araB</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p424HXT7-His oder p423HXT7-His unter Aussparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
araB-R	CCCCGGGAATTGCCATGTTATAG AGTCGCAACGG	Abwärtsprimer zu araB-F7 und zu araB-his mit überlappenden Bereichen zu T2-ORF
araD-F7	TAATTTTAATCAAAAAATGTTAGA AGATCTCAAAC	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>E. coli araD</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p425HXT7-His unter Aussparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
araD-R	CCCCGGGAATTGCCATGTTACTG CCCGTAATATGC	Abwärtsprimer zu araD-F7 mit überlappenden Bereichen zu T2-ORF

YDR-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGAAAA GCAGGAAACGC	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>YDR</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p424HXT7-His unter Aussparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
YDR-R	CCCCGGAATTGCCATGTTATCT ACTAAAGGAC	Abwärtsprimer zu YDR-F7 mit überlappenden Bereichen zu T2-ORF
YJR-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGTCTT CACAAGATGTT	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>YJR</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p425HXT7-His unter Aussparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
YJR-R	CCCCGGAATTGCCATGTCACG GACTGGCCATCTT	Abwärtsprimer zu YJR-F7 mit überlappenden Bereichen zu T2-ORF
YNL-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGAATA GCAGTCTGCAA	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>YNL</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p425HXT7-His unter Aussparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
YNL-R	CCCCGGAATTGCCATGTTAGAG GTGCTGAAATAC	Abwärtsprimer zu YNL-F7 mit überlappenden Bereichen zu T2-ORF
pHXT7seq	CTTTTCTAAGAACAAAGA	Sequenzierung von verschiedenen ORFs hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor, bindet im <i>HXT7</i> -Promotor
araAseq	GATCAAGTTCGGTTTCTCCG	Sequenzierprimer für <i>E. coli araA</i>
ABs-F7	TAATTTTAATCAAAAAATGCTTCA GACAAAGGATTA	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>B. subtilis araA</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p423HXT7-His unter Aussparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
ABs-R	CCCCGGAATTGCCATGCTACTT TTGAAGCCGGTA	Abwärtsprimer zu ABs-F7 mit überlappenden Bereichen zu T2-ORF
AMs-F7	TAATTTTAATCAAAAAATGGCCGA ACACTTCACCGA	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>M. smegmatis araA</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p423HXT7-His unter Aussparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
AMs-R	CCCCGGAATTGCCATGCTAGAG GCCGGCGGCGAT	Abwärtsprimer zu AMs-F7 mit überlappenden Bereichen zu T2-ORF
AF7His	TAATTTTAATCAAAAAATGCATCA CCATCACCATCACACGAT	Aufwärtsprimer zur Amplifikation eines <i>E. coli araA</i> -His ₆ -Epitopes und zur Klonierung in p423HXT7-His mit überlappenden Bereichen zu T71-ORFs
k2-kanMX	TTGTTCGCACCTGATTGCCCG	Abwärtsprimer zur Verifizierung von Gendeletionen, Bindestelle im <i>kanMX</i> -Gen

k3-kanMX	TATGGAAGCTGCCTCGGTGAG	Aufwärtsprimer zur Verifizierung von Gendeletionen, Bindestelle im <i>kanMX</i> -Gen
gal2seq	AATTGCTCCAAAGCACTTGAG	Sequenzierprimer für <i>S. cerevisiae GAL2</i>
gal21seq	CTTTTTGAGAAGGTTTGGTATG	Sequenzierprimer für <i>GAL2</i>
gal22seq	TCTGATCATGGCCGGTATAG	Sequenzierprimer für <i>GAL2</i>
tADHseq	ATTTTCGTTTTAAAACCTAAGAG	Abwärtssequenzierprimer für <i>GAL2</i> in pHL125 mit Bindestelle im <i>ADH1</i> Terminationsbereich
pADHseq	TTGTTTCCTCGTCATTGTTCTCG	Aufwärtssequenzierprimer für <i>GAL2</i> in pHL125 mit Bindestelle im <i>ADH1</i> Promotor
AraDseq	TAGAGCAGCCGGTGAGTTGG	Sequenzierprimer für <i>E. coli araD</i>
pKinre	CAAAGCTCGCACAGAATCAC	Sequenzierprimer für den Promotorbereich von <i>E. coli araB</i>
AraB1seq	GGCAAGCTGTTCCAGCGGCC	Sequenzierprimer für <i>araB</i>
AraB2se	CTGCGACATTCTGATTGCCG	Sequenzierprimer für <i>araB</i>
AraB3se	GTAGAGTGGTATCCCCGTTG	Sequenzierprimer für <i>araB</i>
AraB4se	GGCGAGCGACGACCGTTAAAC	Sequenzierprimer für <i>araB</i>
AraB5se	AACGCACTGGTAAAAGTTAT	Sequenzierprimer für <i>araB</i>
Oligo (dT)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Primer für die Synthese Fluoreszenzmarkierter cDNA zur Analyse in DNA-„Microarray“-Analysen, der an den PolyA-Bereich der mRNA bindet
MutaraB1	GATGTTTCGTATTGTGGAAAAACC ACACTGCGGTTG	Aufwärtsprimer zur Konstruktion der G ₃₆₁ →A ₃₆₁ Mutation von <i>araB</i> in p424araB ^{mut} -his
MutaraB2	CAACCGCAGTGTGGTTTTTCCAC AATACGAACATC	Abwärtsprimer zur Konstruktion der G ₃₆₁ →A ₃₆₁ Mutation von <i>araB</i> in p424H7araB ^{mut} -his
araBhis	AATCAAAAAGTTAACATGCATCAC CATCACCATCACGGTGCTGGTGC GATTGCAATTGGCCTCGAT	Aufwärtsprimer zur Fusionierung von <i>araB</i> mit einem His ₆ -Epitop in p424Hxt7-His
ADH-f	GCAATTAACCCTCACTAAAGGGA ACAAAAGCTGGAGCTGCGGCCG CAACTAATACTGTAGCCCTAGAC T	Aufwärtsprimer zur Amplifikation des <i>ADH1</i> -ORFs mit überlappenden Bereichen zum Plasmid p423H7araABs bzw. p423H7araB
ADH-r	TCAGAAGAACACGCAGGGGCC GAAATTGTTCTACGTCCTCTGA GGACATAAAATACACA	Abwärtsprimer zur Amplifikation des <i>ADH1</i> -ORFs mit überlappenden Bereichen zum Plasmid p423H7araABs bzw. p423H7araB

ADH-araB-f	AGCTATACCAAGCATACAATCAA CTATCTCATATACAATGGCGATT GCAATTGGCCTCGAT	Primer zur Amplifikation des <i>araB^{mut}</i> ORFs mit homologen Bereichen zur 5`-Region des <i>ADH1</i> -ORFs, um <i>ADH1</i> im Plasmid p423H7araABsADH gegen <i>araB^{mut}</i> auszutauschen
ADH-araB-r	ATTTAATAATAAAAATCATAAATC ATAAGAAATTCGCTTATAGAGTC GCAACGGCCTG	Primer zur Amplifikation des <i>araB^{mut}</i> ORFs mit homologen Bereichen zur 3`-Region des <i>ADH1</i> ORFs, zum Austausch von <i>ADH1</i> im Plasmid p423H7araABsADH gegen <i>araB^{mut}</i>
ADH-araA-f	AGCTATACCAAGCATACAATCAA CTATCTCATATACAATGCTTCAGA CAAAGGATTATG	Primer zur Amplifikation des <i>araA</i> ORFs mit homologen Bereichen zur 5`-Region des <i>ADH1</i> ORFs, um <i>ADH1</i> im Plasmid p423H7araB ^{mut} ADH gegen <i>araA</i> auszutauschen
ADH-araA-r	ATTTAATAATAAAAATCATAAATC ATAAGAAATTCGCTACTTTTGAA GCCGGTAAAGCG	Primer zur Amplifikation des <i>B. subtilis araA</i> ORFs mit homologen Bereichen zur 3`-Region des <i>ADH1</i> ORFs, zum Austausch von <i>ADH1</i> im Plasmid p423H7araB ^{mut} ADH gegen <i>araA</i>
araABD-f	CTAGACTAGTGCGGCCGCAAAG GGAACAAAAGCTGGAGCTC	Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araB^{mut}</i> und <i>araD</i> hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor zur Klonierung in p423H7araABs ^{re}
araABD-r	TAGCGGAGCTCACTAGTACTATA GGGCGAATTGGGTACC	Abwärtsprimer zur Amplifikation von <i>araB^{mut}</i> und <i>araD</i> vor dem <i>CYC1</i> -Terminationsbereich zur Klonierung in p423H7araABs ^{re}
ABsseq	ACGGCGGCTGCATTAATGA	Sequenzierprimer für <i>B. subtilis araA</i>
Tal1-f2	CTATGACCATGATTACGCCAAGC TTGCATGCCTGCAGCAGAAAGTT GAGACCAGAAAACC	Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>TAL1</i> und zur Klonierung in YCplac33
Tal1-r2	GTA AACGACGGCCAGTGAATTC GAGCTCGGTACCCGGGTTGTAG TATAGTGCCATTA	Abwärtsprimer zur Amplifikation von <i>TAL1</i> mit überlappenden Bereichen zum Plasmid YCplac33
r-sTAL1-1	GTTGTAGTATAGTGCCGCCATTA	Kurzer Abwärtsprimer zur Amplifikation von <i>TAL1</i> mit überlappenden Bereichen zu Tal1-r2
S1-2pTAL1	GATGGTGACAAGTGTATAAGTCC TCATCGGGACAGCTACGATTTCT CTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifikation des <i>pkHXT7</i> -Promotor- <i>kanMX</i> -Fragmentes vom Plasmid pUG6kpHXT7 mit überlappenden Bereichen zum endogenen <i>TAL1</i> -Promotor
S2-pTAL1	CTAGAGAGTTGTTAGCAACCTTT TGTTTCTTTTGAGCTGGTTCAGA CATTTTTTGATTAATAAAAAA AC	Abwärtsprimer zu S2-pTAL1 mit überlappenden Bereichen zum <i>TAL1</i> -Promotor bis zum ATG

A4-pTAL1	ACAACGACAGTGCCGGAGGCT	Abwärtsprimer zum Nachweis der Deletion des endogenen <i>TAL1</i> -Promotors im Austausch gegen den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor
Tal1seq	ATTCCTTACTCGCGGGTTT	Sequenzierprimer für <i>S. cerevisiae TAL1</i>
Tal1-2seq	CTTAGCGGAGACAGGGTCCA	Sequenzierprimer für <i>S. cerevisiae TAL1</i>
Tal1-3seq	CAGAAGCACTGACGAAATCA	Sequenzierprimer für <i>S. cerevisiae TAL1</i>
Tal1-F7	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTT AATTTTAATCAAAAAATGTCTGAA CCAGCTCAAAAG	Aufwärtsprimer zur Klonierung des <i>TAL1</i> -ORFs hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p426HXT7-His unter Ausparung des His ₆ -Epitopes mit überlappenden Bereichen zu diesem Plasmid
Tal1-RE	GAATGTAAGCGTGACATAACTAA TTACATGACTCGAGTTAAGCGGT AACTTTCTTTTC	Abwärtsprimer zu Tal1-F7 mit überlappenden Bereichen zum Plasmid p426HXT7-His

2.4 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle/Referenz
anti-HIS ₆	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen ein 6xHis-Epitop	Roche
anti-Maus	Sekundär-Antikörper gegen Mausantikörper gekoppelt an Peroxidase	Roche

2.5 Chemikalien, Material

Acros Organics	Galaktose, Harnstoff, KAc, Lysin, Maltose, NaAc, Xylose
Aldrich	L-Ribulose
ARC	Arabinose, L [1- ¹⁴ C]
Bio-Rad	Bio-Rad Protein Assay
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm Ø
Caesar & Loretz	Glukose
Calbiochem	G418/Genitacin
Difco	Bacto Agar, Hefe-Extrakt, Pepton, Trypton, YNB
Fluka	Glycin, tri-Natriumcitrat
GibcoBRL	Agarose
Janssen Chimica	DMF, DMSO, Ethylenglykol

J.T. Baker	Chloroform, KAc, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgCl ₂ , NaCl, NaOH, PEG4000,
Kodak	Röntgenfilme
Lancaster	L-Arabinose
Life Technologies	Superscript II RT-PCR System
Marienfeld	Deckgläser 24 x 50 mm
MBI	Lambda-DNA
Merck	Adenin, EDTA, Leucin, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , TEMED, Uracil
Millipore	Immobilon-N PVDF-Membran, Nitrozellulose Filter
MWG Biotech	Synthetische Oligonukleotide, Pan Yeast Array
NEN	Cyanine 3-dCTP, Cyanine 5-dCTP
Oxoid	Agar, Bacteriological Peptone, Hefe-Extrakt
PCR Inc. Florida	5'-FOA
Pharmacia	dNTP-Mix, T7-Sequencing Kit
Pierce	SuperSignal ULTRA chemiluminescent substrate
Qiagen	QIAquick PCR Purification Kit, Plasmid Mini Kit, Qiaex II Gel Extraction Kit, Ni-NTA-Agarose
Riedel-deHaën	Essigsäure, Ethanol, Glyoxal, NaN ₃ , MeOH
Roche	ATP, NADH, PEP, Fruct.1,6 BP, Expand High Fidelity PCR System, Lebensmittelanalytik-Kit „Ethanol“, Protease Inhibitoren „Complete“
Roth	DTT, Gel30 Acrylamid, Glycin, Isopropanol, KCl, PEG 1000 und 3350
Serva	APS, BSA, Bicin, CaCl, Comassie brilliant blue G250, Glycerin, Mal, SDS, Tween20,
Sigma	Amp, EtBr, HMW, IPTG, LiAc, NaI, NBT, ONPG, PMSF, PonceauS, Sorbit, TCA, Tris, Erythrose-4-P, Fructose-6-P
Sigma ARK	Synthetische Oligonukleotide
Whatman	GF/C Glas-Fiber-Filter
Zinnsser Analytik	Szintillationslösung „Quicksafe A“

2.6 Enzyme

Enzym	Quelle
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Gibco oder Roche
T7 Polymerase Sequenzier-Kit	Pharmacia
Reverse Transkriptase (Superscript II)	Life Technologies
T4-Ligase	Roche oder Gibco
L-Lactat-Dehydrogenase	Roche
Pyruvat Kinase	Roche
Sorbitol-dehydrogenase	Roche
Triosephosphat Isomerase/Glycerin-3-P Dehydrogenase (TPI/GDH)	Roche
Transketolase	Sigma

2.7 Transformationen

2.7.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen erfolgte mittels Elektroporation nach der von Dower *et al.* (1988) und Wirth (1989) beschriebenen Methode. Es wurde ein GENEPULSER-Gerät der Firma BIORAD (München) verwendet.

2.7.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* Zellen wurde nach der Lithiumacetat-Methode nach Gietz und Woods (1994) durchgeführt. Zur Selektion auf eine Geneticinresistenz wurden die Zellen nach der Transformation zunächst für 3h bei 30°C in flüssigem Vollmedium inkubiert und erst anschließend auf G418-haltigem Medium ausplattiert.

2.8 Präparation von DNA oder RNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse nach der Methode von Birnboim und Doly (1979), mit Modifikationen nach Maniatis *et al.* (1989). Für die Restriktionsanalyse wurden ca. 200 ng der isolierten Plasmid-DNA in 20 µl Gesamtvolumen enzymatisch geschnitten. Hochreine Plasmid-DNA

für Sequenzierungen und Klonierungen wurde mit Hilfe des Qiagen „Plasmid Mini Kit“ nach Herstellerangaben isoliert.

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

Die Zellen einer 5 ml Hefekultur in der stationären Phase wurden geerntet und in 400 µl Puffer P1 (Plasmid Mini Kit, Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Qiagen Puffer P2, sowie 2/3 Volumen Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) wurden die Zellen für 5 Minuten mit einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. 0,5 ml des Überstandes wurden mit 0,25 ml Puffer P3 versetzt und die Proteine durch Inkubation für 10 min auf Eis gefällt und anschließend für 15 min mit 10000 rpm abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 0,75 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und durch Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm pelletiert. Nach Waschen der DNA mit 70%igem Ethanol wurde sie getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert. Die DNA wurde anschließend für eine Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.8.3 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte wie von Ciriacy und Williamson (1981) beschrieben. Die Zellen einer stationären 50 ml Hefekultur wurden durch Zentrifugation geerntet und nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml H₂O in 4 ml SCE- Lösung (1 M Sorbit, 100 mM Na-Citrat und 60 mM Na₂-EDTA, pH 7) mit 7,5% Zymolyase (2,5 mg/ml) und 0,8% Mercaptoethanol aufgenommen. Durch eine einstündige Inkubation bei 37°C wurde die Zellwand abgedaut und so Sphäroplasten erhalten. Nach der Zugabe von 8 ml SDS-Lösung (2% SDS, 50 mM Tris EDTA, pH 8) und vorsichtigem Schütteln erfolgte die Lyse der Sphäroplasten durch 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 4 ml einer 5 M NaCl₂-Lösung hinzugefügt und der Ansatz wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Dabei wurden die Proteine zusammen mit der genomischen DNA ausgefällt. Nach einer 15 minütigen Zentrifugation bei 10000 rpm wurde das entstandene Pellet in 4 ml TE-Puffer (1 M Tris-EDTA, pH 8) resuspendiert. Die chromosomale DNA wurde durch eine Phenol-Chloroform Extraktion von Proteinen und Zellresten getrennt und durch Zugabe von 2,5 Volumen 96% Ethanol für 30 min bei -20°C sowie 30 min Zentrifugation bei 13000 rpm ausgefällt. Nach einem Waschschrift mit 70% igem Ethanol wurde das DNA-Pellet unter Vakuum getrocknet und in 500 µl H₂O aufgenommen.

2.8.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae*

Für die Präparation der Gesamt-RNA wurden Hefezellen einer logarithmisch wachsenden 500 ml Kultur geerntet und in 4 ml AE-Puffer (50 mM NaAc, 10 mM

EDTA, pH 5,2) mit 400 µl 10% SDS und 40 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen. Je 550 µl der Zellsuspension wurden auf 10 Eppendorf-Gefäße verteilt und mit je 600 µl Phenol (pH 4,5-5) überschichtet. Die Proben wurden kurz gevortext und für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden sie vorsichtig invertiert und für 15 min auf Trockeneis gelagert. Nach dem Auftauen folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 2 min. Die obere wäßrige Phase aus allen Reaktionsgefäßen wurde abgenommen und in ein Falcon-Röhrchen mit 13 ml RLT-Puffer (Qiagen, RNeasy Maxi-Kit) überführt. Nach Zugabe von 17 ml 70% Ethanol wurde die Aufreinigung der RNA mit Hilfe des Qiagen „RNeasy Maxi-Kits“ nach Herstellerangaben fortgesetzt. Jedoch wurde der erste Durchlauf ein zweites Mal auf die Säule gegeben, bevor er verworfen wurde, um eventuell vorhandene Rest-RNA, die nicht sofort an die Säule gebunden hatte, zu erfassen.

2.9 Enzymatische Modifikationen von DNA oder RNA

2.9.1 DNA-Restriktion

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen über 2-3 Stunden oder über Nacht mit 2-5 U Enzym pro µg DNA. Es wurden Enzyme der und Puffer der Firmen Roche, New England Biolabs und Gibco eingesetzt.

2.9.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden erfolgte durch Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase (CIP) zum Restriktionsansatz und 30 minütige Inkubation bei 37°C.

2.9.3 Ligation

DNA-Fragmente wurden in Gegenwart von 1 U T4-Ligase (Roche) in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 4°C für 16 h ligiert (überstehende Enden). Die Fragment-DNA wurde dabei im Verhältnis zur Vektor-DNA in 2-5-fachem Konzentrationsüberschuß eingesetzt.

2.9.4 DNase-Behandlung von RNA

Zu 200 µl isolierter Gesamt-RNA wurden 1 x DNase-Puffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH8) und 10 µl DNase (100 U, Roche) in einem Gesamt-Volumen von 275 µl gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Anschließend wurde die RNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion von dem Enzym gereinigt und über

Nacht durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaCl und 2,5 Volumen 96% Ethanol bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde das Pellet mit 600 μl 70% igem Ethanol gewaschen und in einer je nach gewünschter Konzentration beliebigen Menge H_2O aufgenommen.

2.10 PCR-Amplifikation von DNA

Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μl mit Hilfe des „Expand High Fidelity PCR System“ (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Synthesevorlage wurden entweder 1-10 ng isolierte Plasmid-DNA eingesetzt oder es wurden ein bis zwei Hefekolonien (ca. 3 μl) mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen und für 1,5 Minuten in der Mikrowelle aufgeschlossen. Zu der zu amplifizierenden DNA wurden 0,2 mM dNTP-Mix, Puffer 2, oder bei schwierigen Amplifikationen Puffer 3 (1x, Expand High Fidelity PCR System, Roche) sowie 1-4 mM MgCl_2 , 2-3 U Polymerase und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer gegeben. Die PCR-Reaktion wurde nach der „Hot-start“-Methode in einem programmierbaren Thermocycler (Techne) durchgeführt. Dabei wird den Syntheseyklen, vor dem Start der Reaktion durch Zugabe der Polymerase, eine 5 minütige Denaturierungsphase vorgeschaltet. Die weiteren Syntheseschritte wurden nach Bedarf wie folgt gewählt:

15-35 Zyklen:	30 s/40 s, 95°C	Denaturierung der DNA 30s = Plasmid-DNA; 40 s= Hefekolonien
	30 s/40 s, $50-60^{\circ}\text{C}$	Bindung der Primer an die DNA (Annealing)
	1-5 min, $72^{\circ}\text{C}/68^{\circ}\text{C}$	DNA-Synthese (Elongation) 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA; Produkte < 3 kb: 72°C Produkte > 3 kb: 68°C
<hr/>		
	5 min, $72^{\circ}\text{C}/68^{\circ}\text{C}$	DNA-Synthese

Die Annealing Temperatur wurde an die spezifischen Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide angepasst. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft und bei Bedarf aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte entweder durch Isolierung aus dem Agarosegel (2.14) oder unter Verwendung des „Qiaquick PCR Purification Kits“ nach Angaben des Herstellers.

2.11 Reverse Transkriptase (RT)-PCR (cDNA-Synthese für „Microarray“-Analysen)

Für eine RT-PCR wurden 50-100 µg Gesamt-RNA und 1 µg Oligo (dT) Primer in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Für die Elongationsreaktion wurden 4 µl dNTP-Mix (5 mM A, G, T und 2 mM C), 4 µl fluoreszenzmarkiertes dCTP (Cy3 oder Cy5-dCTP), 4 µl 0,1 M DTT, 8 µl 5x RT-Reaction buffer (SuperscriptII-Kit, Life Technologies) und 1,5 µl (300 U) Reverse Transkriptase (SuperscriptII, Life Technologies) hinzugegeben. Die Proben wurden für 1,5 h bei 39°C inkubiert und die Reaktion nach Zugabe von 10 µl 1 M NaOH und 1 µl 0,5 M EDTA durch eine Inkubation von 10 min bei 65°C beendet. Zur Neutralisierung wurden 10 µl 1 M HCL, sowie 120 µl TE-Puffer, pH 8 zugesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde aufgereinigt und die Effizienz der Inkorporation der markierten Nukleotide spektralphotometrisch gemessen.

2.12 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,2-20 kb erfolgte in 0,6-1,2% igen Agarosegelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) verwendet (Maniatis *et al.*, 1989). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2 % Bromphenolblau, 25 % Glycerin) versetzt und die Nucleinsäuren wurden nach der Auftrennung durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Als Größenstandard diente eine *EcoRI/HindIII*-geschnittene λ-Phagen DNA.

2.13 MOPS-Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität präparierter Gesamt-RNA wurde anhand einer MOPS-Gelelektrophorese kontrolliert. Die verwendete Gelkammer wurde vorher über Nacht mit 5 g/l Bentonit inkubiert und anschließend mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Die Auftrennung der RNA erfolgte in 1% igen Agarosegelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 7,5). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2 % Bromphenolblau, 25 % Glycerin) versetzt und die RNA wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Die RNA sollte in Form von zwei distinkten Banden (26S und 18S RNA) auftreten. Eine tiefer laufende dritte Bande repräsentiert verbleibende 5S RNA.

2.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde bei langwelligem UV-Licht (366 nm) aus einem TAE-Agarosegel ausgeschnitten und die DNA wurde mit Hilfe des „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.15 DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte oder in einer RT-PCR synthetisierte cDNA wurden mit Hilfe des „Qiaquick PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.16 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA oder RNA

Phenol und Chloroform wurden im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und das gleiche Volumen Phenol-Chloroform wurde zu der aufzureinigenden Lösung gegeben. Die Proben wurden gut gemischt und für 10 min mit 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wäßrige Phase, möglichst ohne die Interphase, abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Der Vorgang wurde noch einmal mit dem Phenol-Chloroform Gemisch und einmal nur mit Chloroform alleine wiederholt. Die gereinigte DNA bzw. RNA wurde bei Bedarf durch Zugabe von 2,5 Volumen 96% Ethanol und NaCl mit einer Endkonzentration von 0,3 M gefällt.

2.17 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA oder von RNA wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Maniatis *et al.*, 1989): Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde durch den Quotient $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ gemessen. Bei einer gereinigten RNA-Präparation sollte dieses Verhältnis bei einem Wert von 2,1 liegen. Eine Extinktion $E_{260\text{nm}}=1$ entspricht dann einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

2.18 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) oder von der Firma Scientific Research & Development GmbH (Oberursel) durchgeführt.

2.19 Herstellung einer Genbank

Die Genbank des Stammes JBY25 wurde nach der von Weierstall *et al.* (1999) beschriebenen Methode hergestellt. Chromosomale DNA des *S. cerevisiae* Stammes JBY25 wurde mit der Restriktionsendonuklease *Sau3A* partiell geschnitten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Die entstandenen DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 5-10 kb wurden aus dem Agarosegel isoliert. Parallel wurde das Plasmid YCplac33 mit *Bam*HI linearisiert, mit alkalischer Phosphatase behandelt und aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente der chromosomalen DNA über Ligation in den geschnittenen Vektor kloniert und der Ligationsansatz zur Amplifikation in *E. coli* transformiert. Die so angefertigte Genbank des Stammes JBY25 wurde dann durch eine Plasmid-Maxi-Präparation aus ca. 50000 *E. coli* Transformanten isoliert.

2.20 Klonierung von DNA-Fragmenten durch *in vivo*-Rekombination

Für eine *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde zunächst das entsprechende Gen bzw. die DNA-Sequenz durch eine PCR-Reaktion (2.10) synthetisiert. Die dabei eingesetzten Oligonukleotide enthalten jeweils im 5'-Bereich 36-39 Nukleotide umfassende spezifische Anhänge, die homolog zu den 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenzen des Integrationsbereiches im Zielvektor sind. Im 3'-Bereich enthalten die Oligonukleotide 20-22 Basen mit Homologie zu den 3'- bzw. 5'-Enden des zu amplifizierenden Gens. Das entstandene PCR-Produkt wurde zusammen mit dem durch Restriktion im Integrationsbereich linearisierten und aufgereinigten Vektor in Hefe transformiert. Die Zellen wurden auf synthetischem Selektivmedium ausplattiert, dem für die Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors die entsprechende Aminosäure bzw. Nukleotidbase fehlte. Auf diese Weise wurden nur solche Transformanten erhalten, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragmentes in den linearisierten Vektor wieder ein stabiles, zirkuläres Plasmid gebildet hatten. Die Plasmide wurden isoliert, in *E. coli* amplifiziert und durch anschließende Restriktionsanalyse, oder durch Sequenzierung überprüft.

2.21 Fusionierung der *E. coli* L-Arabinose Isomerase und der *E. coli* L-Ribulokinase mit einem His₆-Epitop

Für die Klonierung von *E. coli araA-His₆* auf ein Überexpressionsplasmid wurde der *araA*-ORF in einer ersten PCR-Reaktion mit den Primern AF7-His und AraA-R amplifiziert und mit einer für ein 6x His-Epitop kodierenden Sequenz fusioniert. In

einer sich anschließenden zweiten PCR-Reaktion dienen die Produkte der ersten Reaktion als Synthesevorlage für die weitere Amplifizierung mit den Oligonukleotiden T7-1-ORFs und T2-ORF. Das Oligonukleotid AF7-His besitzt an seinem 5`-Ende überlappende Anhängen zu T7-1-ORFs, gefolgt von einem Startkodon und einer für sechs Histidin-Reste kodierenden Sequenz. 3`-terminal enthält es identische Bereiche zum Beginn des *araA*-ORFs unter Aussparung des ATG-Startkodons. T7-1-ORFs enthält 5`terminal identische Bereiche zum *HXT7*-Promotor des Plasmides p423HXT7-His. AraA-R weist 5`terminal homologe Anhängen zu T2-ORF auf, das seinerseits 5`-terminal 51 Nukleotide besitzt, die identisch sind zum komplementären Strang des *CYC1*-Terminationsbereiches auf dem Plasmid p423HXT7-His. Am 3`-Ende von AraA-R befindet sich ein identischer Bereich zum Ende des *araA*-ORFs auf dem komplementären Strang. Über *in vivo*-Rekombination wurde der *araA*-ORF, der mit der für das 6x His-Epitop kodierenden Sequenz fusioniert war, in den *HpaI/BamHI*-linearisierten Vektor kloniert (s. 3.1.4).

Der *E. coli* *araB*-ORF wurde in einer PCR-Reaktion mit den Primern araBhis, sowie araB-R und T2-ORF amplifiziert und mit der für das 6x His-Epitop kodierenden Sequenz fusioniert. Dabei wurde der Primer araB-R in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt, das Plasmid p424H7araB diente als DNA-Vorlage. araBhis besitzt 5`-terminal identische Bereiche zum *HXT7*-Promotor des Plasmides p424HXT7-His, inklusive des ATG-Startkodons und der für sechs Histidin-Reste kodierenden Sequenz. Nach einer kurzen Linker-Region, die für Glycin, Alanin und noch einmal Glycin kodiert, folgen 3`-terminal homologe Nukleotide zum Beginn des *araB*-ORFs, ohne Startkodon. araB-R weist an seinem 5`-Ende überlappende Bereiche zu T2-ORF auf, 3`-terminal befinden sich identische Sequenzen zum Ende des *araB*-ORFs auf dem komplementären Strang. Der, mit der für das 6x His-Epitop kodierenden Sequenz fusionierte, *araB*-ORF würde über *in vivo*-Rekombination in das *PstI/Spel*-linearisierte Plasmid p424HXT7-His kloniert (s. 3.2.3.2). Nach dem selben Prinzip wurde der *araB^{mut}*-ORF mit der für sechs His-Reste kodierenden Sequenz fusioniert und in das Plasmid p424HXT7-His kloniert (s.3.2.3.2). Der Primer araB-R wurde dabei wiederum in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt.

2.22 Promotordeletion bzw. -austausch in *S. cerevisiae*

Die Deletion bzw. der Austausch des endogenen *TAL1*-Promotors in den Stämmen CEN.PK2-1C und JBY25 gegen den verkürzten *HXT7*-Promotor erfolgte unter Verwendung des *loxP::kanMX::loxP/Cre*-Rekombinasesystems (Güldener *et*

al., 1996). Dabei wird die Fähigkeit der Hefe zu homologer Rekombination ausgenutzt. Über eine gezielte homologe Integration einer *loxP::kanMX-kpHXT7::loxP*-Deletionskassette wurde die Deletion der Promotorbereiche im Austausch gegen die Kassette erreicht.

In einer PCR-Reaktion wurde zunächst die *loxP::kanMX-kpHXT7::loxP*-Deletionskassette vom Plasmid pUG6kpHXT7 mit den entsprechenden Oligonukleotiden s1 und s2 amplifiziert. Diese ca. 70 ermeren Primer enthalten einerseits ca. 48 bp lange überlappende Bereiche zu der zu deletierenden DNA-Region und andererseits ca. 20-22 bp lange überlappende Bereiche zu den *loxP* flankierenden Sequenzen des Plasmides pUG6kpHXT7. Die so synthetisierten Deletionskassetten enthielten also den verkürzten *HXT7*-Promotor und das *kanMX*-Gen, flankiert von den zu der zu deletierenden Promotorregion homologen Bereichen. Die Deletionskassetten wurden in die Hefe transformiert und Geneticin-resistente Klone konnten durch Selektion auf G418-haltigem Vollmedium identifiziert werden. Der erfolgte Austausch der Ziel-Promotorregion gegen die Deletionskassette, und somit gegen den verkürzten *HXT7*-Promotor, wurde durch PCR mit ganzen Hefezellen unter Verwendung der Oligonukleotide a1/a4, a1/k2kanMX oder k3kanMX/a4 verifiziert.

Das integrierte *kanMX*-Markergen wurde durch Exzision mit Hilfe des Cre-Rekombinase-Systems entfernt. Die Zellen wurden dafür mit dem Plasmid pSH47 transformiert, welches das Cre-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors exprimiert. Nach 2-tägiger Inkubation der Transformanten auf Galaktose-Medium wurden die Kolonien auf G418-haltiges Medium replikaplattiert und G418-sensitive Kolonien isoliert. Die Exzision des *kanMX*-Genes durch homologe Rekombination der *loxP*-Bereiche wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion unter Verwendung der Oligonukleotide a1/a4 überprüft.

2.23 Kreuzung von Hefestämmen und Tetradenanalyse

Die haploiden, zu kreuzenden Stämme (JBY25 bzw. CEN.PK2-1C + EBY159B) wurden entweder in flüssigem Vollmedium oder auf einer Agarplatte mit Vollmedium miteinander gemischt. Nach einer 3-4 stündigen Inkubation wurden die Hefen auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose und Zusatz von 200 µg/ml G418 vereinzelt. Die auf diesem Medium gewachsenen diploiden Zellen wurden 1-2 Tage in Vollmedium bis zur stationären Phase angezogen, mit Wasser gewaschen und auf Agarplatten mit 2% Kaliumacetat ausplattiert. Nach 3-5 Tagen wurden die sporulierenden Zellen in 0,5 ml Wasser aufgenommen und

die Ascuswände durch Zugabe von 20 µl β-Glukuronidase/Arylsulfatase (0,2 mg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Sporen wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert und zum Auskeimen auf einer Vollmediumsplatte abgelegt. Die Tetraden wurden dann auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose ausgestrichen. Abschließend wurde das Wachstum der Sporen auf synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% Arabinose überprüft.

2.24 Aufreinigung eines 6x His-markierten Proteins über Nickelsäulen

1 l Kulturen von Zellen, die das mit dem 6x His-Epitop markierte Protein enthielten, wurden in Ferlenbach-Kolben bis zur exponentiellen Phase kultiviert, geerntet und je zweimal in kaltem Lysis-Puffer (20 mM Hepes, pH 8; 300 mM NaCl, 10% Glycerin) gewaschen. Die Zellen wurden in 4 ml Aufschlußpuffer (20 mM Hepes, pH 8; 300 mM NaCl; 10% Glycerin, 1 mM PMSF und Protease Inhibitoren (Complete, Roche) resuspendiert. Das Resuspendat wurde auf mehrere Plastikreagenzgläser aufgeteilt und der Zellaufschluß erfolgte für 10 min bei 4°C mit Hilfe von Glasperlen (Ø = 0,45 mm) auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR). Die Überstände wurden vereinigt und die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (zunächst 15 min bei 4°C mit 13000 rpm, anschließend in der Ultrazentrifuge für 1 h bei 42000 rpm) entfernt. Die Überstände (Rohextrakt-Fraktion) wurden abgenommen und je 4 ml wurden mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen) gemischt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Mischung wurde auf Säulen geladen (Midi-Säulen, Qiagen, ohne Matrix) und der Durchlauf wurde als Durchlauf-Fraktion aufgefangen. Nach vier Waschschritten mit Waschpuffer (Lysispuffer + 10 mM Imidazol) (Waschfraktionen) wurden die aufgereinigten Proteine durch viermalige Zugabe von Elutionspuffer (Lysispuffer + 300 mM Imidazol) von der Säule eluiert (Elutionsfraktionen). Die verschiedenen Fraktionen wurden über SDS-Gelelektrophorese (2.26), Coomassie Blau Färbung (2.27) und Western Blot Analyse (2.28) mit 6x His-spezifischen Antikörpern (Roche) analysiert.

2.25 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Mikro-Biuret-Methode nach Zamenhoff (1957) bestimmt. Als Standard diente dabei Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0-200 µg/ml. Zu 1 ml wäßriger, proteinhaltiger Lösung wurden 0,5 ml Mikrobiuret-Reagenz (8 M NaOH, 0,2% Kupfersulfat) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 10 min bei Raumtemperatur wurden,

wenn nötig, die Zelltrümmer durch eine Zentrifugation für 5 min bei 10000 rpm entfernt. Anschließend wurde in Quarzküvetten die Extinktion des Überstandes bei 290 nm bestimmt. Alternativ erfolgte die Proteinbestimmung mit dem „Bio-Rad Protein Assay“ nach Angaben des Herstellers.

2.26 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (1970). Dafür wurden ein 5% iges Sammelgel (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 5% Acrylamid) sowie ein 10% iges Trenngel (375 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 10% Acrylamid) eingesetzt (Maniatis, 1989). Der verwendete Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer (4% SDS; 20% Glycerin; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 mM DTT) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine und des als Molekulargewichtsstandard eingesetzten „Prestained High Molecular Weight Standard“ (Sigma) erfolgte bei 40-50 V über Nacht.

2.27 Nachweis von Proteinen über Coomassie-Blau Färbung

Die Anfärbung der Proteine erfolgte mittels Färbelösung (0,1% Coomassie brilliant blue G250, 50% Methanol, 10% Eisessig) für 1-24 h, die Entfärbung und Fixierung der Gele in Entfärbelösung (7,5% Eisessig, 20% Methanol) für 1h oder über Nacht.

2.28 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Die Übertragung erfolgte für 2,5 h bei 55 V (250 mA) in Blotting Puffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 20% Methanol). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h in PBSTB (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,3% Tween 20; 3% BSA) blockiert. Die Bindung des jeweiligen spezifischen Primärantikörpers (verschieden verdünnt in 10 ml PBSTB) erfolgte für 1-15 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran 3x mit PBST (10 mM

Natriumphosphatpuffer, pH 7,2; 150 mM NaCl, 0,3% Tween 20) gewaschen und für 1-2 h mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in PBSTB) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBST. Der Nachweis der gebundenen, Peroxidase-gekoppelten Antikörper erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion, nach Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates, (SuperSignal ULTRA chemiluminescent substrate) und anschließende Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms.

2.29 Bestimmung der Fermentationsrate

Um die Fermentationsrate zu bestimmen, wurden die Zellen in 500 ml synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% Glukose über Nacht angezogen, zweimal mit synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose oder 2% Glukose gewaschen und jeweils in diesem Medium angeimpft. Nach mindestens zwei Teilungen wurden die Zellen bei einer OD_{600nm} von 1,5 bis 2 geerntet, erneut zweimal mit synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose oder 2% Glukose gewaschen und anschließend in kleinen Flaschen mit aufgelegtem Deckel in 50 ml dieses Mediums unter leichtem Rühren inkubiert. Die Inkubation erfolgte je nach Fragestellung für 1-3 Tage. Zu verschiedenen Zeitpunkten (Fermentation von Glukose: alle 10 min; Fermentation von L-Arabinose: jede Stunde, oder längere Abstände) wurden Proben entnommen. Die Proben wurden für 2 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und aus dem Überstand die jeweilige Ethanolkonzentration bestimmt (2.29.1). Zur Bestimmung des Trockengewichtes (TG) wurden zu Beginn und am Ende der Fermentation zusätzlich je 5 ml Zellsuspension abgenommen. Diese wurden über eine Filtermembran, deren Gewicht zuvor bestimmt worden war, abgesaugt. Der Filter mit den Zellen wurde zweimal mit je 5 ml H_2O gewaschen und anschließend für 10-15 min bei $70^\circ C$ getrocknet. Das Gewicht wurde erneut ausgewogen und so das Trockengewicht der Zellen bestimmt.

2.29.1 Bestimmung der Ethanolkonzentration

Die Bestimmung der Ethanolkonzentration aus Fermentationsproben erfolgte mit Hilfe des Lebensmittelanalytik-Kits „Ethanol“ (Roche) nach Herstellerangaben. $NADH+H^+$ wurde als Meßgröße anhand seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm spektralphotometrisch bestimmt. Abweichend von der Herstelleranweisung wurden die Bestimmungen in einem Drittel des angegebenen Volumens durchgeführt.

2.30 Bestimmung der Aufnahme von [1-¹⁴C] L-Arabinose in *S. cerevisiae*

Die Messung der Aufnahme radioaktiv markierter L-Arabinose in Hefe erfolgte nach dem Prinzip von Bisson und Fraenkel (1983) mit Modifikationen nach Walsh *et al.* (1994) unter Verwendung von [1-¹⁴C] L-Arabinose. Die Aufnahme wurde bei einer L-Arabinose Konzentration von 10 mM bestimmt, die spezifische Radioaktivität der eingesetzten radioaktiv markierten L-Arabinose betrug 55 mCi/mmol. Hefezellen wurden bis zu einer Dichte von $1-2 \times 10^7$ /ml herangezogen und zweimal mit Phosphat-Puffer (0,1 M K_iPO₄, pH 6,5) gewaschen. Anschließend wurde das Naßgewicht der Zellen bestimmt und die Zellen wurden mit einer Konzentration von 60 mg/ml in Phosphatpuffer resuspendiert. Vor Beginn der Aufnahmemessung wurden sowohl die Zellen, als auch die L-Arabinose-Lösung für 5 min bei 30°C inkubiert. Die Aufnahmereaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Zellen zu 50 µl dreifach konzentrierter L-Arabinose-Lösung gestartet. Nach 10 sec oder bis zu 20 min wurden 100 µl des Ansatzes entnommen und die Reaktion durch das Hinzufügen von 10 ml eiskalter Quenchlösung (0,1 M K_iPO₄, pH 6,5; 0-3°C) beendet. Kleine Zeitintervalle wurden mit Hilfe einer speziellen Pipette (Anfertigung der Elektronikwerkstatt der HHU Düsseldorf) auf 1/100 sec genau bestimmt. Die Zellen wurden sofort unter Vakuum abgesaugt, auf Whatman GF/C Glas-Fiber-Filtern gesammelt und viermal mit 10 ml eiskalter Quenchlösung gewaschen. Die Filter wurden in Szintillationsgefäße zu 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, Zinsser Analytik) gegeben und die Radioaktivität wurde unter Verwendung eines Szintillationszählers (Beckmann) gemessen. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität (cpm₀) wurden 10 µl des Reaktionsansatzes in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen. Da die radioaktive L-Arabinose auch unspezifisch an die Glas-Fiber-Filter binden kann, wurden als Kontrolle L-Arabinose Lösung und Zellen gleichzeitig zur vorgelegten Quenchlösung gegeben (cpm_{Kontrolle}). Diese Kontrolle wurde 2-3x bestimmt und der Mittelwert der Messungen von den Meßwerten der Proben abgezogen. Die aufgenommene Zuckermenge [L-Arabinose]_{intra} in nmol wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{L-Arabinose}]_{\text{intra}} \text{ nmol} = [(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Kontrolle}})/(\text{cpm}_0 \times 10)] \times [\text{L-Arabinose}]_{\text{gesamt}} \text{ mM}$$

Die jeweilige Aufnahmegeschwindigkeit V in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg TG}^{-1}$ wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$V = ([\text{L-Arabinose}]_{\text{intra}} \text{ nmol} \times 60 \text{ sec})/t$$

2.31 Messung von Enzymaktivitäten in *S. cerevisiae*

2.31.1 Herstellung von Rohextrakten

5 ml Kulturen von Hefezellen wurden bis zur exponentiellen Phase in Vollmedium oder, für die Selektion auf plasmidhaltige Zellen mit plasmidkodierten Aminosäure/Nukleotidbase-Markergenen, in synthetischem Kompletmedium mit der jeweils erwähnten Kohlenstoffquelle, ohne die entsprechende Aminosäure(n)/Nukleotidbase(n), herangezogen. Die Zellen wurden geerntet, zweimal in 5 ml kaltem Imidazolpuffer (50 mM Imidazol, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, pH 7) gewaschen und mit Hilfe von Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) für 8 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) bei 4°C aufgeschlossen. Anschließend wurden je nach Zellmenge weitere 1-1,5 ml kalter Imidazolpuffer zugegeben und der Überstand abgenommen. Zelltrümmer wurden durch 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm entfernt und der Überstand als Rohextrakt für die Proteinbestimmung (2.25) und für die Messung der Enzymaktivitäten eingesetzt.

2.31.2 Messung der L-Arabinose Isomerase Aktivität

Die Aktivität der L-Arabinose Isomerase wurde diskontinuierlich in zwei Schritten bestimmt: Plasmidtransformierte Zellen, die ein für eine L-Arabinose Isomerase kodierendes Plasmid trugen, wurden wie unter 2.31.1 beschrieben herangezogen und Rohextrakte hergestellt. Anschließend wurde der Rohextrakt (ca. 200 μ l) mit 100 mM L-Arabinose in Imidazolpuffer gemischt (Gesamtvolumen 500 μ l). Während einer 5-50 min (optimal: 10 min) Inkubation bei 30°C konnte die L-Arabinose Isomerase aus dem Rohextrakt L-Arabinose zu L-Ribulose umwandeln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 μ l TCA beendet und der Ansatz mit 195 μ l 2 M Na_2CO_3 neutralisiert. Im einem zweiten Schritt wurde die Abnahme von NADH als Meßgröße bei 30°C und einer Wellenlänge von 340 nm spektralphotometrisch verfolgt, während die gebildete L-Ribulose durch Sorbitol-Dehydrogenase zu Arabitol umgeformt wurde.

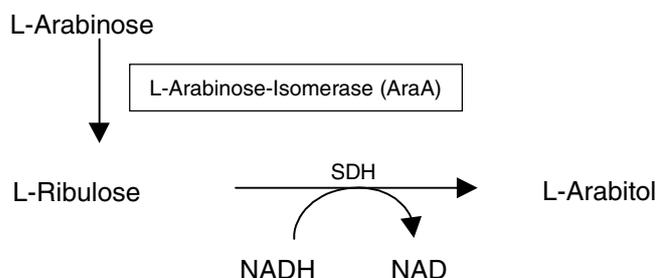


Abb. 3: Prinzip der Bestimmung der L-Arabinose Isomerase Aktivität

Dafür wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml in Imidazolpuffer 0,2 mM NADH, 0,1 mg Sorbitol-Dehydrogenase und 200-300 µl der neutralisierten Probe eingesetzt. Da die Sorbitol-Dehydrogenase eine sehr niedrige Affinität zu L-Ribulose hat, sind die gemessene Menge an L-Ribulose und so die L-Arabinose Isomerase Aktivitäten vermutlich deutlich niedriger, als die tatsächlichen Aktivitäten.

2.31.3 Messung der L-Ribulokinase Aktivität

Für die Bestimmung der L-Ribulokinase Aktivität wurden plasmidtransformierte Zellen, die ein L-Ribulokinase exprimierendes Plasmid trugen herangezogen, geerntet und Rohextrakte hergestellt. Die Aktivität wurde in Imidazolpuffer mit 50 µl Rohextrakt, 1 mM ATP und 5 mM L-Ribulose bei 30°C gemessen. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter (s. 3.2.3.2) wurde 0,1-10 mM L-Ribulose eingesetzt. Der Verbrauch von ATP wurde kontinuierlich durch den Zusatz von 0,23 mM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat (PEP), 1 U L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) und 1 U Pyruvat Kinase (Pyk), sowie 1 mM von deren Aktivator Fruktose-1,6-Bisphosphat bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates L-Ribulose gestartet. Die Abnahme von NADH als Meßgröße wurde dabei photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Da bei der Verwendung von normalen Rohextrakten, die wie unter 2.31.1 beschrieben, hergestellt wurden, durch interne Kinasen eine sehr starke Hintergrundreaktion schon vor Zugabe des Substrates ablief, mußte der Rohextrakt für die Messung sehr stark verdünnt werden. Dieser Hintergrund wurde herausgerechnet, indem jeweils eine Reaktion ohne Substrat parallel ablief und der dafür bestimmte Wert von der eigentlich gemessenen Aktivität abgezogen wurde. Aufgrund dessen konnten sehr niedrige Aktivitäten unter Umständen nicht erfasst werden (s. auch 3.1.6).

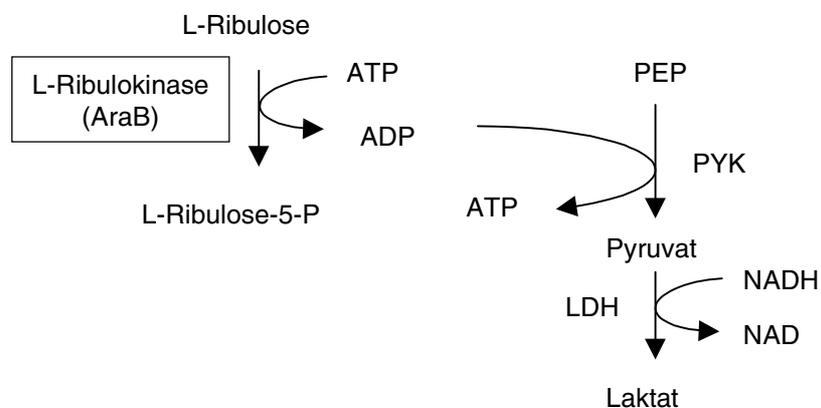


Abb. 4: Prinzip der Bestimmung der L-Ribulokinase Aktivität

2.31.4 Messung der L-Ribulose 5-Phosphat 4-Epimerase Aktivität

Für die Bestimmung der L-Ribulose 5-Phosphat 4-Epimerase Aktivität wurden zum einen plasmidtransformierte Zellen, die ein L-Ribulokinase kodierendes Plasmid trugen, und zum anderen Zellen mit einem L-Ribulose 5-Phosphat 4-Epimerase-Plasmid herangezogen, geerntet und Rohextrakte hergestellt. Zur Produktion von L-Ribulose-5-Phosphat aus 50 mM L-Ribulose und 2 mM ATP in Imidazolpuffer wurde der Rohextrakt (100 µl) der L-Ribulokinase exprimierenden Zellen in 1 ml Gesamtvolumen für 30 min bei 30°C inkubiert. In dem Ansatz für die Bestimmung der L-Ribulose 5-Phosphat 4-Epimerase Aktivität befanden sich neben 50 µl Rohextrakt aus Zellen, die die Epimerase exprimierten, 1 mM D-Ribose-5-Phosphat, 0,23 mM NADH, 0,5 U Transketolase (TKL), 4,5 U Triosephosphat-Isomerase (TIM) und 1,55 U Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (GDH) in Imidazolpuffer. Die Reaktion wurde mit 100 µl der Vorreaktion gestartet, das Gesamtvolumen betrug 1 ml. Meßgröße war NADH, dessen Abnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm spektralphotometrisch verfolgt wurde.

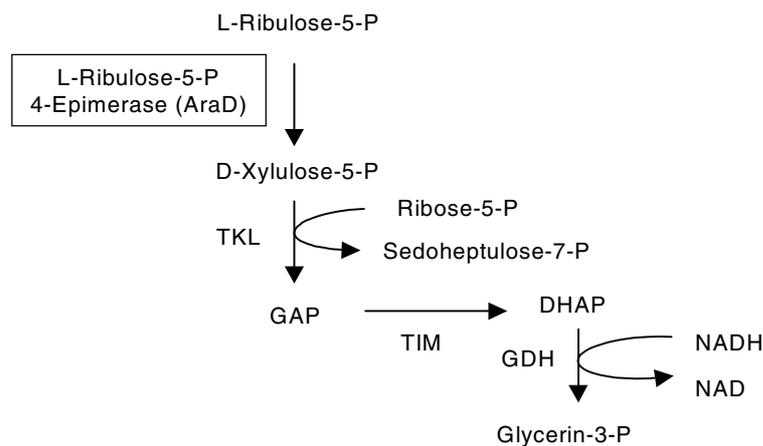


Abb. 5: Prinzip der Bestimmung der L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase-Aktivität

2.31.5 Messung der Transaldolase Aktivität

Die Messung der Transaldolase Aktivität erfolgte nach der Methode von Brand (1974). Hefezellen entweder mit oder ohne zusätzlich plasmidexprimierter Transaldolase wurden herangezogen, geerntet und Rohextrakte wurden hergestellt. In einem Gesamtvolumen von 1 ml wurde die Umsetzung von 0,2 mM Erythrose-4-Phosphat und 3 mM Fructose-6-Phosphat durch die Zugabe von 0,23 mM NADH, sowie 4,5 U Triosephosphat-Isomerase (TIM) und 1,55 U Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (GDH) in Imidazolpuffer kontinuierlich verfolgt. Die Abnahme von NADH als Meßgröße wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Rohextrakt gestartet.

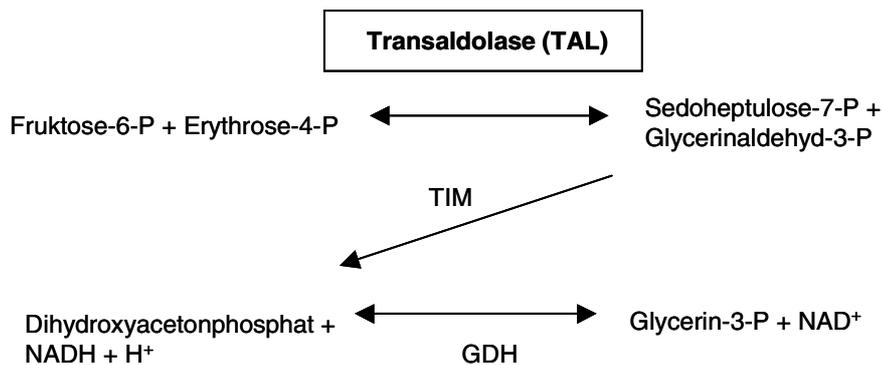


Abb. 6: Prinzip der Bestimmung der Transaldolase-Aktivität

2.32 Genomweite Transkriptionsanalyse („Microarray“-Analyse)

Für die Transkriptionsanalyse des gesamten Hefegenoms wurden „Pan Yeast Arrays“ der Firma MWG Biotech verwendet. Diese Glasfilter enthalten 6250 40mere Oligos, die auf die Glasoberfläche gespottet wurden und spezifisch sämtliche Gene der Hefe repräsentieren. Sämtliche für die Analyse notwendigen Schritte wurden mit kleinen Abänderungen nach der „Pan Yeast Array“ Gebrauchsanweisung durchgeführt.

Aus *S. cerevisiae* Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert (2.8.4) und anschließend mittels RT-PCR (2.11) first strand cDNA hergestellt. Unspezifische Bindungsstellen auf der Oberfläche des Filters wurden durch Inkubation für 45 min bei 42°C in 1x Blocking solution (20x SSC (0,3 M Na Citrat, 3 M NaCl, pH 7), 5% BSA, 2,5% SDS) abgesättigt. Die Blocking solution wurde durch mehrere Waschschritte mit deionisiertem H₂O entfernt und der Array durch 2 min Zentrifugation in einem Falcon-Gefäß bei 1600 rpm getrocknet. Für die Hybridisierung der cDNA mit dem Filter wurde zunächst die fluoreszenzmarkierte cDNA beider Stämme gemeinsam in 28 µl Hybridisierungspuffer (MWG Biotech) aufgenommen und so vereinigt. Dieser Hybridisierungs-Mix wurde für 3 min in einem Heizblock bei 95°C denaturiert und für 30 sec auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Mix sofort auf den Glasfilter gegeben, indem er an eine Ecke eines auf dem Filter platzierten Deckglases pipettiert wurde und so durch Kapillarkräfte unter das Deckglas gezogen wurde. Die Ränder wurden mit „Fixogum“-Klebstoff (Marabu) abgedichtet und die Filter in einer Hybridisierungskammer (Corning) für mindestens 36 h bei 42°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter für 5 min in Waschpuffer 1 (2x SSC, 0,1% SDS), für weitere 5 min in Waschpuffer 2 (1x SSC) und nochmals für 5 min in Waschpuffer 3 (0,5x SSC) gewaschen. Abschließend wurden die Filter durch Zentrifugation

getrocknet (s. oben). Das Scannen der Glasfilter und die Datenerhebung erfolgten durch die Firma MWG Biotech.

2.33 Mikroskopische Untersuchungen

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden lebende, unfixierte Zellen und ein Zeiss Axioskop verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einführung eines Stoffwechselweges zur Verwertung der Pentose L-Arabinose in der Hefe *S. cerevisiae*

Neben den Hexosen Glukose, Galaktose und Mannose sowie der Pentose D-Xylose macht die Pentose L-Arabinose einen großen Anteil der zu fermentierenden Zucker in Lysaten aus pflanzlicher Biomasse aus (McMillan und Boynton, 1994; Hespell *et al.*, 1998). Wie schon in der Einleitung beschrieben, sollte in dieser Arbeit ein *S. cerevisiae* Hefestamm konstruiert werden, der in der Lage ist, diesen Zucker effizient zu verwerten und ihn mit hoher Ausbeute zu Ethanol zu fermentieren. Da die Hefe jedoch natürlicherweise keine Enzyme zur Metabolisierung von L-Arabinose bis zum D-Xylulose-5-Phosphat besitzt, war das erste Ziel dieser Arbeit, einen solchen Stoffwechselweg funktionell in Hefe zu exprimieren.

3.1.1 Konstruktion eines Sets von Überexpressionsvektoren mit verschiedenen Auxotrophie-Markern

Um einen kompletten Stoffwechselweg zu modifizieren, oder aus einem anderen Organismus in Hefe neu zu etablieren, ist es häufig notwendig mehrere Gene gleichzeitig heterolog zu exprimieren. Dies kann am einfachsten erreicht werden, indem diese Gene zunächst von Plasmiden exprimiert werden, auch wenn später unter Umständen eine stabile Integration der Gene ins Genom sinnvoller sein kann (siehe 3.6.1). Soll ein Stoffwechselweg sehr stark und unabhängig von äußeren, eventuell reprimierend wirkenden Bedingungen, wie beispielsweise der Kohlenstoffquelle, exprimiert werden, benötigt man einen konstitutiv stark exprimierenden Promotor auf 2 μ Überexpressionsvektoren.

Der in dieser Arbeit verwendete Wildtypstamm CEN.PK2-1C besitzt drei Aminosäure-Auxotrophien (*his3*, *trp1*, *leu2*) sowie eine Uracil-Auxotrophie (*ura3*), die zur Selektion auf Plasmide mit diesen Markergenen genutzt werden können. Ein für das *URA3*-Markergen kodierendes 2 μ Überexpressionsplasmid stand zu diesem Zweck bereits zur Verfügung (p426-HXT7-His, Hamacher *et al.*, 2002). Dieses Plasmid enthält einen verkürzten, nicht mehr glukosereprimierten und konstitutiv stark exprimierenden *HXT7*-Promotor von -392 bp bis -1 bp gefolgt von einem ATG Start-Kodon, sowie von einem für ein 6x His-Epitop kodierenden Bereich, womit es möglich ist Zielproteine zu markieren und bei Bedarf auch aufzureinigen.

Zur Konstruktion von drei weiteren Überexpressionsvektoren, entweder mit dem *HIS3*, dem *TRP1* oder dem *LEU2*- Markergen, wurden die jeweils *SacI/Spel* geschnittenen Vektoren p423Met25 (*HIS3*), p424Met25 (*TRP1*) bzw. p425Met25 (*LEU2*) zusammen mit dem 0,4 kb großen *SacI/Spel* Fragment des Plasmides p426HXT7-His, bestehend aus dem verkürzten *HXT7*-Promotor, dem 6x His-Epitop, sowie dem *CYC1*-Terminationsbereich, wie in 2.10.3 beschrieben ligiert. Anschließend wurden die auf diese Weise neu konstruierten Plasmide in *E. coli* amplifiziert und nach Isolierung wie unter 2.9.1 beschrieben, durch Restriktion mit *XbaI/HpaI* überprüft. Die Plasmide wurden mit p423HXT7-His (*HIS3*), p424HXT7-His (*TRP1*) und p425HXT7-His (*LEU2*) benannt.

Mit Hilfe dieses Sets von Überexpressionsvektoren (Abb. 7) ist es nun möglich bis zu vier verschiedene Gene zur selben Zeit in einem Hefestamm konstitutiv stark überzuexprimieren und sie eventuell zu markieren.

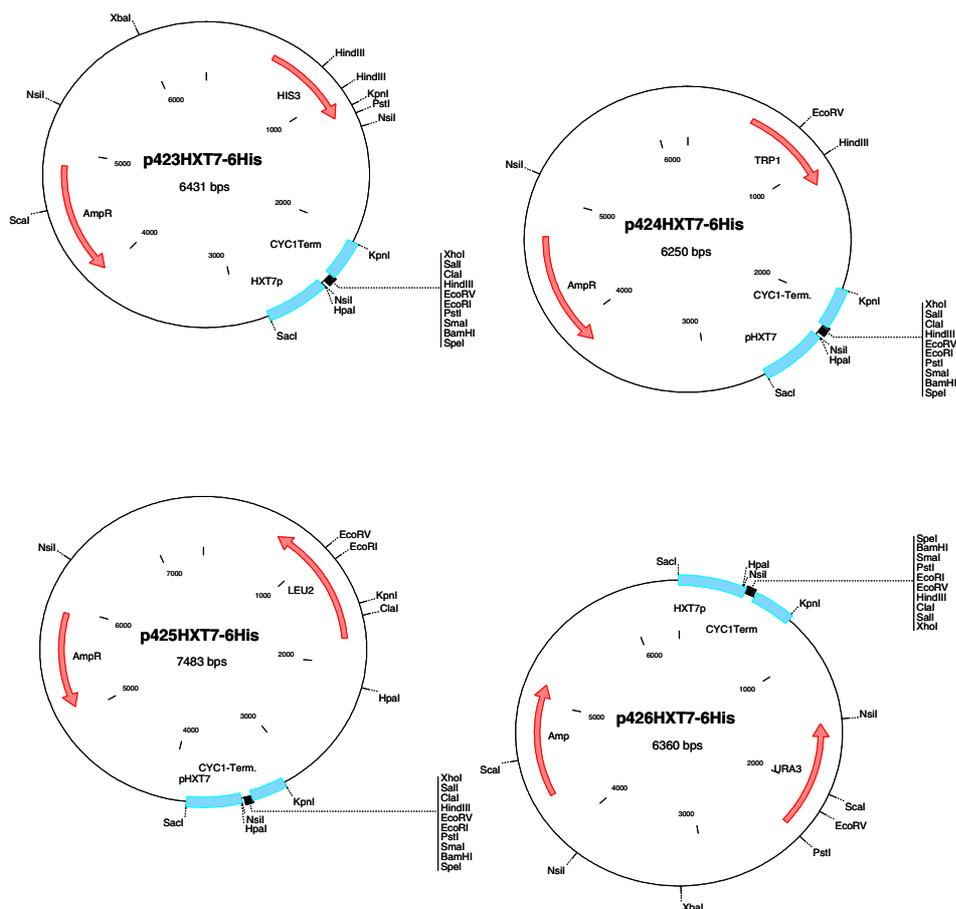


Abb. 7: Set von 2 μ Überexpressionsvektoren mit starkem, konstitutiv exprimierendem Promotor und verschiedenen Markergenen

3.1.2 Überexpression endogener Hefe-Gene, die für Proteine mit Ähnlichkeit zu L-Ribulokinase bzw. L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase kodieren

Die Hefe selber besitzt keine Enzyme zur Metabolisierung von L-Arabinose bis zum D-Xylulose-5-Phosphat, das als Intermediat des Pentose-Phosphat Weges weiter verwertet werden kann. Die heterologe Expression von Genen aus anderen Organismen in Hefe resultiert jedoch manchmal entweder in nicht gebildeten oder nicht funktionellen Enzymen (Amore *et al.*, 1989; Sarthy *et al.*, 1987; Wieczorke *et al.*, 2002). Aus diesem Grund lag es nahe, im Genom der Hefe nach Genen zu suchen, deren Produkte Ähnlichkeit zu Enzymen des L-Arabinose-Katabolismus anderer Organismen aufweisen. Tatsächlich konnten über einen „Blast search“ (National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), wobei die Aminosäuresequenzen der Proteine des L-Arabinose Katabolismus aus *E. coli* als Referenzsequenz dienten, zwei hefeeigene Gene identifiziert werden (*YDR109c* und *YNL249c*), deren Produkte Ähnlichkeiten zu L-Ribulokinase aufweisen (24% bzw. 28% Identität und 37% bzw. 41% Homologie zum *E. coli* Enzym auf Aminosäureebene), sowie ein weiteres Genprodukt mit Ähnlichkeit zu L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase anderer Organismen (*YJR024c*, 20% Identität und 37% Homologie zum *E. coli* Enzym auf Aminosäureebene). Für keines dieser Proteine ist bisher eine physiologische Funktion bekannt und auch eine Deletion der jeweiligen ORFs bringt in keinem Falle eine phänotypische Auswirkung mit sich (*Saccharomyces* Genome Database, SGD). Es läßt sich vermuten, dass die Gene normalerweise entweder nicht oder nur sehr schwach exprimiert werden. Bei einer starken Überexpression des jeweiligen ORFs sollte jedoch eventuell ein funktionelles Protein gebildet werden, das in der Lage ist die gewünschte Reaktion zu katalysieren.

Die Gene *YDR109c* und *YNL249c* (Ähnlichkeit zu L-Ribulokinase), sowie *YJR024c* (Ähnlichkeit zu L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase) wurden über *in vivo*-Rekombination in die Plasmide p424HXT7-His, p426HXT7-His bzw. p425HXT7-His hinter den verkürzten *HXT7*-Promotor kloniert. Hierzu wurden die offenen Leseraster mit den Primern YDR/YNL/YJR-F7 und YDR/YNL/YJR-R aus dem Genom des Stammes CEN.PK2-1C PCR-amplifiziert und in einer zweiten PCR-Reaktion mit den Primern T7-1ORFs und T2-ORF weiter vermehrt. Anschließend wurden die so entstandenen DNA-Fragmente zusammen mit dem jeweiligen durch *HpaI/BamHI* bzw. *HpaI/HindIII* bzw. *BamHI/HindIII* linearisierten Vektor p424HXT7-His bzw. p426HXT7-His bzw. p425HXT7-His in Hefe transformiert. Die so entstandenen Plasmide p424H7YDR109c, p426YNL249c und p425YJR024c wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoRV* bzw.

SpeI/PstI bzw. *XbaI/HindIII* überprüft. Jeweils eines der Plasmide wurde in den Stamm CEN.PK2-1C transformiert und die Transformanten wurden im Falle der mit p424H7YDR109c und p426YNL249c transformierten Zellen auf L-Ribulokinase-Aktivität und im Falle der mit p425YJR024c transformierten Zellen auf L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase-Aktivität untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass durch die Überexpression der genannten hefeeigenen Gene in keinem Fall ein Protein erzeugt werden konnte, das in der Lage war, die Funktion einer L-Ribulokinase oder einer L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase zu übernehmen. Demzufolge kommen den durch die ORFs *YDR109c*, *YNL249c* und *YJR024c* kodierten Proteinen entweder bislang nicht bekannte Funktionen in der Zelle zu, oder die ORFs werden eventuell gar nicht oder nur sehr gering exprimiert.

3.1.3 Expression der Gene des L-Arabinose Katabolismus aus *E. coli* in Hefe

Während viele Hefen und Pilze zwar in der Lage sind, L-Arabinose unter aeroben Bedingungen zu metabolisieren, fehlt den meisten von ihnen jedoch die Fähigkeit sie zu Ethanol zu fermentieren entweder komplett, oder es resultieren nur geringe Ethanol-Produktionsraten und Ausbeuten. Im Gegensatz dazu können die meisten Bakterien L-Arabinose sowohl für aerobes Wachstum nutzen, als auch sie zu diversen Produkten einschließlich Ethanol fermentieren (McMillan und Boynton, 1994; Dien *et al.*, 1996). Die notwendigen Enzyme für die ersten Schritte der Verstoffwechslung bis hin zum D-Xylulose-5-Phosphat werden dabei wie schon in der Einleitung erwähnt durch ein drei Gene beinhaltendes *araBAD* Operon kodiert. Dies sind die Gene *araB* (L-Ribulokinase), *araA* (L-Arabinose Isomerase) und *araD* (L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase) (Lee *et al.*, 1986).

In Eukaryonten hingegen erfolgt die Umwandlung der L-Arabinose zu D-Xylulose-5-Phosphat über einen komplexen Weg, bestehend aus einer Abfolge von zwei Reduktions- und zwei Oxidationsschritten, sowie einer Kinase-katalysierten Reaktion (Chiang und Knight, 1961; Witteveen *et al.*, 1989). Dieser Stoffwechselweg umfasst zum einen wesentlich mehr Enzyme, die aktiv in Hefe exprimiert werden müssen, und bringt zum anderen das Problem eines entstehenden Kofaktor-Ungleichgewichtes durch die Produktion von NADP bei den Reduktionen, aber den Verbrauch von NAD in den Oxidationsschritten mit sich (Richard *et al.*, 2002). D-Xylulose-5-Phosphat kann dann von der Hefe über den Pentosephosphatweg und die Glykolyse zu Ethanol weiter verarbeitet werden.

Der wohl bekannteste, am weitesten verbreitete und am besten erforschte Organismus, der in der Lage ist L-Arabinose zu verwerten ist *E. coli*. Auch die Gene des *E. coli* *araBAD* Operon sind schon seit langem kloniert und sequenziert

(Lee *et al.*, 1986). Daher lag es nahe zunächst die Gene für den L-Arabinose Katabolismus aus diesem Organismus in Hefe zu exprimieren, um einen L-Arabinose verwertenden Hefestamm zu erhalten.

Hierfür wurden die *E. coli* Gene *araA*, *araB* und *araD* durch *in vivo*-Rekombination hinter den verkürzten *HXT7*-Promotor der Plasmide p423HXT7-His, p424HXT7-His bzw. p425HXT7-His unter Aussparung der 6xHis Sequenz kloniert. Die jeweiligen ORFs wurden zunächst mit Hilfe der Oligonukleotide *araA/B/D-F7* und *araA/B/D-R* aus dem Genom des *E. coli* Stammes JM101 PCR-amplifiziert. Die Produkte wurden in einer zweiten PCR-Reaktion mit den Primern T7-1ORFs und T2-ORFs weiter vermehrt. Anschließend wurde das jeweils erhaltene PCR-Produkt zusammen mit dem im Falle von p423HXT7-His und p424HXT7-His *HpaI/BamHI*, bzw. im Falle von p425HXT7-His *HindIII/BamHI* linearisierten Vektor in Hefe transformiert (2.7.2). Nach Isolierung wie in 2.8.2 beschrieben, und Amplifikation in *E. coli* wurden die auf diese Weise entstandenen Plasmide p423H7araA, p424H7araB und p425H7araD mit Hilfe der Restriktionsenzyme *PstI*, bzw. *BglI*, bzw. *EcoRI/SacI* überprüft und anschließend sequenziert. Für die spätere Konstruktion eines Plasmides, das alle drei Gene für den L-Arabinose Katabolismus enthält (s. 3.6.2) wurde außerdem ein Plasmid benötigt, das den *E. coli araB*-ORF zusammen mit dem *HIS3*-Markergen trägt. Dieses wurde nach demselben Prinzip wie die restlichen Vektoren konstruiert und mit p423H7araB benannt. Die Überprüfung erfolgte in dem Fall mit *KpnI*. Um zu untersuchen, ob die Enzyme des L-Arabinose Katabolismus aus *E. coli* aktiv in Hefe exprimiert werden konnten, wurde jeweils eines der Plasmide in den Stamm CEN.PK2-1C transformiert und es wurden Aktivitätsmessungen mit Rohextrakten dieser Transformanten durchgeführt (s. 2.31). Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Aktivitäten der heterolog exprimierten Enzyme aus *E. coli* in Hefe.

Die Einzelexpressionsstämme wurden über Nacht in synthetischem Komplettmedium ohne Histidin bzw. Tryptophan bzw. Leucin mit 2% Maltose herangezogen und geerntet. Anschließend wurden Rohextrakte hergestellt und die jeweilige Enzymaktivität bestimmt. Die Nachweisgrenze für die Aktivität der L-Arabinose Isomerase lag bei 0,1mU/mg Protein.

Gemessenes Enzym	Aktivität (U/ mg Protein)
<i>araA</i> (L-Arabinose Isomerase)	n. b.
<i>araB</i> (L-Ribulokinase)	0,70
<i>araD</i> (L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase)	0,13

Während die L-Ribulokinase und die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase erfolgreich mit hoher Aktivität in Hefe exprimiert werden konnten, zeigten die Trans-

formanten mit dem Plasmid p423H7araA keinerlei messbare L-Arabinose Isomerase-Aktivität. Allerdings ist es aufgrund des verwendeten Testsystems, mit dem die Enzymaktivität nicht quantitativ bestimmt werden konnte, möglich, dass eine geringe L-Arabinose-Isomerase-Aktivität vorhanden war, die jedoch unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 mU/mg Protein lag.

Ähnliches wurde von Sedlak und Ho (2001) berichtet, die ebenfalls in der Lage waren die *E. coli* L-Ribulokinase und L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase mit mehr als 70% der in Wildtyp *E. coli* Zellen gemessenen Aktivität in Hefe zu exprimieren. Zwar zeigte in diesem Fall die L-Arabinose Isomerase ebenfalls eine geringe Aktivität, jedoch betrug diese lediglich 10% der in *E. coli* gemessenen Aktivität.

3.1.4 Western-Blot-Analyse zur Expression einer 6x His-fusionierten L-Arabinose Isomerase aus *E. coli* in Hefe

Die fehlende Aktivität der L-Arabinose Isomerase in Hefezellen, die plasmid-kodiertes *E. coli* *araA* enthalten, kann mehrere mögliche Ursachen haben. Zum Beispiel kann eine mangelnde Expression des Genes ein Grund sein. Weitere mögliche Ursachen für einen Aktivitätsverlust könnten eine falsche Faltung des Proteins, posttranslationale Modifikationen, die Ausbildung inter- oder intramolekularer Disulfidbrücken, eine Instabilität des gebildeten Proteins in Hefe oder Ähnliches sein. Auch die Expression einer aktiven D-Xylose Isomerase in Hefe erwies sich aufgrund einiger der oben genannten Ursachen als problematisch (Amore *et al.*, 1989; Sarthy *et al.*, 1987). So war es bisher lediglich für die D-Xylose Isomerase aus *Thermus thermophilus* möglich, sie mit hoher Aktivität in Hefe zu exprimieren (Walfridsson *et al.*, 1996), wobei hier jedoch das sehr hohe Temperaturoptimum dieses Enzyms Schwierigkeiten bereitete.

Um herauszufinden, ob das *E. coli* *araA* Protein in Hefe gebildet wird, wurden zunächst 6 Histidin Kodons N-terminal mit dem offenen Leserahmen fusioniert (2.21). Hierzu wurde der *araA*-ORF mit den Primern A-F7-His und *araA*-R und dem Plasmid p423H7araA als DNA-Template PCR-amplifiziert, sowie mit dem 6xHis Epitop fusioniert und in einer zweiten PCR-Reaktion mit dem Primerpaar T7-1ORFs und T2-ORF weiter vermehrt. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem *HpaI/BamHI*-linearisierten Vektor p423HXT7-His in den Stamm CEN.PK2-1C transformiert. Nach homologer Rekombination des DNA-Fragmentes hinter den verkürzten *HXT7*-Promotor wurde das neu entstandene Plasmid p423H7araA-His aus der Hefe isoliert und nach Vermehrung in *E. coli* mit der Restriktionsendonuklease *NsiI* überprüft. Das als korrekt verifizierte Plasmid p423H7araA-His wurde erneut in den Stamm CEN.PK2-1C transformiert. Anschließend wurde das

araA Protein über Ni-NTA-Agarose-Säulen aufgereinigt (2.24) und nach Auftrennung durch SDS-Gelelektrophorese (2.26) in einer Western-Blot-Analyse (2.28) mit Hilfe eines Antikörpers gegen das 6x His-Epitop detektiert.

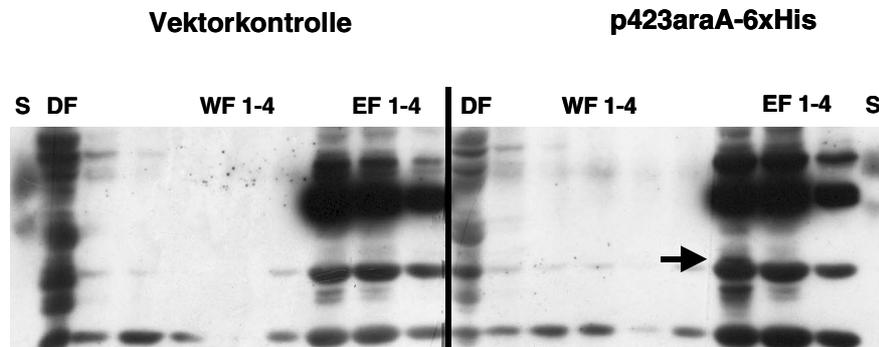


Abb. 8: Western-Blot-Analyse zur Expression von *E. coli* araA-6xHis. Der entweder mit einem leeren Plasmid (p423HXT7-His) oder mit dem Plasmid p423H7araA-6xHis transformierte Stamm CEN.PK2-1C wurde in YNB his⁻ mit 2% Maltose bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen. Die Zellen wurden geerntet und Proteinrohextrakte wurden hergestellt. Das araA-6xHis Protein wurde über Ni-NTA-Agarose-Säulen aufgereinigt und in einer Western-Blot-Analyse mit 6xHis-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. **S**= Standard, **DF**= Durchlaufraktion, **WF**= Waschfraktionen, **EF**= Elutionsfraktionen

Abb. 8 zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse. Da trotz der Aufreinigung der Rohextrakte über Ni-NTA-Agarose noch ein relativ starker Hintergrund von Proteinen vorhanden ist, ist eine eindeutige Aussage zur Expression von *E. coli* araA nicht möglich. Jedoch ist in Rohextrakten von Zellen mit der 6x His-markierten L-Arabinose Isomerase eine schwache Zusatzbande mit der erwarteten Größe von ca. 51 kDa zu erkennen, die möglicherweise das gesuchte Protein repräsentieren könnte. Die Tatsache, dass diese Bande nur sehr schwach ausgebildet ist, läßt vermuten, dass eventuell durch ineffiziente Translation der entsprechenden mRNA nur eine geringe Menge Protein gebildet wird oder das gebildete Protein unter den in der Hefe vorliegenden Bedingungen instabil ist. Dies wären mögliche Erklärungen für die fehlende bzw. von Sedlak und Ho (2001) beobachtete sehr niedrige Aktivität des Proteins in Hefe. Ebenfalls für diese Vermutung spricht, dass Sedlak und Ho (2001) mit Hilfe von RT-PCR eine effiziente Transkription des Genes in dem von ihnen verwendeten Hefestamm nachweisen konnten. Allerdings können andere Ursachen, wie oben beschrieben, nach wie vor nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der Tatsache, dass, wie unter 3.1.5 beschrieben, die Expression der L-Arabinose Isomerasen zweier anderer Organismen in funktionellen Enzymen resultierte, wurden jedoch zur Expression der *E. coli* Isomerase keine weiteren Untersuchungen angestellt.

3.1.5 Expression der L-Arabinose Isomerasen aus *Bacillus subtilis* und *Mycobacterium smegmatis* in Hefe

Da die funktionelle Expression der L-Arabinose Isomerase aus *E. coli* in Hefe nicht erfolgreich war, stellte sich die Frage, ob die Expression bakterieller L-Arabinose Isomerasen in Hefe ein generelles Problem darstellt. Bisher sind die Sequenzen zahlreicher Gene, die für L-Arabinose Isomerasen diverser Organismen kodieren, bekannt. Die L-Arabinose Isomerasen aus *Bacillus subtilis* und aus *Mycobacterium smegmatis* weisen unter den bekannten Sequenzen relativ geringe Ähnlichkeit zu dem Enzym aus *E. coli* auf. So ist die L-Arabinose Isomerase aus *B. subtilis* auf Aminosäureebene zu 52,9% (Sá-Nogueira *et al.*, 1997) und das Protein aus *M. smegmatis* zu 49% identisch zu derjenigen aus *E. coli* (NCBI). Um zu testen, ob die heterologe Expression eines dieser beiden Enzyme in Hefe in einer funktionellen L-Arabinose Isomerase resultiert, wurden die *araA*-ORFs aus beiden Organismen über *in vivo*-Rekombination hinter den verkürzten *HXT7*-Promotor jeweils in das Plasmid p423HXT7-His kloniert. Die offenen Leserahmen der Gene wurden dafür mit den Primern ABs-F7 bzw. AMs-F7 und ABs-R bzw. AMs-R aus dem Genom des *B. subtilis* Stammes DSM 1092 bzw. des *M. smegmatis* Stammes DSM 43078 PCR-amplifiziert und in einer zweiten PCR-Reaktion mit den Primern T7-1ORFs und T2-ORF weiter vermehrt. Die erhaltenen Produkte wurden zusammen mit dem *HpaI/BamHI*-linearisierten Vektor p423HXT7-His in Hefe transformiert und nach erfolgter homologer Rekombination isoliert. Die entstandenen Plasmide p423H7araABs und p423H7araAMs wurden nach Amplifizierung in *E. coli* durch Restriktion mit *PvuII* bzw. *PstI* überprüft und sequenziert. Jeweils eines der Plasmide wurde erneut in den Stamm CEN.PK2-1C transformiert und die Aktivitäten der heterolog exprimierten Enzyme wurden, wie unter 2.31.2 beschrieben, bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Aktivitäten der heterolog exprimierten L-Arabinose Isomerasen aus *B. subtilis* und *M. smegmatis* in Hefe. Die Einzelexpressionsstämme wurden über Nacht in synthetischem Kompletmedium *his⁻* mit 2% Maltose herangezogen und geerntet. Anschließend wurden Rohextrakte hergestellt und die jeweilige Enzymaktivität bestimmt.

Gemessenes Enzym	Aktivität (mU/ mg Protein)
<i>araA (B. subtilis)</i>	≥ 5
<i>araA (M. smegmatis)</i>	≥ 5

Beide heterolog exprimierten Enzyme zeigten eine zwar sehr niedrige, aber im Vergleich zu einer Negativkontrolle mit leerem Plasmid, oder zu dem Enzym aus *E. coli*, deutlich messbare Aktivität in Hefe. Da wie in 2.31.2 beschrieben eine

genaue Bestimmung der L-Arabinose-Aktivitäten mittels der verwendeten Meßmethode nicht möglich war, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die tatsächlichen Aktivitäten höher liegen, als hier berechnet.

3.1.6 Selektion eines L-Arabinose verwertenden Hefestammes

Nachdem die funktionelle Expression aller drei heterologen Enzyme eines prokaryontischen L-Arabinose Stoffwechselweges in Hefe erfolgreich war, sollte nun getestet werden, ob ein Hefestamm, der diesen Weg exprimiert, tatsächlich in der Lage ist mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Zu diesem Zweck sollte der Stamm CEN.PK2-1C mit den Überexpressionsplasmiden p423H7araABs (*HIS3*), das für die L-Arabinose Isomerase aus *B. subtilis* kodiert, sowie p424H7araB (*TRP1*) und p425H7araD (*LEU2*), die für die L-Ribulokinase bzw. die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase aus *E. coli* kodieren, transformiert werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor für die effiziente Verwertung eines Zuckers in Hefe ist jedoch der Transport desselben in die Zelle. Dies wird deutlich, wenn man beispielsweise die große Familie der Hexosetransporter in Hefe betrachtet (Kruckeberg *et al.*, 1996; Boles und Hollenberg, 1997). Eine Expression von Zuckertransportern mit verschiedenen Affinitäten zu ihrem Substrat (Reifenberger *et al.*, 1997) und verschiedenen Bedingungen unter denen sie exprimiert werden, ermöglicht der Hefe zu jeder Zeit eine optimale Aufnahmekapazität für Hexosen. Da die Hefe normalerweise nicht in der Lage ist, Pentosen zu verstoffwechseln, existieren für diese keine spezifischen Transporter, die den Transport in die Zelle vermitteln. Für Xylose ist kürzlich gezeigt worden, dass die Aufnahme in Hefe über verschiedene Hexosetransporter erfolgen kann (Hamacher *et al.*, 2002). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass auch L-Arabinose auf diesem Weg in die Zelle gelangen kann. Zusätzlich ist von der hefeeigenen Galaktose-Permease Gal2 bereits bekannt, dass sie in der Lage ist, L-Arabinose zu transportieren (Kuo *et al.*, 1970). Ein Überexpressionsplasmid, auf dem *GAL2* hinter dem starken *ADH1*-Promotor exprimiert wird, stand mit dem Plasmid pHL125 (Liang und Gaber, 1996) zur Verfügung. Dieses Plasmid wurde zusammen mit den funktionellen, für den L-Arabinose Stoffwechselweg kodierenden Plasmiden (siehe oben) in den Stamm CEN.PK2-1C transformiert. Der resultierende Stamm JBY24-4P wurde auf seine Fähigkeit, mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, getestet. In flüssigem, synthetischem Minimalmedium mit 2% L-Arabinose war jedoch kein Wachstum zu verzeichnen.

Aus diesem Grund sollte eine Selektion auf Wachstum mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt werden. Dazu wurden der Stamm

JBY24-4P sowie ein Stamm mit vier leeren Plasmiden (JBY24, nicht gezeigt) in flüssigem, synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% Arabinose, 0,1% Hefeextrakt und 0,2% Pepton inkubiert. Parallel wurde Stamm CEN.PK2-1C mit dem Gal2-Plasmid pHL125 sowie mit den drei Plasmiden, die alle drei L-Arabinose metabolisierenden Enzyme aus *E. coli* kodierten (inklusive der nicht funktionellen L-Arabinose Isomerase) transformiert (Stamm JBY24-4EP) und der gleichen Selektion unterzogen (nicht gezeigt). Die Inkubation erfolgte dabei über mehrere Wochen bei 30°C in Schüttelkolben, dabei wurden die Stämme sequentiell in frisches Medium überführt (Abb. 9).

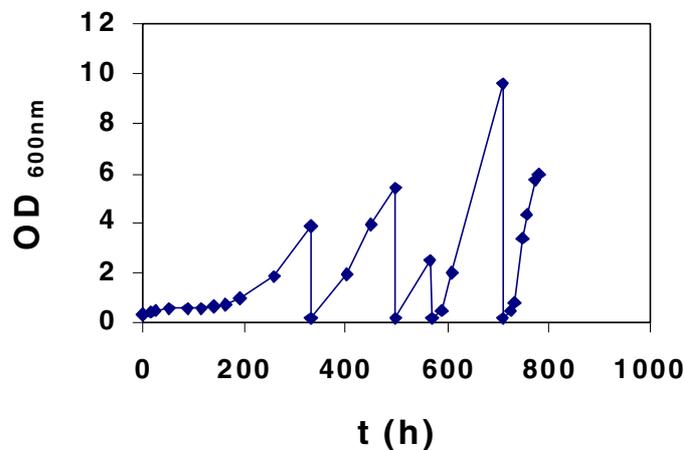


Abb. 9: Selektion des Stammes JBY24-4P auf Wachstum mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle durch sequentiellen Transfer. Der Stamm JBY24-4P wurde über Nacht in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose angezogen. Nach zweimaligem Waschen mit synthetischem Komplett-Selektivmedium 2% L-Arabinose, 0,1% Hefeextrakt und 0,2% Pepton wurden die Zellen mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,2 angeimpft. Über mehrere Tage hinweg wurden 2-3 Proben am Tag zur Bestimmung der OD₆₀₀ entnommen. Jeweils bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 2-3, bzw. später bis zu 10 wurden die Zellen erneut geerntet, gewaschen, erneut mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,2 in frisches Medium der selben Zusammensetzung überführt und weiter kultiviert.

Wie Abb. 9 zeigt, war zunächst keinerlei zusätzliches Wachstum der Stämme JBY24P oder JBY24EP im Vergleich zu dem Stamm mit den leeren Plasmiden messbar. Ein langsames Wachstum aller Stämme war jedoch aufgrund der Zugabe des Hefeextraktes und des Peptons möglich, da deren Inhaltsstoffe als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden konnten. Nach 8-10 tägiger Inkubation in diesem Medium begann Stamm JBY24-4P, nicht aber Stamm JBY24-EP oder der Stamm mit den leeren Plasmiden, langsam, aber stetig zu wachsen. Jedes Mal, wenn die Zellen eine OD₆₀₀ von 2-3, bzw. in späteren Selektionsschritten bis zu 10 erreicht hatten, wurden sie geerntet, gewaschen und in neues Medium derselben Zusammensetzung überführt. Die Wachstumsrate

stieg dabei mit jedem neuen Selektionsschritt kontinuierlich an, bis nach ca. 750 Stunden ein Stamm erzielt wurde, der in der Lage war relativ schnell, mit einer Verdopplungszeit von nur 8,5 Stunden, mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

Um nachzuweisen, dass das bessere Wachstum tatsächlich im Auftreten spontaner Suppressor-Mutationen begründet war und nicht das Ergebnis eines Adaptationsprozesses, wurden die Zellen für sieben Generationen in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose kultiviert. Anschließend wurden sie wieder in L-Arabinose Medium (synthetisches Komplett-Selektivmedium, 2% Arabinose) überführt. Nach einer kurzen lag-Phase zeigten die Zellen erneut ein schnelles Wachstum in diesem Medium, so dass ein Adaptationsprozess ausgeschlossen werden konnte. Eine reine Adaptation, die Hefen befähigt auf einer Kohlenstoffquelle zu wachsen, die sie ansonsten nicht verwerten können, haben zum Beispiel Quain und Boulton (1987) in Medium mit Mannitol oder Sorbitol als einziger Kohlenstoffquelle beobachtet. Sie hatten durch Selektion Hefestämme erhalten, die gut in Mannitol- bzw. Sorbitol-haltigem Medium wachsen konnten. Nach Inkubation auf Glukose-Medium hatten diese Stämme jedoch kein Wachstum mit Mannitol bzw. Sorbitol mehr gezeigt.

Einzelkolonien des selektierten Stammes wurden auf Agarplatten mit synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% Arabinose isoliert und eine der Kolonien wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt (Stamm JBY25-4M). Einen ersten Aufschluß über die Ursachen des besseren Wachstums des selektierten Stammes in L-Arabinose Medium sollte eine erneute Messung der Aktivitäten der heterolog exprimierten Enzyme in diesem Stamm im Vergleich zum Ausgangsstamm JBY24-4P liefern. Demzufolge wurden Rohextrakte von Zellen beider Stämme, wie in 2.31.1 beschrieben, hergestellt und die jeweiligen Enzymaktivitäten wurden bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass die Aktivitäten der L-Arabinose Isomerase und der L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase in beiden Stämmen vergleichbar waren, während überraschenderweise im selektierten Stamm JBY25-4M im Gegensatz zum Ausgangsstamm die Aktivität der L-Ribulokinase unter der Nachweisgrenze lag (Aktivität unter 0,01 U/mg Protein im selektierten Stamm verglichen mit 0,7 U/mg Protein in den Wildtyp Transformanten). Aufgrund der starken Hintergrundreaktion, die bei der Messung der Aktivität der L-Ribulokinase durch in den Rohextrakten enthaltene Kinasen ablief, muß jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Messungen nicht als quantitativ betrachtet werden können. Es ist also durchaus denkbar, dass die Aktivität der Kinase lediglich so stark reduziert

war, dass eine Messung mit dem verwendeten Testsystem in Proteinrohextrakten ohne Aufreinigung des Enzyms nicht mehr möglich war. Dieses Ergebnis war ein erster Hinweis darauf, dass ein entscheidender Faktor für eine effiziente Verwertung von L-Arabinose in Hefe die Aktivität der L-Ribulokinase zu sein scheint. Außerdem zeigte sich bei der Selektion, dass ein weiterer wichtiger Punkt für die Verstoffwechslung der L-Arabinose durch Hefe die L-Arabinose Isomerase ist. Anscheinend weist die L-Arabinose Isomerase aus *B. subtilis* signifikante Unterschiede zu derjenigen aus *E. coli* auf, da die Selektion eines L-Arabinose verwertenden Hefestammes, der die *E. coli* Isomerase exprimiert, nicht erfolgreich war.

3.2 Charakterisierung des Stammes JBY25-4M und seiner Mutationen

Spontane Mutationen, die bei der Selektion eines plasmidtransformierten Stammes durch den gegebenen Selektionsdruck entstehen, können zum einen im Genom des Stammes selber auftreten, oder zum anderen die plasmidkodierten Gene betreffen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass sich Mutationen im Genom des Stammes befinden, die sich jedoch auf die auf den Plasmiden befindlichen Gene auswirken. Um dies herauszufinden, ist es zunächst nötig, die Plasmide aus dem Stamm zu isolieren und dann beides getrennt voneinander zu analysieren.

Die Plasmide wurden aus dem Stamm JBY25-4M reisoliert, wie unter 2.8.2 beschrieben und in *E. coli* amplifiziert. Durch Restriktionsanalyse wurde jeweils bestimmt, um welches der Plasmide es sich handelte. Auf diese Weise wurde von jedem der ursprünglich in den Stamm CEN.PK2-1C transformierten Plasmide ein reisoliertes Plasmid (^{re}) erhalten. Zusätzlich wurde der selektierte Stamm JBY25-4M über mehrere Generationen in nicht selektivem YEP-Glukosemedium kultiviert. Anschließend wurden nach Replikaplattierung auf synthetischem Komplettmedium mit 2% Maltose jeweils entweder ohne Leucin oder Uracil oder Tryptophan oder Histidin solche Kolonien ausgewählt, die alle vier Plasmide verloren hatten. Der so von den Plasmiden „befreite“ Stamm wurde mit dem Namen JBY25 bezeichnet. Dieser Stamm zeigte ohne Plasmide kein Wachstum mehr in L-Arabinose-Medium (nicht gezeigt).

Um genau festlegen zu können, ob Mutationen im Genom des Stammes JBY25 aufgetreten waren, wurden alle vier reisolierten Plasmide gemeinsam in den Wildtypstamm CEN.PK2-1C transformiert, und das Wachstum der Transformanten (Stamm JBY24-4M) in L-Arabinose Medium wurde verfolgt. Sollten im

Verlauf der Selektion keine genomischen Mutationen aufgetreten sein, sondern nur solche auf den Plasmiden, sollte dieser Stamm ebenso gut mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können, wie der selektierte Stamm JBY25-4M.

Aufschluß darüber, ob Mutationen auf den Plasmiden vorlagen, sollte der von den Plasmiden „befreite“ Stamm JBY25 liefern. Dafür wurde er zum einen erneut mit den vier reisolierten Plasmiden (JBY25-4M) und zum anderen mit den vier ursprünglichen Plasmiden (JBY25-4P) transformiert. Anschließend wurde das Wachstum der Transformanten in L-Arabinose Medium untersucht. Sollten nur Mutationen im Genom des Stammes vorliegen, würde man erwarten, dass beide Stämme ein gleiches Wachstumsverhalten zeigen. Abb. 10 zeigt das Wachstumsverhalten der beschriebenen Stämme in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose im Vergleich zu dem nicht in L-Arabinose Medium wachsenden Wildtypstamm, der mit vier leeren Plasmiden transformiert war (JBY24).

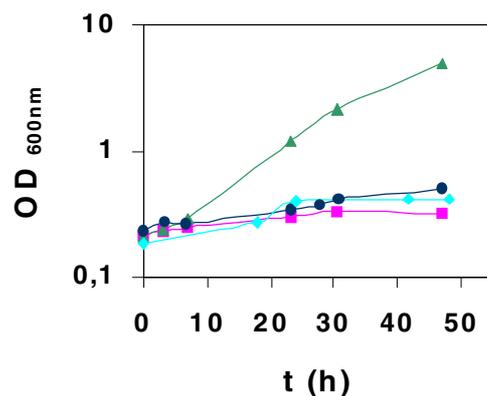


Abb. 10: Wachstum der Stämme JBY24 (■), JBY24-4M (●), JBY25-4M (▲) und JBY25-4P (◆) in flüssigem L-Arabinose Medium. Die Stämme wurden über Nacht in synthetischem Minimedium mit 2% Glukose herangezogen, zweimal mit synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose gewaschen und mit einer OD_{600} von ca. 0,2 in diesem Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte in Schüttelkolben bei 30°C. Zwei- bis dreimal am Tag wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen.

Es stellte sich heraus, dass der Wildtypstamm transformiert mit den reisolierten Plasmiden nur geringfügiges Wachstum in L-Arabinose Medium zeigte. Daraus ließ sich schließen, dass im Laufe des Selektionsverfahrens Mutationen im Genom des selektierten Stammes JBY25 aufgetreten sein mussten. Ebenso zeigte der selektierte Stamm transformiert mit den ursprünglichen Plasmiden (JBY25-4P) ein sehr viel schlechteres Wachstum, als wenn er mit den reisolierten

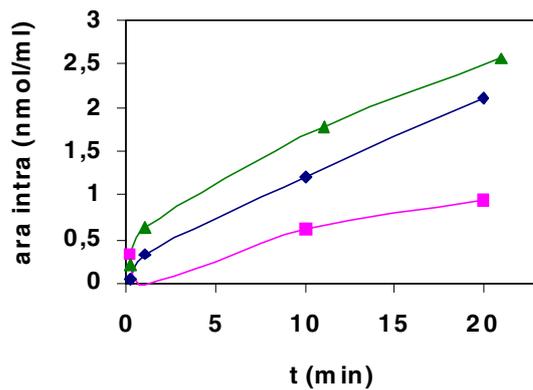
Plasmiden transformiert wurde (JBY25-4M). Dies ist ein deutliches Zeichen dafür, dass auch auf den Plasmiden während der Selektion Mutationen aufgetreten sind.

3.2.1 Notwendigkeit der einzelnen Plasmide für den L-Arabinose Katabolismus

Für die Einführung eines zusätzlichen Stoffwechselweges in Hefe ist es vorteilhaft möglichst wenige Enzyme zu exprimieren. Zum einen sind, wie bereits erwähnt, heterolog exprimierte Enzyme nicht immer funktionell in Hefe, zum anderen stellen mehrere gleichzeitig in einer Zelle vorhandene Plasmide, die für diese Enzyme kodieren, für die Zelle eine Belastung dar („Plasmid-Last“, Review zu *E. coli* von Bailey (1993)). Auch die Produktion der Enzyme selber, also die zusätzlich benötigte Proteinmenge, beeinflusst den gesamten Metabolismus der Zelle („Protein-Last“, Koch, 1983, Snoep *et al.*, 1995). Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob wirklich alle vier verwendeten Enzyme für den L-Arabinose Katabolismus benötigt werden. So besteht zum Beispiel die Möglichkeit, dass durch Enzyme, die von endogenen Hefegenen kodiert werden, und die normalerweise andere Funktionen innehaben, Intermediate des L-Arabinose Katabolismus ebenfalls umgesetzt werden können. Das heterolog exprimierte Enzym, das diese Reaktion katalysiert, würde dann nicht unbedingt benötigt werden. Es lag nahe, zunächst zu überprüfen, ob es möglich ist auf die *GAL2*-Überexpression zu verzichten, da mit großer Wahrscheinlichkeit L-Arabinose auch ohne Überexpression eines Transporters über die Hexosetransporter in die Hefe gelangen kann. In diesem Fall wäre die zusätzliche Expression eines Transporters nicht zwingend erforderlich, wenn der Transport der L-Arabinose in die Zelle nicht zu den limitierenden Schritten des L-Arabinose Katabolismus in Hefe zählt.

3.2.1.1 Einfluß der Gal2-Überexpression auf die L-Arabinose Aufnahme

Um dieser Frage nachzugehen, wurde zunächst untersucht inwieweit die zusätzliche Expression von Gal2 die Transportrate steigern kann. Außerdem sollte getestet werden, ob das reisolierte Gal2-Plasmid im Vergleich zu dem ursprünglichen Plasmid einen effektiveren Transport von L-Arabinose vermitteln kann. Dazu wurde der Wildtypstamm CEN.PK2-1C zum einen mit dem Plasmid pHL125 bzw. pHL125^{re} transformiert und zum anderen mit einem leeren Vektor als Negativkontrolle. Die L-Arabinose Aufnahmeaktivität aller drei Transformanten wurde bei einer Konzentration von 10 mM L-Arabinose über verschiedene Zeitspannen, bis zu 20 Minuten hinweg, gemessen (Abb. 11). Das angegebene V_{\max} bezieht sich dabei auf eine Messung der Aufnahme über eine Minute, da die Aufnahme mindestens über diesen Zeitraum hinweg linear verlief.



JBY25 transformiert mit Plasmid:	V_{\max} (nmol/min mg TG)
p426HXT7-His	0,01
pHL125	0,32
pHL125 ^{re}	0,63

Abb. 11: L-Arabinose-Aufnahme des Stammes CEN.PK2-1C transformiert mit den Plasmiden p426HXT7-His (■), pHL125 (◆) oder pHL125^{re} (▲). Die Transformanten wurden in synthetischem Komplettmedium mit 2% Maltose ohne Uracil bei 30°C bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = \text{ca. } 1$ herangezogen, geerntet, gewaschen und in Phosphat-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit radioaktiv markierter L-Arabinose inkubiert und die intrazelluläre Konzentration der markierten L-Arabinose, in zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Proben, wurde bestimmt.

Die L-Arabinose Aufnahme in einem Stamm mit zusätzlich exprimiertem Gal2 Transporter ist im Vergleich zu einem Stamm mit leerem Plasmid deutlich gesteigert. Wenn also der Transport einen limitierenden Einfluß auf den L-Arabinose Katabolismus hat, kann die Überexpression von Gal2 zu einer optimierten Verwertung des Zuckers beitragen. Eine noch mehr verbesserte L-Arabinose Aufnahme zeigen Transformanten, die das reisolierte Gal2-Plasmid exprimieren. Da jedoch keine Mutationen im *GAL2*-ORF des reisolierten Plasmides vorliegen, ist dieser Effekt vermutlich auf eine erhöhte Kopienzahl des Plasmides zurückzuführen (siehe 3.2.2). Zusätzlich wurden Aufnahmemessungen mit Transformanten des selektierten Stammes JBY25 mit den drei oben genannten Plasmiden durchgeführt. Dies sollte Aufschluß darüber liefern, ob der Stamm eventuell durch die Selektion erworbene, genomische Mutationen trägt, die einen Einfluß auf den L-Arabinose Transport im allgemeinen oder auf den durch Gal2 vermittelten Transport der Pentose haben. Jedoch konnte in diesen Transformanten keine signifikant höhere Aufnahme rate als im Wildtypstamm bestimmt werden (nicht gezeigt). Die Mutationen im Genom des selektierten Stammes scheinen also nicht im Zusammenhang mit dem L-Arabinose Transport zu stehen.

3.2.1.2 Einfluß der Expression der einzelnen reisolierten Plasmide auf das Wachstum in L-Arabinose Medium

Die gesteigerte L-Arabinose Aufnahmekapazität eines Stammes mit einem zusätzlich überexprimierten Transporter muß nicht zwangsläufig auch zu einem verbesserten Wachstum eines solchen Stammes in L-Arabinose Medium führen. Stellt der Transport in die Zelle nicht den limitierenden Schritt für die Verwertung des Zuckers dar, so ist das Wachstum auch durch einen effektiveren Transport nicht zu beeinflussen. Um die Bedeutung der einzelnen überexprimierten Enzyme und insbesondere die Notwendigkeit der Expression eines zusätzlichen Transporters zu untersuchen, wurden Wachstumstests mit Transformanten des Stammes JBY25 angestellt, bei denen jeweils eines der reisolierten Plasmide für den L-Arabinose Katabolismus ersetzt wurde durch ein leeres Plasmid. Das Wachstum der resultierenden Stämme JBY25-3M/423 mit fehlendem Isomerase-Plasmid, JBY25-3M/424, ohne Kinase-Plasmid, JBY25-3M/425 ohne Epimerase-Plasmid und JBY25-3M/426 ohne Transporter-Plasmid, in flüssigem L-Arabinose Medium wurde verfolgt. Als nicht wachsender Vergleichsstamm wurde erneut der Stamm JBY24 verwendet, als Kontrolle für gutes Wachstum Stamm JBY25-4M. Das Ergebnis der Messungen ist in Abb. 12 dargestellt.

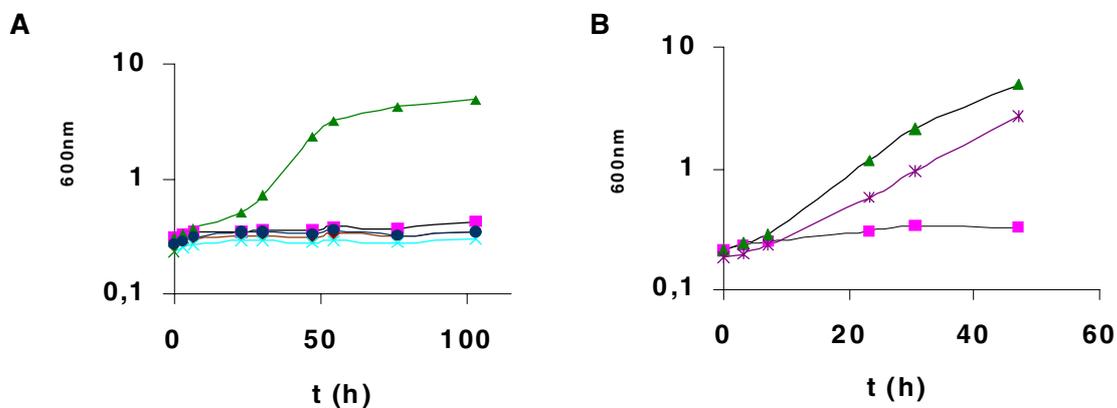


Abb. 12: Wachstum (A) der Stämme JBY25-3M/423 (◆), JBY25-3M/424 (×) und JBY25-3M/425 (●), sowie (B) des Stammes JBY25-3M/426 (*) im Vergleich zu Stamm JBY25-4M (▲) und Stamm JBY24 (■) in flüssigem L-Arabinose Medium. Die Zellen wurden über Nacht in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose herangezogen und nach zweimaligem Waschen in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose mit einer OD_{600} von ca. 0,2 in diesem Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte in Schüttelkolben bei 30°C. Zwei- bis dreimal am Tag wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen. Die dargestellten Ergebnisse wurden als repräsentativ unter mehreren unabhängigen Messungen ausgewählt.

Transformanten ohne heterolog exprimierte Isomerase, Kinase oder Epimerase, aber mit den drei anderen Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus zeigen

keinerlei Wachstum in flüssigem L-Arabinose Medium (Abb. 12 (A)). Diese drei Enzyme sind folglich absolut notwendig für die Verwertung der L-Arabinose in Hefe, so dass auf die Expression von keinem der drei heterolog exprimierten Enzyme verzichtet werden kann. Transformanten, denen die überexprimierte Galaktose Permease fehlt, sind in der Lage mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, jedoch sind die Wachstumsraten im Vergleich zu einem Stamm mit allen vier Enzymen des L-Arabinose Katabolismus leicht erniedrigt. Die Überexpression eines Transporters ist also nicht unabdingbar für das Wachstum in L-Arabinose Medium, kann es aber verbessern.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die zusätzliche Überexpression eines Transporters, der in der Lage ist L-Arabinose spezifisch zu transportieren, einen Vorteil für den L-Arabinose Katabolismus in Hefe bedeutet. Insofern sind alle vier exprimierten Enzyme notwendig, um einen Hefestamm zu erhalten, der möglichst optimal L-Arabinose verwerten kann. Auf der anderen Seite bedeutet die Expression mehrerer Plasmide gleichzeitig eine Belastung für den gesamten Metabolismus der Zelle („Plasmid-Last“, Bailey (1993)). Deshalb wurde für folgende Untersuchungen, bei denen der Einfluß zusätzlicher überexprimierter Gene auf den L-Arabinose Katabolismus getestet werden sollte, jeweils das Gal2 überexprimierende Plasmid ersetzt.

3.2.2 Analyse der reisolierten Plasmide aus Stamm JBY25-4M

Der in Abb. 10 gezeigte Wachstumstest hatte ergeben, dass in jedem Fall Mutationen auf den aus dem Stamm JBY25-4M isolierten Plasmiden aufgetreten sein mussten. Anhand weiterer Untersuchungen sollte nun geklärt werden, welche(s) der Plasmide davon betroffen war(en) und welcher Art die Mutationen genau waren. Um zunächst herauszufinden, auf welchem der reisolierten Plasmide sich Mutationen im Vergleich zu den ursprünglichen Plasmiden befanden, wurden wiederum einfache Wachstumstests durchgeführt. Der selektierte Stamm JBY25 wurde mit jeweils drei der reisolierten Plasmide transformiert, das jeweils vierte reisierte Plasmid wurde jedoch durch ein ursprüngliches Plasmid ersetzt. Auf diese Weise entstanden die Stämme JBY25-3M/TP^{ori}, mit einem ursprünglichen Transporter-Plasmid, JBY25-3M/I^{ori}, mit einem ursprünglichen Isomerase-Plasmid, JBY25-3M/K^{ori}, mit einem ursprünglichen Kinase-Plasmid und JBY25-3M/E^{ori}, mit einem ursprünglichen Epimerase-Plasmid. Das Wachstum dieser Stämme im Vergleich zu Stamm JBY25-4M und Stamm JBY24 ist in Abb. 13 dargestellt.

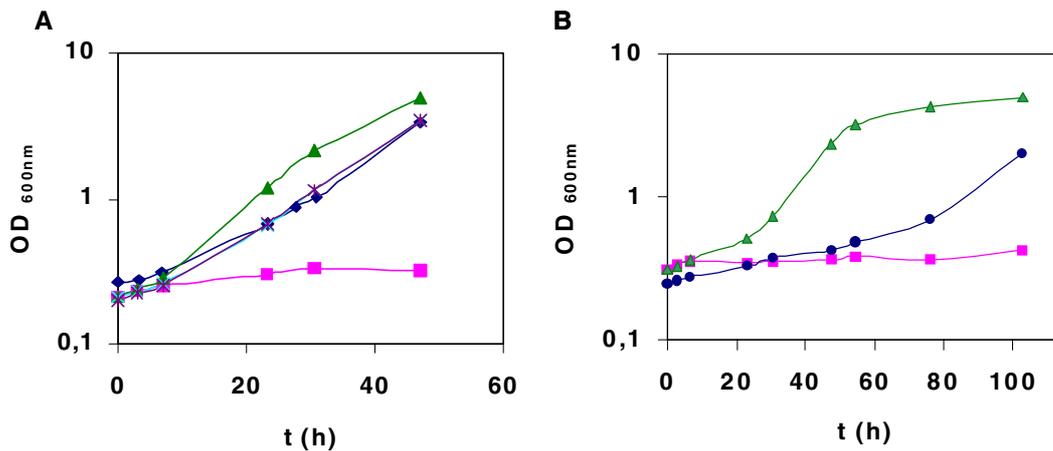


Abb. 13: Wachstumsverhalten in flüssigem L-Arabinose-Medium (A) der Stämme **JBY25-3M/TP^{ori}** (◆), **JBY25-3M/I^{ori}** (×), **JBY25-3M/E^{ori}** (✱) und **(B)** des Stammes **JBY25-3M/K^{ori}** (●) im Vergleich zu Stamm **JBY24** (■) und Stamm **JBY25-4M** (▲). Die Zellen wurden über Nacht in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose herangezogen, zweimal mit synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose gewaschen und mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,2 in diesem Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte in Schüttelkolben bei 30°C. Zwei- bis dreimal am Tag wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen. Die dargestellten Ergebnisse wurden als repräsentativ unter mehreren unabhängigen Messungen ausgewählt.

Im Gegensatz zu Transformanten mit einem ursprünglichen Kinase-Plasmid, weisen Transformanten mit einem ursprünglichen Transporter-, Isomerase-, oder Epimerase-Plasmid, anstelle des jeweiligen reisolierten Plasmides, nur eine leicht verlängerte lag-Phase im Vergleich zum Stamm JBY25-4M auf. Sequenzierungen der offenen Leserahmen, inklusive der Promotorregionen, zeigten jedoch keine Sequenzabweichungen zwischen den ursprünglichen und den reisolierten Plasmiden. Dies läßt vermuten, dass durch Mutationen in anderen Plasmidregionen zum Beispiel die Kopienzahl der reisolierten Plasmide im Vergleich zu den ursprünglichen Plasmiden verändert sein könnte. In folgenden Experimenten wurden jeweils die reisolierten Transporter-, Isomerase und Epimerase-Plasmide eingesetzt, da diese offensichtlich eine optimalere Verwertung der L-Arabinose gewährleisten.

Transformanten, die das ursprüngliche Kinase-Plasmid anstelle des reisolierten Plasmides exprimierten, zeigten im Vergleich zu Transformanten mit vier reisolierten Plasmiden ein deutlich schlechteres Wachstum in flüssigem L-Arabinose Medium. Dies deutet darauf hin, dass das reisierte Kinase-Plasmid eine Mutation mit größerem Einfluß auf das Wachstum auf L-Arabinose trägt (3.2.3).

3.2.3 Mutation der L-Ribulokinase

Eine Sequenzierung des *araB*-ORFs inklusive der *HXT7*-Promotorregion offenbarte tatsächlich eine Mutation der Base G₃₆₁ zu A₃₆₁ im offenen Leserahmen des Kinase-Gens. Daraus resultiert der Austausch eines Aspartat-Restes an Position 121 des entstandenen Proteins gegen einen Asparagin-Rest.

Die Vermutung lag nahe, dass die Mutation der L-Ribulokinase in irgendeiner Form die Struktur des Proteins beeinflusst, so dass seine katalytische Aktivität vermindert wird. Zum Beispiel könnte die Affinität zu dem Substrat (L-Ribulose) herabgesetzt sein, oder auch die Bindungsfähigkeit an ATP könnte beeinträchtigt werden. Die Möglichkeit, dass die L-Ribulokinase durch die Mutation komplett inaktiviert wird, konnte aufgrund der zuvor beschriebenen Beobachtung, dass ohne das reisolierte, die Kinase exprimierende Plasmid, kein Wachstum der Hefe in L-Arabinose Medium mehr vorhanden ist (s. 3.2.1.2), ausgeschlossen werden. Demzufolge mußte in jedem Fall noch eine niedrige Restaktivität des Enzyms vorhanden sein.

Für die L-Ribulokinase selber existiert noch kein Röntgenstrukturmodell, das Aufschluß über eventuelle Strukturveränderungen in der Mutante geben könnte. Jedoch lieferte die Protein Struktur Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) das Röntgenstrukturmodell der *E. coli* Glycerinkinase als verwandte Sequenz. Mit Hilfe der Cn3D Anwendung (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?form=6&db=t&Dopt=s&uid=12196>) konnte, wie in Abb. 14 dargestellt, gezeigt werden, dass sich der Austausch bei der Glycerinkinase in der konservierten Zuckerkinase Domäne befindet und zwar genauer gesagt in der Substratbindedomäne. Es ist deutlich zu erkennen, dass das gebundene ATP-Molekül zu weit von dem mutierten Rest entfernt ist, als dass dieser einen Einfluß auf die Bindung ausüben könnte. Das Glycerin-Molekül als Substrat hingegen befindet sich in unmittelbarer Nähe zu der ausgetauschten Aminosäure, so dass eine Wechselwirkung zwischen diesen beiden durchaus denkbar ist. Außerdem ist der entsprechende Aminosäurerest in dem Modell in direkter Nachbarschaft zu einem Tyrosin-Rest lokalisiert, von dem bekannt ist, dass er mit dem Substrat interagiert (Hurley *et al.*, 1993).

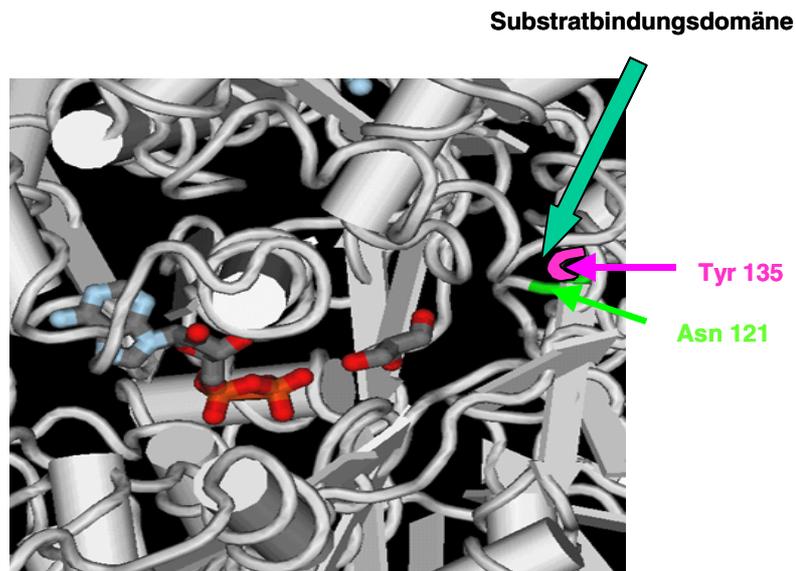


Abb. 14 : Ausschnitt eines Röntgenstrukturmodells der *E. coli* Glycerinkinase. Grün markiert ist der in der mutierten L-Ribulokinase ausgetauschte Rest dargestellt, pink der Tyrosin-Rest der Glycerinkinase, der mit dem Substrat Glycerin interagiert.

Aufgrund der Homologie der beiden Proteine und der starken Konservierung der betroffenen Domäne ist es wahrscheinlich, dass diese Angaben auch für die L-Ribulokinase zutreffen. Demzufolge könnte der Austausch des Aspartat-Restes 121 gegen einen Asparagin-Rest dazu führen, dass das Substrat L-Ribulose weniger effizient gebunden werden kann, also die Kinase eine reduzierte Affinität zu ihrem Substrat aufweist. Dies könnte wiederum die verminderte Aktivität der Kinase bewirken, da die L-Ribulose weniger effizient gebunden und phosphoryliert wird. Diese langsamere Umsetzung könnte das bessere Wachstum auf L-Arabinose Medium hervorrufen.

3.2.3.1 Expression der Wildtyp- und der mutierten L-Ribulokinase von einem Centromer-Plasmid

Von einem Centromer-Plasmid liegen nur ein bis zwei Kopien in der Zelle vor. Ein episomales 2 μ Plasmid hingegen liegt in den meisten *S. cerevisiae* Stämmen mit 50-100 Kopien vor (Kornberg und Baker, 1992), so dass normalerweise durch die Expression eines Enzyms von einem solchen Plasmid eine wesentlich höhere Aktivität des Enzyms erzielt wird. Demzufolge sollte die Expression sowohl der mutierten, als auch der Wildtyp-Kinase von Centromer-Plasmiden im selektierten Stamm JBY25 weiteren Aufschluß darüber liefern, ob tatsächlich eine erniedrigte Aktivität der L-Ribulokinase zu einem besseren Wachstum in L-Arabinose Medium führte.

Ein 2,1 kb großes DNA-Fragment mit dem *E. coli* *araB* bzw. *araB^{mut}*-ORF hinter dem verkürzten *HXT7*-Promotor, jedoch ohne Terminationsregion, wurde über

Restriktion mit *SacI/BamHI* aus dem Plasmid p424H7araB bzw. p424H7araB^{mut} ausgeschnitten. Dieses Fragment wurde über Ligation in den ebenso linearisierten Vektor YCplac33 kloniert. Die entstandenen Plasmide YCparaB und YCparaB^{mut} wurden mit der Restriktionsendonuklease *PvuII* kontrolliert. Anschließend wurde jeweils eines der Plasmide zusammen mit den anderen Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus in den Stamm JBY25 transformiert. Das Wachstum der daraus resultierenden Transformanten (Stamm JBY25-2M/CB bzw. JBY25-2M/CB^{mut}) in flüssigem synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose im Vergleich zu einem Stamm mit leeren Plasmiden (JBY24) und dem selektierten Stamm (JBY25-4M) wurde verfolgt. Das Ergebnis des Wachstumstests ist in Abb. 15 dargestellt.

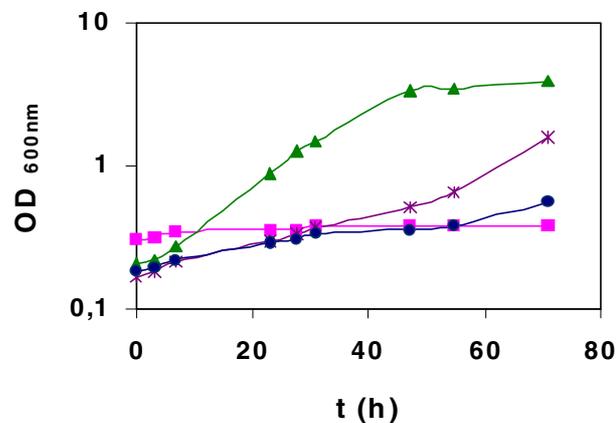


Abb. 15: Wachstum der Stämme JBY25-2M/CB (*), JBY25-2M/CB^{mut} (●), JBY25-4M (▲) und JBY24 (■) L-Arabinose Medium. Die Zellen wurden über Nacht in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose herangezogen und nach zweimaligem Waschen in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,2 in diesem Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte in Schüttelkolben bei 30°C. Zwei- bis dreimal am Tag wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen. Die dargestellten Ergebnisse wurden als repräsentativ unter mehreren unabhängigen Messungen ausgewählt.

Die Expression von Wildtyp *araB* von einem Centromer-Plasmid resultiert in deutlich besserem Wachstum der Transformanten in 2% L-Arabinose Medium, als die Expression von *araB*^{mut} von einem solchen Plasmid. Weiterhin zeigen Transformanten, die *araB*^{mut} von einem Centromer-Plasmid exprimieren, insgesamt nur ein sehr langsames Wachstum in L-Arabinose-Medium (Abb. 15). Diese Beobachtungen bestätigen zum einen, dass eine reduzierte Aktivität der L-Ribulokinase (im Vergleich zur Wildtyp-Kinase exprimiert von einem 2μ Plasmid) einen Wachstumsvorteil für die Hefe bewirkt. Zum anderen wird deutlich, dass die Aktivität der L-Ribulokinase sich in einem sehr engen Rahmen bewegen muß. Eine zu niedrige Aktivität, wie sie bei der Expression der mutierten L-Ribulokinase

von einem Centromer-Plasmid entsteht, wirkt sich wiederum negativ auf das Wachstumsverhalten der Transformanten aus. Insgesamt läßt sich feststellen, dass die Aktivität der L-Ribulokinase einen der entscheidenden Faktoren für das Wachstum der Hefe mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle darstellt.

3.2.3.2 Aufreinigung und Kinetik der mutierten und der Wildtyp

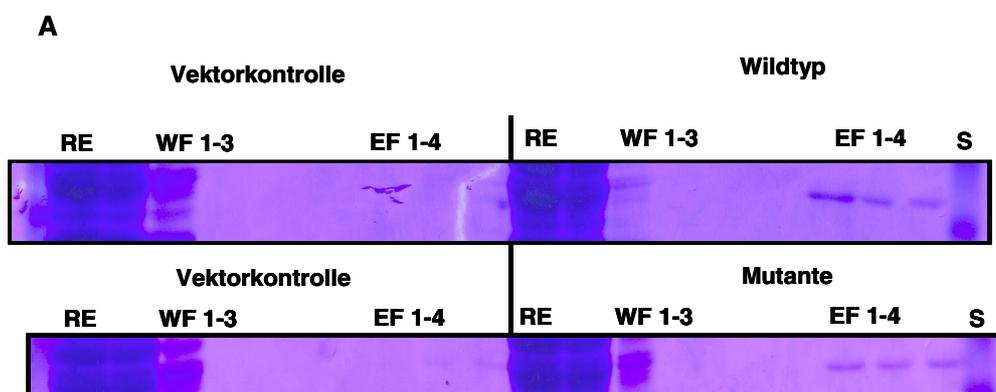
L-Ribulokinase

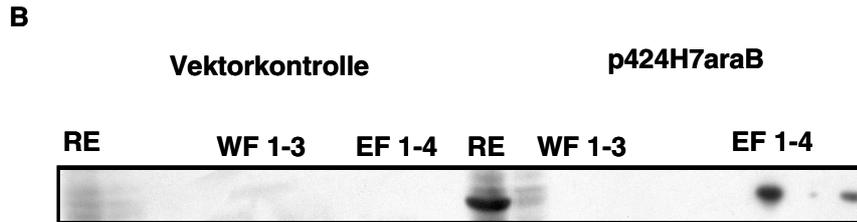
Um zu bestätigen, dass die verminderte Aktivität der mutierten L-Ribulokinase durch eine niedrigere Affinität zum Substrat L-Ribulose hervorgerufen wird, sollten quantitative Enzymmessungen und Kinetikbestimmungen, sowohl mit dem Wildtyp- als auch mit dem mutierten Protein, durchgeführt werden. Dazu wurden zunächst N-terminal mit 6 Histidin Kodons fusionierte, markierte Versionen beider Enzyme konstruiert, womit eine Aufreinigung ermöglicht wurde. Der offene Leserahmen der Wildtyp-Kinase wurde durch eine PCR-Reaktion mit den Primern araBhis, araB-R/T2-ORF und mit dem Plasmid p424H7araB als DNA-Template amplifiziert und mit dem für das 6x His-Epitop kodierenden Bereich fusioniert. Anschließend wurde das erhaltene DNA-Fragment aufgereinigt und zusammen mit dem durch Restriktion mit *Pst*I/*Spe*I linearisierten Vektor p424HXT7-His in Hefe transformiert. Nach *in vivo*-Rekombination des WTaraB-6xHis-Genes hinter den verkürzten HXT7-Promotor des Vektors wurde das neu konstruierte Plasmid p424H7araB-his aus der Hefe isoliert und in *E. coli* amplifiziert. Eine mit dem 6x His-Epitop fusionierte Version der mutierten Kinase wurde nach dem selben Prinzip hergestellt. Die Mutation im ORF der mutierten Kinase wurde jedoch bei der Amplifizierung des offenen Leserahmens mit Hilfe zweier mutagener Primer (Mut1araB/Mut2araB) künstlich eingefügt, um sicherzustellen, dass tatsächlich diese Mutation die Ursache für den veränderten Phänotyp darstellte. Hierzu wurde der offene Leserahmen der Kinase per PCR in Form von zwei verschiedenen PCR-Fragmenten, zum einen mit den Primern araB-his und Mut2araB und zum anderen mit den Primern Mut1araB, araB-R/T2-ORF, amplifiziert. Die 35 bp umfassenden Oligonukleotide Mut1araB und Mut2araB sind komplett zueinander komplementär und binden im ORF der Kinase ab 341 Basen nach dem ATG. Sie enthalten etwa in der Mitte ihrer Sequenz die ausgetauschte Base der mutierten Kinase. Beide PCR-Produkte und der linearisierte Vektor wurden zusammen in Hefe transformiert und über *in vivo*-Rekombination rekombinierten zum einen die beiden Fragmente miteinander, so dass der gesamte araB^{mut}-ORF entstand, als auch die Fragmente mit dem Vektor. Auf diese Weise wurde der araB^{mut}-ORF hinter den verkürzten HXT7-Promotor kloniert. Die erhaltenen Plasmide p424H7araB-his und p424H7araB^{mut}-his wurden durch Restriktion mit *Nsi*I überprüft, sowie in den Stamm JBY25 transformiert und anhand von

Wachstumstests auf ihre Funktionalität getestet (nicht gezeigt). Beide Enzyme vermittelten denselben Phänotyp wie die nicht markierten Varianten. Das heißt, dass Stamm JBY25 transformiert mit den Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus und dem Plasmid p424H7araB-his nur sehr schlechtes Wachstum in flüssigem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose zeigten, während Transformanten, die stattdessen p424H7araB^{mut}-his exprimierten, sehr gut in diesem Medium wachsen konnten (nicht gezeigt). Also konnte davon ausgegangen werden, dass die Fusion mit dem 6x His-Epitop keine signifikante Veränderung der Eigenschaften der Enzyme zur Folge hat.

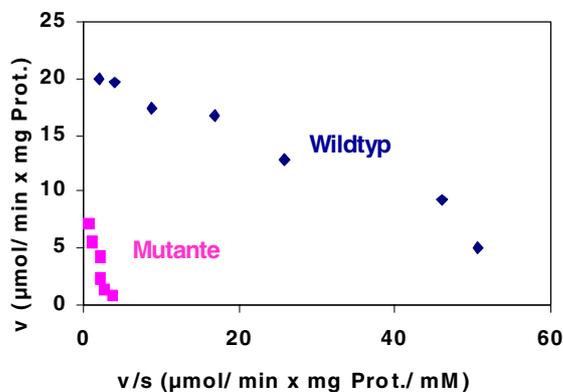
Anschließend wurden Rohextrakte von Transformanten des Stammes JBY25, die jeweils eines der Plasmide exprimierten, hergestellt und die markierten Kinase-Proteine über Ni-NTA-Agarose-Säulen aufgereinigt (2.24). Die aufgereinigten Proteine wurde über SDS-Page-Gelelektrophorese (2.26) aufgetrennt und mittels einer Coomassie-Blau-Färbung (2.27) im Gel angefärbt (Abb. 16-A). Um sicherzugehen, dass die erhaltenen Banden mit der erwarteten Größe von ca. 61 kDa tatsächlich den aufgereinigten L-Ribulokinasen entsprechen wurden zusätzlich Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen das 6x His-Epitop durchgeführt und so die Proteine detektiert (WT Kinase: Abb. 16-B, für die mutierte Kinase nicht gezeigt). Beide Proteine konnten mit einem hohen Reinheitsgrad aufgereinigt werden.

Abb. 16: (A) Coomassie-Färbung der aufgereinigten L-Ribulokinasen. Mit dem Plasmid p424H7araB-His bzw. p424H7araB^{mut}-His transformierte Zellen des Stammes JBY25 wurden über Nacht in synthetischem Komplettmedium mit 2% Maltose ohne Tryptophan herangezogen, aufgeschlossen und es wurden Proteinrohextrakte hergestellt. Diese wurden nach Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose-Säulen in einer SDS-Page-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Blau angefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. **RE=** Rohextrakt, **WF=** Waschfraktion, **EF=** Elutionsfraktion, **S=** Standard **(B) Western Blot-Analyse der Wildtyp L-Ribulokinase.** Nach einer weiteren SDS-Page-Gelelektrophorese wurde das Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das 6x His- Epitop detektiert.





Mit den aufgereinigten Proteinextrakten (vereinigte Elutionsfraktionen 2-4) wurden quantitative Enzymmessungen durchgeführt und so die kinetischen Parameter der Enzyme bestimmt. Hierfür wurden die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme bei verschiedenen Substratkonzentrationen von 0,1 mM bis zu 10 mM L-Ribulose gemessen. Die Ergebnisse der Enzymtests sind in Abb. 17 dargestellt.



JBY25 transformiert mit Plasmid:	V_{\max} ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg Protein^{-1})	K_m (mM)
p424H7araB-His	20	0,3
p424H7araB ^{mut} -His	8	1,5

Abb. 17: Eadie Hofstee Plot der L-Ribulose Umsetzung der Wildtyp- und der mutierten L-Ribulokinase. Der mit dem Plasmid p424H7araB-His (◆) bzw. p424H7araB^{mut}-His (■) transformierte Stamm JBY25 wurde über Nacht in synthetischem Komplettmedium mit 2% Maltose ohne Tryptophan angezogen und es wurden Rohextrakte hergestellt. Nach Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose Säulen wurden die Elutionsfraktionen 2-4 vereinigt und quantitative Enzymtests durchgeführt.

Die Bestimmung der Kinetiken der L-Ribulokinase ergab einen stark erhöhten K_m -Wert von $1,5 \text{ mM min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für die mutierte Kinase, im Gegensatz zu $0,3 \text{ mM min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ für das Wildtyp-Protein. Wie postuliert ist also die Affinität der Kinase zu ihrem Substrat L-Ribulose deutlich erniedrigt und so die Aktivität, unter den in der Zelle vorherrschenden Substratkonzentrationen, verringert. Der für die Wildtyp-Kinase bestimmte K_m -Wert stimmt gut überein mit Messungen von Lee *et al.* (2001), die für die *E. coli* L-Ribulokinase einen K_m -Wert von 0,14 mM mit L-Ribulose als Substrat bestimmen konnten. Außerdem zeigt die mutierte Kinase ein reduziertes V_{\max} von nur 8 mM im Vergleich zu 20 mM für die Wildtyp-Kinase. Zusätzlich arbeitet das Enzym also wesentlich langsamer als das Wildtyp-Enzym. Beide Faktoren gemeinsam bedingen anscheinend das

verbesserte Wachstum in L-Arabinose Medium von Zellen, die die mutierte Kinase anstelle des Wildtyp-Enzyms exprimieren.

Die Beobachtung, dass die spezifisch reduzierte Aktivität der L-Ribulokinase so wichtig für die effiziente Verwertung von L-Arabinose ist, stimmt dabei überein mit einer kürzlich veröffentlichten theoretischen Abhandlung. So konnten Teusink *et al.* (1998a) zeigen, dass katabolische Stoffwechselwege, die mit einem ATP-verbrauchenden Aktivierungsschritt beginnen, um jedoch in späteren Schritten einen Überschuß an ATP zu produzieren, eine in einem bestimmten Rahmen liegende Aktivität der anfänglichen, phosphorylierenden Enzyme benötigen.

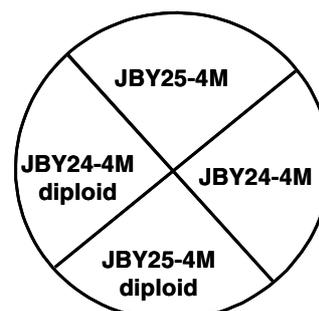
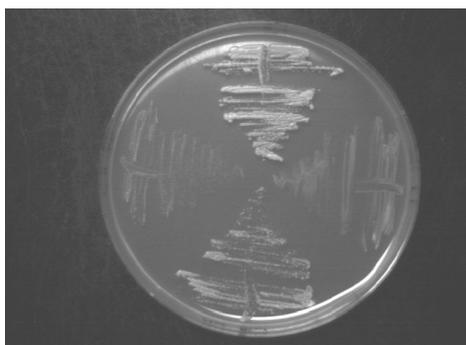
3.2.4 Charakterisierung der genomischen Mutationen des Stammes JBY25

Anhand der in Abb. 10 gezeigten Wachstumsuntersuchungen konnte geschlossen werden, dass nicht nur plasmidkodierte Mutationen für das bessere Wachstum des selektierten Stammes JBY25-4M in L-Arabinose Medium verantwortlich sein konnten. Demzufolge müssen in jedem Fall auch eine oder mehrere genomische Mutationen durch das Selektionsverfahren entstanden sein. Das Ziel der folgenden Untersuchungen war die Identifizierung dieser genomischen Mutationen.

3.2.4.1 Kreuzungsanalyse

Zunächst sollte bestimmt werden, ob es sich bei der oder den genomischen Mutationen um dominante oder rezessive Mutationen handelt. Hierfür wurden sowohl der mit den vier Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus transformierte mutierte Stamm (JBY25-4M), als auch als Kontrolle der plasmidtransformierte parentale Ausgangsstamm (JBY24-4M) mit dem korrespondierenden Wildtypstamm des anderen Paarungstyps gekreuzt (EBY159B, s. 2.23). Der Wachstumsphänotyp der resultierenden diploiden Stämme wurde auf Agarplatten mit synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose, sowie in flüssigem, synthetischem Komplett-Selektivmedium derselben Zusammensetzung untersucht (Abb. 18 (A) und (B)).

A



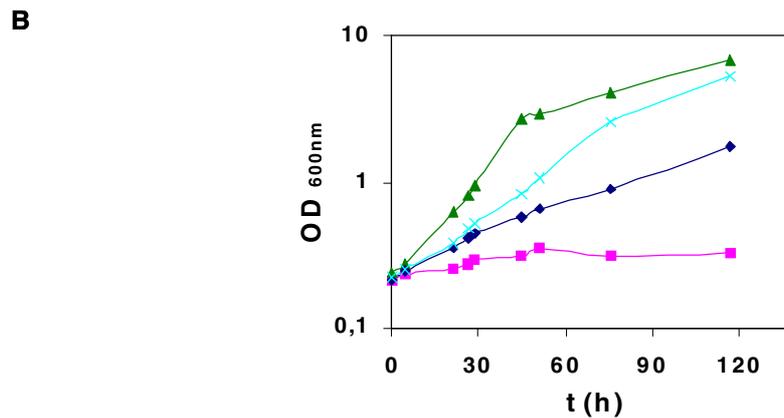


Abb. 18: Wachstumsphänotypen des heterozygot diploiden mutierten Stammes und eines diploiden Wildtypstammes mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle. (A) Wachstum der diploiden Stämme im Vergleich zu dem haploiden Stamm JBY25-4M, sowie dem haploiden Stamm JBY24-4M auf Agarplatten. Die Zellen wurden für 5 Tage bei 30°C auf synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose inkubiert. **(B)** Wachstum der Stämme JBY25-4M diploid (×), JBY24-4M diploid (◆), im Vergleich zu den Stämmen JBY25-4M haploid (▲) und JBY24-4M haploid (■). Die Zellen wurden über Nacht in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose herangezogen und nach zweimaligem Waschen in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose mit einer OD_{600} von ca. 0,2 in diesem Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte in Schüttelkolben bei 30°C. Zwei- bis dreimal am Tag wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen.

Wie in Abb. 18 dargestellt, ist anhand des Wachstumsverhaltens des diploiden mutierten Stammes keine eindeutige Aussage möglich, ob es sich bei den mutierten Allelen um (eine) dominante oder rezessive Mutation(en) handelt. Das Wachstum des Stammes in L-Arabinose Medium ist nicht so gut wie das des haploiden mutierten Stammes, aber auch nicht so schlecht wie das des diploiden Wildtypstammes. Aufgrund dieses Phänotyps liegt die Vermutung nahe, dass mehrere Mutationen im Genom des Stammes JBY25 vorliegen, wovon eine oder mehrere einen dominanten Phänotyp haben und eine oder mehrere andere einen rezessiven Phänotyp. Im Falle der dominanten Mutation(en) unterdrückt das mutierte Allel den rezessiven Phänotyp des Wildtypallels, wodurch ein besseres Wachstum in L-Arabinose Medium vermittelt wird. Auf der anderen Seite werden die rezessiven Mutationen durch die dominanten Wildtypallele überlagert. Dadurch kommt ein schlechteres Wachstum des diploiden Stammes mit L-Arabinose Medium zustande. Beides zusammen liefert die Grundlage für das intermediäre Wachstum des diploiden mutierten Stammes.

3.2.4.2 Tetradenanalyse

Um festzustellen, ob eine oder mehrere Mutationen im Genom des mutierten Stammes vorliegen und ob diese auf demselben oder auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, wurde der diploide mutierte Stamm auf 2%

Kaliumacetat sporuliert und eine Tetradenanalyse (2.23) mit den resultierenden Sporen angestellt. Jedoch konnten aufgrund der Tatsache, dass die in dem diploiden Stamm enthaltenen Plasmide häufig während der Sporulation auf Kaliumacetat falsch verteilt wurden, oder bei der Anzucht der Sporen auf Vollmedium verloren gingen, nur zwei Tetraden mit allen Plasmiden erhalten und für eine Auswertung herangezogen werden. Dennoch läßt sich anhand der Ergebnisse die Aussage treffen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit mehrere Mutationen im Genom des mutierten Stammes vorliegen, denn es trat bei diesen kompletten Tetraden kein 2:2 Aufspaltungsverhältnis zwischen den auf L-Arabinose Medium wachsenden und den nicht wachsenden Sporen auf (nicht gezeigt). Da das Verhalten der diploiden Stämme ebenfalls für das Vorhandensein mehrerer Mutationen spricht, kann also von verschiedenen Mutationen im Genom des mutierten Stammes JBY25, als Anpassung im Hinblick auf eine optimierte Verwertung der Pentose L-Arabinose, ausgegangen werden.

3.2.4.3 Suche nach dominanten mutanten Allelen mit einer Genbank des Stammes JBY25

Zur Identifizierung der dominanten Mutationen des Stammes JBY25 wurde, wie unter 2.19 beschrieben, zunächst eine Genbank dieses Stammes hergestellt. Dafür wurde genomische DNA isoliert, mit *Sau3A* partiell verdaut und die DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 5 und 10 kb aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend wurden diese Fragmente über Ligation in den mit Hilfe von *Bam*HI linearisierten Vektor YCplac33 kloniert. Die so erhaltene Genbank wurde in *E. coli* amplifiziert und dann zusammen mit den drei Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus, jedoch ohne das Gal2-Plasmid, in den Wildtypstamm CEN.PK2-1C transformiert. Die Transformanten wurden zunächst auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose auf das Vorhandensein aller vier Plasmide selektiert. Nach Replikplattierung auf synthetisches Komplet-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose wurden solche Kolonien ausgewählt, die wieder in der Lage waren mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle effizient zu wachsen. Als Kontrolle für Wachstum wurde dabei der Stamm JBY25-4M herangezogen, als Negativkontrolle dienten solche Transformanten, die anstelle eines Genbankplasmides einen leeren Vektor mit dem *URA3*-Markergen exprimierten (JBY24-3M/426). Von insgesamt mehr als 300.000 erhaltenen Transformanten waren ca. 160 durch das aufgenommene Genbank-Plasmid wieder in der Lage gut auf den L-Arabinose haltigen Agarplatten zu wachsen. Diese besser wachsenden Kolonien wurden durch Plattierung auf synthetischem Komplet-medium mit 2% Maltose ohne Leucin, Tryptophan und Histidin und mit Zusatz von 1 mg/ml 5`FOA auf einen Verlust des Genbank-Plasmides selektiert. Bei erneuter

Plattierung auf L-Arabinose Medium waren sie nicht mehr in der Lage gut auf diesem Medium zu wachsen. Dadurch wurde sichergestellt, dass das zuvor beobachtete bessere Wachstum tatsächlich durch das jeweilige Genbank-Plasmid bedingt war. Die enthaltenen Plasmide wurden aus den besser wachsenden Kulturen isoliert und die verschiedenen großen Inserts von fünf der Genbank-Plasmide wurden sequenziert. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass alle fünf Plasmide überlappende Teile einer bestimmten Region des Hefegenoms enthielten. Auf allen Plasmiden war als einziges komplettes Gen das *TAL1*-Gen vorhanden, das für die Transaldolase kodiert (Schaaff *et al.*, 1990).

Bei Tal1 handelt es sich um ein Enzym des nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatweges, das die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Sedoheptulose-7-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat katalysiert (s. Abb. 19). Es wurde vermutet, dass bei der Fermentation von Xylose und Xylulose die Verwertung der Pentosephosphatweg-Metabolite einen Engpass darstellt. Dabei sollen die durch die Transaldolase und die Transketolase vermittelten Reaktionen die flukontrollierenden Faktoren darstellen (Ciriacy und Porep, 1986; Senac und Hahn-Hägerdal, 1991). Während die Überexpression des für die Transketolase kodierenden Gens *TKL1* jedoch keinen Effekt auf das Wachstum auf Xylose eines Xylose-verwertenden *S. cerevisiae* Stammes hatte, bewirkte die Überexpression von *TAL1* in demselben Stamm ein deutlich verbessertes Wachstum auf diesem Zucker (Walfridsson *et al.*, 1995). Auch die Überexpression des Transketolase kodierenden Gens aus *Pichia stipitis* (*TKT*) konnte keinen Wachstumsvorteil für einen *S. cerevisiae* Stamm mit integrierten *XYL1* und *XYL2* Genen erbringen (Metzger und Hollenberg, 1994).

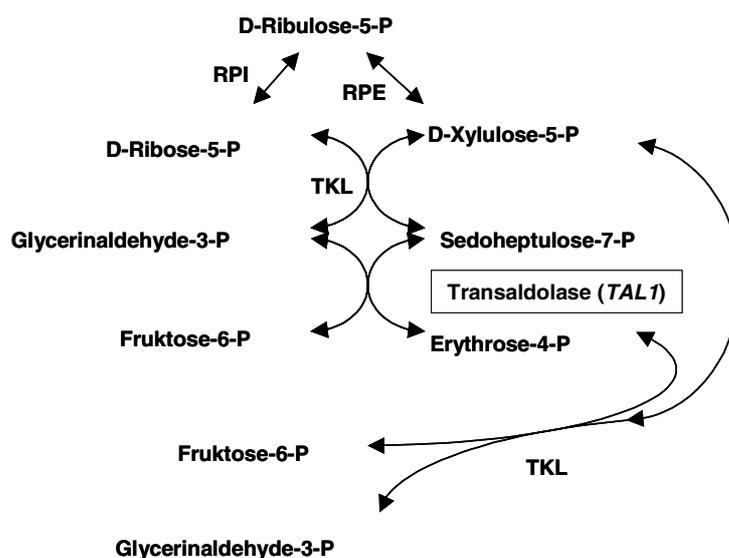


Abb. 19: Reaktionen des nicht-oxidativen Teils des Pentosephosphatweges

Diese Beobachtungen zusammen mit der Identifizierung des *TAL1*-ORFs auf den sequenzierten Genbank-Plasmiden legen den Schluß nahe, dass auch bei der Verwertung von L-Arabinose der Transaldolase-katalysierte Schritt limitierend ist. In Bezug auf die ursprüngliche Fragestellung, nämlich die Auffindung der dominanten Mutationen im Genom des Stammes JBY25, ließ dieses Ergebnis des Genbank-Screens jedoch keine Rückschlüsse zu. Das durch das Genbank-Plasmid bedingte bessere Wachstum der ausgewählten Hefekolonien konnte zum einen durch einen einfachen Überexpressions-Effekt des auf den Plasmiden enthaltenen *TAL1*-ORFs verursacht sein. Auf der anderen Seite konnte aber auch tatsächlich im Genom des mutierten Stammes eine Mutation im *TAL1*-ORF entstanden sein, die entweder eine höhere Aktivität des Enzyms mit sich bringt, oder aber verhindert, dass ein Repressor, der sonst die Transkription des Enzyms beeinflusst, angreifen kann.

Eine Sequenzierung des *TAL1*-Gens, inklusive der flankierenden Regionen, im Wildtypstamm im Vergleich zum *TAL1*-Gen des mutierten Stammes JBY25 zeigte keine Sequenzunterschiede. Das beobachtete bessere Wachstum der Transformanten, die *TAL1* von den Genbank-Plasmiden exprimierten, war demzufolge nicht auf eine Mutation im *TAL1*-ORF oder in seinem Promotorbereich zurückzuführen, sondern war bedingt durch die zusätzliche Kopie des Gens auf dem Genbank-Plasmid.

3.2.5 Effekt einer zusätzlichen Kopie von *TAL1* auf einem Centromer-Plasmid

Um zu bestätigen, dass keine der *TAL1* auf den Genbank-Plasmiden umgebenden, genomischen Regionen noch einen Einfluß auf das Wachstum der Transformanten auf L-Arabinose Medium hatte, wurde zunächst ein neues Centromer-Plasmid konstruiert, das nur das *TAL1*-Gen inklusive Promotor und Terminationsbereich enthielt. Damit sollte außerdem genauer bestimmt werden, wie groß der Effekt einer zusätzlichen *TAL1*-Kopie auf das Wachstum der L-Arabinose verwertenden Hefen ist. Dies wurde im Vergleich zu dem selektierten Stamm bestimmt, der die Plasmide für die L-Arabinose Verwertung inklusive des *GAL2* exprimierenden Plasmides trägt (JBY25-4M). Zu diesem Zweck wurde das *TAL1*-Gen mitsamt der Promotorregion von -736 Basen vor dem Start-ATG und dem Terminationsbereich bis 434 Basen nach dem Stop Kodon durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden TAL1-f2 und Tal1-r2 aus dem Genom des Stammes CEN.PK2-1C amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde zusammen mit dem *Bam*HI/*Sal*I-linearisierten Vektor YCplac33 in Hefe transformiert. Nach *in vivo*-Rekombination des *TAL1*-Gens in den Vektor wurde das

entstandene Plasmid YCpTAL1 aus der Hefe isoliert und in *E. coli* amplifiziert. Die Überprüfung erfolgte durch Restriktion mit *Scal*. Das Plasmid wurde zusammen mit den Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus in den Stamm CEN.PK2-1C transformiert. Das Wachstum der resultierenden Transformanten (Stamm JBY24-3T) in flüssigem, synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose wurde im Vergleich zu einem Stamm mit leeren Vektoren (JBY24) und zum Stamm JBY25-4M beobachtet (Abb. 20).

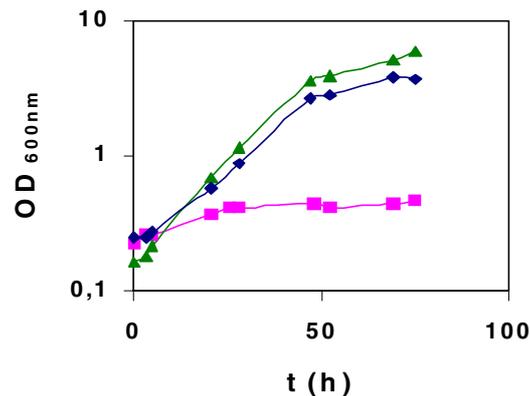


Abb. 20: Wachstum des Stammes JBY24-3T (◆) im Vergleich zu den Stämmen JBY25-4M (▲) und JBY24 (■) in flüssigem L-Arabinose Medium. Die Zellen wurden über Nacht in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose herangezogen und nach zweimaligem Waschen in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,2 in diesem Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte in Schüttelkolben bei 30°C. Zwei- bis dreimal am Tag wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen.

Die *TAL1* zusätzlich von einem Centromer-Plasmid exprimierenden Transformanten zeigten ein nahezu ebenso gutes Wachstum in flüssigem L-Arabinose Medium, wie der Stamm JBY25-4M. Außerdem zeigten Messungen im Stamm JBY24-3T und JBY25-4M, dass die Transaldolase-Aktivitäten in beiden Stämmen vergleichbar sind, wenn auch der Stamm JBY24-3T eine etwas höhere Aktivität zeigt (s. Tab. 10). Die geringe Überexpression von *TAL1*, zusammen mit den Genen für die Metabolisierung der L-Arabinose bis zum D-Xylulose-5-Phosphat, scheint also schon ausreichend zu sein, um einen effizient L-Arabinose verwertenden Stamm zu erhalten. Aufgrund dieser Beobachtung stellte sich die Frage, ob eine zusätzliche Expression des *TAL1* kodierenden Centromer-Plasmides im Stammhintergrund des selektierten Stammes JBY25 eine verbesserte Umsetzung der L-Arabinose zur Folge hätte. Um das zu testen, wurde der Stamm JBY25 mit den drei Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus ohne das *GAL2*-Plasmid, dafür aber mit dem Plasmid YCpTAL1 transformiert. Auch in diesem Fall wurde das Wachstum der Transformanten in

flüssigem, synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose und im Vergleich zu den oben genannten Stämmen getestet. Die zusätzliche Überexpression von *TAL1* im Stamm JBY25 hatte jedoch keinen Effekt auf das Wachstum der Transformanten in L-Arabinose Medium (nicht gezeigt).

3.3 Überexpression von *TAL1*

Das gute Wachstum, das Transformanten des Wildtypstammes zeigten, die die Plasmide für den L-Arabinose Katabolismus, sowie eines der für *Tal1* kodierenden Genbank-Plasmide trugen, war, wie oben dargestellt, nicht verursacht durch eine Mutation des *TAL1*-Gens im Stamm JBY25. Der beobachtete Phänotyp resultierte hingegen aus der Überexpression von *TAL1* durch die zusätzliche, auf dem Genbank-Plasmid enthaltene Kopie des Gens. Der für die Konstruktion der Genbank verwendete Vektor YCplac33 ist ein Centromer-Vektor, so dass die erzielte erhöhte Expression sich lediglich auf eine weitere Kopie pro Zelle belief. Offensichtlich war jedoch bereits diese geringe Überexpression ausreichend, um ein deutlich besseres Wachstum in L-Arabinose Medium zu vermitteln. Dies wurde bestätigt durch das Wachstum von Transformanten, die nur das *TAL1*-Gen ohne die flankierenden genomischen Regionen auf einem Centromer-Plasmid exprimierten (3.2.5). Auch die Ergebnisse der durchgeführten genomweiten Transkriptionsanalyse („Microarray“) zeigten, dass die Expression des *TAL1*-Gens im Stamm JBY25 lediglich verdoppelt ist (siehe 3.4). Im folgenden sollte der Effekt einer *TAL1* Überexpression größeren Ausmaßes auf das Wachstum mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle untersucht werden.

3.3.1 Effekt einer starken Überexpression von *TAL1*

Obwohl die Überexpression von *TAL1* auf einem Centromer-Plasmid das Wachstum des selektierten Stammes JBY25 in L-Arabinose Medium nicht weiter steigern konnte, bestand die Möglichkeit, dass eine sehr viel stärkere Überexpression von *TAL1* einen positiveren Effekt auf das Wachstum in L-Arabinose Medium haben könnte. Dies sollte untersucht werden, indem zunächst der endogene *TAL1*-Promotor ab -406 Basen bis zum ATG, sowohl im Genom des Wildtypstammes CEN.PK2-1C, als auch in dem des mutierten Stammes JBY25, mit Hilfe der *kanMX*-*kpHXT7*-Promotor-Deletionskassette gegen den verkürzten *HXT7*-Promotor ausgetauscht wurde. Dafür wurde das DNA-Fragment bestehend aus dem *kanMX*-Gen und dem verkürzten *HXT7*-Promotor durch eine PCR-Reaktion mit den Primern S1-2p*TAL1* und S2-2*TAL1* und mit dem Plasmid pUG6kp*HXT7* als DNA-Vorlage amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde in die beiden Stämme transformiert und der endogene *TAL1*-

Promotorbereich wurde über *in vivo*-Rekombination gegen das beschriebene PCR-Fragment ausgetauscht. Die positiven Transformanten wurden durch Selektion auf G418-haltigem Medium identifiziert und durch eine weitere PCR-Reaktion mit Hilfe der Primer k3-kanMX und A4pTAL1 auf die korrekte Integration der Deletionskassette überprüft. Im Anschluß wurde das *kanMX*-Gen unter Verwendung des loxP/Cre-Rekombinasesystems (s. 2.22) wieder aus dem Genom der Stämme entfernt. Hierfür wurden die Hefen mit dem Plasmid pSH47 transformiert, das für die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors kodiert. Nach Inkubation auf galaktosehaltigem Medium wurden diejenigen Transformanten ausgewählt, die Sensitivität gegen Geneticin zeigten. Eine Messung der Transaldolase-Aktivitäten in den so konstruierten Stämmen JBY28 und JBY29 sollte Aufschluß darüber liefern in welchem Maße der Austausch der Promotorregionen zu einer gesteigerten Aktivität führte. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Transaldolase-Aktivität im Vergleich zu den beiden Ausgangsstämmen, die den endogenen *TAL1*-Promotor exprimierten, nicht verändert war.

Abhilfe sollte daraufhin die Konstruktion eines 2 μ Überexpressionsplasmides schaffen, das den *TAL1*-ORF unter der Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors enthält. Zu diesem Zweck wurde der offene Leserahmen des *TAL1*-Gens durch eine PCR-Reaktion mit dem Primerpaar TAL1-F7 und TAL1-RE aus dem Genom des Wildtypstammes CEN.PK2-1C amplifiziert. Zusammen mit dem *EcoRI/BamHI* linearisierten Vektor p426HXT7-His wurde das entstandene DNA-Fragment in Hefe transformiert. Nach *in vivo*-Rekombination des *TAL1*-ORFs hinter den verkürzten *HXT7*-Promotor im Plasmid p426HXT7-His wurde das so konstruierte Plasmid p426H7TAL1 aus der Hefe isoliert. Nach Amplifikation in *E. coli* wurde das Plasmid durch Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *NsiI* kontrolliert. Nach erneuter Transformation des 2 μ *TAL1* Überexpressionsplasmides in den Stamm CEN.PK2-1C wurden die Transaldolase-Aktivitäten der resultierenden Transformanten im Vergleich zum Ausgangsstamm bestimmt (Tab. 10).

Tab. 10: Transaldolase-Aktivitäten verschiedener Stämme. Die Zellen wurden in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 0,1% Maltose und 2% L-Arabinose herangezogen und in der exponentiellen Phase geerntet. Anschließend wurden Rohextrakte hergestellt und die jeweiligen Enzymaktivitäten bestimmt. Stamm CEN.PK2-1C wurde in synthetischem Komplettmedium mit 2% Maltose ura⁻ angezogen.

Stamm	Aktivität (mU/mg Protein)
JBY24-4M	40
JBY25-4M	70
JBY24-3T	90
CEN.PK2-1C:p426H7TAL1	1500

Die Transaldolase-Aktivität der Transformanten, die *TAL1* von einem 2 μ Plasmid exprimieren, ist im Vergleich zum Ausgangsstamm und zu Transformanten, die *TAL1* nur von einem Centromer-Plasmid überexprimieren, sehr stark erhöht. Um vergleichbare Bedingungen in Bezug auf die verwendeten Medien zu gewährleisten, wurde auch die Transaldolase-Aktivität des Wildtypstammes, wenn er mit einem leeren Plasmid (p426HXT7-His) transformiert war, bestimmt. Diese entsprach jedoch der Aktivität des Stammes JBY24-4M (nicht gezeigt), so dass die in Tab. 10 aufgeführten Werte trotz unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen repräsentativ sind. Prinzipiell ist also auch eine starke Überexpression von *TAL1* möglich, die in deutlich gesteigerter Aktivität der Transaldolase resultiert. Das heißt, dass kein genereller Mechanismus in der Zelle existiert, der eine zu hohe Transaldolase-Aktivität unterbindet. Die Tatsache, dass die Transaldolase-Aktivität in den Stämmen, in denen der endogene *TAL1*-Promotor gegen den verkürzten *HXT7*-Promotor ausgetauscht wurde, nicht gesteigert war, muß demzufolge andere, nicht geklärte Ursachen haben.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob unter Verwendung des 2 μ *TAL1*-Überexpressionsplasmides, also durch eine sehr stark erhöhte Transaldolase-Aktivität, ein besseres Wachstum in L-Arabinose Medium erzielt werden kann. Dafür wurden sowohl der Wildtypstamm, als auch der mutierte Stamm JBY25 wiederum mit den drei Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus (ohne *GAL2*-Überexpressionsplasmid) und mit dem Plasmid p426H7*TAL1* transformiert. Das Wachstum der Transformanten in flüssigem, synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose im Vergleich zu den Stämmen JBY25-4M und JBY24 wurde verfolgt. Allerdings konnte kein besseres Wachstum der Hefen festgestellt werden, die *TAL1* von einem 2 μ Plasmid überexprimierten (nicht gezeigt). Statt dessen war das Wachstum solcher Zellen eher leicht verringert, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass sich eine zu starke Überexpression von *TAL1* wieder negativ auf den Metabolismus auswirken könnte. Zusammenfassend läßt sich folgern, dass eine, im Vergleich zum Wildtypstamm, erhöhte Expression von *TAL1* ein wichtiger Faktor für die Verwertung von L-Arabinose durch Hefe ist, diese sich jedoch vermutlich, ebenso wie schon für die Aktivität der Kinase beobachtet, in einem bestimmten Rahmen bewegen sollte.

3.4 Genomweite Transkriptions Analyse („Microarray-Analyse“)

Parallel zu der Suche nach den dominanten mutierten Allelen des Stammes JBY25 durch den vorher beschriebenen Genbank-Screen sollte untersucht werden, ob das gesamte Expressions-Muster dieses Stammes sich von dem eines

Wildtypstammes unterscheidet. Auch auf diesem Wege könnten genomische Mutationen aufgefunden werden, sofern sie Auswirkungen auf Transkriptionsebene mit sich bringen würden. Für den genomweiten Vergleich der beiden Stämme wurden die „Pan Yeast Arrays“ der Firma MWG Biotech eingesetzt. Auf diesen Glasfiltern sind 6250 *S. cerevisiae* ORFs in Form von 40 meren einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden aufgebracht. Mittels Hybridisierung mit der aus verschiedenen Stämmen isolierten und anschließend fluoreszenzmarkierten cDNA kann ein Vergleich der Expression sämtlicher Gene erfolgen (Shalon *et al.*, 1996, Duggan *et al.*, 1999).

Hierbei sollten auch Mutationen erfasst werden, die speziell bei einem Wachstum der Hefe auf L-Arabinose eine stärkere Expression bestimmter Gene verursachen, oder solche Mutationen, die spezifisch bei Anwesenheit der heterolog exprimierten Gene zu einer Induktion führen. Deshalb wurden die Stämme JBY25 und CEN.PK2-1C jeweils mit den vier Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus transformiert. Für die Präparation der Gesamt-RNA wurden sie zunächst in synthetischem Komplet-Selektivmedium mit 0,2% Maltose herangezogen, um Zellmasse zu produzieren, aber die Glukoserepression bestimmter Gene zu vermeiden, und dann in flüssigem synthetischem Komplet-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose kultiviert. Da jedoch der Wildtypstamm JBY24-4M im Gegensatz zum Stamm JBY25-4M nur ein sehr schlechtes Wachstum auf Medium mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle zeigt, wurden außerdem Untersuchungen mit Zellen angestellt, die in permissivem synthetischem Komplet-Selektivmedium mit 2% Galaktose herangezogen wurden. Die Fluoreszenz-Markierung der synthetisierten cDNA von Zellen, die auf beide Arten kultiviert worden waren, wurde so durchgeführt, dass jeder Stamm mit beiden fluoreszierenden Nukleotiden markiert vorlag. So sollten eventuelle durch die Markierung bedingte Abweichungen ausgeglichen sein. Insgesamt lagen also für die Analyse zwei Sets bestehend aus je zwei umgekehrt zueinander markierten cDNAs vor. Diese beiden Sets wurden mit vier vorbehandelten Glasfiltern hybridisiert. Die Auswertung erfolgte mit den Software Komponenten Imagene 4.2 und GeneSight (Bio-discovery). Normalisierung und Hintergrundkorrektur wurden mit der Software MAVI (MWG) durchgeführt. So wurde ein direkter Vergleich der Expression einzelner Gene ermöglicht und die Expression der Gene quantifiziert. Für die Interpretation der Ergebnisse wurden solche Gene herangezogen, die auf allen vier Filtern für den mutierten Stamm JBY25 eine mehr als 1,5-fach erhöhte Expression zeigten, also induziert bzw. dereprimiert vorlagen. Die so erhaltenen ORFs sind in Tab. 11 aufgelistet. ORFs die in allen vier Experimenten reprimiert waren, also

einen 1,5-fach erniedrigten Transkriptionsspiegel zeigten, konnten nicht gefunden werden.

Tab. 11: Mehr als 1,5-fach induzierte Gene des Hefestammes JBY25

Systematischer Name	Standard Name (Funktion)	Fache Induktion (Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten)
<i>YLR342w</i>	<i>FKS1</i> (1,3 beta-Glucan Synthase)	1,99
<i>YLR348c</i>	<i>DIC1</i> (Dicarboxylsäure Transporter)	2,58
<i>YLR351c</i>	<i>NIT3</i> (unbekannte Funktion)	2,21
<i>YLR354c</i>	<i>TAL1</i> (Transaldolase)	2,28
<i>YLR359w</i>	<i>ADE13</i> (Adenylsuccinat Lyase)	3,76
<i>YLR370c</i>	<i>ARC18</i> (Struktureller Bestandteil des Cytoskeletts)	1,88
<i>YLR387c</i>	- (unbekannte Funktion)	2,14
<i>YLR396c</i>	<i>VPS33</i> (intrazellulärer Transport)	2,07
<i>YLR420w</i>	<i>URA4</i> (Dihydroorotase)	2,03
<i>YLR424w</i>	- (unbekannte Funktion)	2,15

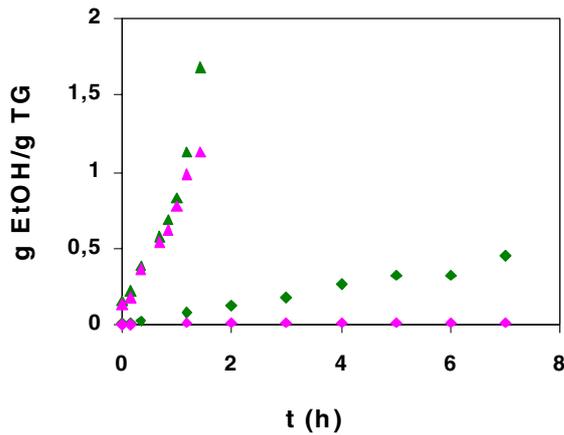
Wie aus Tab. 11 ersichtlich ist, stellte sich heraus, dass sämtliche im Stamm JBY25 induzierten Gene auf dem selben Chromosom (Chromosom L= Nr.12) liegen und dort zusätzlich alle auf dem rechten Arm des Chromosoms lokalisiert sind. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass bei allen 10 induzierten Genen die Expression in etwa zweimal so stark wie in dem Referenzstamm ist, legt den Schluß nahe, dass es im Zuge des Selektionsverfahrens zu einer Verdopplung dieses Teils des Genoms im Stamm JBY25 gekommen ist. Interessanterweise ist auch das *TAL1*-Gen von dieser möglichen Duplikation betroffen, was den semi-dominanten Phänotyp des nicht mutierten *TAL1*-Gens im Stamm JBY25 erklären würde. Demnach könnte das nur intermediäre Wachstum des diploiden mutierten Stammes (s. 3.2.4.1) darin begründet sein, dass in diesem Stamm durch das *TAL1*-Wildtypallel des Kreuzungspartners die *TAL1*-Expression nur 150% im Vergleich zum haploiden Wildtypstamm beträgt, während im haploiden mutierten Stamm die *TAL1*-Expression auf 200% gesteigert ist.

Die Tatsache, dass in der genomweiten Expressionsanalyse keine weiteren Gene gefunden wurden, die in dem mutierten Stamm stärker exprimiert sind, bedeutet jedoch nicht, dass außer der mutmaßlichen Duplikation eines Teils des Genoms keine zusätzlichen Veränderungen vorliegen. Solche Mutationen, die entweder nur eine sehr schwache Änderung des Expressionsmusters bewirken, oder einen Effekt auf posttranskriptioneller Ebene hervorrufen, können mit Hilfe der „Microarray“-Analyse nicht erfasst werden. Möglich wäre auch eine Mutation in einem ORF, die die Aktivität des davon kodierten Enzyms erhöht oder erniedrigt, was mittels der angewandten Methode nicht nachgewiesen werden könnte.

3.5 Fermentationen mit Stamm JBY25-4M

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand darin einen *S. cerevisiae* Hefestamm zu konstruieren, der L-Arabinose effizient für die Bildung von Biomasse verwerten kann, vor allem aber auch in der Lage ist diese Pentose zu Ethanol umzusetzen. Fermentationen von Xylose mit *S. cerevisiae* Hefestämmen, die integrierte *P. stipitis* *XYL1* und *XYL2* Gene für die Xylose-Verwertung exprimieren, resultierten häufig in dem in großen Mengen gebildeten Nebenprodukt Xylitol (Kötter und Ciriacy, 1993; Tantirungkij *et al.*, 1993; Walfridsson *et al.*, 1997). Dieses wurde jedoch dem Kofaktor Ungleichgewicht zugeschrieben, das die Expression eukaryontischer Enzyme zur Metabolisierung der Xylose mit sich bringt (Kötter und Ciriacy, 1993). Aufgrund der Tatsache, dass die Umsetzung der L-Arabinose mittels des in dieser Arbeit beschriebenen rekombinanten Hefestammes über die redoxneutralen Reaktionen abläuft, die von den prokaryontischen Enzymen katalysiert werden, sollte diese Problematik nicht auftreten.

Die Produktion von Ethanol wurde im Rahmen dieser Arbeit unter semi-anaeroben Bedingungen untersucht, da dies zum einen den bei industriellen Anwendungen vorherrschenden Bedingungen entspricht und zum anderen die Möglichkeiten zur Durchführung von strikt anaeroben Fermentationen nicht gegeben waren. Der Stamm JBY25-4M, sowie der entsprechende Referenzstamm JBY24 wurden zu diesem Zweck in synthetischem Komplet-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose oder 2% Glukose kultiviert. Sauerstoff-limitierte Bedingungen wurden durch eine sehr hohe Zelldichte ($OD_{600nm} = 15-20$) sowie durch Inkubation in kleinen, halb zugedrehten Flaschen, unter leichtem Rühren, erzielt. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen. Die Bildung von Ethanol wurde verfolgt, indem zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen wurden, deren Ethanolkonzentration bestimmt wurde (Abb. 21).



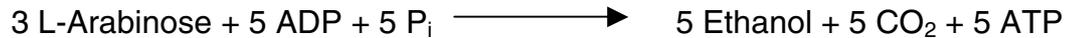
Stamm/ Medium	Ethanolproduktionsrate (g EtOH/ g TG h)
JBY25-4M/Glc	0,80-0,90
JBY24/Glc	0,75-0,85
JBY25-4M/Ara	0,06-0,08
JBY24/Ara	0,00015-0,00020

Abb. 21: Ethanolproduktion der Stämme JBY25-4M (pink) und JBY24 (grün) mit Glukose (▲) bzw. L-Arabinose (◆) als einziger Kohlenstoffquelle. Die Zellen wurden in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% Glukose oder 2% L-Arabinose angezogen, nach mindestens zwei Teilungen bei einer OD_{600nm} von 1,5 bis 2 geerntet und zweimal in synthetischem Komplett-Selektivmedium entweder mit 2% Glukose oder mit 2% L-Arabinose gewaschen. Anschließend wurden sie in dem jeweiligen Medium in kleinen Flaschen, unter leichtem Rühren, mit einer OD_{600nm} von 15-20 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, deren Ethanolkonzentration bestimmt wurde. Am Beginn und am Ende der Fermentationen wurde zusätzlich das Trockengewicht der Zellen gemessen. Die dargestellten Ergebnisse wurden als repräsentativ aus verschiedenen unabhängigen Messungen ausgewählt. Die in der Tabelle gezeigten Ethanolproduktionsraten verstehen sich als Mittelwerte unabhängiger Messungen.

Abb. 21 zeigt, dass der auf Wachstum in L-Arabinose Medium selektierte Stamm JBY25-4M nicht nur in der Lage ist, mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle bei geringer Verdopplungszeit zu wachsen (s. 3.1.6), sondern die Pentose auch effizient zu Ethanol fermentieren kann. Der als Referenz eingesetzte Wildtypstamm JBY24 hingegen ist nicht in der Lage L-Arabinose zu Ethanol umzusetzen. Zwar sind die Ethanolproduktionsraten in Glukose kultivierten Zellen noch deutlich höher (Faktor 10), aber die in L-Arabinose gemessene Rate ist vergleichbar mit den höchsten jemals von rekombinanten D-Xylose fermentierenden *S. cerevisiae* Stämmen in D-Xylose-Medium erzielten Raten (Kötter *et al.*, 1990; Wahlbom und Hahn-Hägerdal, 2002). Die Ethanolproduktion beider Stämme in Glukosemedium weist keine signifikanten Unterschiede auf. Demzufolge scheinen die genomischen Mutationen des Stammes JBY25-4M keinen generellen Einfluß auf die Fermentationskapazität zu haben, sondern spezifisch die Fermentation von L-Arabinose zu begünstigen.

Wenn man davon ausgeht, dass L-Arabinose über eine Kombination aus Pentosephosphatweg und Glykolyse (s. Abb. 2) exklusiv zu Ethanol als Hauptfermentationsprodukt metabolisiert würde, beträgt die maximale theoretische Ausbeute von

20 g/l L-Arabinose (133 mmol/l) 10,2 g/l Ethanol (222 mmol/l). Dabei werden drei Mol L-Arabinose zu 5 Mol Ethanol nach der folgenden Stöchiometrie umgesetzt:



Die maximale Ethanol-Ausbeute, die bei der Fermentation von L-Arabinose mit einer Ausgangskonzentration von 20 g/l Pentose durch den Stamm JBY25-4M produziert wurde, betrug 6 g/l Ethanol (nach ca. 25- 30 h Inkubation). Dies macht 60% der maximalen theoretischen Ausbeute basierend auf der Menge des verfügbaren Zuckers aus. Obgleich damit ein sehr gutes Resultat erzielt werden konnte, muß gesagt werden, dass die tatsächliche Ethanol-Ausbeute deutlich größer sein sollte, da unter den angewandten semi-anaeroben Fermentationsbedingungen ein Teil des gebildeten Ethanols verdunstet sein kann. Weitere Ursachen für den Unterschied zu der theoretischen Ausbeute können in zurückbleibender unfermentierter L-Arabinose, der Bildung von Nebenprodukten oder einer teilweisen Respiration des Ethanols, ebenfalls aufgrund der nicht strikt anaeroben Bedingungen, liegen.

Resultate einer Fermentation von L-Arabinose durch den Stamm JBY25-4M unter vollständig anaeroben Bedingungen (Versuch und persönliche Mitteilung von C. Larsson, Department of Applied Microbiology, Universität Lund) zeigten, dass der selektierte Stamm L-Arabinose auch unter diesen Bedingungen zu Ethanol als Hauptprodukt metabolisiert. Dabei wurden ähnliche Ausbeuten wie unter den in dieser Arbeit eingesetzten semi-anaeroben Bedingungen erzielt (12,5 g/l Ethanol aus 50 g/l L-Arabinose). Die eingesetzte L-Arabinose wurde nahezu vollständig umgesetzt, als Nebenprodukte konnten Glycerin und Essigsäure nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise zeigte Stamm JBY25-4M auch unter anaeroben Bedingungen langsames Wachstum in L-Arabinose Medium.

3.5.1 Fermentation von L-Arabinose ohne überexprimiertes *GAL2*

Auch in Bezug auf die Fermentation von L-Arabinose stellte sich die Frage, ob eventuell eines der überexprimierten Enzyme nicht zwingend erforderlich ist. Jedoch hatten Wachstumstests, bei denen jeweils eines der für diese Enzyme kodierenden Plasmide durch ein leeres Plasmid (s. 3.2.1.2) ersetzt war, schon gezeigt, dass bis auf das *GAL2* exprimierende Plasmid keines der Plasmide für das Wachstum in L-Arabinose Medium verzichtbar war. Diese Versuche hatten außerdem verdeutlicht, dass die Überexpression eines zusätzlichen Transporters für L-Arabinose das Wachstum mit diesem Zucker dennoch verbessern kann. Daraus kann allerdings nicht automatisch geschlossen werden, dass auch die Ethanolproduktionsrate durch einen zusätzlich exprimierten Transporter gesteigert

werden kann. Um herauszufinden, ob dies der Fall ist, wurden weitere Fermentationen mit dem Stamm JBY25-4M, sowie dem Stamm JBY25-3M/426, der ein leeres Plasmid anstelle des Gal2-Plasmides exprimiert, mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt. Die Resultate dieser Fermentationen sind in Abb. 22 dargestellt.

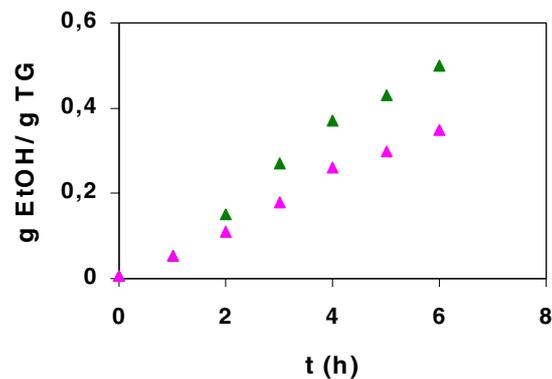


Abb. 22: Fermentation von L-Arabinose durch die Stämme JBY25-4M (▲) und JBY25-3M/426 (▲). Die Zellen wurden in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose angezogen, nach mindestens zwei Teilungen bei Erreichen einer OD_{600nm} von 1,5 bis 2 geerntet und zweimal in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose gewaschen. Anschließend wurden sie in kleinen Flaschen unter leichtem Rühren mit einer OD_{600nm} von 15-20 in diesem Medium inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, deren Ethanolkonzentration bestimmt wurde. Am Beginn und am Ende der Fermentationen wurde zusätzlich das Trockengewicht der Zellen gemessen. Die dargestellten Ergebnisse wurden als repräsentativ aus verschiedenen unabhängigen Messungen ausgewählt.

Auch die Fermentation von L-Arabinose kann durch die zusätzliche Überexpression eines effizient L-Arabinose transportierenden Transporters gesteigert werden (Abb. 22). Somit ist der Transport der Pentose in die Zelle nicht nur ein limitierender Schritt für das Wachstum der Hefe in L-Arabinose Medium, sondern auch für die Fermentation dieses Zuckers. Eine hohe Transportrate zählt damit ebenfalls zu den für den L-Arabinose Katabolismus in Hefe entscheidenden Faktoren.

3.6 Konstruktion einer „Expressionskassette“ für den L-Arabinose Katabolismus

Wie schon erwähnt, ist es vorteilhaft für die Konstruktion eines L-Arabinose metabolisierenden Hefestammes möglichst wenige Enzyme zusätzlich in Hefe exprimieren zu müssen. Dies ist zum einen darin begründet, dass die funktionelle

Expression von Enzymen anderer Organismen problematisch sein kann, aber auch in der Tatsache, dass die Transformation der Hefe mit mehreren Plasmiden gleichzeitig Schwierigkeiten mit sich bringt (siehe auch 3.2.1). So ist die Transformationseffizienz bei einer Kotransformation von vier Plasmiden in einem Ansatz, so wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, sehr gering. Desweiteren kann eine Hefezelle, die vier Plasmide trägt, relativ schnell eines oder mehrere der Plasmide wieder verlieren. Auch für den gesamten Metabolismus der Zelle können vier zusätzliche Plasmide, die stark exprimiert sind, eine Belastung bedeuten, so dass zum Beispiel die Wachstumsrate beeinträchtigt werden kann. Ein weiteres Problem bringt die Tatsache mit sich, dass die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für den L-Arabinose Katabolismus sehr große homologe Bereiche besitzen. Vor allem der Promotor- und der Terminationsbereich sind bei mindestens drei der verwendeten Plasmide komplett identisch. Durch die Fähigkeit der Hefe zur homologen Rekombination besteht also die Gefahr, dass diese Regionen miteinander rekombinieren und so entweder völlig neue Plasmide aus verschiedenen Teilen der einzelnen Plasmide entstehen, oder einzelne Gene für den L-Arabinose Katabolismus auf diese Weise herausrekombinieren. Um diese Risiken auszuschalten, sollte mit Hilfe verschiedener Ansätze versucht werden, die gleichzeitige Expression mehrerer Plasmide zu umgehen und so einen Hefestamm zu erhalten, der die Enzyme für den L-Arabinose Katabolismus stabil exprimiert. Dies hätte auf der einen Seite den Vorteil, dass die Effizienz der Umsetzung der L-Arabinose eventuell gesteigert werden könnte und auf der anderen Seite auch eine gleichzeitige Expression der Enzyme des L-Arabinose und des D-Xylose Katabolismus erleichtert würde. Eine solche Expression beider Pentose-Stoffwechselwege in einem Hefestamm ist eine Grundvoraussetzung dafür, einen Stamm zu erhalten, der effizient Rohextrakte aus pflanzlicher Biomasse verwerten kann und so für industrielle Prozesse eingesetzt werden kann.

3.6.1 Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus in das Genom des Wildtypstammes

Der erste Ansatz für eine stabilere Expression des L-Arabinose Katabolismus in Hefe bestand darin, die Gene der Enzyme, die bis zu diesem Zeitpunkt funktionell exprimiert waren, also *E. coli araB* und *araD*, sowie *S. cerevisiae GAL2*, in das Genom des Wildtypstammes CEN.PK2-1C zu integrieren. Der selektierte Stamm JBY25 existierte zu diesem Zeitpunkt noch nicht. Um weiterhin eine starke und konstitutive Expression zu gewährleisten, sollten die Gene dabei unter der Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors bzw. des *ADH1*-Promotors belassen werden. Die Integration sollte mit Hilfe von integrativen Plasmiden bewerkstelligt werden. Zunächst wurden die Gene mitsamt der Promotorregionen über

Restriktion aus den ursprünglichen Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus ausgeschnitten. Im Falle von *araD* wurde das Plasmid p425H7araD mit den Restriktionsendonukleasen *SacI/KpnI* geschnitten und das 1,3 kb Fragment aus *HXT7*-Promotor, *araD* und *CYC1*-Terminationsbereich aus dem Gel aufgereinigt. Das Plasmid p424H7araB wurde zunächst mit *SacI* linearisiert und anschließend partiell mit 2 U *KpnI* über verschiedene Zeiträume geschnitten. Dies war notwendig, da eine zweite *KpnI*-Schnittstelle im *araB*-ORF selber vorhanden war. Die verschiedenen Ansätze wurden im Agarosegel aufgetrennt, die Bande mit der korrekten Größe von 2,3 kb wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wurde isoliert. Das Plasmid pHL125 wurde mit *SphI* geschnitten und das 2,4 kb DNA-Fragment bestehend aus dem *GAL2*-Gen mit dem *ADH1* Promotor- und Terminationsbereich wurde ebenfalls aus dem Agarosegel aufgereinigt. Parallel wurden die integrativen Vektoren YIplac128 (*LEU2*), YIplac204 (*TRP1*) und YIplac211 (*URA3*) ebenfalls mit *KpnI/SacI* bzw. mit *SphI* geschnitten und die entsprechenden Vektorbanden aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit den Genen des L-Arabinose Katabolismus über Ligation in die jeweiligen Vektoren kloniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gene jeweils auf Plasmide mit denselben Markergenen wie zuvor kloniert wurden. Demzufolge wurde das *araD*-Fragment mit dem Vektor YIplac128 ligiert, das *araB*-Fragment mit Vektor YIplac204 und das *GAL2*-Fragment mit dem Vektor YIplac211. Nach erfolgter Integration der neu konstruierten Plasmide wäre der entstandene Stamm also noch Histidin auxotroph, so dass das *HIS3*-Markergen für die Selektion auf das benötigte L-Arabinose Isomerase Plasmid genutzt werden könnte. Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* transformiert, die gebildeten Plasmide YIplacaraB, YIplacaraD und YIplacGAL2 isoliert und durch Restriktion mit *EcoRV* bzw. *PvuII/XhoI* bzw. *PvuII* überprüft. Für die Integration ins Genom durch *in vivo*-Rekombination in das jeweilige Aminosäure/Nukleotidbase-Markergen (Abb. 23) wurden die Plasmide mit *EcoRV* bzw. *Bsu36I* linearisiert und sukzessive in Hefe transformiert. Die Selektion der Transformanten mit integrierten Plasmiden erfolgte durch Plattierung auf die entsprechenden Aminosäure-Selektivmedien. Um zu prüfen, ob es tatsächlich zu einer Integration der Plasmide gekommen war, wurden zunächst PCR-Reaktionen mit den Primern M13-frw/M13-rev, araBF7/M13-rev und araDF7/M13rev durchgeführt. Zusätzlich wurden die Transformanten für mehrere Tage in nicht-selektivem Vollmedium inkubiert. Bei nicht erfolgter Integration würden die Plasmide auf diese Weise verloren gehen. Anschließend wurden die Zellen erneut auf Selektivmedium kultiviert und so das Vorhandensein der Markergene nachgewiesen. Der Wildtypstamm mit integriertem *araB*, *araD* und *GAL2*-Gen wurde als JBY30 bezeichnet.

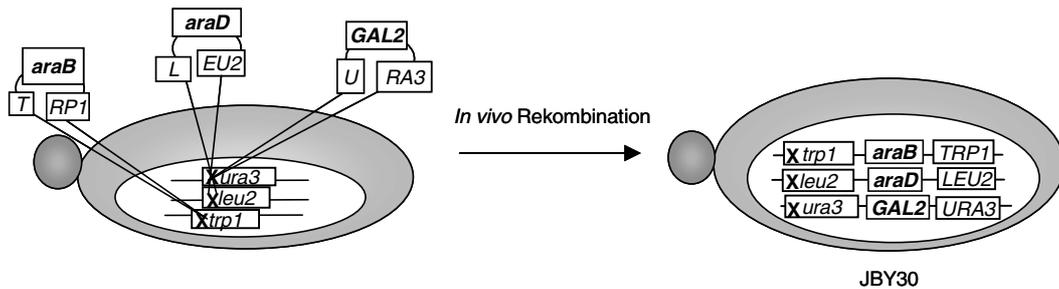


Abb. 23: Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus in das Genom des Wildtypstammes

In diesem Stamm wurden erneut die Enzymaktivitäten der heterolog exprimierten L-Ribulokinase und der L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase gemessen. Während die L-Ribulokinase-Aktivität ungefähr um ein Drittel auf einen Wert von 0,23 U/mg Protein erniedrigt war, war überraschenderweise keine Epimerase-Aktivität mehr nachzuweisen (< 5 mU/mg Protein). Ein partieller Verlust der Aktivitäten der Enzyme, die durch die integrierten Plasmide kodiert wurden, war zu erwarten, da die Expression von einem 2μ Plasmid viel stärker ist, als die durch eine Integration erzielte Expression. Jedoch sollte aufgrund des konstitutiv stark exprimierenden verkürzten *HXT7*-Promotor dennoch eine, wenn auch niedrigere, Aktivität nachzuweisen sein. Da zu diesem Zeitpunkt allerdings schon trotz relativ hoher Enzymaktivitäten bei einer Expression der Enzyme von episomalen Plasmiden kein Wachstum in L-Arabinose Medium erreicht werden konnte, wurde der Ansatz verworfen.

3.6.2 Konstruktion eines Plasmides mit drei Genen für den L-Arabinose Katabolismus

Da der Ansatz zur genomischen Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus im Wildtypstamm fehlgeschlagen war, sollten als nächstes alle drei für den L-Arabinose Katabolismus in Hefe notwendigen Gene von einem einzigen Plasmid exprimiert werden. Dies würde die Transformation der Hefen erleichtern und das Risiko, dass einzelne Plasmide verloren gehen, beseitigen. Außerdem ständen dadurch wieder freie Aminosäure-/Nukleotidbase-Auxotrophien zur Verfügung, die für die Expression zusätzlicher Gene von Plasmiden mit den entsprechenden Markergenen genutzt werden könnten.

Da ein bereits existierender D-Xylose metabolisierender *S. cerevisiae* Hefestamm mit einer Histidin-Auxotrophie zur Verfügung stand (PUA-Stamm, Porep, 1987, Kötter und Ciriacy, 1993), wäre in diesem Stamm die Expression eines Plasmides mit einem *HIS3*-Markergen möglich. Aus diesem Grund sollte, ausgehend vom Plasmid p423H7araABs^{re}, ein Plasmid konstruiert werden, das außerdem die

E. coli araB^{mut}- und *araD*-ORFs enthält. Um eine mögliche homologe Rekombination zwischen identischen Promotorregionen zu vermeiden, sollte der *araB^{mut}*-ORF dabei hinter dem *ADH1*-Promotor exprimiert werden und der *araD*-ORF hinter dem *PGK1*-Promotor. Dafür wurde zunächst das *S. cerevisiae ADH1*-Gen, inklusive 508 bp vor dem ATG und 297 bp nach dem Stop-Kodon, über eine PCR-Reaktion mit den Primern ADH-f und ADH-r aus chromosomaler DNA des Stammes EBY.VW5000 amplifiziert. Der Primer ADH-f enthält zusätzlich nach den homologen Bereichen zum Plasmid an seinem 5'-Ende eine Sequenz für eine *NotI*-Schnittstelle, so dass das Plasmid für die Klonierung eines weiteren Gens mit diesem „Single-Cutter“ geöffnet werden kann. Zusammen mit dem *SacI*-linearisierten Plasmid p423H7araABs^{re} wurde das erhaltene PCR-Produkt in Hefe transformiert und über *in vivo*-Rekombination in das Plasmid, vor den *HXT7*-Promotor, kloniert. Das entstandene Plasmid p423H7araABsADH wurde aus Hefe isoliert, in *E. coli* amplifiziert und erneut isoliert. Die Überprüfung erfolgte durch Restriktion mit *PvuII*. Anschließend wurde der *ADH1*-ORF im Plasmid gegen den *araB^{mut}*-ORF ausgetauscht. Der offene Leserahmen des *araB^{mut}*-Gens wurde über eine PCR-Reaktion mit dem Plasmid p424H7araB^{re} als DNA-Vorlage und den Oligonukleotiden ADH-araB-f/ADH-araB-r synthetisiert, und zusammen mit dem *PfI*-linearisierten Plasmid p423H7araABsADH in Hefe transformiert. Durch *in vivo*-Rekombination erfolgte der Austausch des *ADH1*-ORFs gegen den *araB*-ORF, so dass das Plasmid p423H7araApAaraB^{mut} gebildet wurde (s. Abb. 24). Nach Amplifikation in *E. coli* wurde das Plasmid durch Restriktion mit *PvuII* verifiziert. Als nächstes sollte getestet werden, ob dieses Plasmid, das vorerst zwei der Gene für den L-Arabinose Katabolismus enthält, ebenso gutes Wachstum mit der Pentose vermitteln kann, wie zwei einzelne Plasmide und ob eine Expression des *araB^{mut}*-ORFs hinter dem *ADH1*-Promotor das Wachstum eventuell beeinträchtigt. Dafür wurde der mutierte Stamm JBY25 mit dem neuen Plasmid, sowie mit dem die Epimerase exprimierenden Plasmid p425H7araD und zwei leeren Vektoren mit *TRP1*- bzw. *URA3*-Marker gen transformiert (Stamm JBY31) und das Wachstum der Transformanten zusammen mit solchen Transformanten, die stattdessen vier leere Plasmide enthielten (JBY24), in flüssigem, synthetischem Komplet-Selektivmedium verfolgt (Abb. 25). Es zeigte sich jedoch, dass durch das neu konstruierte Plasmid mit zwei Genen für den L-Arabinose Katabolismus kein Wachstum in L-Arabinose Medium vermittelt werden konnte. Dies ist vermutlich darin begründet, dass die Aktivität der mutierten L-Ribulokinase sich, wie bereits erwähnt, in einem sehr engen Rahmen bewegen muß, um Wachstum zu erzielen. Wahrscheinlich ist die Aktivität des mutierten Enzyms bei einer Expression vom verkürzten *HXT7*-Promotor genau ausreichend, um Wachstum zu bewirken, wogegen die Expression vom *ADH1*-Promotor zu schwach ist, um das Wachstum aufrecht erhalten zu können.

Aufgrund dieser Vermutung wurde nach dem oben beschriebenen Prinzip ein zweites Plasmid konstruiert, wobei jedoch in diesem Fall der Wildtyp-*araB*-ORF verwendet wurde. Wie schon in 3.2.3 gezeigt, wirkt sich eine zu hohe Aktivität der von diesem ORF kodierten Wildtyp L-Ribulokinase negativ auf das Wachstum in L-Arabinose Medium aus. Demzufolge sollte eine schwächere Expression, wie sie durch den *ADH1*-Promotor vermittelt wird, unter Umständen zu einem verbesserten Wachstum führen. Jedoch konnte auch die Expression dieses zweiten Plasmides kein Wachstum in L-Arabinose Medium bewirken (nicht gezeigt).

Ebenso führte die Expression eines Plasmides, das den *araB^{mut}*-ORF unter der Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors und den *B. subtilis araA*-ORF hinter dem *ADH1*-Promotor exprimiert (p423H7araB^{mut}pAara; ausgehend vom Plasmid p423H7araB unter Verwendung der Oligonukleotide ADH-f/ADH-r, sowie ADH-araA-f/ADH-araA-r nach dem oben beschriebenen Prinzip konstruiert; Abb. 24), nicht zu einem L-Arabinose metabolisierenden Hefestamm (Stamm JBY32, Abb. 25). In diesem Fall ist die Ursache vermutlich in der sehr niedrigen Aktivität der L-Arabinose Isomerase zu suchen, die bei einer Expression durch den *ADH1*-Promotor ebenfalls nicht mehr ausreichend für eine effiziente Verwertung des Zuckers zu sein scheint.

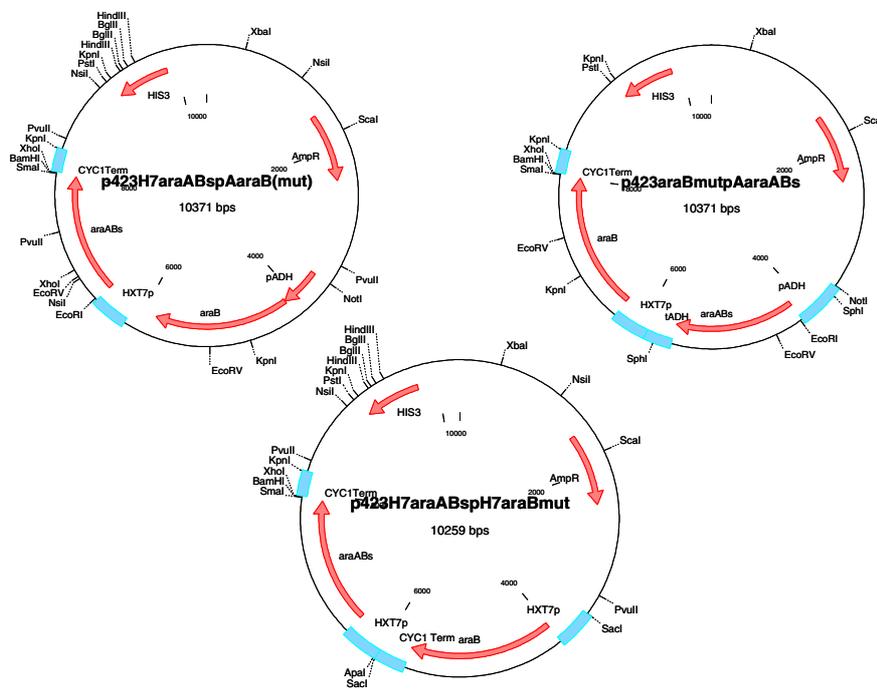


Abb. 24: Verschiedene Ansätze zur Konstruktion eines Plasmides mit mehreren Genen für den L-Arabinose Katabolismus

Ein letzter Ansatz zur Konstruktion eines Plasmides mit allen drei für den L-Arabinose Katabolismus in *S. cerevisiae* benötigten Genen bestand darin, diese Gene

auf einem Plasmid alle hinter dem verkürzten *HXT7*-Promotor zu exprimieren. Da dies mittels Ligation durchgeführt werden sollte, mussten zunächst Schnittstellen an beiden Seiten des *araB^{mut}*- und später auch des *araD*-ORFs, vor dem verkürzten *HXT7*-Promotor und nach dem *CYC1*-Terminationsbereich, eingefügt werden. Dafür wurde der *araB^{mut}*-ORF inklusive des *HXT7*-Promotors und des *CYC1*-Terminationsbereiches mit Hilfe der Oligonukleotide *araABD-f* /*araABD-r* und mit dem Plasmid p424H7araB^{mut} als DNA-Vorlage amplifiziert. Der Primer *araABD-f* enthält an seinem 5`-Ende eine aus 4 Nukleotiden bestehende Linker-Sequenz, gefolgt von einer *SpeI*-Schnittstelle, einer *NotI*-Schnittstelle und 23 Basen, die zum verkürzten *HXT7*-Promotor der Plasmide p424H7araB^{mut} und p425H7araD homolog sind. Der Primer *araABD-r* umfasst ausgehend von seinem 3`-Ende Sequenzen, die homolog zum komplementären Strang dieser Plasmide im Bereich der *CYC1*-Terminationsregion sind, darauf folgt eine *SpeI* und schließlich eine *SacI*-Schnittstelle mit einer 5 Nukleotide umfassenden Linker-Sequenz. Das PCR-Produkt, das den *araB^{mut}*-ORF beinhaltetete, wurde aufgereinigt, mit *SacI* geschnitten und mit dem ebenfalls mit *SacI* linearisierten Vektor p423H7araABs^{re} ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* transformiert, das entstandene Plasmid p423H7araABspH7araB^{mut} (s. Abb. 24) isoliert und durch Restriktion mit *KpnI* überprüft. Anschließend wurde das Plasmid zusammen mit dem für die Epimerase kodierenden Plasmid, sowie dem *GAL2*-Plasmid und einem leeren Vektor mit dem *TRP1*-Markergen in den Stamm JBY25 transformiert und das Wachstum der Transformanten (Stamm JBY33) in flüssigem, synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose wurde verfolgt (Abb. 25).

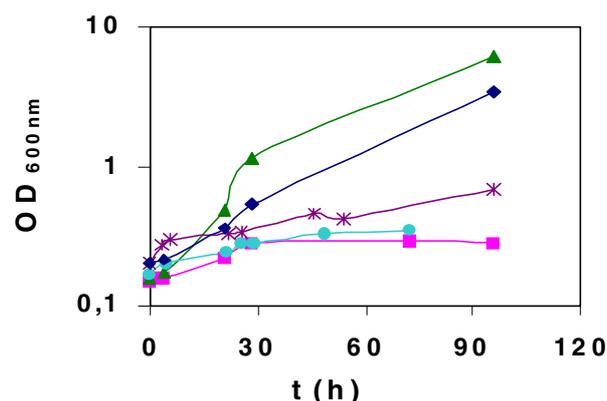


Abb. 25: Wachstum der Stämme JBY31 (*), JBY32 (●), JBY33 (◆) in flüssigem synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose, im Vergleich zu den Stämmen JBY24 (■) und JBY25-4M (▲). Die Zellen wurden über Nacht in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose herangezogen und nach zweimaligem Waschen in synthetischem Komplett-Selektivmedium mit 2% L-Arabinose mit einer OD_{600 nm} von ca. 0,2 in diesem Medium angeimpft. Die Inkubation erfolgte in Schüttelkolben bei 30°C. Zwei- bis dreimal am Tag wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte entnommen. Die dargestellten Meßwerte wurden als repräsentativ unter mehreren unabhängigen Messungen ausgewählt.

Wie Abb. 25 zeigt, war auch das Wachstum solcher Transformanten, die sowohl die Isomerase als auch die mutierte Kinase unter der Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors von einem gemeinsamen Plasmid exprimierten, schlechter als das von Transformanten, die einzelne Plasmide enthielten. Zudem erwies sich die zusätzliche Klonierung der Epimerase, ebenfalls hinter dem verkürzten *HXT7*-Promotor, auf das Plasmid p423H7araABsH7araB^{mut} als nicht durchführbar, da trotz wiederholter Versuche nur Religanden erhalten wurden. Der Grund dafür liegt vermutlich darin, dass die identischen Promotor- und Terminationsbereiche der einzelnen Gene miteinander rekombinieren und so eine Klonierung aller drei Gene auf ein Plasmid nicht möglich ist. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde der Versuch, eine Expressionskassette mit allen drei Genen für den L-Arabinose Katabolismus zu konstruieren, bis auf Weiteres verworfen.

4 DISKUSSION

4.1 Funktionelle Expression von Enzymen für den L-Arabinose Katabolismus in *S. cerevisiae*

Die Hefe *S. cerevisiae* ist einer der meistgenutzten Mikroorganismen für industrielle Prozesse. Aufgrund ihrer Fähigkeit, effizient Ethanol zu produzieren, wird sie vor allem für Fermentationen in großem Maßstab eingesetzt. Als kostengünstiges und leicht verfügbares Substrat für solche Fermentationen ist dabei am besten pflanzliche Biomasse geeignet (van Wyk, 2001). Der entscheidende Nachteil dieser Hefe ist jedoch ihr relativ beschränktes Substratspektrum. Die beiden Pentose-Zucker D-Xylose und L-Arabinose, die einen signifikanten Anteil der zu vergärenden Zucker in pflanzlicher Biomasse ausmachen (McMillan und Boynton, 1994), können beispielsweise von *S. cerevisiae* nicht verwertet werden (Barnett, 1976). Eine Möglichkeit, einen Stoffwechselweg für die Pentosen in Hefe zu etablieren, ist die heterologe Expression von Enzymen anderer Organismen, die dazu fähig sind diese Zucker zu metabolisieren. Zum anderen können endogene Hefegene überexprimiert werden, deren Genprodukte eventuell in der Lage sind, Reaktionen des L-Arabinose Katabolismus zu katalysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die Produkte endogener Hefegene auf ihre Fähigkeit untersucht, Intermediate des L-Arabinose Katabolismus umzusetzen, als auch Enzyme des L-Arabinose Katabolismus aus anderen Organismen heterolog in Hefe exprimiert.

4.1.1 Endogene Hefegene

S. cerevisiae kann weder mit D-Xylose noch mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Dennoch konnten hefeeigene Gene identifiziert werden, die für eine Xylose-Reduktase (Toivari *et al.*, 1998, Jeong *et al.*, 2001) bzw. für eine Xylitol-Dehydrogenase (Richard *et al.*, 1999) kodieren, sowie eine unspezifische Aldose-Reduktase, die ebenfalls Xylose-Reduktase Aktivität aufweist (Kuhn *et al.*, 1995). Außerdem bestimmten kürzlich Traff *et al.* (2002) Gre3 als das hauptsächliche D-Xylose reduzierende Enzym in Hefe und Gre3, Ypr1 und das durch den ORF *YJR096w* kodierte Protein als L-Arabinose reduzierende Enzyme. Die Aktivitäten dieser endogenen Enzyme reichen jedoch nicht aus, bzw. sind im Fall der L-Arabinose nicht alle notwendigen Enzyme vorhanden, um durch *S. cerevisiae* eine signifikante Metabolisierung von D-Xylose oder L-Arabinose zu Ethanol zu erreichen. D-Xylulose hingegen, ein Zwischenprodukt des D-Xylose Katabolismus kann von Hefe anaerob zu Ethanol fermentiert werden (Wang und Schneider, 1980, Ueng *et al.*, 1981, Suikho und

Poutanen, 1984). Allerdings erwies sich die Aktivität der endogenen Xylulokinase, die Xylulose zu Xylulose-5-Phosphat, einem Intermediat des Pentosephosphatweges, umwandelt, als limitierender Schritt bei der Pentoseverwertung (Deng und Ho, 1990). Eine Überexpression der hefeeigenen Xylulokinase konnte die Ethanol-Ausbeute in rekombinanten Xylose-verwertenden *S. cerevisiae* Stämmen steigern und die Xylitol-Produktion verringern (Johansson *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen zeigen, dass Genprodukte endogener Hefegene unter Umständen die Umsetzung einzelner Intermediate beim Abbau dieses Stoffes bewerkstelligen können, auch wenn ein Substrat von der Hefe natürlicherweise nicht vollständig katabolisiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Genprodukte endogener Hefegene mit Ähnlichkeiten zu prokaryontischen L-Ribulokinase (Ydr109c und Ynl249c) bzw. zu L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerasen (Yjr024c) in *S. cerevisiae* stark überexprimiert und auf Aktivität dieser Enzyme hin untersucht. Keines der Proteine wies jedoch eine messbare Enzymaktivität auf (3.1.2). Die Ähnlichkeiten zu Enzymen des L-Arabinose-Katabolismus sind demnach vermutlich eher zufällig und die untersuchten Hefeproteine haben andere, bislang nicht geklärte Aufgaben in der Zelle. Möglicherweise werden die entsprechenden Gene auch normalerweise nicht oder nur sehr schwach transkribiert bzw. translatiert. Es könnte sich dabei auch um Pseudogene handeln, so wie beim *HXT12*-Gen (Boles und Hollenberg, 1997). In diesem Fall wären in den ORFs Mutationen (z. B. Punktmutationen) vorhanden, so dass keine funktionellen Enzyme entstehen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine sehr schwache Enzymaktivität ohne Aufreinigung der Enzyme nicht messbar ist, da bei beiden verwendeten Meßsystemen im Assay schon ohne Zugabe des eigentlichen Substrates durch unspezifische Reaktionen im Rohextrakt die Menge an NADH abnimmt. In diesem Fall kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese geringe Aktivität nicht ausreichend wäre, um zu einer signifikanten Umsetzung der L-Arabinose beizutragen. Demnach ist für die Katabolisierung von L-Arabinose durch Hefe, ebenso wie bei der D-Xylose, die heterologe Expression von Enzymen anderer Organismen notwendig.

4.1.2 Heterolog exprimierte Enzyme

Anhand zahlreicher Beispiele läßt sich belegen, dass die heterologe Expression von Genen anderer Organismen in Hefe nicht immer zu funktionellen Enzymen führt (Kasahara und Kasahara 1996, 1997, Wieczorke *et al.*, 2002, Makuc, 2002, Sarthy *et al.*, 1987, Amore *et al.*, 1989, Hallborn, 1995, Moes *et al.*, 1996). Dennoch konnten in dieser Arbeit die L-Ribulokinase, sowie die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase aus *E. coli* erfolgreich und mit hohen Aktivitäten in Hefe exprimiert werden. Auch Sedlak und Ho (2001) konnten beide Enzyme mit ca.

70% der nativen Aktivitäten in Hefe exprimieren. Problematisch erwies sich dagegen die funktionelle Expression einer L-Arabinose Isomerase in Hefe. Die Expression der *E. coli* L-Arabinose Isomerase durch Sedlak und Ho (2001) in *S. cerevisiae* erbrachte zwar ein funktionelles Enzym, jedoch betrug die Aktivität nur etwa 10% der Aktivität in *E. coli*, obwohl das Gen sehr effizient transkribiert wurde. In der vorliegenden Arbeit war bei einer Expression der L-Arabinose Isomerase aus *E. coli* in Hefe keine Enzymaktivität nachzuweisen. Mögliche Gründe dafür können zum Beispiel eine geringe Expression des Enzyms, Instabilität des Proteins in Hefe oder mangelnde Funktionalität aufgrund von falscher Faltung, posttranslationalen Modifikationen oder der Ausbildung inter- oder intramolekularer Disulfidbrücken sein. Es muß außerdem darauf hingewiesen werden, dass mit dem verwendeten Testsystem eine quantitative Messung nicht möglich war, so dass sehr niedrige Enzymaktivitäten unter Umständen nicht erfasst werden konnten. Die Expression von D-Xylose Isomerasen, die eine sehr ähnliche Reaktion katalysieren, aus verschiedenen Organismen in Hefe resultierte ebenfalls entweder in nicht gebildeten oder in nicht funktionellen Enzymen (Sarthy *et al.*, 1987, Amore *et al.*, 1989, Hallborn, 1995, Moes *et al.*, 1996). In Bezug auf die Schwierigkeiten einer funktionellen Expression von D-Xylose-Isomerasen in Hefe wurden als mögliche Ursachen verschiedene der oben angeführten Probleme in betracht gezogen, allerdings wurde keine der Spekulationen verifiziert. Auch die bevorzugte Nutzung unterschiedlicher Kodons in *S. cerevisiae* und in Bakterien wurde diskutiert. Dies kann jedoch als Ursache ausgeschlossen werden, da *T. thermophilus*, dessen Xylose Isomerase aktiv exprimiert werden konnte (Walfridsson *et al.*, 1996) bei der Verwendung der Kodons die geringsten Ähnlichkeiten zu Hefe aufweist. Demzufolge hat dieser Aspekt vermutlich auch keinen Einfluß auf die Funktionalität der L-Arabinose Isomerasen in Hefe.

Die L-Arabinose Isomerasen aus *B. subtilis* und *M. smegmatis* konnten hingegen aktiv exprimiert werden, auch wenn die gemessenen Aktivitäten gering waren. Möglicherweise existieren grundlegende strukturelle Unterschiede zwischen den L-Arabinose Isomerasen der verschiedenen Organismen, wobei sich die Enzyme aus *B. subtilis* und *M. smegmatis* ähnlich sein könnten, während das *E. coli* Enzym abweichende Merkmale hat. Auch die D-Xylose Isomerasen verschiedener Organismen konnten nicht alle aktiv in Hefe exprimiert werden. Diese Enzyme werden jedoch abhängig von ihren physikalischen Eigenschaften und von Sequenzhomologien in zwei Gruppen unterteilt (Review: Bhosale *et al.*, 1996). Zu der ersten Gruppe gehören dabei die Enzyme Gram-positiver Bakterien (*Actinoplanes*, *Streptomyces* und *Arthrobacter*-Arten) und aus *Thermus* Arten mit hohem G+C-Gehalt der DNA. Die Enzyme der zweiten Gruppe (aus *B. subtilis*,

E. coli, *Lactobacillus pentosus* etc.) haben eine verlängerte N-terminale Region und ein nahezu neutrales pH-Optimum. Trotz der geringen Homologie zwischen beiden Gruppen sind jedoch die Aminosäuren, die in die Substrat- und Metall-Ionen-Bindung, sowie in die Katalyse involviert sind, vollständig konserviert. Beide Xylose-Isomerasen, die bisher aktiv in Hefe exprimiert werden konnten (Walfridsson *et al.*, 1996, Schründer *et al.*, 1996) gehören zu der ersten Gruppe, so dass ein Einfluß der Struktur und der physikalischen Eigenschaften auf die Funktionalität der Enzyme in Hefe nahe liegt. Die L-Arabinose Isomerasen verschiedener Organismen weisen jedoch in ihren Sequenzen alle relativ große Ähnlichkeiten zueinander auf. Demnach ist es am wahrscheinlichsten, dass die Entscheidung darüber, ob diese Enzyme aktiv in Hefe exprimiert werden können, von der Struktur (zum Beispiel Faltung des Proteins) abhängt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass hier signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymen verschiedener Organismen bestehen könnten.

4.2 Zufällige Mutagenese durch Selektion

Da trotz der funktionellen Expression aller für den L-Arabinose Katabolismus notwendigen Enzyme in Hefe kein Wachstum mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle erzielt werden konnte, wurden die Stämme JBY24-4P und JBY24-4EP auf Wachstum in L-Arabinose Medium selektiert (3.1.6). Auf diese Weise konnte ein Stamm isoliert werden, der gut mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnte. Mutanten, die in der Lage waren, besser in Xylose-Medium zu wachsen konnten von Wahlbom *et al.* (2002) nach vorangegangener zufälliger EMS-Mutagenese isoliert werden. Porep (1987) erreichte durch UV-Mutagenese eine verbesserte Xyluloseverwertung in *S. cerevisiae* Stämmen. Quain und Boulton (1987) konnten durch verlängerte Inkubation in Mannitol- bzw. Sorbitol-haltigem Medium und durch wiederholtes Umimpfen in neues Medium *S. cerevisiae* Stämme isolieren, die gut in diesem Medium wachsen konnten und nach der Selektion auf Mannitol- bzw. Sorbitol-haltigen Agarplatten weiter kultiviert werden konnten. Wurden diese Stämme jedoch zwischenzeitlich in Glukose-Medium inkubiert, verloren sie die Fähigkeit in Mannitol- bzw. Sorbitol-haltigem Medium zu wachsen. Eine solche reine Adaptation der Hefen konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da der selektierte Stamm JBY25-4M auch nach Kultivierung in Glukose-Medium weiterhin gutes Wachstum in L-Arabinose-Medium zeigte. Weitere Beispiele 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 und von Aarnio *et*

al. (1991), die Hefestämme selektierten, die eine gesteigerte Toleranz gegenüber Essigsäure zeigten.

4.3 Notwendigkeit eines zusätzlichen L-Arabinose Transporters

Bevor ein Zucker in Hefe metabolisiert werden kann, muß er zunächst über die Plasmamembran in die Zelle gelangen. Obwohl *S. cerevisiae* in der Lage ist Pentosen zu transportieren (1.5), ist sie jedoch nicht auf eine effiziente Aufnahme dieser Zucker bei niedrigen Konzentrationen oder in der Gegenwart von Glukose ausgerichtet. Es ist bekannt, dass auch bei der Hexose Glukose der Transport einer der wichtigsten Faktoren ist, die die Glukose-Fermentationsrate in *S. cerevisiae* bestimmen (Lagunas *et al.*, 1982, Oehlen *et al.*, 1994, Teusink *et al.*, 1998b). Es liegt also nahe, dass bei der Metabolisierung der Pentosen D-Xylose und L-Arabinose durch *S. cerevisiae* der Transport einen entscheidenden Einfluß ausübt und die relativ geringe natürliche Transportrate eine möglichst effiziente Umsetzung der Pentosen behindert. Auch Richard *et al.* (2002) vermuteten, dass ein Grund für das sehr langsame Wachstum des von ihnen konstruierten rekombinanten L-Arabinose metabolisierenden *S. cerevisiae* Hefestammes der langsame Transport der Arabinose in die Hefezelle ist. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Transport von L-Arabinose einen limitierenden Faktor für das Wachstum und auch für die Fermentation mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle darstellt. Deshalb wurde zusätzlich zu den Enzymen des L-Arabinose Katabolismus die hefeeigene Galaktose-Permease Gal2 überexprimiert, die in der Lage ist L-Arabinose zu transportieren (Kuo *et al.*, 1970). Während die L-Arabinose Isomerase, die L-Ribulokinase und die L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase absolut notwendig für das Wachstum von *S. cerevisiae* in L-Arabinose Medium waren, stellte sich heraus, dass ein Stamm, der keinen zusätzlichen L-Arabinose Transporter exprimiert, ein geringfügig schlechteres Wachstum zeigte, als ein Stamm mit allen vier Plasmiden (3.2.1). Dies deutete darauf hin, dass die Überexpression eines Transporters für L-Arabinose das Wachstum mit diesem Zucker verbessern kann. Auch die Fermentationsrate eines Stammes ohne Überexpression eines Transporters für L-Arabinose war im Vergleich zu einem Stamm mit überexprimiertem Transporter reduziert (3.5.1). Demzufolge stellt eine hohe Transportrate nicht nur für ein optimales Wachstum mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle, sondern auch für eine möglichst effektive Fermentation dieses Zuckers einen wichtigen Faktor dar. Ein weiterer Hinweis darauf, dass der Transport von L-Arabinose in die Zelle limitierend auf die Metabolisierung dieses Zucker wirkt, ist die Tatsache, dass im Zuge des Selektionsverfahrens (3.1.6) das für Gal2 kodierende Plasmid offensichtlich eine oder

mehrere Mutationen erworben hat, wodurch mit dem reisolierten Plasmid eine deutlich gesteigerte L-Arabinose Aufnahme erreicht werden konnte (3.2.1.1). Eliasson *et al.* (2000) stellten auch in Bezug auf die Pentose D-Xylose fest, dass unter anaeroben Bedingungen in Chemostat-Kulturen mit Mineral-Medium eine erhöhte Xylose-Konzentration im Medium einen gesteigerten Xylose-Fluß bewirkte und sich somit vermutlich der Transport limitierend auf den Fluß auswirkt. Hamacher *et al.* (2002) beobachteten dagegen, dass in dem von ihnen verwendeten *S. cerevisiae* PUA-Stamm, der jedoch auf schnelleres Wachstum auf Xylulose selektioniert worden war (Porep, 1987, Kötter und Ciriacy, 1993), eine zusätzliche Expression Xylose-transportierender Zuckertransporter kein besseres Wachstum in Xylose Medium bewirkte und auch die Ethanol-Produktionsrate unter semi-anaeroben Bedingungen nicht gesteigert werden konnte. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass bei der Verwertung der zweiten Pentose D-Xylose der Transport keine limitierende Rolle spielt. Allerdings wurde von ihnen diskutiert, dass der verwendete PUA-Stamm eventuell schon im Zuge des vorangegangenen Selektionsverfahrens eine gesteigerte Zucker-Transportkapazität erworben haben könnte. Somit ist anzunehmen, dass generell mit einer optimierten Aufnahme der Pentosen in *S. cerevisiae* die Metabolisierung dieser Zucker verbessert werden kann.

4.4 Plasmidkodierte Mutationen von JBY25-4M

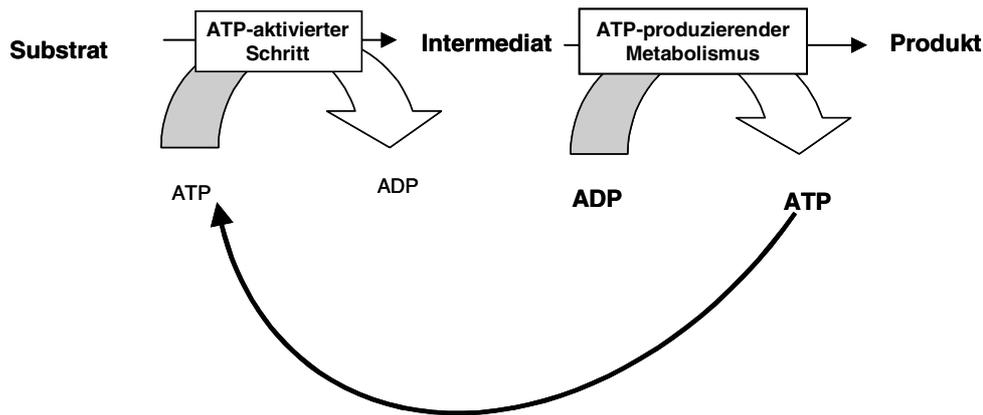
Im Zuge des Selektionsverfahrens auf besseres Wachstum in L-Arabinose Medium waren sowohl im Genom des Stammes JBY25-4M, als auch auf seinen Plasmiden spontane Mutationen aufgetreten, die eine optimierte Metabolisierung der L-Arabinose gewährleisten (3.2). Es hatte sich gezeigt, dass die für die Isomerase, die Epimerase und den Transporter kodierenden Plasmide Mutationen trugen, die jedoch nur einen geringen Einfluß auf das Wachstum in L-Arabinose Medium ausübten. Da in den ORFs der Enzyme selber keine Sequenzabweichungen zu den ursprünglichen Plasmiden festgestellt werden konnten, mußten die Mutationen andere Plasmidregionen betreffen (3.2.2). Die wahrscheinlichste Möglichkeit ist dabei eine Beeinflussung der Kopienzahl der Plasmide. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass keine gesteigerte Enzymaktivität der Isomerase und der Epimerase in Rohextrakten des selektierten Stammes festgestellt werden konnte. Die L-Arabinose Aufnahmerate hingegen war bei Verwendung des reisolierten Transporter-Plasmides gesteigert (3.2.1.1), was bei einer erhöhten Kopienzahl des Transporterplasmides zutreffen würde. Da eine detaillierte Untersuchung (z. B. Sequenzierung) der gesamten Plasmidregionen zu aufwendig gewesen wäre, wurden jeweils die reisolierten Isomerase-,

Epimerase- und Transporter-Plasmide eingesetzt, um eine optimale L-Arabinose-Metabolisierung zu erreichen.

4.4.1 Auswirkungen der Mutation der L-Ribulokinase

Bei Messungen der Enzymaktivitäten der heterolog exprimierten Enzyme des L-Arabinose Katabolismus in Rohextrakten des selektierten Stammes JBY25-4M war keine L-Ribulokinase Aktivität mehr nachzuweisen, während die Aktivitäten der anderen heterolog exprimierten Enzyme nahezu unverändert blieben (3.1.6). Dies stand in deutlichem Gegensatz zu der relativ hohen Aktivität der L-Ribulokinase vor der Selektion (3.1.3). Als verantwortlich für den Aktivitätsverlust zeigte sich ein Basenaustausch im *araB*-ORF an Position 361 (G₃₆₁ zu A₃₆₁). Diese Mutation resultierte in einem Aminosäureaustausch der Aminosäure 121 von Aspartat zu Asparagin im Kinase-Protein. Eine Aufreinigung sowohl des mutierten als auch des Wildtypproteins und Bestimmung der Enzymkinetiken bestätigten die Vermutung, dass der Austausch zu einer reduzierten Affinität der mutierten Kinase zu ihrem Substrat L-Ribulose führte und zeigten zudem, dass das mutierte Protein langsamer arbeitete, als das Wildtypenzym (3.2.3.2). Trotz dieser scheinbar negativen Auswirkungen der Mutation war das Wachstum in L-Arabinose Medium eines Stammes, der die mutierte L-Ribulokinase anstelle der Wildtyp-Kinase exprimierte, deutlich verbessert (3.2.2). Auch Untersuchungen, in denen entweder die Wildtyp- oder die mutierte Kinase von einem Centromer-Plasmid exprimiert wurden bestätigten, dass tatsächlich eine erniedrigte Aktivität des Enzyms einen Wachstumsvorteil für die Hefe bedeutete (3.2.3.1). Allerdings durfte die Aktivität der Kinase auch nicht zu gering sein, da in diesem Fall vermutlich die Umsetzung der L-Ribulose zu L-Ribulose-5-Phosphat limitierend wird und dann das Wachstum in L-Arabinose Medium beeinträchtigt wird. Somit muß sich die Aktivität der L-Ribulokinase in einem engen Rahmen bewegen.

Ein von Teusink *et al.* (1998a) für den Glukose-Metabolismus aufgestelltes mathematisches Modell erklärt dieses Phänomen. Viele Stoffwechselwege in der Zelle beginnen mit einem ATP verbrauchenden Schritt, durch den die Reaktion sozusagen aktiviert wird. In späteren Schritten wird jedoch ein Überschuß an ATP produziert, der von der Zelle genutzt werden kann. Ist der erste, ATP verbrauchende Schritt aber zu schnell, kann der Rest des Metabolismus nicht mithalten, so dass die Zelle ihr komplettes ATP verbraucht, bevor neues ATP gebildet werden kann. Demzufolge kann die hohe, unkontrollierte Aktivität einer Zucker-Kinase am Anfang eines metabolischen Weges zu einer anomalen Anhäufung von Zucker-Phosphaten führen und sämtliches verfügbares intrazelluläres ATP verbrauchen, so dass der Metabolismus zum Erliegen kommt (s. Abb. 26).



modifiziert nach: Teusink *et al.* (1998a)

Abb. 26: Generelles Schema eines katabolischen Stoffwechselweges, bei dem im ersten Schritt die Aktivierung eines Substrates an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist.

Ähnliche Beobachtungen wurden in Bezug auf den Metabolismus der Pentose D-Xylose in *S. cerevisiae* gemacht. Ein von Eliasson *et al.* (2001) aufgestelltes kinetisches Modell der ersten Schritte des Xylose-Metabolismus, das eventuelle negative Auswirkungen einer Überexpression der Xylulokinase außer acht läßt, ergibt zwar, dass die Überproduktion dieses Enzyms für die Ethanol-Produktion mit einem *XYL1* und *XYL2* exprimierenden, rekombinanten Hefestamm notwendig ist. Es existieren jedoch Hinweise, dass eine zu hohe Aktivität der Xylulokinase den Metabolismus beeinträchtigt. So erzielten Johansson *et al.* (2001) durch zusätzliche Überexpression von *XKS1* auf einem 2 μ Plasmid in *XYL1* und *XYL2* exprimierenden Stämmen unabhängig vom Medium eine gesteigerte Ethanol-Ausbeute und eine verminderte Produktion von Xylitol, gleichzeitig war jedoch die Xylose-Verbrauchsrate beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu konnten Toivari *et al.* (2001) in dem von ihnen verwendeten rekombinanten Xylose metabolisierenden Stamm durch eine Überproduktion der endogenen Xylulokinase die Xylose-Verbrauchsrate steigern. Die Unterschiede zwischen den in diesen beiden Arbeiten verwendeten Hefestämmen sind dabei insofern interessant, als beide Stämme denselben Ausgangsstamm haben (van Dijken *et al.*, 2000). Ein Unterschied zwischen den Stämmen ist jedoch, daß *XKS1* in dem Stamm von Johansson *et al.* (2001) um etwa zwei Größenordnungen stärker überexprimiert ist, als in dem Stamm von Toivari *et al.* (2001). Diese stärkere Expression der Xylulokinase könnte sich entsprechend zu dem von Teusink *et al.* (1998a) aufgestellten Modell negativ auf die Xylose-Verbrauchsrate auswirken (Johansson, 2001). Außerdem konnten von Wahlbom *et al.* (2001) mit einer genomisch integrierten Version von *XKS1* in rekombinanten Xylose verwertenden *S. cerevisiae* Stämmen höherer Xylose-Verbrauch und höhere Ethanol-Produktion

nachgewiesen werden, als von Johansson *et al.* (2001) mit der stärker über-exprimierten Version auf einem 2 μ Plasmid. Dies spricht ebenfalls dafür, dass eine geringere Aktivität des Enzyms vorteilhafter für den Xylose-Metabolismus ist. Ho *et al.* (1998) berichteten zwar, dass eine Überexpression der endogenen *S. cerevisiae* Xylulokinase in einem rekombinanten Xylose-verwertenden Hefestamm zu einer gesteigerten Xylose-Verbrauchsrate und einer erhöhten Ethanol-Ausbeute, sowie zu einer geringeren Xylitol-Anhäufung führte. Dabei wurde jedoch kein direkter Vergleich der Xylose-Fermentationskapazitäten eines Stammes, der nur *XYL1* und *XYL2* exprimiert und eines Stammes, der zusätzlich *XKS1* exprimiert angestellt. Die Ergebnisse bezogen sich stattdessen auf die höhere Xyloseverbrauchsrate des *XYL1* und *XYL2* sowie *XKS1* exprimierenden Stammes im Vergleich zu früheren Arbeiten mit anderen nur *XYL1* und *XYL2* beinhaltenden Stämmen (Kötter und Ciriacy, 1993, Tantirungkij *et al.*, 1993, Walfridsson *et al.*, 1997). Alle diese Ergebnisse zusammen deuten darauf hin, dass sich auch die Aktivität der Xylulokinase, ebenso wie in dieser Arbeit für die L-Ribulokinase-Aktivität in einem rekombinanten L-Arabinose verwertenden Hefestamm beschrieben, in einem intermediären Rahmen bewegen muß.

Da die von der L-Ribulokinase katalysierte Reaktion erst das zweite Enzym des in der vorliegenden Arbeit exprimierten L-Arabinose Stoffwechselweges ist, könnte aufgrund der niedrigen gemessenen Aktivität des ersten Enzyms, der L-Arabinose Isomerase, argumentiert werden, dass das von Teusink *et al.* (1998a) aufgestellte Modell für diesen metabolischen Weg eventuell nicht angewendet werden kann. Denn wenn schon der erste Schritt einer Metabolisierung limitierend für den gesamten Weg ist, kann normalerweise die Aktivität des zweiten Enzyms nicht zu hoch sein. Dabei muß jedoch wiederum beachtet werden, dass die Messung der L-Arabinose Isomerase Aktivität nicht quantitativ erfolgen konnte, so dass die tatsächliche Aktivität vermutlich deutlich höher liegt als die gemessene Aktivität (siehe 2.31.2). Demnach stellt der erste Schritt der Umsetzung der L-Arabinose nicht unbedingt den limitierenden Faktor dar. Ein weiterer Grund dafür, dass eine erniedrigte Aktivität der L-Ribulokinase zu einer besseren Verwertung des Zuckers führt, könnte zum Beispiel auch die Tatsache sein, dass die L-Ribulokinase zusätzlich ATPase Aktivität aufweist (Lee *et al.*, 2001). Dadurch könnte es auch dann zu einem vorzeitigen Verbrauch sämtlichen zur Verfügung stehenden ATPs kommen, wenn schon der erste Schritt des L-Arabinose Katabolismus limitierend ist. Ebenso wäre es möglich, dass die L-Ribulokinase bei starker Überexpression durch unspezifische Nebenaktivitäten unter ATP-Verbrauch andere Metabolite in der Zelle umsetzt, was ebenfalls dazu führen würde, dass nicht mehr genug ATP für den restlichen Metabolismus zur Verfügung steht. Gegen diese Hypothesen

spricht jedoch, dass bei der Messung der L-Ribulokinase Aktivität nach der Aufreinigung der Kinasen keine unspezifische Umsetzung von ATP ohne Zugabe des Substrates mehr messbar war.

4.5 Genomische Mutationen von JBY25-4M

Verschiedene Untersuchungen hatten gezeigt, dass der selektierte Stamm JBY25-4M im Zuge des Selektionsverfahrens auch genomische Mutationen erworben haben muß (3.2). Eine Untersuchung des Wachstumsverhaltens eines diploiden JBY25-4M Stammes im Vergleich zu einem diploiden Wildtypstamm (3.2.4.1) und eine vorläufige Tetradenanalyse (3.2.4.2) hatten außerdem ergeben, dass mehr als eine Mutation im Genom des Stammes JBY25-4M vorliegen und dass mindestens eine dieser Mutationen dominant und mindestens eine weitere rezessiv sein muß. In einem Genbank-Screen mit einer Genbank des Stammes JBY25 wurde das *TAL1*-Gen auf mehreren verschiedenen unabhängigen Genbank-Plasmiden als verantwortlich für besseres Wachstum des Wildtypstammes, der transformiert war mit den Plasmiden für den L-Arabinose Katabolismus, identifiziert (3.2.4.3). Das *TAL1*-Gen kodiert für die Transaldolase, ein Enzym des Pentosephosphatweges, das einen der flußkontrollierenden Schritte dieses Stoffwechselweges katalysiert, nämlich die Umsetzung von Fruktose-6-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat zu Sedoheptulose-7-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Andere Mutationen mit einem dominanten Phänotyp konnten im Genom des Stammes jedoch nicht aufgefunden werden.

4.5.1 Einfluß der Transaldolase-Aktivität auf das Wachstum in L-Arabinose Medium

Anhand der Sequenzierung des gesamten *TAL1*-ORFs und der flankierenden Regionen aus dem Wildtypstamm, sowie aus dem selektierten Stamm JBY25 wurde ersichtlich, dass es keine Mutation in dieser Region war, die das bessere Wachstum in L-Arabinose Medium verursachte (3.2.4.3). Vielmehr war alleine die geringe Überexpression von *TAL1* durch die zusätzliche Kopie auf dem Genbank-Plasmid ausreichend, um einen Wachstumsvorteil zu bewirken. Diese Beobachtung wurde durch die Expression des *TAL1*-Gens ohne die flankierenden DNA-Sequenzen auf einem Centromer-Plasmid im Wildtypstamm bestätigt (3.2.5), da auch diese Transformanten ein deutlich verbessertes Wachstum in L-Arabinose Medium zeigten. Die in der genomweiten DNA-„Microarray“-Analyse erhaltenen Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass mindestens ein Teil des rechten Armes von Chromosom XII, der auch das *TAL1*-Gen beinhaltet, im Stamm JBY25 dupliziert vorliegt (3.4). Eine solche Duplikation würde auch

erklären, dass *TAL1* auf den Genbank-Plasmiden bei der Suche nach dominanten, genomischen Mutationen identifiziert wurde. Dementsprechend war zusätzlich die Transaldolase-Aktivität in Stamm JBY25 leicht erhöht (3.3.1). Alle diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die durch die Transaldolase katalysierte Reaktion zwar offensichtlich limitierend für den L-Arabinose Katabolismus ist, aber schon eine geringfügige Steigerung der Expression dieses Enzyms eine deutlich verbesserte Metabolisierung von L-Arabinose vermitteln kann. Eine Überexpression von *TAL1* im Stamm JBY25, der schon von vornherein eine höhere Transaldolase-Aktivität aufweist, oder eine starke Überexpression der Transaldolase von einem 2 μ Plasmid, unabhängig davon in welchem Stammhintergrund, brachte keine weitere Verbesserung des Wachstums in L-Arabinose Medium (3.2.5/3.3.1). Dies deutet darauf hin, dass die Bildung von zuviel Tal1 Protein sich eher negativ auswirken könnte.

Senac und Hahn-Hägerdal, (1990, 1991) und Kötter und Ciriacy (1993), die die Etablierung eines funktionellen D-Xylose Stoffwechselweges in *S. cerevisiae* als Ziel hatten, vermuteten dass die Reaktionen des nicht-oxidativen Pentosephosphatweges und dabei insbesondere die von der Transaldolase und der Transketolase katalysierten Reaktionen einen Engpaß für den Pentose-Metabolismus in *S. cerevisiae* darstellen. Dies war begründet in der signifikanten Anhäufung von Sedoheptulose-7-Phosphat bei der Fermentation von D-Xylose mit rekombinanten Xylose-verwertenden Hefestämmen. Tatsächlich verbesserte eine Überexpression des endogenen *TAL1*-Gens, das für die Transaldolase kodiert, das aerobe Wachstum eines solchen Stammes auf Xylose Medium deutlich, während die Überexpression von *TKL1*, das für die Transketolase kodiert, keinen Einfluß auf das Wachstum mit Xylose Medium hatte (Walfridsson *et al.*, 1995). Allerdings war die Ethanol-Produktion unter den verwendeten Bedingungen nicht beeinflusst. Inwieweit bei dem in dieser Arbeit konstruierten L-Arabinose verwertenden Hefestamm die Transaldolase-Aktivität einen Einfluß auf die Fermentationsrate hat, kann anhand der durchgeführten Versuche nicht genau bestimmt werden. Es ist zwar anzunehmen, dass die erhöhte Transaldolase-Aktivität im Stamm JBY25 einer der entscheidenden Faktoren sowohl für das Wachstum in L-Arabinose Medium, als auch für die Fermentation dieses Zuckers ist, jedoch können auch weitere durch die Selektion entstandene, bislang nicht identifizierte Mutationen im Genom dieses Stammes eine Rolle spielen. Um darüber entscheiden zu können müssten zusätzliche Fermentationen, diesmal mit dem Stamm JBY24-3T, durchgeführt werden. Dieser Stamm basiert auf dem Wildtyp Stamm CEN.PK2-1C, der im Gegensatz zum Stamm JBY25 keine genomischen Mutationen als Anpassung an eine verbesserte L-Arabinose Metabo-

lisierung enthält. Allerdings ist *TAL1* in diesem Stamm von einem Centromer-Plasmid überexprimiert. Sollte mit dem Stamm JBY24-3T also eine ebenso effiziente Fermentation von L-Arabinose erreicht werden können, wie mit dem selektierten Stamm JBY25-4M, wäre bestätigt, dass der entscheidende Faktor für die im Vergleich zum Wildtypstamm verbesserte L-Arabinose Fermentation eine erhöhte Expression von *TAL1* ist. Außerdem wäre es interessant zu testen, ob ein Stamm, der *TAL1* stark überexprimiert (also von einem 2 μ Plasmid) eine gesteigerte Fermentationsrate im Vergleich zu Stamm JBY25-4M aufweist. Dies ist zwar eher unwahrscheinlich, da das Wachstum eines solchen Stammes in L-Arabinose Medium nicht verbessert war, aber eventuell könnten die beim Wachstum aeroben bzw. bei der Fermentation nahezu anaeroben Bedingungen in Bezug auf die optimale Metabolisierung der Pentose einen Unterschied machen. In diesem Fall könnte ein unter aeroben Bedingungen limitierender Schritt unter anaeroben Bedingungen keinen Einfluß haben oder umgekehrt. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zu *TAL1* deuten jedoch insgesamt darauf hin, dass die Kapazität des nicht-oxidativen Pentosephosphatweges und dabei insbesondere die Aktivität der Transaldolase in Wildtyp *S. cerevisiae* bei der Metabolisierung der Pentosen nicht für eine effiziente Umsetzung der entstehenden Pentosephosphatweg-Intermediate ausreicht und bestätigen damit frühere Vermutungen (siehe oben).

Generell übt allerdings ein einzelnes Enzym nur einen geringen Einfluß auf den Fluß von Metaboliten aus. So hatte zum Beispiel die Überexpression eines einzigen Enzyms der Tryptophan-Biosynthese lediglich einen leichten Anstieg des Flusses zur Folge, während die gleichzeitige Überproduktion von fünf Enzymen einen starken Anstieg bewirkte (Niederberger *et al.*, 1992). Auch die Überexpression einzelner glykolytischer Gene erbrachte keine Steigerung des glykolytischen Flusses (Schaaff *et al.*, 1989), die Überexpression von sieben Enzymen hingegen (Hauf *et al.*, 2000) steigerte die Glykolyse-Kapazität unter bestimmten Bedingungen (Smits *et al.*, 2000). Aus diesem Grund konstruierte Johansson (2001) einen Hefestamm, in dem vier Gene des nicht-oxidativen Pentosephosphatweges (*RPE1*, *RKI1*, *TAL1* und *TKL1*) überexprimiert waren. Obwohl die Aktivitäten aller resultierenden Enzyme deutlich gesteigert werden konnten, wurde aber weder im Chemostat, noch in Batch-Kulturen eine verbesserte Xylose-Verbrauchsrate erzielt. Möglicherweise könnte jedoch für die Metabolisierung der L-Arabinose eine solche Überexpression des gesamten nicht-oxidativen Pentosephosphatweges eine weiter optimierte Verwertung dieses Zuckers bewirken.

In Bezug auf eventuell vorhandene weitere genomische Mutationen des Stammes JBY25 konnte in dieser Arbeit weder in den genomweiten DNA-Microarray-

Analysen (siehe 4.6), noch über den eingesetzten Genbank-Screen Aufschluß erhalten werden. Dennoch ist es aufgrund des intermediären Wachstumsverhaltens des diploiden mutierten Stammes auf L-Arabinose-haltigen Agarplatten wahrscheinlich, dass mindestens eine weitere rezessive Mutation vorhanden ist. Die andere Möglichkeit besteht darin, dass das schlechtere Wachstum des diploiden mutierten Stammes dadurch bedingt ist, dass insgesamt nur eine *TAL1*-Expression von 150% im Vergleich zum haploiden Wildtypstamm vorliegt, während im haploiden mutierten Stamm 200% der Expression vorhanden sind.

4.6 Problematik der genomweiten Expressionsanalyse durch DNA-„Microarrays“

Ziel der genomweiten DNA-„Microarray“-Analyse war es Mutationen im Genom des selektierten Stammes JBY25 zu finden, die mit der verbesserten L-Arabinose Verwertung durch diesen Stamm in Zusammenhang stehen. Mit Hilfe der „Microarray“-Analyse können dabei jedoch nur solche Mutationen erfasst werden, die die Regulation auf transkriptioneller Ebene betreffen. In den vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsansätzen konnten insgesamt 10 Gene identifiziert werden, die im Stamm JBY25-4M mehr als 1,5-fach stärker exprimiert sind, als im Stamm JBY24-4M (3.4). Auffallend war dabei, dass diese Gene alle auf dem rechten Arm des Chromosom XII lokalisiert sind und dass die Expression jeweils in etwa verdoppelt war. Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, dass es im Zuge des Selektionsverfahrens zur besseren L-Arabinose Verwertung zu einer Duplikation dieses Teil des Genoms gekommen ist. Um jedoch sicheren Aufschluß darüber zu erhalten wäre es nötig den Karyotyp beider Stämme zu bestimmen und zu vergleichen. Allerdings konnte eine ähnliche Duplikation bestimmter Teile des Hefegenoms als Antwort auf eine verlängerte Inkubation in einer Nährstoff-limitierten Umgebung schon von Brown *et al.* (1998) beobachtet werden. In diesem Fall waren Hefestämme über 450 Generationen unter Glukose-Limitierung kultiviert worden. Nach dieser Selektion zeigten die Zellen Wachstum bei signifikant erniedrigten Glukose-Konzentrationen und eine erhöhte Zellmasse pro Mol Glukose. Außerdem war der hoch-affine Glukosetransport deutlich gesteigert. Dabei hatte sich herausgestellt, dass mehrfache Tandem-Duplikationen der Hexosetransporter-Gene *HXT6* und *HXT7* aufgetreten waren. Die Autoren schlagen einen genetischen Mechanismus vor, der Genduplikationen als gängige Antwort von Mikroorganismen auf Nährstoff-Limitierung bewirkt. In einer aktuelleren Publikation konnten Dunham *et al.* (2002) zeigen, dass eine solche Neu-Arrangierung des Genoms in *S. cerevisiae* generell eine Reaktion auf starken Selektionsdruck zu sein scheint.

Obwohl vermutlich noch weitere Mutationen im Genom des Stammes JBY25 vorliegen, konnten in der genomweiten Transkriptionsanalyse außer den oben erwähnten ORFs keine zusätzlichen Abweichungen zum Wildtypstamm gefunden werden. Weder konnten andere signifikant induzierte ORFs identifiziert werden, noch reprimierte ORFs. Daraus kann allerdings nicht automatisch geschlossen werden, dass es nicht zu weiteren genomischen Veränderungen im Stamm JBY25 gekommen ist. Zunächst muss man beachten, dass nicht alle Modifikationen mit Hilfe der „Microarray“-Analysen festgestellt werden können. Zum Beispiel eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene oder auch eine Mutation, die einen Einfluss auf die Aktivität eines Enzyms hat, können mittels dieser Methode nicht erfasst werden. Desweiteren könnte auch die Sensitivität des Systems zu gering sein, das heißt, dass sehr geringe Expressionsveränderungen nicht mehr detektiert werden können. Problematisch war es auch vergleichbare Bedingungen zwischen den beiden zu untersuchenden Stämmen zu schaffen. Während der selektierte Stamm JBY25-4M sehr gut in L-Arabinose Medium wächst, erreicht Stamm JBY24-4M maximal eine Verdopplung in diesem Medium. Insofern war es nahezu unmöglich beide Stämme in derselben Wachstumsphase zu ernten, wie es für eine absolut genaue Durchführung der Analyse notwendig gewesen wäre. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zwei Versuchsansätze in Galaktose-Medium durchgeführt, wodurch diese Problematik umgangen wurde. Der Nachteil bei der Verwendung von Galaktose-Medium ist jedoch, dass solche Mutationen, die eine spezifische Induktion oder Repression bestimmter ORFs nur in Anwesenheit von Arabinose bewirken, nicht erfasst werden könnten. Dies ist in Anbetracht dessen, dass Stamm JBY25-4M durch verlängerte Inkubation in L-Arabinose-Medium selektiert wurde aber nicht unwahrscheinlich. Demnach muss davon ausgegangen werden, dass eventuell vorhandene Mutationen aufgrund solcher Beschränkungen nicht detektiert werden konnten.

4.7 L-Arabinose Fermentation

Die mit dem Stamm JBY25-4M erreichte Fermentationsrate von 0,6-0,8 g Ethanol/gTG x h liegt in derselben Größenordnung wie die Fermentationsraten, die bisher mit den am besten Xylose-fermentierenden rekombinanten *S. cerevisiae* Hefestämmen erhalten wurden (Kötter *et al.*, 1990, Wahlbom *et al.*, 2002). Mit 60% der maximalen theoretischen Ethanol-Ausbeute konnte somit ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden (3.5). Dennoch muß man deutlich sagen, dass vermutlich noch bessere Resultate erreicht werden könnten. Zum einen konnte, wie bereits erwähnt, unter den in dieser Arbeit verwendeten, nicht komplett anaeroben Bedingungen ein Teil des gebildeten Ethanols wieder von den Hefen

veratmet werden oder verdunsten, so dass die gemessene Ethanol-Ausbeute vermutlich niedriger ist als die tatsächliche Ausbeute. Zum anderen wurde der in der vorliegenden Arbeit konstruierte und selektierte Hefestamm nicht auf L-Arabinose-Verwertung unter anaeroben Bedingungen, wie sie bei der Fermentation vorherrschen, optimiert, sondern auf Wachstum unter aeroben Bedingungen. Um eine weitere Verbesserung der Fermentationskapazität dieses Stammes zu erhalten könnte ein neues Selektionsverfahren angewendet werden, bei dem eine Selektion auf die Metabolisierung der Pentose unter anaeroben Bedingungen stattfindet. Dafür könnte in einem ersten Schritt eine Selektion auf Wachstum in L-Arabinose Medium unter anaeroben Bedingungen vollzogen werden und in einem zweiten Schritt eine Selektion auf die optimale Fermentation des Zuckers.

4.8 Möglichkeiten zur stabileren Expression der Gene des L-Arabinose Katabolismus

Sowohl die Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus in das Genom des Stammes CEN.PK2-1C (3.6.1), als auch die Konstruktion eines einzigen Plasmides mit den drei für die L-Arabinose Verwertung absolut notwendigen Genen (3.6.2) hatten nicht den gewünschten Erfolg. Dies ist darin begründet, dass für das Wachstum in L-Arabinose Medium die Aktivitäten der einzelnen Enzyme und vermutlich auch das Verhältnis der Aktivitäten zueinander optimal angepasst sein müssen, wie in dem durch Selektion für die Metabolisierung von L-Arabinose optimierten Stamm JBY25-4M. Jede Veränderung dieser fein abgestimmten Situation, sei es durch die Verwendung anderer Promotoren (siehe 3.6.2), oder durch eine Veränderung der Kopienzahl, die eine Integration mit sich bringt, resultierte in dieser Arbeit in einem partiellen oder vollständigen Verlust der Enzymaktivitäten (verringerte Aktivität der genomisch integrierten L-Ribulokinase, keine meßbare Aktivität der integrierten Epimerase, siehe 3.6.1) bzw. in einem schlechteren Wachstums in L-Arabinose Medium. Zusätzlich erschwerten die großen homologen Bereiche die Konstruktion eines Plasmides, das alle drei Gene des L-Arabinose Katabolismus unter der Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors enthalten sollte. In diesem Fall konnte das dritte Gen nicht mehr auf ein solches Plasmid kloniert werden. Auf der anderen Seite bringt die Verwendung von vier einzelnen Plasmiden zur Etablierung des L-Arabinose Katabolismus verschiedene Probleme mit sich. Abgesehen von den Beeinträchtigungen des gesamten Zell-Metabolismus durch die hohe Plasmid-Last bzw. die daraus resultierende Protein-Last, war der in dieser Arbeit konstruierte L-Arabinose verwertende Hefestamm nur jeweils über einen Zeitraum von ca. 6-8 Wochen stabil. Nach dieser Zeit mußte der Stamm wieder neu mit den vier Plasmiden

transformiert werden. Dabei war auch die Transformation mit vier Plasmiden gleichzeitig nicht immer in einem Arbeitsgang möglich, so dass sie oft in zwei einzelnen Schritten erfolgen mußte. Desweiteren waren die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen oft relativ schwer reproduzierbar. Diese Probleme waren vermutlich in Rekombinationen zwischen den Plasmiden begründet, die durch die relativ großen identischen Plasmid-Bereiche ermöglicht wurden. Aufgrund dessen wäre eine stabilere Expression des L-Arabinose Stoffwechselweges in Hefe sehr wünschenswert und würde mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer noch mehr verbesserten Metabolisierung der Pentose beitragen.

Eine Möglichkeit mehrere Gene gleichzeitig stabil in das Genom eines Organismus zu integrieren ist eine Integration in die ribosomale DNA (rDNA), die in vielen Kopien in der Zelle vorliegt (Lopes *et al.*, 1989). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass durch eine multiple Integration der verwendeten integrativen Plasmide hohe Kopienzahlen erzielt werden können und dass mehrere verschiedene Gene gleichzeitig unter Verwendung des selben Selektionsmarkers (beispielsweise im einfachsten Fall Aminosäure-Markergene, die in Aminosäure-auxotrophen Stämmen eingesetzt werden können, oder auch dominante Marker) integriert werden können (Klabunde *et al.*, 2002). Durch die Verwendung ineffizienter Promotoren für die kodierten Selektionsmarkergene und die resultierende sehr geringe Expression werden bei Selektion auf Aminosäure-Prototrophie die integrierten Kopien vielfach amplifiziert. Der genaue Mechanismus dieser Amplifikation ist allerdings nicht bekannt (Bergkamp *et al.*, 1992). Die Integration ist dabei mitotisch stabil, das heißt die integrierten Plasmide bleiben auch unter nicht-selektiven Bedingungen in Vollmedium stabil erhalten. Verschiedene Arbeitsgruppen haben eine solche Integration von bis zu drei verschiedenen Genen gleichzeitig in das Genom von *S. cerevisiae* und anderen Hefestämmen erfolgreich eingesetzt und konnten auf diese Weise heterologe Proteine in großen Mengen produzieren (Lopes *et al.*, 1989, Bergkamp *et al.*, 1992, Rossolini *et al.*, 1992, Nieto *et al.*, 1999, Klabunde *et al.*, 2002). Eine Integration der Gene des L-Arabinose Katabolismus in die ribosomale DNA des Stammes JBY25 wäre vor allem deshalb besonders interessant, da die jeweilige optimale Enzymaktivität auch von der Kopienzahl abhängt und eventuell auch die Menge der Enzyme im Verhältnis zueinander eine Rolle spielt. Das heißt, dass durch eine Selektion auf L-Arabinose Verwertung eines Stammes, der in die ribosomale DNA integrierte Gene für den L-Arabinose Katabolismus trägt, ein optimierter Stamm erhalten werden könnte, bei dem jedes Gen individuell in so vielen Kopien wie nötig vorliegt und somit jedes Enzym in der optimalen Konzentration in der Zelle vorkommen würde.

4.9 Entscheidende Faktoren der L-Arabinose Verwertung in *S. cerevisiae*

Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass verschiedene Faktoren einen entscheidenden Einfluß auf die L-Arabinose Verwertung durch *S. cerevisiae* ausüben (Abb. 27).

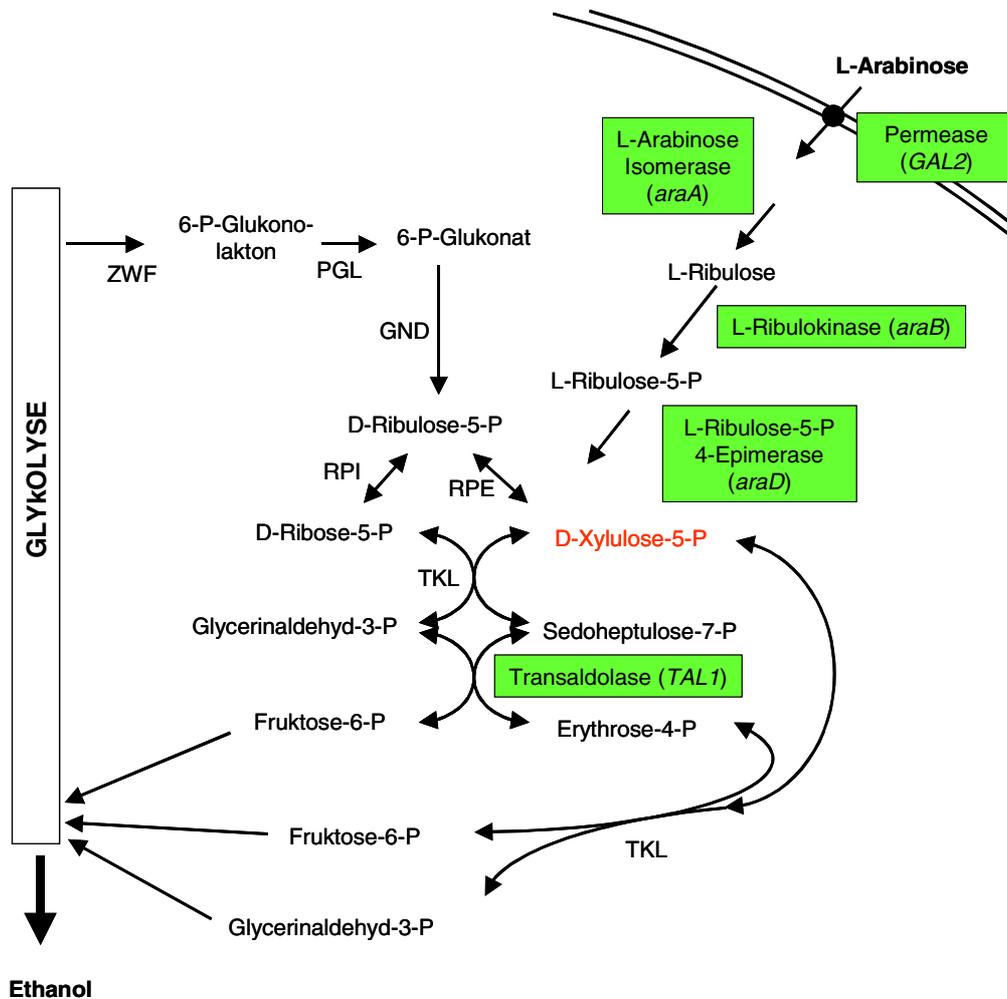


Abb. 27: Schema des L-Arabinose Katabolismus in dem in dieser Arbeit konstruierten *S. cerevisiae* Hefestamm. Enzyme, die eine wichtige Rolle für die L-Arabinose-Verwertung durch Hefe spielen, sind grün unterlegt dargestellt.

Zunächst muß der Zucker über einen spezifischen Transporter schnell und effizient in die Zelle transportiert werden. Im Anschluß erfolgt die Metabolisierung der Pentose bis zum D-Xylulose-5-Phosphat. Dabei ist jedoch die heterologe Expression einer aktiven L-Arabinose Isomerase notwendig, wie es in dieser Arbeit für die Enzyme aus *B. subtilis* oder *M. smegmatis* im Gegensatz zu demjenigen aus *E. coli* nachgewiesen wurde. Die Aktivität des folgenden Enzyms, der L-Ribulokinase darf nicht zu hoch sein, aber auch nicht zu gering und muß sich demzufolge in einem engen Rahmen bewegen. Für die weitere Metabo-

lisierung von D-Xylulose-5-Phosphat über den Pentosephosphatweg ist schließlich noch eine erhöhte Aktivität der Transaldolase erforderlich, die aber ebenfalls nicht zu stark überexprimiert sein darf.

4.10 Biotechnologische Aspekte der Arbeit

Wie bereits erwähnt ist die Existenz eines *S. cerevisiae* Hefestammes mit erweitertem Substratspektrum, wie er in dieser Arbeit konstruiert wurde, vor allem für eine Anwendung in industriellen Fermentationsprozessen zur Produktion von Ethanol aus pflanzlicher Biomasse von großer Bedeutung. Ein solcher Hefestamm müsste jedoch idealerweise in der Lage sein neben L-Arabinose auch die zweite wichtige Pentose D-Xylose zu metabolisieren. Um dies zu erreichen müsste entweder in dem Stamm JBY25-4M zusätzlich ein Xylose-Stoffwechselweg exprimiert werden, was jedoch aufgrund der weiteren metabolischen Belastung durch Plasmid- und Protein-Last problematisch sein könnte. Die zweite Möglichkeit wäre es den in dieser Arbeit beschriebenen L-Arabinose Stoffwechselweg in einem bereits existierenden rekombinanten D-Xylose fermentierenden *S. cerevisiae* Stamm zu exprimieren. Dies wäre allerdings aufgrund derselben Problematik nur dann wirklich sinnvoll, wenn dafür eine „Expressions-kassette“ mit den Genen dieses Weges zur Verfügung stände. Außerdem wären in diesem Fall genomische Mutationen wie im Stamm JBY25, die eventuell eine entscheidende Rolle für den L-Arabinose Katabolismus spielen, nicht vorhanden. Es wäre also möglich, dass die L-Arabinose Verwertung in einem solchen Stamm nicht so effizient wäre wie in dieser Arbeit gezeigt bzw. wäre es eventuell erforderlich diesen Stamm erneut einer Selektion auf optimiertes Wachstum in L-Arabinose Medium zu unterziehen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass die in industriellen Fermentationsprozessen eingesetzten und dafür optimierten Hefestämme prototroph, meistens diploid oder aneuploid und darüber hinaus wenig charakterisiert sind. Dadurch sind sie zum Beispiel nicht für eine genetische Manipulation mit Auxotrophie-Markern geeignet, so daß für eine genetische Manipulation dominante Resistenz-Marker verwendet werden müssen. (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Außerdem sind diese Stämme nur schwierig zu transformieren. Die Übertragung des L-Arabinose Katabolismus in einen solchen Industriestamm ist demnach ebenfalls nicht unproblematisch. Ein Xylose verwertender *Saccharomyces* Industriestamm ist zum Beispiel der Stamm 1400, ein Hybrid aus *S. diastaticum* und *S. uvarum*, der auf gesteigerte Temperatur-Toleranz selektiert worden war (D'Amore *et al.*, 1989). In diesen Stamm waren multiple Kopien der *P. stipitis*

XYL1- und *XYL2*-Gene, sowie des *S. cerevisiae XKS1*-Gens unter der Kontrolle von glykolytischen Promotoren integriert worden. Der entstandene rekombinante Stamm 1400 war in nicht-selektivem Medium stabil und fermentierte in einem komplexen Medium Xylose zu Ethanol (Ho *et al.*, 1998, 1999).

Ein weiteres großes Problem eines Hexosen und Pentosen verwertenden Industriestammes stellt die Kofermentation der Zucker dar. So würde bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose und anderen Hexosen in den Hydrolysaten pflanzlicher Biomasse wiederum eine Verdrängung der Pentosen durch die Hexosen an den Transportproteinen entstehen. Außerdem wäre vermutlich eine gleichzeitige Fermentation der Hexosen und Pentosen schwer umzusetzen. So hatten Mohagheghi *et al.* (2002) in ihrem rekombinanten Xylose und Arabinose fermentierenden *Z. mobilis* Stamm zwar eine Kofermentation von Glukose, Xylose und Arabinose erreicht, dennoch wurden aber die Zucker bevorzugt in dieser Abfolge umgesetzt. Eine ähnliche Problematik könnte demzufolge auch in Hexosen und Pentosen verwertenden Hefestämmen auftreten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Als ideales Ausgangssubstrat für industrielle Fermentationen zur Herstellung von Bioalkohol durch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bietet sich pflanzliche Biomasse an. Allerdings kann *S. cerevisiae* die darin in großer Menge enthaltenen Pentosen D-Xylose und L-Arabinose nicht verwerten. Für einen ökonomisch effizienten Fermentationsprozess ist es daher essentiell, das Substratspektrum der Hefe entsprechend zu erweitern. Während bereits rekombinante Hefestämme existieren, die in der Lage sind D-Xylose zu Ethanol zu vergären, schlugen alle bisherigen Versuche fehl, L-Arabinose vergärende *S. cerevisiae* Stämme zu konstruieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun zum ersten Mal ein Hefestamm konstruiert werden, der L-Arabinose als alleinige Kohlenstoffquelle für Wachstum nutzen und zu Ethanol vergären kann. Dafür wurde zunächst ein in den Pentosephosphatweg mündender bakterieller L-Arabinose Stoffwechselweg in *S. cerevisiae* exprimiert, der aus der L-Arabinose Isomerase von *Bacillus subtilis* und der L-Ribulokinase und L-Ribulose-5-Phosphat 4-Epimerase von *Escherichia coli* bestand. Ausserdem wurde die hefeeigene Galaktose-Permease, die in der Lage ist L-Arabinose zu transportieren, in diesem Stamm überexprimiert. Obwohl alle vier Proteine in funktioneller Form in der Hefe exprimiert werden konnten, war dieser Stamm zunächst nicht in der Lage auf L-Arabinose Medium zu wachsen. Durch sequentiellen Transfer des Stammes in L-Arabinose Medium über mehrere Wochen konnte jedoch ein Stamm selektioniert werden, der mit L-Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle mit einer Verdopplungszeit von etwa 8 Stunden wachsen konnte.

Die genetische Charakterisierung des Stammes ergab, dass dieser sowohl Mutationen im eigenen Genom als auch in einem der heterologen Gene erworben hatte. In der kodierenden Region der L-Ribulokinase konnte ein Basenaustausch identifiziert werden, der in einem Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin an Position 121 des Proteins resultierte. Nach Aufreinigung des mutierten und des Wildtyp-Proteins konnte gezeigt werden, dass dieser Austausch zu einer erniedrigten Affinität der Kinase gegenüber der Ribulose führt und eine verlangsamte Umsetzung bewirkt. Die spezifisch reduzierte Aktivität der Kinase stellte sich als der entscheidende Faktor bei der Verstoffwechslung der L-Arabinose heraus.

Durch „DNA-Microarray“- Analysen konnte eine um den Faktor zwei gesteigerte Transkription mehrerer Hefegene festgestellt werden, die alle auf dem rechten Arm des Chromosom XII lokalisiert sind. Dies deutete auf eine Duplikation dieser Region des Genoms hin. Davon betroffen war auch das *TAL1*-Gen, das für die Transaldolase im Pentosephosphatweg der Hefe kodiert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass eine geringfügige Steigerung der *TAL1*-Expression eine deutlich verbesserte Metabolisierung von L-Arabinose bewirkte. Außerdem steigerte eine erhöhte L-Arabinose-Aufnahmerate die Wachstums- und die Fermentationsrate. Mit einer Ethanol-Produktionsrate von 0,06-0,08 g Ethanol pro g Trockengewicht und Stunde unter Sauerstoff-limitierten Bedingungen und Ethanol-Ausbeuten von ca. 60% der maximal möglichen Ausbeute ist dieser Stamm sehr gut für eine effiziente Fermentation von Hexosen und Pentosen in Hydrolysaten lignozellulosischer Biomasse geeignet.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aarnio, T.H., Suikho, M.L. und Kauppinen, V.S.** (1991) Isolation of acetic acid-tolerant bakers yeast variants in a turbidostat. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **27**: 55-64.
- 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.
- Aristidou, A. und Penttilä, M.** (2000) Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 187-198.
- Bailey, J.E.** (1993) Host-vector interactions in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem Eng.* **48**: 29-52.
- Banerjee, S., Anderson, F. und Farber, G.K.** (1995) The evolution of sugar isomerases. *Protein Eng.* **8**: 1189-1195.
- Barnett, J.A.** (1976) The utilization of sugars by yeasts. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 125-234.
- Beall, D.S., Ohta, K. und Ingram, L.O.** (1991) Parametric studies of ethanol from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 296-303.
- Bergkamp, R.J.M., Kool, I.M., Geerse, R.H. und Planta, R.J.** (1992) Multiple-copy integration of the α -galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* **21**: 365-370.
- Bhosale, S.H., Rao, M.B. und Deshpande, V.V.** (1996) Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. reviews* **60**: 280-300.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bisson, L.F. und Fraenkel, D.G.** (1983) Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **80**: 1730-1734.
- Boeke, J.D., Lacroute, F. und Fink, G.R.** (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.
- Boles, E. und Hollenberg, C.P.** (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 85-111.
- Boynton, B.L. und McMillan, J.D.** (1994) High-yield shake-flask fermentation of xylose to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **45-46**: 509-514.
- Brand, K.** (1974) Transaldolase. In: Methoden der enzymatischen Analyse 1. (ed. Bergmeyer, H.U.) Verlag Chemie, Weinheim p 752-756.
- Brau, B. und Sahn, H.** (1986) Cloning and expression of the structural gene for pyruvate decarboxylase of *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **144**: 296-301.
- Breznak, J.A. und Brune, A.** (1994) Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 453-487.
- Brown, C.J., Todd, K.M. und Rosenzweig, R.F.** (1998) Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 931-942.
- Brown, K.S.** (1999) Taking global warming to the people. *Science* **283**: 1440-1441.

- Brown, S.W. und Oliver, S.G.** (1982) Isolation of ethanol-tolerant mutants of yeast by continuous selection. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 119-122.
- Bruinenberg, P.M., de Bot, P.H.M., van Dijken, J.P. und Scheffers, A.W.** (1983) The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 287-292.
- Busturia, A. und Lagunas, R.** (1986) Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 379-385.
- Chandrakant, P. und Bisaria, V.S.** (1998) Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Crit. Rev. Biotechnol.* **18**: 295-331.
- Chiang, C. und Knight, S.G.** (1961) L-arabinose metabolism by cell free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta.* **46**: 271-278.
- Ciriacy, M. und Williamson, V.M.** (1981) Analysis of mutations affecting Ty-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **182**: 159-163.
- Ciriacy, M. und Porep, H.** (1986) Conversion of pentoses to ethanol by baker's yeast. In: E. Magnien (ed.), Biomolecular engineering in European community. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands :p. 677-679
- D'Amore, T., Celotto, G., Russel, I. und Stewart, G.G.** (1989) *Enzyme Microb. Technol.* **11**: 411.
- Deanda, K, Zhang, M., Eddy, C. und Picataggio, S.** (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4465-4470.
- Deng, X.X. und Ho, N.W.Y.** (1990) Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24-25**: 193-199.
- 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.
- Dien, B.S., Nichols, N.N., O'Bryan, P.J. und Bothast, R.J.** (2000) Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84/86**: 181-196.
- 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.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P und Trent, J.** (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* **21**: 10-14.
- Dunham, M.J., Badrane, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, P.O., Rosenzweig, F. und Botstein, D.** (2002) Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*: in press.
- 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.
- Eliasson, A., Hofmeyr, J.S., Pedler, S. und Hahn-Hägerdal, B.** (2001) The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enz. Microb. Technol.* **29**: 288-297.

- Evans, C.T. und Ratledge, C.** (1984) Induction of xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts grown on D-xylose: the key to efficient xylose metabolism. *Arch. Microbiol.* **139**: 48-52.
- Gietz, R.D. und Sugino, A.** (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Gietz, R.D. und Woods, R.A.** (1994) High efficiency transformation in yeast. (Invited Book chapter) In: Molecular genetics of yeast: Practical approaches, ed. J.A. Johnston, Oxford University Press pp121-134.
- Glazer, N.A. und Nikaido, H.** (1995) Ethanol In: *Microbial technology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco pp 359-391.
- Gong, C.-S., Chen, L.F., Flickinger, M.C. und Tsao, G.T.** (1981) Conversion of hemicellulose carbohydrates. *Adv. Biochem. Engin.* **20**: 93-118.
- Gordon, R.E. und Mihm, J.M.** (1959) A comparison of four species of mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **21**:736-748.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. und Hegemann, J.H.** (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* **24**: 2519-2524.
- Hahn-Hägerdal, B., Wahlbom, 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.
- Hall, D.O., Mynick, H.E. und Williams, R.H.** (1991) Cooling the greenhouse with bioenergy. *Nature* **353**: 11-12.
- Hallborn, J.** (1995) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of genes involved in pentose metabolism. PhD thesis, Lund University, Schweden.
- Hamacher, T., Becker, J., Gárdonyi, M., Hahn-Hägerdal, B. und Boles, E.** (2002) Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* **148**: 2783-2788.
- Hauf, J., Zimmermann, F.K., Müller, S.** (2000) Simultaneous genomic overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**: 688-698.
- Hespell, R.B.** (1998) Extraction and characterization of hemicellulose from the corn fiber produced by corn wet-milling processes. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 2615-2619.
- 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.
- Ho, N.W., Chen, Z., Brainard, A.P. und Sedlak, M.** (1999) Successful design and development of genetically engineered *Saccharomyces* yeasts for effective cofermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **65**: 163-192.
- Hurley, J.H., Faber, H.R., Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Pettigrew, D.W. und Remington, S.J** (1993) Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III^{Glc} with Glycerol kinase. *Science* **259**:673-677.
- Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W. und Preston III, J.F.** (1987) Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2420-2425.

- Ingram, L.O. und Conway, J. (1988) Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *E. coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 397-404.
- Ingram, L.O., Aldrich, H.C., Borges, A.C., Causey, T.B., Martinez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S.A., Yomano, L.P., York, S.W., Zaldivar, J. und Zhou, S. (1999) Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol. Prog.* **15**: 855-866.
- Jeffries, T.W. und Shi, N.Q. (1999) Genetic engineering for improved xylose fermentation in yeast. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **65**: 117-161.
- Jeong, E.Y., Sopher, C., Kim, I.S. und Lee, H. (2001) Mutational study of the role of tyrosine-49 in the *Saccharomyces cerevisiae* xylose reductase. *Yeast* **18**: 1081-1089.
- Johansson, B. (2001) Metabolic engineering of the pentose phosphate pathway of xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. Doctoral Thesis, Lund University, Sweden.
- Johansson, B., Christensson, C., Hopley, T. und Hahn-Hägerdal, 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.
- Kasahara, T. und Kasahara, M. (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* **315**: 177-182.
- Kasahara, T. und Kasahara, M. (1997) Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1324**: 111-119.
- Klabunde, J., Diesel, A., Waschke, 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.
- Koch, A.L. (1983) The protein burden of *lac* operon products. *J. Mol. Evol.* **19**: 455-462.
- Kornberg, A. und Baker, T. (1992) DNA Replication, 2nd ed. W.H. Freeman, New York, USA.
- Kötter, P., Amore, R., Hollenberg, C.P. und Ciriacy, M. (1990) Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Curr. Genet.* **18**: 493-500.
- Kötter, P. und Ciriacy, M. (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 776-783.
- Kruckeberg, A.L. (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **166**: 283-292.
- Kuhn, A., van Zyl, C., van Tonder, A. und Prior, B.A. (1995) Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1580-1585.
- Kuo, S.C., Christensen, M.S. und Cirillo, V.P. (1970) Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Characteristics of galactose uptake and exchange in galactokinaseless cells. *J. Bacteriol.* **103**: 671-678.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lagunas, R. und Gancedo, J.M. (1973) Reduced pyridine-nucleotide balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **37**: 90-94.

- Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. und Sáez, M.J.** (1982) Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* **152**: 19-25.
- Lagunas, R.** (1993) Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 229-242.
- Lee, L.V., Gerratana, B. und Cleland, W.W.** (2001) Substrate specificity and kinetic mechanism of *Escherichia coli* ribulokinase. *Arch Biochem. Biophys.* **396**: 219-224.
- Lee, N., Gielow, W., Martin, R., Hamilton E. und Fowler, A.** (1986) The organization of the *araBAD* operon of *Escherichia coli*. *Gene* **47**: 231-244.
- Lee, W.J., Kim, M.D., Ryu, Y.W., Bisson, L.F. und Seo, J.H.** (2002) Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 186-191.
- 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.
- Lönn, A., Gárdonyi, M., van Zyl, W., Hahn-Hägerdal, B. und Otero, C.** (2002) Cold adaption of xylose isomerase from *Thermus thermophilus* through random PCR mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **269**: 157-163.
- Lopes, T.S., Klootwijk, J., Veenstra, A.E., van der Aar, P.C., van Heerikhuizen, H., Raué, H.A. und Planta, R.J.** (1989) High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene* **79**: 199-296.
- Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J. und Wyman, C.E.** (1991) Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* **251**: 1318-1323.
- Mac Pherson, A.J., Jones-Mortimer, M.C. und Henderson, P.J.** (1981) Identification of the *AraE* transport protein of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **196**: 269-283.
- Maiden, M.C., Jones-Mortimer, M.C. und Henderson, P.J.** (1988) The cloning, DNA sequence, and overexpression of the gene *araE* coding for arabinose-proton symport in *Escherichia coli* K12. *J. Biol.Chem.* **263**: 8003-8010.
- Makuc, J.** (2002) Molekulargenetische und physiologische Charakterisierung von endogenen und heterologen Monocarboxylattransportern in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität.
- Maniatis, T.M., Fritsch, E.F. und Sambroock, J.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- 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.S. und van Zyl, W.H.** (1996) Cloning and expression of the *Chlostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **18**: 269-274.
- Mohagheghi, A, Evans, K., Chou, Y.-C. und Zhang, M.** (2002) Cofermentation of glucose, xylose and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98/100**: 885-894.

- Mumberg, D., Müller, R. und Funk, M.** (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**: 5767-5768.
- Nichols, N.N., Dien, B.S. und Bothast, R.J.** (2001) Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 120-125.
- Niederberger, P., Prasad, R., Miozzari, G. und Kacser, H.** (1992) A strategy for increasing an *in-vivo* flux by genetic manipulations. The tryptophan system of yeast. *Biochem J.* **287**: 473-479.
- Nieto, A., Prieto, J. und Sanz, P.** (1999) Stable high copy-number integration of *Aspergillus oryzae* α -amylase cDNA in an industrial baker's yeast strain. *Biotechnol. Prog.* **15**: 459-466.
- Nogae, I. und Johnston, M.** (1990) Isolation and characterization of the *ZWF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene* **96**: 161-169.
- Oehlen, L.J., Scholte, M.E., de Koning, W. und van Dam, K.** (1994) Decrease in glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae cdc35-1* cells at restrictive temperature correlates with a decrease in glucose transport. *Microbiology* **140**: 1891-1898.
- Ohta, K., Beall, D.S., Meija, J.P., Shanugham, K.T. und Ingram, L.O.** (1991a) Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 893-900.
- Ohta, K., Beall, D.S., Meija, J.P., Shanugham, K.T. und Ingram, L.O.** (1991b) Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* MSA1 for ethanol production from xylose and glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2810-2815.
- Parisi, F.** (1989) Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. *Adv. Biochem. Engin.* **38**: 53-87.
- Patrick, J. und Lee, N.** (1968) Purification and properties of an L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* **243**: 4312-4319.
- 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.
- Porep, H.J.** (1987) Xyluloseverwertung bei *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Prior, B.A. und Kötter, P.** (1997) Pentose utilization by yeasts. In: Yeast sugar metabolism: Biochemistry, genetics, biotechnology and applications. (Eds.: Zimmermann, F.K. und Entian, K.D.), Technomic, Lancaster, PA. pp 435-457.
- Quain, D.E. und Boulton, C.A.** (1987) Growth and metabolism of mannitol by strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1675-1684.
- Reifenberger, E., Freidel, K. und Ciriacy, M.** (1995) Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* **16**: 157-167.
- Reifenberger, E., Boles, E. und Ciriacy, M.** (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* **245**: 324-333.

- Richard, P., Toivari, M.H. und Penttilä, M.** (1999) Evidence that the gene *YLR070c* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS Letters* **457**: 135-138.
- Richard, P., Londesborough, J., Putkonen, M., Kalkkinen, N. und Penttilä, M.** (2001) Cloning and expression 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-xylulose reductase gene. *Biochemistry* **41**: 6432-6437.
- Rizzi, M.C., Klein, C., Schulze, C., Bui-Tanh, N.A. und Dellweg, H.** (1989) Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen-limited growth and fermentation of yeast *Pichia stipitis* with xylose as carbon source. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 509-514.
- Rosenberg, S.L.** (1980) Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 185-193.
- Rossolini, G.M., Riccio, M.L., Gallo, E. und Galeotti, C.L.** (1992) *Kluyveromyces lactis* rDNA as a target for multiple integration by homologous recombination. *Gene* **119**: 75-81.
- Sá-Nogueira und Lencastre, H.** (1989) Cloning and characterization of *araA*, *araB* and *araD*, the structural genes for L-arabinose utilization in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 2855-2857.
- Sá-Nogueira, I. und Ramos, S.S.** (1997) Cloning, functional analysis, and transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *araE* gene involved in L-arabinose utilization. *J. Bacteriol.* **179**: 7705-7711.
- Sá-Nogueira, I., Nogueira, T.V., Soares, S. und de Lencastre, H.** (1997) The *Bacillus subtilis* L-arabinose (*ara*) operon: nucleotide sequence, genetic organization and expression. *Microbiology* **143**: 957-969.
- Sarthy, A.V., McConaughy, B.L., Lobo, Z., Sundstrom, J.A., Furlong, C.L. und Hall, B.D.** (1987) Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1996-2000.
- Schaaff, I., Heinisch, J. und Zimmermann, F.K.** (1989) Over-production of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast* **5**: 285-290.
- Schaaff, I., Hohmann, S. und Zimmermann, F.K.** (1990) Molecular analysis of the structural gene for yeast transaldolase. *Eur. J. Biochem.* **188**: 597-603.
- Schaaff-Gerstenschläger, I. und Miosga, T.** (1997) The pentose phosphate pathway. In: *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*. (Eds: Zimmermann, F.K. und Entian, K.D.), Chapter 15. Technomic, Lancaster, PA.
- Schell, D.J. und Harwood, C.** (1994) Milling of lignocellulosic biomass: Results of pilot-scale testing. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **45-46**: 159-168.
- 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. *Curr. 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. Technol.* **28**: 16-24.
- Seki, T., Oshima, T. und Oshima, Y.** (1975) Taxonomic study of *Bacillus* by deoxyribonucleic acid hybridization and interspecific transformation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**: 258-270.

- Senac, T. und Hahn-Hägerdal, B.** (1990) Intermediary metabolite concentrations in xylulose- and glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 120-126.
- Senac, T. und Hahn-Hägerdal, B.** (1991) Effects of increased transaldolase activity on D-xylulose and D-glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* cell extracts. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 1701-1706.
- Shalon, D., Smith, S.J. und Brown, P.O.** (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* **6**: 639-645.
- Shatwell, K.P., Charalambous, B.M., McDonald, T.P. und Henderson, P.J.** (1995) Cloning, sequencing, and expression of the *araE* gene of *Klebsiella oxytoca* 8017, which encodes arabinose-H⁺ symport activity. *J. Bacteriol.* **177**: 5379-5380.
- Shechter, E., Letellier, L. und Simons, E.R.** (1982) Fluorescence dye as monitor of internal pH in *Escherichia coli* cells. *FEBS Lett.* **139**: 121-124.
- Slavik, J.** (1982) Intracellular pH of yeast measured with fluorescent probes. *FEBS Lett.* **140**: 22-26.
- Smits, H.P., Hauf, J., Müller, S., Hopley, T., Zimmermann, F.K., Hahn-Hägerdal, B., Nielsen, J. und Olsson, L.** (2000) Simultaneous overexpression of enzymes of the lower part of glycolysis can enhance the fermentative capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1325-1334.
- Snoep, J.L., Yomano, L.P., Westerhoff, H.V. und Ingram, L.O.** (1995) Protein burden in *Zymomonas mobilis*: negative flux and growth control due to overproduction of glycolytic enzymes. *Microbiol.* **141**: 2329-2337.
- Suikho, M.-L. und Poutanen, K.** (1984) D-xylulose fermentation by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.* **6**: 189-194.
- Swings, J. und De Ley, J.** (1977) The biology of *Zymomonas mobilis*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 1-46.
- Taherzadeh, M.J., Eklund, R., Gustafsson, L., Niklasson, C. und Lidén, G.** (1997) Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Ind. Eng. Chem. Res.* **36**: 4659-4465.
- Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C. und Kennison, J. A.** (1992) Brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator *SNF2/SWI2*. *Cell* **68**: 561-572.
- Tantirungkij, M., Nakashima, N., Seki, T. und Yoshida, T.** (1993) Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 83-88.
- 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.
- Teusink, B., Diderich, J.A., Westerhoff, H.V., van Dam, K. und Walsh, M.C.** (1998b) Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J. Bacteriol.* **180**: 556-
- Toivari, M., Richard, P., Ruohonen, L., Londesborough, J. und Penttilä, M.** (1998) The endogenous xylose utilization pathway of *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast as a cell factory. Vlaardingen, The Neatherlands.
- Tolan, J.S. und Finn, R.K.** (1987a) Fermentation of D-xylose and L-arabinose to ethanol by *Erwinia chrysanthemi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2033-2038.

- Tolan, J.S. und Finn, R.K.** (1987b) Fermentation of D-xylose to ethanol by genetically modified *Klebsiella planticola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2039-2044.
- Traff, K.L., Jonsson, L.J. und Hahn-Hägerdal, B.** (2002) Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 1233-1241.
- Ueng, P.P.C., Hunter, C.A., Gong, C.S. und Tsao, G.T.** (1981) D-xylulose fermentation in yeasts. *Biotechnol. Lett.* **3**: 315-320.
- van Dijken, J.P., Bauer, J., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J.M., Gancedo, C., Giuseppin, M., Heijnen, J.J., Hoare, M., Lange, H.C., Madden, E.A., Niederberger, P., Nielsen, J., Parrou, J.L., Petit, T., Porro, D., Reuss, M., van Riel, N., Rizzi, M., Steensma, H.Y., Verrips, C.T., Vindelov, J. und Pronk, J.T.** (2000) An interlaboratory comparison of physiological and genetics properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb. Technol.* **26**: 706-714.
- van Wyk, J.P.H.** (2001) Biotechnology and the utilization of biowaaste as a resource for bioproduct development. *Trends Biotechnol.* **19**: 172-177.
- von Sivers, M. und Zacchi, G.A.** (1995) A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresour. Technol.* **51**: 43-52.
- 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.
- Wahlbom, C.F. und Hahn-Hägerdal, B.** (2002) Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **78**: 172-178.
- Walfridsson, M., Hallborn, J., Penttilä, M., Keranen, S. und Hahn-Hägerdal, B.** (1995) Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4184-4190 .
- Walfridsson, M., Bao, X., Anderlund, M., Lilius, G., Bülow, L. und Hahn-Hägerdal, B.** (1996) Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 4648-4651.
- Walfridsson, M., Anderlund, M., Bao, X. und Hahn-Hägerdal, B.** (1997) Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis XYL1* and *XYL2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and ist effects on product formation during xylose utilisation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 218-224.
- Walsh, M.C., Smits, H.P., Scholte, M. und van Dam, K.** (1994) Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J. Bacteriol.* **176**: 953-958.
- Wang, P.Y. und Schneider, H.** (1980) Growth of yeasts on D-xylulose. *Can. J. Microbiol.* **26**: 1165-1168.
- Wartenberg, A.** (1989) Einführung in die Biotechnologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Weierstall, T., Hollenberg, C.P. und Boles, E.** (1999) Cloning and characterization of three genes (*SUT1-3*) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Mol. Microbiol.* **31**: 871-883.

- Weinberg, C.J. und Williams, R.H.** (1990) Energie aus regenerativen Quellen. *Spektrum der Wissenschaft* **13**: 158-166.
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. und Boles, E.** (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **464**: 123-128.
- Wieczorke, R., Dlugai, S., Krampe, S. und Boles, E.** (2002) Restoration of glucose uptake and growth in hexose transport-deficient yeast mutants by rat and human GLUT1 and GLUT4 glucose transporters. *Cell. Physiol. Biochem.* in press.
- Wirth, R.** (1989) Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA. *Forum Mikrobiol.* **11**: 507-515.
- Witteveen, C.F.B., Busink, R., Van de Vondervoort, P., Dijkema, C., Swart, K. und Visser, J.** (1989) L-arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2163-2171.
- Wu, J.F., Lastick, S.M., und Updegraf, D.M.** (1986) Ethanol production from sugars derived from plant biomass by a novel fungus. *Nature* **321**: 887-888.
- 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.
- Wyman, C.E.** (2001) Twenty years of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology: selected key events along the way. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **91-93**: 5-21.
- Zamenhoff, S.** (1957) Preparation and assay of desoxyribonucleic acids from animals tissue. *Methods Enzymol.* **3**: 696-704.
- Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M. und Picataggio, S.** (1995) Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* **267**: 240-243.
- 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

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara	L-Arabinose
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
CEN	Centromersequenz
¹⁴ C	radioaktives Kohlenstoff-Isotop
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FOA	Fluororotsäure
g	Gramm
G418	Geneticin
Gal	Galactose
h	Stunde
HMW	Molekulargewichtsstandard „High molecular weight, prestained“
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
Leu	Leucin

LiAc	Lithiumacetat
M	Molar
Mal	Maltose
min	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
n.b.	nicht bestimmbar
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> (lat.), Säurestärke
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Einheit der Enzymaktivität
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
WT	Wildtyp
YEP	Yeast Extract Peptone
YNB	Yeast Nitrogen Base
z. B.	zum Beispiel

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. C. Hollenberg danke ich für die freundliche Übernahme des Referats.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles für die Bereitstellung des Themas, für die aufmerksame Betreuung dieser Arbeit, für immer neue Ideen, wertvolle Tips und Anregungen und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für kleine und größere Probleme hatte.

Herrn Prof. Dr. Bünemann danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Bei allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre, für Ratschläge in allen Lebenslagen und für anregende Diskussionen bedanken.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeglicher Form unermüdlich unterstützt und aufgebaut haben und jederzeit für mich da waren.

Eidesstattliche Erklärung

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

Jessica Becker

Düsseldorf, den 03.02.2003