

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
TU-München/Weihenstephan

B89

Name der Forschungsstelle

Vorhaben-Nr.

11.06.2005 bis 10.02.2006

Bewilligungszeitraum

Schlussbericht für den Zeitraum : 11.06.05 bis 10.02.06

Zu dem aus Haushaltsmitteln der Wissenschaftsförderung der Deutschen
Brauwirtschaft e.V. geförderten Forschungsvorhaben

Forschungsthema : **Heterologe Expression oberflächenaktiver Proteine aus
Weizen und *Fusarium culmorum* in Hefen und *E. coli***

Freising-Weihenstephan, 03.08.2006

Ort, Datum

Unterschrift des Projektleiters

Inhalt	Seite
1. Einleitung	1
2. Zielsetzung der Forschungsarbeiten	2
3. Ergebnisse	4
3.1 Klonierung von LTP1500 aus Weizen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>E. coli</i>	4
3.1.1 Gewinnung einer Intron-freien DNA-Sequenz des LTP1500 Gens aus Weizen	4
3.1.2 Klonierung des LTP1500 Gens in einen <i>E. coli</i> Expressionsvektor	6
3.1.3 Expression von LTP1500 aus Weizen in <i>E. coli</i>	8
3.1.4 Klonierung von LTP1500 aus Weizen in einen Hefe-Expressionsvektor	11
3.1.5 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit LTP1500 aus Weizen und Nachweis der Expression	13
3.2 Klonierung des Hydrophobins FcHyd5p aus <i>F. culmorum</i> in <i>S. cerevisiae</i>	15
3.2.1 Herstellung einer exprimierbaren FcHyd5 Sequenz durch Gensynthese	17
3.2.2 Klonierung des FcHyd5 Gens in einen Hefe-Shuttlevektor	18
3.2.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit dem FcHyd5 Gen	18
3.2.4 Expression von FcHyd5p durch <i>S. cerevisiae</i> Transformanten	19
3.3 Klonierung des Hydrophobins FcHyd3p aus <i>F. culmorum</i> in <i>S. cerevisiae</i>	20
3.3.1 Herstellung einer exprimierbaren FcHyd3 Sequenz durch Gensynthese	21

3.3.2	Klonierung des FcHyd3 Gens in einen Hefe-Shuttlevektor	22
3.3.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit dem FcHyd3 Gen	23
3.3.4	Expression von FcHyd3p durch <i>S. cerevisiae</i> Transformanten	24
3.4	Gärversuche mit transgenen <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	24
4	Schlussbetrachtung	26
5	Wirtschaftliche Bedeutung für kleine und mittlere Unternehmen	29
6	Umsetzung der Forschungsergebnisse	31
7	Gewerbliche Schutzrechte	33
8	Schlagwörter	33
9	Bibliographische Daten	33
10	Literatur	34

1. Einleitung

Oberflächenaktive Proteine haben im Bier nachhaltige Auswirkungen auf Bildung und Stabilisierung von Gasblasen. Zu ihnen gehören sowohl basische als auch saure Proteine, deren Eigenschaften zudem signifikant durch Glykosylierung beeinflusst werden. Entsprechend diesem Spektrum kann ihre Wirkung auf das Bier sowohl positiv als auch negativ sein und reicht von einer verbesserten Schaumstabilität bis zum Gushing, dem spontanen Übersäumen von Flaschenbieren bei der sachgerechten Öffnung. Die Kenntnis der Entstehung und der Eigenschaften solcher Proteine ermöglicht die ursächliche Klärung des Entstehens stabiler und instabiler Schäume. Für entsprechende Versuche im Bier müssen die Proteine über eine Reinigung gewonnen, oder über einen genetischen Ansatz rekombinant produziert werden. Da deren Glykosylierung voraussichtlich einen entscheidenden Einfluss auf ihre oberflächenaktiven Eigenschaften hat, ist eine Produktion dieser (Glyko)proteine in ihrer glykosylierten, oberflächenaktiven Form von der Produktion ihrer Polypeptidkette zu unterscheiden.

Im Rahmen des Projekts AiF 13468/N „Untersuchungen zur Rolle oberflächenaktiver Proteine von Pflanzen und Pilzen bei der Entstehung des Gushings sowie zu den Möglichkeiten ihrer Beeinflussung“ förderte die AiF unter Federführung der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e. V. ein Vorhaben zur Charakterisierung dieser ambivalenten Proteine. Hierbei konnte ein Protein identifiziert werden, dessen Vorhandensein bzw. Abwesenheit zu Bieren mit unterschiedlichem Gushingpotenzial korrelierte. Die Konzentrationen des als LTP1 identifizierten Proteins waren in Gushingbieren deutlich geringer, als in stabilen Bieren. Das Vorhandensein von LTP1 könnte damit die Funktion eines Stabilisators gegenüber der Gushingneigung von Bieren besitzen. Anhand eines Datenbankvergleiches konnte festgestellt werden, dass dieses Protein durch das Gen LTP1500 in *Triticum aestivum* kodiert wird. Das hierauf kodierte Polypeptid wird als „lipid transfer protein 1 precursor“ bezeichnet. LTP1500 wurde durch Simmonds *et al.* (2000) in *E. coli* kloniert, die damit die Struktur dieses Gens charakterisieren konnten. Der kodierende Bereich besitzt demnach eine Länge von 441 bp. Das Gen enthält ein Intron von 90 bp. Die Analyse der Aminosäuresequenz zeigte die Anwesenheit eines 26 Aminosäuren langen Signalpeptids. Das sekretierte Protein (ohne Signalsequenz) besitzt eine Größe von 90 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von ca. 9,6 kDa entspricht.

Finnische Wissenschaftler beschrieben erstmalig im Jahre 2001 die Anwesenheit bestimmter pilzlicher Proteine in Gushingbieren (Kleemola *et al.*, 2001). Diese als Hydrophobine bezeichneten sauren und sehr stabilen Proteine konnten aus verschiedenen Pilzen isoliert werden. Die Zugabe von Hydrophobinen aus *Trichoderma reesei*, *Fuarium poae* und *Nigrospora* sp. zu Bieren führte in den beschriebenen Versuchen zu Gushing. Auch in abgeschlossenem Projekt AiF 13468/N konzentrierten sich die Arbeiten auf Hydrophobine, die durch ihre Fähigkeit

zur Bildung stabiler Polymerfilme an Gas-Wasser Grenzflächen geeignet sind, sowohl Gushing als auch die Schaumbildung in Bier zu beeinflussen. Innerhalb der Projektlaufzeit von AiF 13468/N konnten jedoch keine Hydrophobine aus pilzlichen Reinkulturen isoliert werden. Die Versuche ergaben aber, dass in den Kulturüberständen andere, ebenfalls kleine, stabile und äußerst oberflächenaktive Proteine vorhanden waren, die einen Einfluss auf die Schaumstabilität haben können. Die als AfpA (alkaline foam protein A) und AfpB beschriebenen, ca. 20 und 17 kDa großen und stark basischen Protein hatten jedoch keine Ähnlichkeit mit Hydrophobinen. Proteine mit ähnlicher Struktur wie AfpA wurden aus der Zellwand von *Emericella nidulans* isoliert. Aufgrund ihrer Schaum-beeinflussenden Eigenschaften wurde in der betreffenden Publikation (Zapf *et al.*, J. Appl. Microbiol., under revision) für diese neue Gruppe von Proteinen der Name Fungispumine vorgeschlagen.

Sarlin *et al.* (2005) stellten fest, dass die in ihren Versuchen zu Gushing führenden Hydrophobine aus *T. reesei*, *F. poae* und *Nigrospora* sp sämtlich der Gruppe der Klasse 2 Hydrophobine angehören. Im Rahmen des Projektes AiF 13468/N konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von *F. culmorum* in Malz massives Gushing auslöst. In dem Pilz wurde durch die Forschungsstelle ein als FcHyd5 bezeichnetes Gen identifiziert, welches ebenfalls für ein Hydrophobin der Klasse 2 (FcHyd5p) kodiert. Ein homologes Gen wurde darüber hinaus auch in *F. graminearum* gefunden, einer Pilzart, die ebenfalls Gushing verursachen kann. Ob FcHyd5p oder FgHyd5p im Bier tatsächlich Gushing auslösen, konnte jedoch bisher nicht festgestellt werden, da eine Isolierung im Rahmen der Arbeiten noch nicht gelungen ist.

Als wesentliches Ergebnis der bisher durchgeführten Arbeiten kann festgestellt werden, dass im Malz und im Bier Proteine vorhanden sind, die einerseits Gushing fördern können, während andere möglicherweise in der Lage sind, dieses zu reduzieren. Als Arbeitshypothese für die geplanten Untersuchungen wird daher angenommen, dass die Auslösung von Gushing wesentlich durch das mengenmäßige Verhältnis derartiger „Induktor“- und „Repressorproteine“ in einem Bier beeinflusst wird. Weiterhin zeigten die bisherigen Untersuchungen, dass die Aktivität solcher Proteine bei der Gushinginduktion wesentlich von ihrem Glykosylierungsgrad abhängt, der bei ihrer natürlichen Bildung und nicht zuletzt auch durch das Würzekochen verändert werden kann.

2. Zielsetzung der Forschungsarbeiten

Als Konsequenz aus den oben beschriebenen Untersuchungsergebnissen aus dem Projekt AiF 13468/N forderte das forschungsbegleitende Gremium in seiner Sitzung am 7.12.04 eine eingehendere Untersuchung der ursächlichen Beteiligung von LTP1 an Gushing bzw. dessen Minderung, sowie der Relevanz des

Hydrophobins FcHyd5p bei der Entstehung von Gushing (siehe Protokoll der Sitzung vom 7.12.04). Grundlegende Voraussetzung für die geforderten Untersuchungen ist jedoch die Verfügbarkeit ausreichend großer Mengen dieser Proteine in reiner Form. Da die Isolierung ausreichender Mengen von reinem LTP1 aus Weizen bisher auf verschiedene experimentelle Schwierigkeiten stieß und auch eine Detektion von FcHyd5p aus Reinkulturen, Malz oder Bier bisher nicht gelang, stellt die Produktion dieser Proteine in transgener Form einen alternativen Weg dar, um größere Proteinmengen zu erhalten und damit die Grundlage für weitere Untersuchungen zu ihrer Struktur und Funktion zu ermöglichen

Bei der rekombinanten Produktion dieser Proteine ist es entscheidend, dass ihre Tertiärstruktur der natürlich vorkommenden möglichst nahe kommt bzw. mit ihr identisch ist. Nur so kommt ihr für die Schaumaktivität wichtiger amphiphiler Charakter zum Tragen. Dies scheint vorzugsweise unter Verwendung eines eukaryontischen Expressionssystems möglich zu sein, da hier die Wahrscheinlichkeit der naturidentischen Faltung größer ist als bei bakteriellen Expressionssystemen. Hefen besitzen als Eukaryonten ähnliche Systeme für die Proteinbiosynthese wie diejenigen Organismen, aus denen die zu exprimierenden Gene gewonnen wurden (Weizen, *Fusarium*). Da es für das Gelingen der geplanten Versuche von besonderer Bedeutung ist, dass die hergestellten Proteine einerseits in der richtigen Weise gefaltet werden und andererseits auch Glykosylierungen an den richtigen Stellen vorliegen, ist es deshalb vorteilhaft, für die Versuche Hefezellen als Expressionssystem zu verwenden. Hefezellen stellen darüber hinaus ein ideales Expressionssystem dar, da für sie die entsprechenden Vektoren und Klonierungstechniken zur Verfügung stehen. Je nach Art bevorzugen sie unterschiedliche Glykosylierungsraten. Als Eukaryonten prozessieren sie jedoch Proteine in sehr ähnlicher Weise wie dies auch Pflanzen und Pilze tun.

Das Ziel der im Verlauf des vorliegenden Projektes durchgeführten Arbeiten war, durch heterologe Transformation die Gene für das Protein LTP1 aus Weizen sowie für die Hydrophobine FcHyd3p und FcHyd5p aus *Fusarium culmorum* TMW 4.0111 in *Saccharomyces cerevisiae* zu klonieren und die Proteine in den so erzeugten Hefetransformanten zur Expression zu bringen. LTP1 sollte darüber hinaus auch in einem bakteriellen Expressionssystem kloniert werden. Anschließend sollten die gebildeten Proteine aus Kulturüberständen und Zellen der Transformanten gereinigt werden. Mit den transformierten *S. cerevisiae* Stämmen sollten darüber hinaus Brauversuche durchgeführt werden, um dadurch den Einfluss der Proteine auf das Übersäumen von Bier zu untersuchen.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung von LTP1500 aus Weizen in *Saccharomyces cerevisiae* und *E. coli*

Die DNA-Sequenz des LTP1500 Gens wurde durch Simmonds *et al.* (2000) in der NCBI Datenbank hinterlegt (Accession no. AF551849). Die Sequenz hat eine Länge von 1.470 nt und umfasst die Promotorregion, die beiden kodierenden Exons sowie ein 90 nt großes Intron. Die Struktur des Gens zeigt Abb. 1 in schematischer Form.

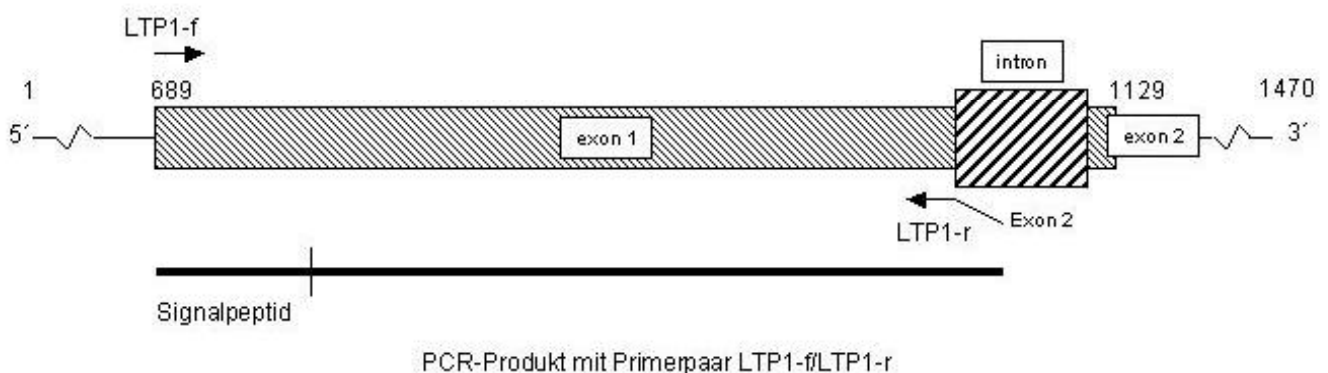


Abbildung 1: Schematische Darstellung des LTP1500 Gens aus Weizen mit Angabe der Bindepositionen der verwendeten Primer LTP1-f und LTP1-r

3.1.1 Gewinnung einer Intron-freien DNA-Sequenz des LTP1500 Gens aus Weizen

Für die Expression des Gens in Bakterien oder Hefe musste zunächst eine Intron-freie Version des Gens hergestellt werden. Dies kann einerseits durch die Herstellung von cDNA aus der mRNA von Weizen geschehen. Da dieser Weg jedoch relativ aufwändig ist, wurde hier eine andere Methode gewählt. Da das im LTP1500 Gen vorhandene Intron sehr nahe dem 3'-Ende des Gens liegt, konnte dieser Bereich durch die Wahl eines entsprechenden Rückwärtsprimers (LTP1-r, siehe Tabelle 1) überbrückt werden. Ein weiterer Vorteil war die Tatsache, dass bei LTP1500 das Exon 2 nur aus 7 Basen besteht. Der gewählte Rückwärtsprimer wurde daher aus den letzten 20 Basen des Exon 1 sowie den sieben Basen, aus denen das Exon 2 besteht, zusammengesetzt. Während der PCR kann dabei der Primer an den hinteren Teil von Exon 1 binden, wobei die angehängten sieben Basen der Exon 2 Sequenz zunächst „in der Luft hängen“. Diese werden aber im Verlaufe der Amplifikation des PCR Produktes zu dessen Bestandteil, so dass am Ende der PCR ein Produkt vorliegt, in dem Exon 1 und Exon 2 direkt hintereinander liegen.

Tabelle 1: Oligonukleotid-Primer, die in der vorliegenden Studie benutzt wurden. Angehängte Schnittstellensequenzen und Spacer sind kursiv dargestellt

Bezeichnung	Sequenz 5´ - 3´	Orientierung
LTP1-f	ATG GCC CGC GCT CAG GTA AT	Vorwärtsprimer
LTP1-r	TTA CAC CCT GCT GCA GTC GAT GTT GAG	Rückwärtsprimer
LTP1f-EcoRI	<i>GGA ATT</i> CAT GGC CCG CGC TCA GGT AAT	Vorwärtsprimer
LTP1r-XhoI	<i>CCG CTC</i> GAG TTA CAC CCT GCT GCA GTC GA	Rückwärtsprimer
LTP1f-NcoI	CAT GCC ATG GCC CGC GCT CAG GTA AT	Vorwärtsprimer
LTP1f-ohne SP-NcoI	CAT GCC ATG GCC ATC GAC TGC GGC CAC	Vorwärtsprimer
LTP1r-XbaI	<i>GCT CTA</i> GAT TAC ACC CTG CTG CAG TCG A	Rückwärtsprimer
Hyd32f	ATG AAG TTC TCA CTC GCC GCC GT	Vorwärtsprimer Hyd5
Hyd33r	TTA GRC CTG GAC ACC AGT AGG AG	Rückwärtsprimer Hyd5
Hyd42f	ATG CAG TTC TCT ACT CTC ACC ACT G	Vorwärtsprimer Hyd3
Hyd43r	CTA GAG GAG CTT GAC ACA GTT GAG	Rückwärtsprimer Hyd3
Hyd46f	ATG AAA TTT TCT TTG GCT GCA G	Vorwärtsprimer Hyd5 GeneArt
Hyd47r	TTA ATC TTG AAC ACC TGT TGG AG	Rückwärtsprimer Hyd5 GeneArt
Hyd48f	<i>GGA ATT CAA AAA</i> TGC AAT TTT CTA CTT TG	Vorwärtsprimer Hyd3 GeneArt
Hyd49r	<i>CCG CTC GAG TCA</i> TTA CAA CAA TTT AAC AC	Rückwärtsprimer Hyd3 GeneArt
pYX242-for	GGC TCG GCT GCT GTA ACA GGG	Vorwärtsprimer für pYX242 Insert
pYX242-rev	CAG TTA GCT AGC TGA GCT CGA G	Rückwärtsprimer für pYX242 Insert

Die Amplifikation mit dem Primerpaar LTP1-f/LTP1-r ergab ein Produkt mit der erwarteten Länge von 351 bp. Das PCR Produkt wurde aus dem Agarsegel gereinigt und zur Überprüfung seiner Sequenz kloniert. Dazu wurde es über Nacht bei 14 °C in den TA-Klonierungsvektor pST Blue-1 ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in kompetente Zellen von *E. coli* DH5 α transformiert. Nach Ausplattieren des Ansatzes auf LB-Ampicillin Medium und Bebrütung über Nacht bei 37 °C resultierten 37 Transformanten. Von diesen wurden 20 isoliert und über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB-Ampicillin Bouillon für die Plasmidpräparation bei 220 rpm im Schüttler kultiviert. Aus allen Transformanten konnte nach Übernachtkultur Plasmid isoliert werden (E.Z.N.A plasmid miniprep kit, Peqlab). Die isolierten Plasmide wurden als Template in eine PCR mit einem Primerpaar eingesetzt, welches jeweils außerhalb des Bereiches bindet, in den das zu überprüfende PCR Produkt in den Vektor inseriert wurde. Von

den 20 untersuchten Transformanten enthielten nach dieser Untersuchung 14 ein Insert der richtigen Größe. Von diesen positiven Plasmiden wurden fünf für eine Sequenzierung des Inserts ausgewählt. Die Sequenzierung erfolgte als Auftrag an Dritte durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg). Die aus den Klonen 865, 871, 877 und 880 isolierten Plasmide enthielten alle ein Insert von einheitlicher Sequenz. Die aus diesen Sequenzen abgeleitete Consensussequenz stimmte zu 100 % mit der durch Simmonds *et al.* (2000) hinterlegten LTP1500 Sequenz von *Triticum aestivum* überein. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch die Wahl der Primer LTP1-f/LTP1-r tatsächlich eine Entfernung des Introns aus dem Gen gelungen war und die Sequenz auf diese Weise für weitere Arbeiten zur Expression von LTP1500 geeignet war.

3.1.2 Klonierung des LTP1500 Gens in einen *E. coli* Expressionsvektor

Das LTP1500 Gen aus Weizen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeiten in zwei verschiedenen Varianten in *E. coli* kloniert und zur Expression gebracht werden. Dabei unterschieden sich die beiden zu klonierenden Gene durch das Vorhandensein bzw. das Fehlen des in der Sequenz kodierten 26 Aminosäuren umfassenden Signalpeptids. Dieser Teil des Proteins wird benötigt, damit Proteine, die aus der Zelle in das umgebende Medium abgegeben werden, einerseits erkannt und andererseits in die für die Ausschleusung zuständigen Membransysteme integriert und in diesen transportiert werden können. Das Signalpeptid wird während des Ausschleusungsvorganges durch spezifische Proteasen abgetrennt, so dass das reife Protein entsteht. Eukaryontische Signalpeptide werden jedoch von Bakterien nicht erkannt, so dass derartige Protein nicht aus der Zelle transportiert werden. Ein Signalpeptid bleibt daher in einer Bakterienzelle Bestandteil des gebildeten Proteins, welches hierdurch eine von dem im Weizen gebildeten reifen Protein deutlich abweichende Struktur und Funktion haben kann. Daher war im Rahmen der vorliegenden Arbeiten das LTP1500 in einer Version mit Signalpeptid sowie ohne ein solches zu klonieren, um eventuell vorhandene Unterschiede und deren Einflüsse auf die Funktion des Proteins untersuchen zu können.

Für die weiteren Arbeiten zur Klonierung und Expression des LTP1500 Gens in *E. coli* wurden zwei verschiedene Vorwärtsprimer für das LTP1500 Gen aus der unter 3.1.1 erhaltenen Intron-freien Sequenz abgeleitet. Der erste Vorwärtsprimer (LTP1f-NcoI) hybridisiert an das 5'-Ende der Gensequenz und amplifiziert deshalb das gesamte Gen inklusive dem Signalpeptid. Die Länge des zu erwartenden PCR-Produkts mit dem Rückwärtsprimer LTP1r-XbaI ist 365 bp. Der zweite Vorwärtsprimer (LTP1f-ohne SP-NcoI) bindet an die ersten 15 auf die Sequenz des Signalpeptides folgenden Nukleotide. Am 5'-Ende wurde dem Primer ein Startkodon sowie ein weiteres Nukleotid angehängt, welches für die Aufrechterhaltung des Leserahmens notwendig war. Das mit dem Rückwärtsprimer LTP1r-XbaI erwartete

PCR Produkt hatte eine Länge von 283 bp. Allen hier verwendeten Primern wurde an das jeweilige 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle angehängt, die eine Integration des entstandenen PCR Produktes in den Expressionsvektor pBAT/myc-his B erlaubt. Die Restriktionsschnittstellen wurden so ausgewählt, dass sie nur einmal in der Multiple Cloning Site des verwendeten Vektors vorhanden waren und außerdem nicht in der Sequenz des zu integrierenden Gens vorkamen. Damit wurde sicher gestellt, dass der Vektor vor der Integration des Gens so geschnitten wurde, dass an den Enden der entstandenen linearen DNA jeweils eine überhängende Schnittstelle (sog. *sticky end*) vorhanden war. Durch Anhängen der selben Schnittstellen an die LTP1500 PCR Produkte (mit und ohne Signalpeptid) und deren anschließende Restriktion mit den selben Enzymen wurde erreicht, dass die PCR-Produkte in der richtigen Orientierung in den Vektor integriert wurden. Dies ist bei Expressionsvektoren besonders wichtig, damit das 5'-Ende des zu exprimierenden Gens hinter dem im Vektor vorhandenen Promoter liegt, ohne den eine spätere Ablesung in der transformierten Zelle nicht stattfinden kann.

Für die Integration in den *E. coli* Expressionsvektor pBAT/myc-his B wurde das Primerpaar LTP1f-NcoI/LTP1r-XbaI aus der LTP1500 Sequenz abgeleitet (siehe Tab. 1). Die an die beiden Primer angehängten Restriktionsschnittstellen einschließlich der hinzugefügten Adaptersequenzen erscheinen in Tabelle 1 im Kursivdruck. Zur Herstellung eines PCR-Produktes mit den oben genannten Primern wurde das unter 3.1.1 für die Sequenzierung hergestellte PCR-Produkt als Template verwendet. Die Amplifikation fand unter den selben Bedingungen statt. Die Kontrolle der Größe des nunmehr entstandenen Produktes zeigte die erwartete Länge von ca. 370 bp. Das PCR-Produkt wurde über QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gereinigt und anschließend mit den Restriktionsenzymen NcoI und XbaI in Y Tango Puffer (NBI Fermentas) in einem gemeinsamen Ansatz verdaut. Die Reinigung des doppelt verdauten PCR Produktes erfolgte durch Auftrennen des gesamten Ansatzes im Agarosegel und Herausschneiden der nach dem Verdau nur noch 350 bp großen Bande. Das verdaute PCR-Produkt wurde mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel Extraktions Kit (Peqlab) aus dem Gel gereinigt und in H₂O eluiert. Das so erhaltene PCR Produkt mit verdauten Restriktionsschnittstellen wurde in den zuvor ebenfalls mit NcoI und XbaI in Y Tango Puffer verdauten und aus dem Gel gereinigten Vektor ligiert, wobei die Ligation mit verschiedenen Verhältnissen von PCR-Produkt und Vektor parallel angesetzt wurde. Die Ligation erfolgte in Ligationspuffer mit T4 Ligase (beide MBI Fermentas) bei 14 °C über Nacht.

Für die Transformation wurden kompetente Zellen (CaCl₂ Methode) von *E. coli* DH5α mit den oben hergestellten Ligationsprodukten gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C mit anschließender Zugabe von 1 mL LB-Medium mit 20 mM Glukose und 1 h Bebrütung bei 37 °C im Schüttler zur Adaptation der Zellen. Aus den so hergestellten Vorkulturen wurden je 2 x 500 µL auf LB Ampicillin Medium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Aus dem Versuch resultierten 127 Transformanten. Von diesen Transformanten

wurden 67 ausgewählt und in jeweils 5 ml LB Ampicillin Bouillon über Nacht kultiviert.

Nach der Übernachtkultur waren 64 Transformanten angewachsen. Aus Ihnen wurde jeweils mit den E.Z.N.A Plasmid Mini Prep Kit (Peqlab) eine Plasmidisolierung vorgenommen. Zur Kontrolle wurden die gereinigten Plasmide in eine PCR mit den Primern LTP1-f/LTP1-r eingesetzt. Alle gestesteten Plasmide enthielten ein Insert von ca. 350 bp, was der theoretischen Größe des inserierten PCR-Fragments entsprach.

Für die Überprüfung der Sequenz und der korrekten Lage des integrierten Fragmentes wurden die Klone 891, 910 und 940 ausgewählt. Nach Reinigung größerer Mengen der jeweiligen Plasmide wurden diese zur Sequenzierung an die Firma MWG Biotech (Ebersberg) verschickt. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen ergab, dass beide überprüften Klone das Plasmid pBAD-myc/his B mit einem in der richtigen Richtung integrierten LTP1500 Gen ohne Intron enthielten. Die Sequenz stimmte zu 100 % mit der durch Simmonds *et al.* (2000) hinterlegten Sequenz von LTP1500 aus Weizen überein.

3.1.3 Expression von LTP1500 aus Weizen in *E. coli*

Das LTP1500 Gen aus Weizen lag für weitere Arbeiten in dem Vektor pBAD-myc/his B als Klon 910 in *E. coli* DH5 α vor. Dieser Typ von *E. coli* besitzt jedoch für die Expression von Proteinen mit Vektoren, die das zu bildende Gen unter der Kontrolle des durch Arabinose induzierbaren BAD-Promotors besitzen, verschiedene Nachteile. Um diese zu umgehen, wurde der Vektor pBAD-myc/his B LTP1500 aus dem Klon 910 in den Stamm *E. coli* TOP10 umkloniert. Von den über 300 resultierenden Transformanten wurden 10 auf das Vorhandensein eines Vektorinserts der richtigen Größe getestet. Alle Klone bildeten ein ca. 350 bp großes Produkt in einer PCR mit den Primern LTP1-f/LTP1-r. Klon 950 wurde zur Kontrolle noch einmal durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) sequenziert. Die Auswertung der Sequenz ergab, dass das LTP1500 in der richtigen Orientierung, ohne Intron sowie mit der korrekten Sequenz in dem Plasmid des Klons 950 vorlag.

Für die Expression von LTP1500 wurden von *E. coli* TOP10 Klon 950 sowie von *E. coli* DH5 α mit dem leeren Plasmid pBAT-myc/his-B als Negativkontrolle, Vorkulturen in jeweils 5 mL LB Ampicillin Bouillon angelegt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Mit je 0,1 mL der beiden Vorkulturen wurden jeweils nochmals 10 mL LB Ampicillin Bouillon beimpft und erneut über Nacht bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Aus den bewachsenen Kulturen wurden für den Klon 950 4 x 500 mL LB Ampicillin Bouillon sowie für die Negativkontrolle 1 x 500 mL beimpft und für ca. 4,5 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt, bis eine OD_{600nm} der Kulturen von 0,7 resultierte. Von jeder der Kulturen wurden 50 mL steril entnommen und als Nullprobe bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Die verbleibenden 450 mL wurden mit Arabinose so versetzt, dass Konzentrationen von jeweils 1 mM, 5 mM, 10

mM und 15 mM resultierten. Die Kultur mit dem Kontrollstamm *E. coli* DH5 α ohne LTP1500 Gen erhielt 10 mM Arabinose. Die Kulturen wurden zur Induktion des BAT-Promotors für weitere 3 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Kulturmedium getrennt. Das Kulturmedium wurde bei 4 °C für eventuelle weitere Untersuchungen gelagert.

Die Untersuchung auf Bildung von LTP durch *E. coli* TOP10 nach Transformation mit dem Vektor pBAT-myc/his LTP1500 B wurden die aus den Kulturen abgetrennten Zellen aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in einem Lysozym-haltigen Puffer aufgenommen und nach Einwirkung des Zellwand-abbauenden Enzyms mit Ultraschall behandelt. Nach dem Sedimentieren der Zelltrümmer wurde der erhaltene Überstand der vier unterschiedlich mit Arabinose induzierten Kulturen sowie der Kontrolle auf das Vorhandensein des LTP1500 Proteins untersucht. Dazu wurden aus den zellfreien Aufschlüssen je 100 μ l entnommen und mit 100 μ l Probenpuffer vermischt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Aus dieser Lösung wurden 16 μ l auf Polyacrylamidgel aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Von zwei parallel angesetzten Gelen wurden mit Hilfe eines Elektrophoret-Verfahrens die getrennten Proteine aus dem Gel auf Blotting-Membranen übertragen. Abb. 2 zeigt die mit Coomassie Blue gefärbte Membran, auf der das gesamte Spektrum der Proteine sichtbar ist. Es war eine Vielzahl von Banden verschiedenster Größen auf dem Gel zu erkennen. Eine Zuordnung einzelner Banden zu dem gesuchten Protein LTP1500 konnte hier nicht erfolgen. Diese Zuordnung gelang jedoch mit Hilfe des Blots des parallel angesetzten Gels von den selben Ansätzen. Dieser Blot wurde mit einem für LTP1500 aus Weizen spezifischen Antikörper, der durch den Lehrstuhl für Phytopathologie zur Verfügung gestellt wurde, inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Antikörperbindung wurde die Membran mit einem anti-Maus Antikörper behandelt, an den Alkalische Phosphatase zur Markierung gebunden war. Nach Zugabe eines Enzymsubstrates, welches nach Umsetzung durch das Enzym ein unlösliches gefärbtes Produkt ergibt, konnte wie in Abb. 3 gezeigt, eine Bande mit einer Größe von ca. 10 kDa detektiert werden.

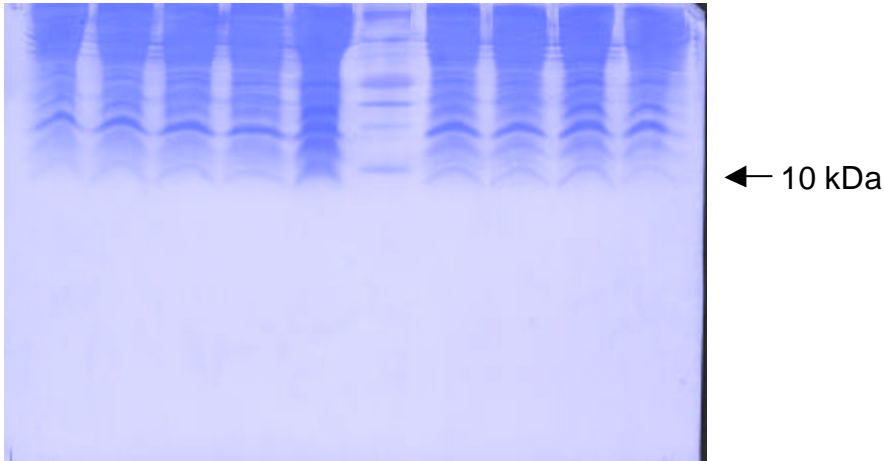


Abbildung 2: Spektrum der Proteine aus dem Zellaufschluss von *E. coli* TOP10 Transformanten mit dem Plasmid pBAT-myc/his LTP1500 B nach der Induktion mit Arabinose (Spuren 1-4) und vor der Induktion mit Arabinose (Spuren 7-9). Die Spuren 5 und 10 enthalten den Aufschluss der Kulturen, die mit dem leeren Plasmid pBAT-myc/his B ohne LTP1500 transformiert wurden. Die Spur 6 enthält den Größenstandard mit der kleinsten Bande bei ca. 10 kDa

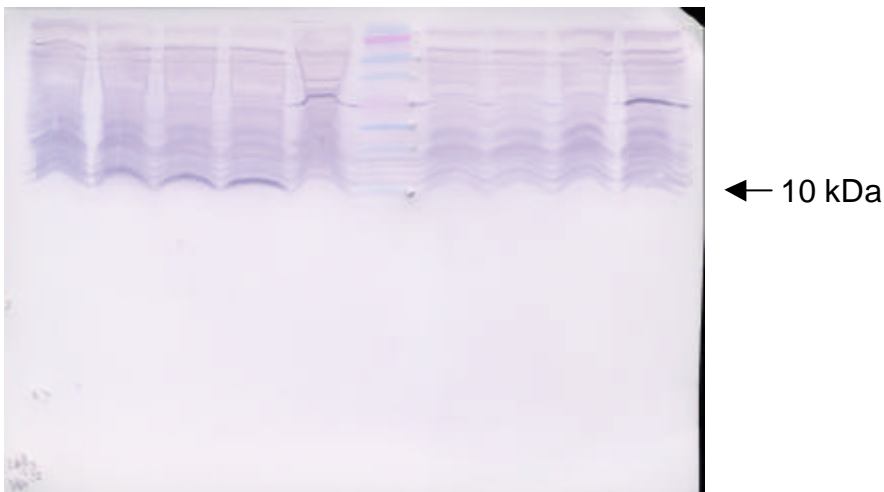


Abbildung 3: Westernblot des Zellaufschluss von *E. coli* TOP10 Transformanten mit dem Plasmid pBAT-myc/his LTP1500 B nach der Induktion mit Arabinose (Spuren 1-4) und vor der Induktion mit Arabinose (Spuren 7-9). Die Spuren 5 und 10 enthalten den Aufschluss der Kulturen, die mit dem leeren Plasmid pBAT-myc/his B ohne LTP1500 transformiert wurden. Die Spur 6 enthält den gefärbten Größenstandard mit der kleinsten Bande bei ca. 10 kDa

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, dass LTP1500 in den transformierten *E. coli* TOP10 Zellen von Klon 950 gebildet wurde, nachdem der im Plasmid vorhandene BAT-Promotor mit Arabinose induziert worden war. In den vor der Induktion gezogenen Proben konnte kein LTP1500 detektiert werden. Ebenso

trat das Protein weder vor noch nach der Induktion in dem mit dem leeren Vektor als Negativkontrolle transformierten *E. coli* DH5 α Stamm auf.

3.1.4 Klonierung von LTP1500 aus Weizen in einen Hefe-Expressionsvektor

Für die Klonierung des LTP1500 Gens in einen Vektor, der für die Expression des Proteins in *S. cerevisiae* geeignet war, wurde eine ähnliche Strategie verfolgt, wie sie oben bereits für die Transformation von *E. coli* beschrieben wurde. Für die Experimente wurde der Vektor pYX242 eingesetzt, der als sog. Shuttlevektor sowohl in *E. coli* Zellen vermehrt als auch für die Transformation von Hefen verwendet werden kann. Der Vektor besitzt sowohl eine Ampicillinresistenz zur Selektion in *E. coli* als auch ein Gen zur Synthese von Leucin, mit dem unter Verwendung eines Leucin-defizienten Hefestammes in Leucin-freiem Medium auf Transformanten selektiert werden kann. Die Vektorkarte von pYX242 ist in Abb. 4 dargestellt.

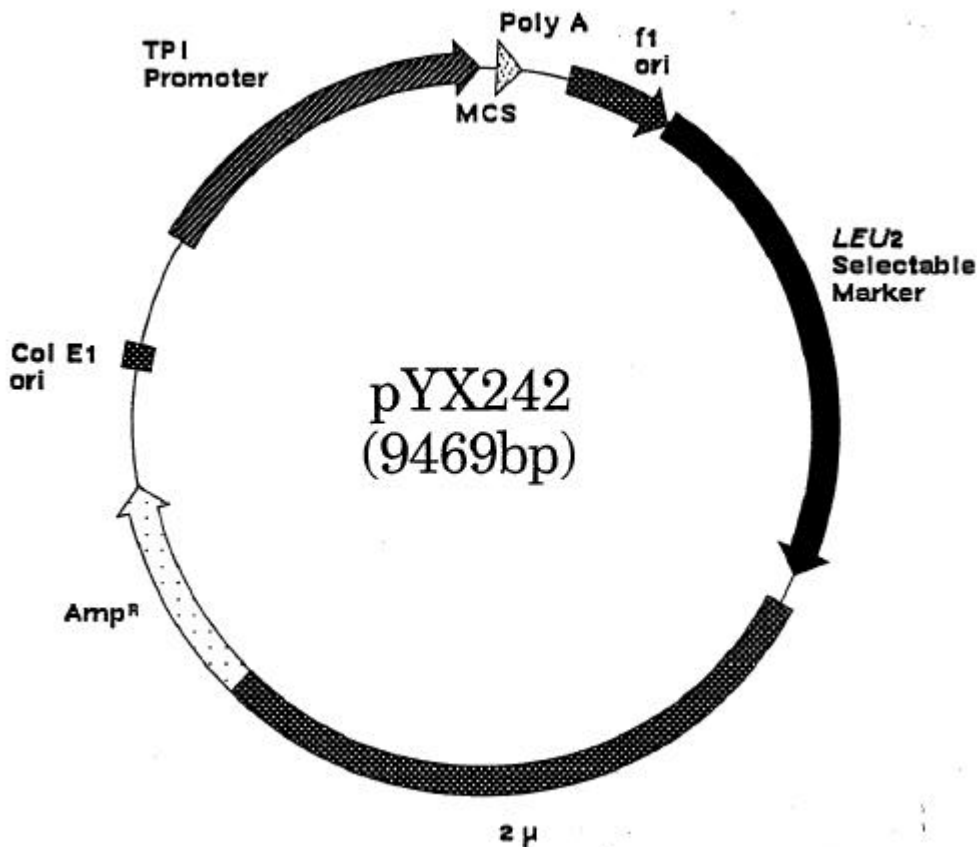


Abbildung 4: Vektorkarte des Vektors pYX242. Das LTP1500 Gen wurde in die MCS und Kontrolle des TPI Promotors kloniert. LEU2 = Gen für Leucinbiosynthese, Amp^R = Ampicillinrestistenzgen, Col E1 ori = Replikations-Origin für Vermehrung des Vektors in *E. coli*, 2 μ = 2 μ -Plasmid aus *S. cerevisiae* zur Vermehrung des Vektors in Hefezellen. MCS mit Schnittstellen für *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *SmaI*, *XhoI* und *SacI*

In der Multiple Cloning Site (MCS) von pYX242 fanden sich Restriktionsschnittstellen für EcoR1 und XhoI, die beide in der Gensequenz von LTP1500 nicht vorkamen. Diese Schnittstellen wurden analog zu der für die *E. coli* Transformation unter 3.1.2 beschriebenen Vorgehensweise an die Primer LTP1-f und LTP1-r angehängt. Die Sequenzen der resultierenden Primer LTP1f-EcoRI und LTP1r-XhoI sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Der Vektor pYX242 wurde zunächst in *E. coli* DH5 α transformiert, um ihn in größeren Mengen für weitere Experimente zu produzieren. Nach Reinigung aus den Zellen konnte er mit den beiden Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI in einer gemeinsamen Reaktion geschnitten werden.

Für die Herstellung des in den Vektor zu integrierenden LTP1500 Gens wurde unter Verwendung des unter 3.1.1 hergestellten PCR Produktes als Template und des Primerpaares LTP1f-EcoRI/LTP1r-XhoI (Tabelle 1) ein für die Klonierung geeignetes PCR Produkt hergestellt. Das Produkt hatte eine Größe von ca. 370 bp. Es wurde unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) aus dem Agarosegel gereinigt und anschließend mit XhoI bei 37 °C über Nacht verdaut. Die Restriktionsreaktion wurde durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C gestoppt. Anschließend wurde dem Ansatz EcoRI für den Verdau der zweiten Schnittstelle zugesetzt und wiederum bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach nochmaligem Abstoppen der Reaktion bei 65 °C für 10 min wurde die gesamte Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Das ca. 350 bp große Produkt wurde aus dem Gel herausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) gereinigt.

Für die Ligation des mit EcoRI und XhoI verdauten PCR-Produktes mit dem in gleicher Weise verdauten Vektor pYX242 wurden beide Komponenten in verschiedenen Mischungsverhältnissen zusammen mit T4 Ligase (MBI Fermentas) in Ligationspuffer bei 14 °C über Nacht inkubiert. Der ligierte Vektor wurde zur Transformation mit kompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Behandlung der Zellen für 90 s bei 42 °C wurden diese mit 1 ml LB Ampicillin Bouillon mit 20 mM Glukose gemischt und für 1 h bei 37 °C zur Adaptation der Zellen bebrütet. Anschließend wurden die Zellen zu 500 μ l pro Platte auf LB Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

Es konnten insgesamt nur 4 Transformanten erhalten werden. Diese wurden in jeweils 3 mL LB Ampicillin Bouillon überimpft und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Aus den Klonen 881, 882 und 883 konnten mit dem E.Z.N.A Plasmid Mini Kit (Peqlab) Plasmidpräparationen hergestellt werden, die zur Überprüfung des Vorhandenseins des LTP1500 Gens als Template in einer PCR mit dem Primerpaar LTP1-f/LTP1-r eingesetzt wurden. Alle Plasmide enthielten nach dieser Untersuchung ein Insert der erwarteten Länge von 350 bp. Die Inserts der Plasmide aus den Klonen 881 und 882 wurden durch MWG Biotech (Ebersberg) sequenziert. Die Analyse der Sequenzen ergab, dass die Plasmide der Klone 881 und 882 das LTP1500 Gen ohne Intron und in richtiger Orientierung enthielten. Die Sequenz

stimmte zu 100 % mit der durch Simmonds et al. (2000) in GenBank hinterlegten Sequenz von LTP1500 aus Weizen überein.

3.1.5 Transformation von *S. cerevisiae* mit LTP1500 aus Weizen und Nachweis der Expression

Mit dem unter 3.1.4 beschriebenen Vektor pYX242-LTP1500 stand ein für die Transformation von *S. cerevisiae* geeignetes Vektorsystem zur Verfügung, mit dem das LTP1500 Gen in die Hefe eingebracht und dort exprimiert werden konnte. Das in den Vektor eingebrachte Gen-Insert besaß neben der Region, die für das eigentliche Protein kodiert, noch eine sog. Leader-Sequenz. Diese kodiert für ein Signalpeptid, welches für den Export des Proteins aus der Zelle hinaus in das Medium notwendig ist. Bei der Ausschleusung des Proteins aus der Zelle wird dieses Signalpeptid durch spezifische Proteinasen der Zelle abgespalten, so dass das reife Protein im Kulturüberstand resultiert. Im Falle des hier verwendeten Vektors pYX242 musste die Weizen-Signalsequenz an dem LTP1500 zwingend an dem Gen belassen werden, da pYX242 keine Hefe-spezifische Signalsequenz besitzt, die hier hätte verwendet werden können. Es war daher für die weiteren Arbeiten wichtig zu zeigen, dass die Weizen-eigene Signalsequenz von der Hefe erkannt wird und das reife Protein tatsächlich aus den Zellen in den Kulturüberstand gelangt.

Für die Hefe-Transformation wurde der Stamm *S. cerevisiae* DSM 3820 in 20 mL YEPD Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C bebrütet. Als Vollmedium enthält YEPD Leucin, so dass dieser Leucin defiziente Stamm dort wachsen kann. Aus der Vorkultur wurden am nächsten Tag 300 mL YEPD als Hauptkultur mit 30 µL aus der Vorkultur beimpft und wiederum über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Diese Hauptkultur wurde mit 500 mL frischem YEPD Medium verdünnt, so dass sich eine Zellzahl von 8×10^6 Zellen mL⁻¹ ergab. Die Kultur wurde bei 30 °C bis OD₆₀₀ = 0,32 weitergeführt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert. Jeweils 200 µL der kompetenten Zellen wurden mit 20 µL Heringssperma (Sigma) und verschiedenen Mengen des aus dem Klon 881 isolierten Vektors pYX242-LTP1500 sowie unterschiedlichen Mengen an Lithiumacetat und 500 µL TE-Puffer gemischt. Als Positivkontrolle wurde statt pYX242-LTP1500 der leere Vektor pYX242 verwendet. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Plasmid ausplattiert. Zur Selektion von Transformanten wurden die verschiedenen Ansätze auf SC-d/o-Leu⁻ Agar ausgestrichen und für fünf Tage bei 30 °C bebrütet. Es traten insgesamt 864 Transformanten in den Proben auf. Bei den Positivkontrollen mit leerem Plasmid zeigten sich 63 Transformanten. Die Negativkontrolle ohne Plasmid zeigte keinerlei Wachstum.

Von den 864 Transformantenkolonien in den Proben wurden 18 abisoliert und als Glycerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt. Klone 951, 960, 961, 962 und 965 sowie

als Positivkontrollen mit leeren Plasmid die Klone 969 und 970, wurden zur Überprüfung auf Expression und Sekretion von LTP1500 jeweils in 300 mL SC-d/o-Leu⁻ Bouillon angeimpft und bei 30 °C für vier Tage bei 90 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und jeweils 50 mL der zellfreien Kulturüberstände in Centriprep-Röhrchen (Amicon) über eine Membran mit einem cut off von 5 kDa auf ca. 500 µL eingengt (Konzentrationsfaktor 20:1). Aus diesen Proben wurde ein Aliquot mit SDS-Probenpuffer gemischt, bei 70 °C für 10 min denaturiert und anschließend auf zwei parallel angesetzte Polyacrylamidgelen aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden beide Gele durch Electroblothing auf eine PVDF-Membran übertragen. Eine der Membranen wurde zur Sichtbarmachung des gesamten Proteinspektrums der Proben mit Coomassie Blue gefärbt (siehe Abb. 5)

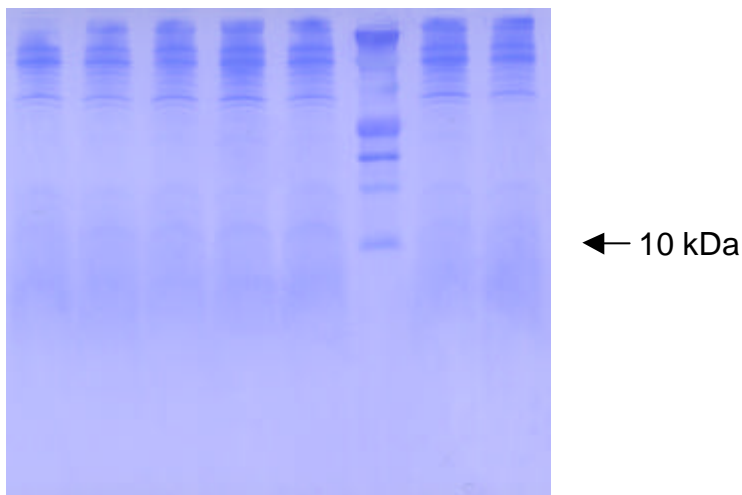


Abbildung 5: Spektrum der Proteine aus dem zellfreien Kulturüberstand verschiedener Klone von *S. cerevisiae* DSM 3820 mit dem Plasmid pYX242-LTP1500, Coomassie Blue gefärbte PVDF Membran nach Elektrotransfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel. Bahn 1 = Klon 951, Bahn 2 = Klon 960, Bahn 3 = Klon 961, Bahn 4 = Klon 962, Bahn 5 = Klon 965, Bahn 6 = Größenstandard Biorad prestained, Bahn 7 = Klon 969 (Kontrolle mit leerem Plasmid), Bahn 8 = Klon 970 (Kontrolle mit leerem Plasmid)

Eine weitere Membran wurde mit einem anti-LTP1500 Antikörper aus der Maus behandelt, der spezifisch and LTP1500 aus Weizen bindet (Lehrstuhl für Phytopathologie). Um die Bindung des Antikörpers an sein Antigen nachzuweisen, wurde die Membran anschließend mit einem anti-Maus Alkalische Phosphatase (APase) Konjugat überschichtet. Nach Zugabe eines APase Substrates, welches bei Umsetzung durch das Enzym ein unlösliches Produkt ergibt, erfolgte die Detektion des LTP1500 Proteins. Wie Abb. 6 zeigt, trat LTP1500 in allen getesteten Kulturüberständen auf. In den Überständen der Kontrollen mit leerem Plasmid konnte keine Bildung von LTP1500 beobachtet werden.

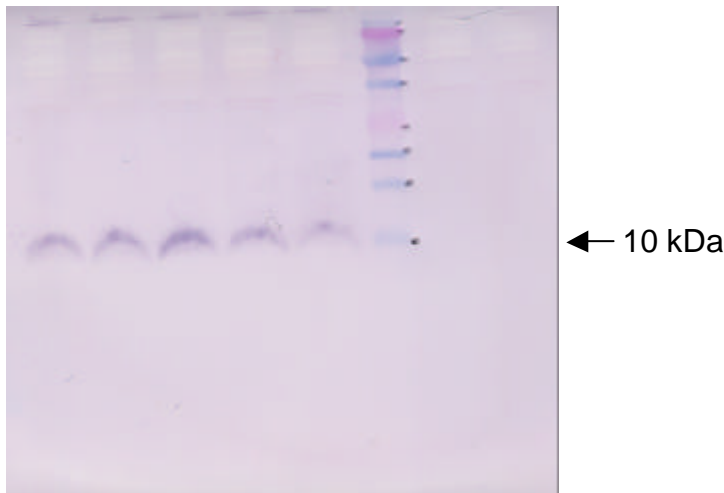


Abbildung 6: Westernblot der Proteine aus dem zellfreien Kulturüberstand verschiedener Klone von *S. cerevisiae* DSM 3820 mit dem Plasmid pYX242-LTP1500. Zur spezifischen Markierung wurde ein anti-LTP1500 Antikörper aus Kaninchen verwendet, der durch ein anti-Kaninchen Alkalische Phosphatase Konjugat spezifisch detektiert wurde. Bahn 1 = Klon 951, Bahn 2 = Klon 960, Bahn 3 = Klon 961, Bahn 4 = Klon 962, Bahn 5 = Klon 965, Bahn 6 = Größenstandard Biorad prestained, Bahn 7 = Klon 969 (Kontrolle mit leerem Plasmid), Bahn 8 = Klon 970 (Kontrolle mit leerem Plasmid)

3.2 Klonierung des Hydrophobins FcHyd5p aus *F. culmorum* in *S. cerevisiae*

Das Gen, welches für das Klasse 2 Hydrophobin FcHyd5p kodiert, wurde im Rahmen der Arbeiten zum Forschungsprojekt AiF 13468 identifiziert und konnte sowohl in Stämmen von *F. culmorum* als auch in *F. graminearum* nachgewiesen werden. Die Struktur dieses Gens wurde in dem Schlussbericht zu dem genannten Projekt beschrieben. Tabelle 2 wurde aus diesem Bericht übernommen und fasst die wichtigsten Eigenschaften des Hydrophobins FcHyd5p aus *F. culmorum* zusammen.

Tabelle 2: Eigenschaften des Hydrophobins FcHyd5p aus *F. culmorum* TMW 4.0111

FcHyd5p		
	mit SP	ohne SP
Größe Signalpeptid (SP)	17 Aminosäuren	
N-Glykosylierungsstelle	eine, NFSA an Position 64	
Größe	98 Aminosäuren	81 Aminosäuren
errechnetes Molekulargewicht	10,03 kDa	8,40 kDa
pI	4,05	3,85

Der Sequenzvergleich von FcHyd5p mit Hilfe des BLAST Algorithmus zeigte deutliche Homologien zu bereits bekannten Hydrophobinen wie HYD5 von *Gibberella moniliformis* (*F. verticillioides*), Magnaporin (mp) von *Magnaporthe grisea* und einem Cryparin *presursor* CRP von *Cryphonectria parasitica*. Einen Vergleich der Hydrophobine FcHyd5p, des seit 2004 im Genom von *F. graminearum* annotierten hypothetischen Proteins FgHyd5p und des Hydrophobins FvHyd5p von *F. verticillioides* (Fuchs *et al.*, 2004) ermöglicht Abb. 7. Die Analyse der Daten lieferte folgendes Ergebnis: Das im Rahmen dieser Arbeit durch Übersetzung der Gensequenz erhaltene Hydrophobin FcHyd5p zeigte eine 100%-ige Identität (98/98 Aminosäuren) auf Proteinebene mit dem durch das Gen FgHyd5 kodierte hypothetischen Protein FgHyd5p. Auf DNA-Ebene gab es hier einige Unterschiede, die aber bei der Translation in das Protein keine Rolle spielen. Weiterhin zeigt FcHyd5p eine 85%-ige Identität (83/98 Aminosäuren) auf Proteinebene mit dem Hydrophobin FvHyd5p aus *F. verticillioides*.

FcHyd5p	MKFSLA	AAVAL	LGAVVS	SALPA	NEKRQAY	IIPC	SGLYGTS	QCC	ATDVLGV	VADL	DCGNPP	SSPT
FgHyd5p	MKFSLA	AAVAL	LGAVVS	SALPA	NEKRQAY	IIPC	SGLYGTS	QCC	ATDVLGV	VADL	DCGNPP	SSPT
FvHyd5p	MQFSLA	LALVTL	LATAVS	SALPT	EKRQAY	IIPC	SGLYGTS	QCC	ATDVLGV	VADL	DCGNPP	STPA
<hr/>												
FcHyd5p	DADNFS	AVCA	EIGQRAR	CCV	LPILDQ	GILC	NTPTG	VQD				
FgHyd5p	DADNFS	AVCA	EIGQRAR	CCV	LPILDQ	GILC	NTPTG	VQD				
FvHyd5p	NATDFS	AVCS	AIGQRAR	CCV	LPILDQ	GILC	NTPTG	VQD				

Abbildung. 7: Sequenzvergleich nach ClustalW von FcHyd5p aus *F. culmorum* TMW 4.0111, dem hypothetischen Protein FgHyd5p (FG01831.1) aus *F. graminearum* contig 1.94 und FvHyd5p aus *Gibberella moniliformis* (*F. verticillioides*, Genbank NCBI AY158024). Die zu FcHyd5p identischen Aminosäuren sind fett markiert. Die für Hydrophobine charakteristischen acht Cysteine sind eingerahmt. Das Signalpeptid (nach Vorhersage mit SignalP) ist durch einen Strich vom sekretierten Protein abgetrennt.

Untersuchungen zur Genexpression des Hyd5 Gens in *F. culmorum* in dem genannten AiF 13468/N Projekt zeigten, dass die stärkste Aktivität des Gens am fünften Kulturtag gemessen werden kann, wo sie annähernd der Expression des β -Tubulin Gens entsprach und damit als vergleichsweise hoch einzustufen ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurde versucht, auf der Grundlage der bekannten Sequenz des Hyd5 Gens in *F. culmorum* (FcHyd5) das durch dieses Gen kodierte Protein in *S. cerevisiae* zur Expression zu bringen. Damit sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, das Protein in reiner Form und in größeren Mengen zu produzieren, als dies durch die Aufarbeitung von *F. culmorum* Kulturüberständen bisher gelungen war.

3.2.1 Herstellung einer exprimierbaren FcHyd5 Sequenz durch Gensynthese

Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, enthält die Sequenz des FcHyd5 Gens ein 45 bp großes Intron, das zwei etwa gleich große Exon-Bereiche voneinander trennt. Wegen der Lage des Intronbereiches im mittleren Teil des Gens, konnte hier eine Strategie zur Herstellung einer Intron-freien Genkopie analog zur Vorgehensweise bei LTP1500 nicht angewendet werden (siehe 3.1.1). Als Alternative wäre hier die Gewinnung einer entsprechenden Sequenz aus mRNA gewesen. Wegen des relativ hohen zeitlichen Aufwandes durch Klonierung und Sequenzierung von cDNA aus Pilzkulturen wurde in der vorliegenden Arbeit der Weg über die *in vitro* Synthese des betreffenden Gens gewählt.

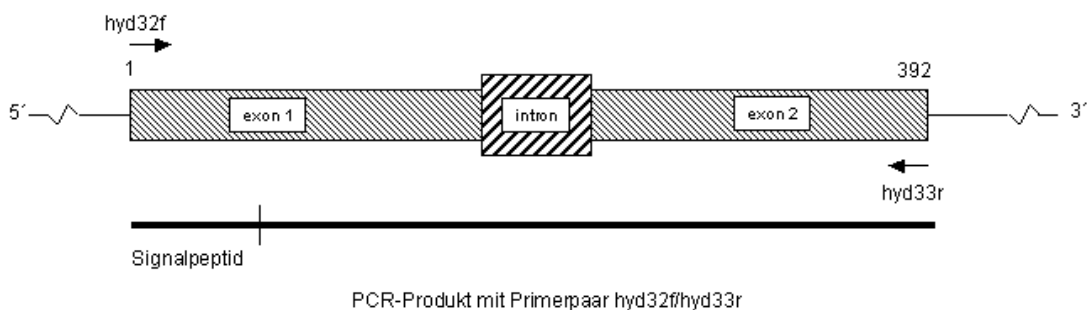


Abbildung 8: Schematische Darstellung des FcHyd5 Gens aus *F. culmorum* mit Angabe der Bindepositionen der verwendeten Primer hyd32f und hyd33r

Die Gensynthese wurde durch die Firma GeneArt GmbH (Regensburg) anhand der Sequenz von FcHyd5 aus *F. culmorum* TMW 4.0111 durchgeführt. Ein weiterer Vorteil des hier gewählten Weges der Herstellung einer Intron-freien Genkopie ist die Editierung und Optimierung der Sequenz vor der Synthese. Dabei wird die DNA-Sequenz unter Beibehaltung der Aminosäuresequenz des auf dem Gen kodierten Proteins so bearbeitet, dass sie möglichst gut zu der sog. Codon Usage desjenigen Organismus passt, in dem das Protein später exprimiert werden soll, im vorliegenden Fall *S. cerevisiae*. Das Gen wurde so synthetisiert, dass das Signalpeptid, welches der Aminosäuresequenz des reifen Proteins vorgelagert ist, beibehalten wurde. Hierdurch sollte sicher gestellt werden, dass FcHyd5p durch die Hefe in das Medium ausgeschleust werden kann. Das synthetische Gen wurde durch GeneArt in dem Vektor 042849 pPCR-Script kloniert geliefert.

3.2.2 Klonierung des FcHyd5 Gens in einen Hefe-Shuttlevektor

Der Vektor 042849 pPCR-Script wurde in der Forschungsstelle in *E. coli* DH5 α subkloniert und konnte in dem resultierenden Klon 730 für weitere Arbeiten vermehrt werden. Der gereinigte Vektor wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Es zeigte sich, dass die beiden Kombination der Enzyme EcoRI/XhoI und EcoRI/SacI geeignet waren, um das FcHyd5 Insert aus dem Vektor 042849 pPCR-Script herauszuschneiden. Beide Kombination fanden sich auch in dem für die Hefetransformation vorgesehenen Vektor pYX242 (siehe Abb. 4). Für die Klonierung von FcHyd5 in dem Hefe-Shuttlevektor pYX242 wurde daher das Gen mit den Enzymen EcoRI und XhoI aus dem Vektor 042849 pPCR-Script herausgeschnitten und gereinigt. Gleichzeitig wurde auch der Vektor pYX242 mit den selben Enzymen verdaut und ebenfalls gereinigt. Die beiden verdauten Produkte wurden anschließend in einem Ligationsansatz mit T4 Ligase über Nacht bei 14 °C ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden kompetente Zellen von *E. coli* DH5 α transformiert (Hitzschock bei 42 °C für 90 s), die im Anschluss zur Selektion auf LB-Ampicillin ausplattiert wurden. Es resultierten insgesamt 210 Transformanten, von denen 41 in jeweils 5 mL frisches LB-Ampicillin Medium abgeimpft wurden. Aus allen Klonen konnte ein Plasmid isoliert werden. Zur Kontrolle auf Vorhandensein eines Inserts der richtigen Größe (ca. 300 bp) wurden 29 der isolierten Plasmide mit EcoRI und XhoI verdaut und alle Ansätze auf einem Agarosegel getrennt. Es zeigte sich, dass von den 29 untersuchten Klonen 27 ein Insert der richtigen Größe besaßen. Die Klone 793, 809 und 820 wurden für weitere Arbeiten aufbewahrt, die restlichen wurden vernichtet. Die Sequenzierung der aus den Klonen 793, 809 und 820 isolierten Plasmide ergab in allen drei Fällen, dass es sich bei dem dort vorhandenen ca. 300 bp großen Insert um das Intron-freie FcHyd5 Gen handelte. Damit stand ein für die Transformation von *S. cerevisiae* geeigneter Shuttlevektor zur Verfügung, der im Folgenden als pYX242-FcHyd5 bezeichnet wird.

3.2.3 Transformation von *S. cerevisiae* mit dem FcHyd5 Gen

Für die Transformation von *S. cerevisiae* mit dem FcHyd5 Gen wurde ein Hefestamm verwendet, der die Aminosäure Leucin nicht selber bilden kann. Entsprechend wächst der Stamm DSM 3820 nur auf Medien, denen Leucin zugesetzt wurde. Der verwendete Shuttlevektor pYX242-FcHyd5 besitzt ein Gen für die Bildung von Leucin (siehe Vektorkarte Abb. 4), was dazu führt dass Zellen, die mit diesem Vektor transformiert wurden, auch auf Leucin-freiem Medium wachsen können. Damit können Transformanten gegenüber nicht-transformierten Zellen selektiert werden. Die Hefen wurden wie unter 3.1.4 beschrieben kultiviert und zur Transformation mit der PEG-Methode vorbereitet. Die Transformation erfolgte mit

dem gereinigten Vektor pYX242-FcHyd5. Als Positivkontrolle wurden in gleicher Weise behandelte Zellen mit dem leeren Vektor pYX242 transformiert. Im Anschluss wurden die Transformationsansätze auf SC-d/o-Leu⁻ Agar ausplattiert und bei 30 °C über Nacht bebrütet. Danach wurde die Inkubation bei Raumtemperatur für weitere vier Tage fortgesetzt.

Es resultierte sowohl für die Ansätze, die mit dem Vektor pYX242-FcHyd5 transformiert wurden, als auch für die mit dem leeren Vektor pYX242 transformierten Kontrollansätze eine sehr große Anzahl an Transformanten. Aus den Ansätzen, die mit pYX242-FcHyd5 transformiert worden waren, wurden 18 isoliert liegende Kolonien in je 20 mL SC-d/o-Leu⁻ Medium überimpft. Für die Kontrolle wurden zwei Transformanten in das selbe Medium überführt. Alle Kulturen wurden bei 30 °C für 25 h bei 180 rpm geschüttelt. Für die Kontrolle auf Anwesenheit des FcHyd5 Gens in den Klonen wurde aus den Zellen jeweils nach enzymatischem Aufschluss (Zymolyase) mit Hilfe des Zymoprep II Yeast Plasmid Miniprep Kit (HISS Diagnostics, Freiburg) Plasmid-DNA isoliert. Diese Präparate wurden in eine PCR mit dem Primerpaar Hyd46f/Hyd47r (siehe Tabelle 1) eingesetzt. Aus allen 18 getesteten Klonen konnte ein PCR-Produkt der richtigen Größe erhalten werden. Damit wurde eindeutig gezeigt, dass alle Hefeklone das FcHyd5 Gen enthalten.

3.2.4 Expression von FcHyd5p durch *S. cerevisiae* Transformanten

Untersuchungen zur Expression des FcHyd5p Proteins wurden mit den Klonen 841, 844, 847, 850 und 856 durchgeführt. Als Negativkontrolle diente der Hefeklon 860, der mit dem leeren Vektor pYX242 transformiert worden war. Dazu wurden Vorkulturen der Hefeklone in 50 mL SC-d/o-Leu⁻ Medium angesetzt und bei 30 °C über Nacht bei 80 rpm geschüttelt. Aus diesen Vorkulturen wurden je Klon 300 mL SC-d/o-Leu⁻ Medium ohne Sorbitzusatz als Hauptkultur beimpft und bei 30 °C für sechs Tage bei 80 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden zur Sedimentation für 24 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Kulturüberstände von den Zellen dekantiert und mit Druck über eine Membran filtriert. Die verwendete Membran hatte eine Ausschlussgrenze von 5 kDa, so dass ein eventuell gebildetes Hydrophobin mit einem Molekulargewicht von ca. 8,5 kDa zurückgehalten werden konnte. Aus den auf ca. 3 mL eingegangenen Kulturüberständen (Konzentrationsfaktor 1:100) wurde eine Probe entnommen und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Färbung mit Coomassie Blue konnte in keiner der Proben ein Protein im Größenbereich <10kDa beobachtet werden. Auch eine Nachfärbung des Gels mit Silber brachte bei höherer Empfindlichkeit kein Ergebnis.

3.3 Klonierung des Hydrophobins FcHyd3p aus *F. culmorum* in *S. cerevisiae*

Das Gen, welches für das Klasse 1 Hydrophobin FcHyd3p kodiert, wurde ebenfalls im Rahmen der Arbeiten zum Forschungsprojekt AiF 13468 in seiner Struktur aufgeklärt und konnte sowohl in Stämmen von *F. culmorum* als auch in *F. graminearum* nachgewiesen werden. Die Struktur dieses Gens wurde in dem Schlussbericht zu dem genannten Projekt beschrieben. Tabelle 3 wurde aus diesem Bericht übernommen und fasst die wichtigsten Eigenschaften des Hydrophobins FcHyd3p aus *F. culmorum* zusammen.

Tabelle 3: Eigenschaften des Hydrophobins FcHyd3p aus *F. culmorum* TMW 4.0111

		FcHyd3p	
		mit SP	ohne SP
Größe Signalpeptid (SP)		18 Aminosäuren	
N-Glykosylierungsstelle		keine vorhergesagt	
Größe		83 Aminosäuren	65 Aminosäuren
errechnetes Molekulargewicht		8,33 kDa	6,51 kDa
pI		6,83	6,83

Nach der Analyse ist FcHyd3p ein Hydrophobin der Klasse 1, da es alle bisher beschriebenen Eigenschaften wie die Reihenfolge und den typischen Abstand der 8 Cystein-Reste voneinander aufweist. Das Hydrophobin FcHyd3p (mit Signalpeptid) ist 83 Aminosäuren lang, hat ein errechnetes Molekulargewicht von 8,33 kDa und einen pI von 6,83. Es handelt sich also um ein wesentlich basischeres Protein, als FcHyd5p. Es beinhaltet nach Vorhersage des Programms SignalP ein Signalpeptid von 18 Aminosäuren am N-Terminus. Nach Analyse mit dem Programm NetNGly1.0 besitzt es keine mögliche N-Glykosylierungsstelle.

FcHyd3p	MQFSTLTTVF	ALVAAVAAP	HG-----	---SSGGNN-	PVCSAQNNQV	CCNGLLS	CAV
FgHyd3p	MQFSTLTTVF	ALVAAVAAP	H-----	---SSGGNN-	PVCSAQNNQV	CCDGILTCPI	
FvHyd3p	MQFAKIASVL	AMAAVAAP	APGNYEVEPR	TGGSNNGNNQ	PACSAQSSNV	CCNG-LG	CLV

FcHyd3p	QVLGSNCNGN	AYCCNTEAP-	-TGTLINVAL	LNCVKLL
FgHyd3p	QVLGSNCNGN	SYCCKTDA-	-VGALINVAL	LNCVKLL
FvHyd3p	QILGAGCSTK	SYCCQSDAPL	AVGALVNVNA	LNCVQVL

Abbildung 9: Sequenzvergleich nach ClustalW von FcHyd3p aus *Fusarium culmorum* TMW 4.0111, dem hypothetischen Protein FgHyd3p (FG09066.1) aus *F. graminearum* contig 1.370 und FvHyd3p aus *Gibberella moniliformis* M-3125 (*F. verticillioides*, Genbank NCBI AY155498). Die zu FcHyd3p identischen Aminosäuren sind fett markiert. Die für Hydrophobine charakteristischen acht Cysteine sind eingerahmt. Das Signalpeptid (nach Vorhersage mit SignalP) ist durch einen Strich vom sekretierten Protein abgetrennt.

3.3.1 Herstellung einer exprimierbaren FcHyd3 Sequenz durch Gensynthese

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurde versucht, auf der Grundlage der bekannten Sequenz des Hyd3 Gens in *F. culmorum* (FcHyd3) das durch dieses Gen kodierte Protein in *S. cerevisiae* zur Expression zu bringen. Damit sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, Neben dem bereits beschriebenen Hydrophobin FcHyd5p auch das Protein FcHyd3p in reiner Form und in größeren Mengen zu produzieren, als dies durch die Aufarbeitung von *F. culmorum* Kulturüberständen bisher gelungen war. Eine schematische Darstellung des FcHyd3 Gens zeigt Abb. 10.

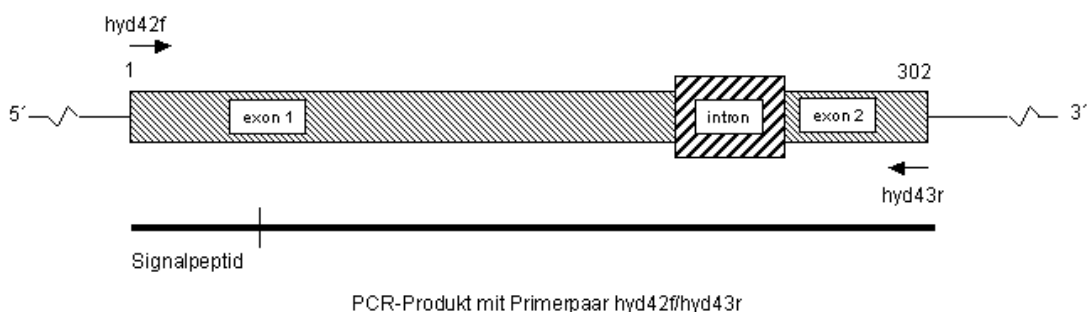


Abbildung 10: Schematische Darstellung des FcHyd3 Gens aus *F. culmorum* mit Angabe der Bindepositionen der verwendeten Primer hyd42f und hyd43r

Ein Vergleich des FcHyd3 Gens mit dem in Abb. 8 gezeigten FcHyd5 Gen zeigt, dass die Sequenz des Gens um 90 Basen kürzer ist. Es ist ebenfalls ein 50 bp

großes Intron in der Sequenz vorhanden, dessen Position aber im letzten Drittel des Gens liegt und nicht in der Mitte, wie dies bei FcHyd5 der Fall war. Analog zu diesem Gen ist auch in der FcHyd3 Sequenz am N-terminalen Ende ein Signalpeptid von 18 Aminosäuren Länge kodiert.

Wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, wurde die Gensynthese durch die Firma GeneArt GmbH (Regensburg) anhand der Sequenz von FcHyd3 aus *F. culmorum* TMW 4.0111 durchgeführt. Dabei wurde analog zu FcHyd5 eine Intron-freie Genkopie erstellt, die wiederum hinsichtlich der Optimierung der Codon Usage von *S. cerevisiae* editiert wurde. Das Gen wurde wiederum so synthetisiert, dass das Signalpeptid, welches der Aminosäuresequenz des reifen Proteins vorgelagert ist, beibehalten wurde. Hierdurch sollte sicher gestellt werden, dass FcHyd3p durch die Hefe in das Medium ausgeschleust werden kann. Das synthetische Gen wurde durch GeneArt in dem Vektor 052549 pPCR-Script kloniert geliefert. Die synthetische Sequenz wurde am 5'-Ende mit einer KpnI und einer EcoRI Schnittstelle versehen, am 3'-Ende wurde eine XhoI und eine SacI Schnittstelle angefügt. Das FcHyd3 Gen war nach Sequenzierung durch GeneArt (Regensburg) als 271 bp großes Vektorinsert enthalten, so das damit für weitere Arbeiten eine Intron-freie und für die Expression in *S. cerevisiae* optimierte Gensequenz zur Verfügung stand.

3.3.2 Klonierung des FcHyd3 Gens in einen Hefe-Shuttlevektor

Die Arbeiten zur Klonierung des synthetischen FcHyd3 Gens in einen Hefe-Shuttlevektor verliefen analog zu der für das Gen FcHyd5 unter 3.2.2 beschriebenen Vorgehensweise. Der Vektor 052549 pPCR-Script, der das durch die Firma GeneArt (Regensburg) synthetisierte FcHyd3 Gen enthielt, wurde zur Sicherung und für weitere Arbeiten in *E. coli* DH5 α subkloniert. Die aus den Klonen 975 und 980 isolierten Plasmide enthielt nach Sequenzanalyse jeweils das vollständige und fehlerfreie FcHyd3 Gen. Sie wurden zur Sicherung des Vektors bei -80 °C eingefroren und stehen für weitere Arbeiten zur Verfügung.

Für die Überführung des FcHyd3 Gens in einen Hefe-Shuttlevektor wurde, ausgehend von dem Plasmid aus Klon 980 mit den zu der synthetischen Sequenz passenden Primern Hyd48f und Hyd49r (siehe Tabelle 1) ein PCR-Produkt erzeugt. An den Vorwärtsprimer Hyd48f wurde eine EcoRI Schnittstelle mit dazu passender Spacersequenz angehängt, der Rückwärtsprimer Hyd49r war mit einer XhoI Schnittstelle inklusive Spacersequenz versehen. In der PCR mit diesen Primern und dem aus Klon 980 isolierten Plasmid resultierte ein 276 bp großes Amplifikat, welches aus dem Agarosegel gereinigt und mit EcoRI und XhoI in zwei aufeinander folgenden Restriktionen verdaut wurde. Das verdaute PCR Fragment wurde im Agarosegel von den verdauten Resten der Schnittstellen getrennt und für die Ligation in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen und gereinigten Hefe-Shuttlevektor

pYX242 als Fragment von nunmehr 265 bp Länge aus dem Gel gereinigt. Die Ligation erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben.

Der ligierte und aus dem Agarosegel gereinigte Vektor pYX242-FcHyd3 wurde in kompetente Zellen von *E. coli* DH5 α kloniert. Es resultierten 13 Klone, von denen zehn nach Überimpfen auf LB-Ampicillin Medium angewachsen waren. Eine PCR mit dem Primerpaar pYX242-for/pYX242-rev (siehe Tabelle 1) ergab für die Plasmide aus den Klonen 982, 988, 989 und 994 ein Insert der richtigen Länge (265 bp). Die aus den Klonen 988 und 994 präparierten Plasmide wurden durch MWG Biotech (Ebersberg) sequenziert. Beide Sequenzen waren mit der durch GeneArt (Regensburg) synthetisierten Sequenz identisch. Klone *E. coli* DH5 α 982, 988, 989 und 994 wurden als Glycerinkulturen präpariert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Sie enthalten das Plasmid pXY242-FcHyd3, welches im weiteren Verlauf der Untersuchungen als Vektor für die Transformation von *S. cerevisiae* mit dem FcHyd3 Gen verwendet wurde.

3.3.3 Transformation von *S. cerevisiae* mit dem FcHyd3 Gen

Bei der Transformation von *S. cerevisiae* mit dem FcHyd3 Gen wurde analog zu der unter 3.2.3 für das FcHyd5 Gen beschriebenen Vorgehensweise verfahren. Auch hier wurden kompetente Zellen des für Leucin defizienten Stammes *S. cerevisiae* DSM 3820 in parallelen Ansätzen mit dem aus Klon 988 und 994 isolierten Vektor pYX242-FcHyd3 inkubiert. Die Ansätze wurden auf SC-d/0-Leu $^{-}$ Agar (ohne Zusatz von Leucin) ausplattiert und über Nacht bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ sowie für weitere 5 Tage bei Raumtemperatur bebrütet. Es resultierten für beide Vektoren insgesamt über 9000 Klone, von denen 34 für weitere Untersuchungen in SC-d/0-Leu $^{-}$ Flüssigmedium überimpft wurden. Klone 1041 bis 1064 wurden als Glycerinkulturen präpariert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die Kontrolle auf Anwesenheit des FcHyd3 Gens in den Klonen wurde aus den Zellen jeweils nach enzymatischem Aufschluss (Zymolyase) mit Hilfe des Zymoprep II Yeast Plasmid Miniprep Kit (HISS Diagnostics, Freiburg) Plasmid-DNA isoliert. Diese Präparate wurden in eine PCR mit dem Primerpaar Hyd48f/Hyd49r (siehe Tabelle 1) eingesetzt. Aus allen 34 getesteten Klonen konnte ein PCR-Produkt der richtigen Größe erhalten werden. Damit wurde eindeutig gezeigt, dass alle Hefeklone das FcHyd3 Gen enthalten.

3.3.4 Expression von FcHyd3p durch *S. cerevisiae* Transformanten

Untersuchungen zur Expression des Klasse 1 Hydrophobins FcHyd3p durch die unter 3.3.3 hergestellten Transformanten konnten im Rahmen der Projektlaufzeit nicht mehr durchgeführt werden.

3.4 Gärversuche mit transgenen *S. cerevisiae* Stämmen

Um den Einfluss der Proteine LTP1500, FcHyd5p und FcHyd3p auf die Blasenbildung und das Überschäumverhalten von Bieren zu untersuchen, wurden im Rahmen des Projektes B89 Brauversuche mit den verschiedenen unter 3.1, 3.2 und 3.3 hergestellten Hefetransformanten durchgeführt. Dazu wurden die Klone 961 (LTP1500 aus Weizen), 858 (Klasse 2 Hydrophobin FcHyd5p aus *F. culmorum*), 1064 (Klasse 1 Hydrophobin FcHyd3p aus *F. culmorum*) und 970 (leeres Plasmid pYX242 als Kontrolle) in je 50 mL SC-d/o-Leu⁻ Medium angeimpft und für 7 Tage bei 25 °C und 120 rpm geschüttelt. Als weitere Kontrolle für das Gelingen der Gärung wurde der Hefestamm Weihenstephan 66/70 (*S. cerevisiae* ssp. *uvarum* var. *carlsbergensis*) eingesetzt. Aus den Vorkulturen wurden jeweils 1000 mL SC-d/o-Leu⁻ ohne Glukose angeimpft und wiederum bei 25 °C und 90 rpm für drei Tage geschüttelt. Anschließend wurde je Kultur 25 g Glukose aus steriler Stammlösung zugesetzt und weiter wie oben inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Kulturen für vier Tage zum Sedimentieren bei 4 °C gelagert. Der klare Überstand wurde von den Kulturen dekantiert und die sedimentierten Zellen in 20 mL 50 % Glukose aufgenommen. Ein Aliquot jeder Lösung wurde nach Verdünnung auf Malzextrakt und SC-d/o-Leu⁻ Agar ausplattiert und zur Bestimmung der Lebendkeimzahlen bis zum übernächsten Tag bebrütet. Alle Hefekulturen hatten Keimzahlen von ca. 3×10^6 mL⁻¹.

Mit den so hergestellten Hefesuspensionen wurden jeweils 15 L belüftete und gehopfte Gerstenmalzwürze beimpft, die durch das Hofbrauhaus Freising zur Verfügung gestellt und vor Ort heiß in Korneliusbehälter abgefüllt wurde. Die Gärung erfolgte bei 20 °C unter gelegentlichem Schütteln der Gärbehälter. Entstehendes CO₂ wurde über ein Ventil in einen Schlauch abgeleitet, dessen Ende in einem Behälter mit Desinfektionsmittel lag, so dass keine transgenen Hefezellen in die Umwelt gelangen konnten. Nach der sieben-tägigen Hauptgärung wurde keine CO₂ Bildung mehr beobachtet und die Gäransätze wurden auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden die Container mit CO₂ auf einen konstanten Druck von 1 bar gebracht. Laut Sättigungsdiagramm (MEBAK) ergab sich damit ein CO₂ Gehalt von 5 g L⁻¹. Die Jungbiere wurden anschließend 7 d bei 4 °C gelagert, wobei die Behälter zur Verbesserung der Karbonisierung täglich geschüttelt wurden. Nach Ablauf der Lagerung wurden die Biere mit Hilfe eines Einzelfüllers mit einer Vorspannung von 1,2 bar in neue sterile 0,5 L NRW-Flaschen abgefüllt und mit sterilen Kronkorken

verschlossen. Pro getesteter Hefe wurden 20 Flaschen abgefüllt, die zum Sedimentieren der Hefe für 14 d bei 4 °C gelagert wurden.

Aus dem nicht in Flaschen gefüllten Rest jedes Gäransatzes wurde untersucht, wie hoch nach der Gärung der Anteil von Plasmid-tragenden Zellen war. Diese Untersuchung war notwendig, weil die Möglichkeit des Ausschleusens der Plasmide besteht, sobald Leucin im Medium vorhanden ist. Als Vollmedium enthält Würze alle Aminosäuren in großen Mengen, weshalb die Gefahr besteht, dass die Zellen ohne das Plasmid das transgene Protein nicht produzieren würden. Um dies zu untersuchen, wurden von allen Ansätzen Verdünnungsreihen in steriler Ringerlösung hergestellt und jeweils auf SC-d/o-Leu⁻ Agar und auf Malzextraktagar ausplattiert. Der Prozentsatz von Plasmid-haltigen Zellen errechnete sich aus dem Verhältnis der Zellzahlen auf dem selektiven SC-d/o-Leu⁻ Medium und den Zellzahlen auf dem Malzextrakt Vollmedium. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Gärung 77 % (LTP1500), 65 % (FcHyd5) und 50 % (FcHyd3) der lebenden Hefezellen noch das zur Transformation verwendete Plasmid besaßen. Die Bildung relevanter Mengen der transgenen Proteine während der Gärung konnte daher erwartet werden.

Im Anschluss an die 14 tägige Lagerung wurden jeweils vier Flaschen der mit transgenen Hefen hergestellten Biere für 24 h bei 20 °C und 28 rpm über Kopf geschüttelt. Vor dem Öffnen der Flaschen wurden sie für ein Stunde aufrecht stehend ruhen gelassen und kurz vor dem Öffnen von Hand fünfmal um ihre Längsachse rotiert. Jede Flasche wurde einzeln vor und nach dem Öffnen gewogen, um das ausgetretene Volumen zu bestimmen. Dabei wurde angenommen, dass 1 mL Bier bei Raumtemperatur eine Masse von 1 g besitzt. Tabelle 4 fasst die ermittelten Überschäumvolumina zusammen.

Tabelle 4: Überschäumvolumen von Bieren, die mit transgenen Hefen vergoren wurden

Hefeklon	Überschäumvolumen [mL]				Mittelwert [mL]	Standardabw. [mL]
	Flasche 1	Flasche 2	Flasche 3	Flasche 4		
<i>S. cerevisiae</i> ssp. <i>uvarum</i> var. <i>carlsbergensis</i> Stamm W66/70	0	0	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> DSM 3820 [pYX242], Klon 970	0	0.3	3.5	0.5	1.1	1.6
<i>S. cerevisiae</i> DSM 3820 [pYX242-LTP1500] Klon 961	0	0	0	0.5	0.125	0.25
<i>S. cerevisiae</i> DSM 3820 [pYX242-FcHyd3] Klon 1064	0	0	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i> DSM 3820 [pYX242-FcHyd5] Klon 858	14.2	25.0	10.1	26.2	18.8	7.9

Die Auswertung der Überschäumvolumina für die mit den verschiedenen Transgenen hergestellten Biere zeigte einen deutlichen Einfluss des Hefeklons 858. Nur in dem mit diesem Klon hergestellten Bier konnte ein durchschnittliches Überschäumvolumen von 18,8 mL pro Flasche festgestellt werden. Das mit dem Referenzstamm 66/70 vergorene Bier sowie die mit den transgenen *S. cerevisiae* Klonen 1064 (FcHyd3p) und 961 (LTP1500) hergestellten Biere zeigten kein Überschäumen von Bier beim Öffnen der Flaschen. Lediglich die Hefe, die mit dem leeren Plasmid pYX242 transformiert wurde, verursachte ein geringes Käppeln des Bieres.

4 Schlussbetrachtung

Im Rahmen vorhergehender Untersuchungen (AiF 13468/N) konnte festgestellt werden, dass das oberflächenaktive LTP1 Protein aus Weizen in Weizenbieren mit Gushing in deutlich geringerer Menge vorhanden war, als in vergleichbaren Bieren, die kein Gushing zeigten. Darüber hinaus konnten in den genannten Arbeiten zwei Hydrophobingene in *F. culmorum* und *F. graminearum* identifiziert und charakterisiert werden. Beide Pilze wurden in verschiedenen Untersuchungen mit dem Auftreten von Gushing in Verbindung gebracht. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten von Kleemola *et al.* (2001) und Sarlin *et al.* (2005) deuten auf eine Beteiligung von Hydrophobinen der Klasse 2 bei der Entstehung des Gushing hin. Auch das in AiF 13468/N charakterisierte Gen FcHyd5 kodiert für ein Hydrophobin der Klasse 2.

Das Ziel der im Verlauf des vorliegenden Berichtes beschriebenen Arbeiten war daher die heterologe Expression von LTP1 aus Weizen sowie des Hydrophobins FcHyd5p. Die Bildung der Proteine sollte dabei sowohl durch *E. coli* als auch durch die Hefe *S. cerevisiae* erfolgen. Beide Expressionssysteme unterscheiden sich durch ihr Verhalten bei der Prozessierung von Proteinen nach der Translation, denn Glykosylierung, Faltung und Transmembrantransport verlaufen in beiden Systemen nicht in der gleichen Weise. Da es sich sowohl bei LTP1 als auch bei FcHyd5p um eukaryontische Proteine handelt, war die Wahl eines eukaryontischen Expressionssystems wie es *S. cerevisiae* darstellt, besonders wichtig für die Herstellung eines dem natürlichen Vorbild in Struktur und Funktion möglichst ähnlichen Proteins. Ein weiterer Vorteil von *S. cerevisiae* als Expressionssystem gegenüber *E. coli* war die Tatsache, dass die Hefe für die Durchführung von Brauversuchen verwendet werden kann. Hierdurch sollte es möglich sein, die Proteine heterolog während der Gärung zu exprimieren und sie so quasi auf natürlichem Wege in das Bier einzubringen. Damit sollten die Proteine zumindest teilweise den Bedingungen unterliegen, denen sie bei der Bierherstellung tatsächlich ausgesetzt sind.

Die unter 3.1 und 3.2 beschriebenen Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten zeigen, dass sowohl das Gen für LTP1 aus Weizen (LTP1500) als auch das für das

Hydrophobin FcHyd5p kodierende Gen (FcHyd5) erfolgreich in *E. coli* und in *S. cerevisiae* kloniert werden konnte. Darüber hinaus gelang zusätzlich die Klonierung des für das Klasse 1 Hydrophobin FcHyd3p kodierenden Gens (FcHyd3) in beiden Organismen. Dabei wurde für die Klonierung der beiden Hydrophobingene eine Strategie gewählt, bei der die zu übertragenden Gene *in vitro* synthetisiert wurden. Die gewählte Strategie hatte für die hier durchgeführten Arbeiten zwei Vorteile: 1. eine exprimierbare Version des Gens musste nicht durch zeit- und materialaufwändige Klonierung von cDNA erzeugt werden und 2. die ursprüngliche Gensequenz konnte vor der Synthese so bearbeitet werden, dass sie im Empfänger leichter „verstanden“ wird und bei der Translation so in eine Aminosäuresequenz umgesetzt wird, dass am Schluss eine möglichst genaue Kopie des durch den Spenderorganismus gebildeten Proteins entsteht. Darüber hinaus konnte bei der Gensynthese die Sequenz um bestimmte Teile, wie etwa Restriktionsschnittstellen, ergänzt werden, die eine einfachere Prozessierung in späteren Klonierungsschritten ermöglichen.

Untersuchungen zur Expression der klonierten Gene ergaben, dass sowohl der *E. coli* Klon 950 als auch fünf Klone von *S. cerevisiae* das LTP1 Protein aus Weizen in Flüssigkulturen exprimieren. Dabei konnte das Protein in *E. coli* nur nach Zellaufschluss nachgewiesen werden, da das Protein von den Zellen nicht in das Medium abgegeben werden kann. Die fünf erwähnten Klone von *S. cerevisiae*, die mit dem Vektor pYX242-LTP1500 transformiert worden waren, produzierten das Protein im Kulturüberstand. Der Nachweis des Proteins gelang in allen Fällen durch Verwendung eines für LTP1 aus Weizen spezifischen Antikörpers, der im Rahmen des Projektes AiF 13468 durch den Lehrstuhl für Phytopathologie entwickelt worden war. Die Tatsache, dass für den in Abb. 6 gezeigten Nachweis von transgenem Weizen-LTP1 eine Aufkonzentrierung des Kulturüberstandes um den Faktor 20 nötig war und das Signal dennoch relativ schwach war, lässt auf die Produktion von nur geringen Mengen des Proteins durch die Zellen schließen. Zur Erhöhung der Produktivität sind weitere Untersuchungen notwendig, die eine Optimierung der Kulturbedingungen zum Ziel haben. Eine Reinigung des Proteins über eine Immunoaffinitätssäule, die mit dem genannten anti-LTP1 Antikörper im Rahmen der Arbeiten hergestellt wurde, gelang bisher nicht. Auch hier könnte jedoch durch die Optimierung der Versuchbedingungen eventuell eine Verbesserung erreicht werden.

Die Expression der beiden Hydrophobine FcHyd5p und FcHyd3p konnte im Rahmen der durchgeführten Arbeiten bisher nicht direkt nachgewiesen werden. Sicher ist jedoch, dass die Gene jeweils in mehreren *S. cerevisiae* Klonen vorhanden sind, die alle für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Eine Expression der beiden Hydrophobine in *E. coli* wurde im Rahmen der Untersuchungen nicht angestrebt, da dies die Übertragung der Gene in einen zusätzlichen Vektor bedeutet hätte, der in *E. coli* exprimiert wird. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen wurde dieser Organismus lediglich für die Vermehrung und Sicherung von

Shuttlevektoren verwendet, die für die Transformation von *S. cerevisiae* vorgesehen waren.

Insgesamt haben die vorliegenden Ergebnisse gezeigt, dass eine Übertragung von Genen, die für Gushing-relevante Proteine kodieren, in *E. coli* und *S. cerevisiae* möglich ist. Mit der hier angewendeten experimentellen Strategie konnte damit der „Proof of Principle“ erreicht werden. Die Produktion größerer Mengen der durch die übertragenen Gene kodierten Proteine, also LTP1 aus Weizen, FcHyd3p und FcHyd5p, durch die hergestellten Transformanten konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeiten noch nicht gezeigt werden. Lediglich für LTP1 war der Nachweis geringer Mengen in den transgenen *E. coli* Zellen möglich. Die gebildeten Mengen waren allerdings so gering, dass eine Isolierung nicht lohnenswert erschien. Das Gleiche gilt für die mit dem selben Gen transformierten *S. cerevisiae* Klone, die LTP1 aus Weizen in das Medium ausschieden. In Anbetracht der geringen Mengen erscheint die Gewinnung aus Weizen hier eher sinnvoll zu sein, da die Reinigung und Isolierung für diese Matrix bereits optimiert wurde.

Die Bildung der beiden klonierten Hydrophobine FcHyc3p und FcHyd5p konnte im Rahmen der Untersuchungen nicht durch Isolierung der Proteine aus den Kulturüberständen belegt werden. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass die gebildeten Mengen zu gering für einen Nachweis auf einem SDS-PAGE Gel waren. Auch stehen für diese Proteine noch keine Antikörper zu Verfügung, mit denen eine spezifischer und sensitiver Nachweis über Western-Blott möglich gewesen wäre. Einen indirekten Hinweis auf die tatsächliche Expression der klonierten Gene gaben jedoch die im Rahmen der Arbeiten mit den transformierten *S. cerevisiae* Klonen durchgeführten Gärversuche. Hier kam die Tatsache, dass diese Hefe als Expressionssystem gewählt wurde, besonders vorteilhaft zum Tragen. Gegenüber anderen Systemen, insbesondere *Pichia pastoris*, hat sie den Vorteil, dass es sich hier um eine Brauhefe handelt. Damit besteht die Möglichkeit, transgene Proteine während der Gärung zu produzieren und ihren Einfluss auf die Schaumbildung und Schaumstabilität direkt im Bier zu untersuchen. Eine Beurteilung der Auswirkung von Modifikationen der Protein, wie sie im Brauprozess etwa durch die Würzkochung zu erwarten sind, können mit dem hier gewählten Ansatz jedoch nicht untersucht werden. Dazu hätte es des gereinigten Proteins in größeren Mengen bedurft.

Die im Rahmen des vorliegenden Projektes B89 durchgeführten Gärversuche erbrachten dennoch sehr interessante Ergebnisse, die den weiteren Verlauf der Arbeiten in anderen Projekten beeinflussen werden. Es konnte gezeigt werden, dass nur die mit dem Hefeklon 858 vergorene Würze im abgefüllten Bier zum Überschäumen führte. Weder der LTP1 aus Weizen produzierende Klon 961 noch der mit dem Gen für das Klasse 1 Hydrophobin FcHyd3p transformierte Klon 1064 führten zu Bieren mit signifikanten Überschäumvolumina. Die hier gemachten Beobachtungen werden durch Ergebnisse von Sarlin *et al.* (2005) bestätigt. Diese Autoren berichten, dass Gushing auslösende Hydrophobine aus *Trichoderma reesei*,

Fusarium poae und *Nigrospora* sp., alle der Klasse 2 dieser Proteingruppe angehörten. Ob die durch die Autoren beschriebenen Hydrophobine jedoch in der Praxis relevant sind, ist schwer zu beurteilen, da lediglich *F. poae* gelegentlich auf Braugetreide in größeren Mengen auftritt. Die in dem vorliegenden Projekt B89 bearbeiteten Hydrophobine von *F. culmorum* und *F. graminearum* dürften nach den bisher bekannten Fakten über den Zusammenhang von Pilzbefall und Gushing eine deutlich höhere Relevanz besitzen. Insgesamt zeigten die Ergebnisse der unter B89 durchgeführten Brauversuche jedoch, dass FcHyd5p einen deutlichen Einfluss auf das Gushing hat. Daher sollten sich weitere Untersuchungen neben anderen Aspekten, auf dieses Protein konzentrieren.

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass die für das Projekt gesetzten Ziele erreicht wurden. Mit den hergestellten Klonen ist die Grundlage für weiterführende Arbeiten zur Gushing-Thematik vorhanden. Brauversuche mit diesen Klonen haben gezeigt, dass sich weitere Arbeiten unter anderem auf die Rolle von FcHyd5p bei der Gushing-Auslösung konzentrieren sollten.

5 Wirtschaftliche Bedeutung für kleine und mittlere Unternehmen

Eine Umfrage aus dem Jahre 1999 unter 162 deutschen Brauereien zeigte, dass in den letzten zehn Jahren 54 % der befragten Betriebe mindestens einmal von Gushing betroffen waren. Dabei waren insbesondere Weizenbiere anfällig. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle (>45 %) gaben die Brauereien das Malz als Ursache für die aufgetretenen Probleme an. Als Konsequenz ließen über 50 % dieser Brauereien regelmäßig ihr Malz auf sein Gushing-Potenzial untersuchen und verschnitten ihre Malze mit unbeanstandeter Ware.

Die Kosten, die deutschen Brauereien, aber auch den betroffenen Mälzereien und ihnen zuliefernden Landwirten durch die notwendigen Maßnahmen entstehen, können nur sehr schwer beziffert werden, da darüber keine repräsentativen Zahlen vorliegen. Neben den direkten Kosten des Gushing, die durch Maßnahmen zur Qualitätssicherung bzw. Rücknahme und Entsorgung unverkäuflichen Bieres entstehen, bringt vor allem der Imageverlust bei der Kundschaft im Fall des Auftretens von Gushing oftmals gravierende wirtschaftliche Nachteile für die betroffenen Betriebe. Legt man weiterhin zugrunde, dass die deutsche Brauwirtschaft über ihre Verbände bereits seit mehr als fünfzehn Jahren regelmäßig erhebliche Beträge für Projekte zur Erforschung des Gushing und der mit dem Schimmelpilzbefall verbundenen Qualitätseinbußen aufwendet, so kann die Dringlichkeit einer abschließenden Lösung des Problems ermessen werden.

Von größtem wirtschaftlichem Interesse für die durch Gushing geschädigten Betriebe ist natürlich die Beantwortung der Frage, ob man gegen das primäre

Gushing etwas ausrichten kann, wenn ein Schimmelpilzbefall stattgefunden hat. Die Erfahrung, dass mit einem *Fusarium*-infizierten Malz nicht in jeder Brauerei Gushing auftritt und auch seine Ausprägung mit dem selben Malz in verschiedenen Brauereien unterschiedlich intensiv sein kann, lässt eine Beeinflussung des Verhaltens Gushing-induzierender Faktoren im Bier durch physikalische, chemische und technische Parameter vermuten. Die bisher im Rahmen des mittlerweile abgeschlossenen Projektes AiF 13468/N erhaltenen Ergebnisse belegen, dass es bei oberflächenaktiven Proteinen aus Gushing-relevanten *Fusarium*-Arten durch brautechnische Prozesse zu Modifikationen kommt, die den beobachteten Effekt verstärken können. Auch die festgestellten Veränderungen hinsichtlich des Proteinspektrums von Gushing-Bieren gegenüber unbeanstandeten Bieren kann ein Ansatzpunkt für ein besseres Verständnis und damit für eine mögliche Lösung der Probleme sein. Die dabei zugrunde liegenden Zusammenhänge sind bislang jedoch erst teilweise verstanden worden. Die wirtschaftliche Bedeutung des geplanten Projektes für die Unternehmen muss daher längerfristig gesehen werden. Der zu erwartende Effekt sollte jedoch infolge der resultierenden Qualitätsverbesserung der Produkte erheblich sein.

Mit den Ergebnissen der im Rahme des vorliegenden Projektes B89 durchgeführten Arbeiten ist man der Lösung des Problems Gushing insofern wiederum ein Stück näher gekommen, als dass nunmehr Proteine, die mit der Auslösung von Gushing in Verbindung gebracht werden, transgen hergestellt werden können. Dies wird in entscheidender Weise die weiteren Arbeiten zu Thema erleichtern und vereinfachen.

6. Umsetzung der Forschungsergebnisse

Die im Rahmen der durchgeführten Arbeiten erhaltenen Ergebnisse sowie die mit den verschiedenen Gushing-relevanten Genen transformierten Hefeklone stehen für eine Nutzung in weiteren Arbeiten zum Thema Gushing zur Verfügung. Eine Weiterführung der Arbeiten erfolgt in dem kürzlich genehmigten und bereits begonnenen Projekt AiF 14551/N, welches als Fortsetzung des AiF 13468/N konzipiert ist. Auf diese Weise ist sicher gestellt, dass die nunmehr erhaltenen Ergebnisse direkt in die weitere Forschung einfließen. Das Ziel dieser Arbeiten ist es, die stofflichen, physikalischen und technologischen Zusammenhänge zu verstehen, die zum Übersäumen von Bieren führen und auf der Grundlage dieses Wissens Strategien für eine Verhinderung seines Auftretens zu entwickeln. Eine wichtige Maßnahme wird dabei die Entwicklung von Verfahren sein, mit deren Hilfe der Beitrag der verwendeten Rohstoffe zum Gushing ermittelt werden kann. Nach den bisherigen Erkenntnissen scheinen dabei die im vorliegenden Projekt klonierten Proteine eine Rolle zu spielen. Mit den nunmehr in *S. cerevisiae* und *E. coli* klonierten Genen stehen Systeme zu Verfügung, mit deren Hilfe die betreffenden Proteine hergestellt werden können. Dieser Schritt ist entscheidend für die Entwicklung von Antiseren zu ihrem Nachweis in Getreide, Malz und Bier. Die Anwendung der erzeugten Klone für die Gewinnung von Antiseren stellt daher eine optimale Umsetzung der erhaltenen Ergebnisse in eine praktische Anwendung dar.

Zur Verbreitung der Ergebnisse aus dem vorliegenden Projekt B89 wurde ein Manuskript an Journal of the Institute of Brewing eingereicht, welches zur Zeit fachlich begutachtet wird. Darüber hinaus werden Teile der Ergebnisse im Rahmen eines Vortrages auf dem 9. Internationalen Fusarium Seminar in Wageningen (Niederlande) der wissenschaftlichen Öffentlichkeit vorgestellt. Die Einreichung eines Beitrages als Vortrag oder Poster für den in 2007 in Venedig stattfindenden EBC Kongress ist geplant. Ebenso sollen Ergebnisse aus diesem Projekt bei dem Anfang 2007 in Freising stattfindenden Brautechnologischen Seminar vorgestellt werden. Eine Zusammenfassung der Projektergebnisse wird zudem zeitnah in der Brauwelt veröffentlicht. In dieser Zusammenfassung wird ein Hinweis auf die Abrufbarkeit dieses Abschlussberichtes über die Internetseite der WiFö zu finden sein.

Folgende Publikationen wurden im Zusammenhang mit den aus dem Projekt AiF 13468 sowie dem vorliegenden Projekt B89 erhaltenen Ergebnissen veröffentlicht:

Zapf, M.W., Theisen, S., Vogel, R.F., Hecht, D., Elstner, E.F., Niessen, L. Characterization of surface active proteins from *Fusarium* and grain affecting foam stability. In: *Proceedings of the 30th EBC Congress*, Prag, Mai 2005

Niessen, L., Hecht, D., Zapf, M., Theisen, S., Vogel, R.F., Elstner, E., Hippeli, S. (2006) Zur Rolle oberflächenaktiver Proteine von Pflanzen und Pilzen bei der Entstehung des Gushings sowie zu den Möglichkeiten ihrer Beeinflussung. *Brauwelt*, **146**(19-20): 570-572

Zapf, M.W. Charakterisierung oberflächenaktiver Proteine aus *Fusarium* spp. und deren Einfluss auf die Blasenbildung in Bier. Dissertation, Technische Universität München, 189 pp.

Zapf, M.W., Theisen, S., Rohde, S., Rabenstein, F., Vogel, R.F., Niessen, L. Characterization of AfpA, an alkaline foam protein from cultures of *Fusarium culmorum* and its identification in infected malt. *Journal of Applied Microbiology*, **under revision**.

Zapf, M.W., Theisen, S., Vogel, R.F., Niessen, L. Cloning of wheat LTP1500 and two *Fusarium culmorum* hydrophobins in *Saccharomyces cerevisiae* and assessment of their gushing inducing potential in experimental wort fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, **accepted**.

Zapf, M.W., Vogel, R.F., Niessen, L. Surface hydrophobicity measurement as a tool in malting and brewing - a mini-review. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, **accepted**.

7 Gewerbliche Schutzrechte

Im Zusammenhang mit den in Projekt B89 erhaltenen Ergebnissen wurden keine gewerblichen Schutzrechte beantragt oder erteilt.

8 Schlagwörter

Gushing, Wildwerden, Weizen, non specific lipid transfer protein, LTP1, LTP1500, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Hydrophobin, Klonierung, heterologe Expression

9 Bibliographische Daten

9.1 Projektgeber: Wissenschaftsförderung der Deutschen
Brauwirtschaft e.V.
Neustädtische Kirchstraße 7a

10117 Berlin

9.2 Forschungsstelle: Technische Universität München
Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie
Weihenstephaner Steig 16

85350 Freising

9.3 Leiter der Forschungsstelle: Prof. Dr. Rudi F. Vogel

9.4 Projektleiter: PD Dr. rer. nat. Ludwig Niessen

10 Literatur

Fuchs, U., Czymmek, K.J., Sweigard, J.A. (2004). Five hydrophobin genes in *Fusarium verticilloides* include two required for microconidial chain formation. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 852-864

Kleemola, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttillä, M., Kotaviita, E., Olkku, J., Heikara, A. (2001). Characterization of the gushing factors produced by fungi. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, Budapest. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg

Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttillä, M., Heikara, A. (2005). Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(2): 105-111.

Simmonds, J., Cass, L., Harris, L., Allard, S. (2000). Wheat aleurone regulatory elements. United States Patent 6,013,862. Eingereicht durch Agri-Food Canada 22.07.1998, erteilt 11.01.2000