

Herstellung und Charakterisierung einer rekombinanten, sequenzspezifischen Protease zur Generierung bioaktiver Peptide

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie
Lehrstuhl Biotechnologie

vorgelegt von
Thomas Hug

aus Leonberg
2009

Dekan: Prof. Dr. *rer. nat.* Heinz Breer
1. Berichtende Person: Prof. Dr. *rer. nat.* Lutz Fischer
2. Berichtende Person: Prof. Dr. *rer. nat.* Andreas Kuhn
Angenommen am: 16.04.2010
Mündliche Prüfung am: 04.05.2010

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Stuttgart, den

Thomas Hug

für Jonas

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Betreuers in folgenden Publikationsmanuskripten vorab dargestellt:

Hug, T., Lutz-Wahl, S. und Fischer, L. Characterization of recombinant lysyl endopeptidase from *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes*.

Hug, T., Lutz-Wahl, S. und Fischer, L. Fermentation of recombinant lysyl endopeptidase from *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* in *E. coli* host cells and pro-peptide assisted *in vitro* renaturation.

Danksagung

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. **Lutz Fischer**, Leiter des Lehrstuhls Biotechnologie an der Universität Hohenheim, für das Überlassen des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die zahlreichen konstruktiven Besprechungen und Diskussionen, welche maßgeblich für den Fortschritt dieser Arbeit waren. Prof. Dr. **Andreas Kuhn** danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Dr. **Sabine Lutz-Wahl** für die sehr gute und engagierte praktische Betreuung meiner Arbeit, das Korrekturlesen und Ihre unentbehrlichen Tipps und Hinweise im Laboralltag.

Bei Dipl.-Ing (FH) **Wolfgang Claassen** bedanke ich mich für die kompetente Hilfe bei allen technischen und computerbezogenen Fragen sowie seine Unterstützung bei den Bioreaktorfermentationen.

Frau Dipl.-Ing. (FH) **Anja Manns** danke ich für die Hilfe bei allen bioanalytischen Fragen und Problemen.

Vielen Dank an Frau **Susanne Herr** für ihre fachkundige Unterstützung bei vielen mikrobiologischen Fragestellungen und an Herrn Dipl.-LM-Ing. **Thomas Eisele** sowie Herrn Dipl.-LM-Ing. **Timo Stressler** für ihre Hilfe bezüglich HPLC und Bioaktivitäts-Assays.

Vielen Dank an Frau **Iris Klaiber** (Life Science Center, Universität Hohenheim) für die sehr schöne und hilfreiche Auswertung der MS-Ergebnisse.

Bei Dr. **Frank Niehaus** (BRAIN AG) möchte ich mich für die kompetenten Hinweise und Diskussionen zum Thema Proteasen im Rahmen des BMBF-Projekts bedanken.

Prof. Dr. **Vincent Eijsink** und Dr. **Lars Axelsson** (Matforsk) danke ich für das freundliche Überlassen der Komponenten des verwendeten *Lactobacillus*-Expressionssystems.

Dem **Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)** danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen **Eltern** und **Freunden** für die finanzielle und persönliche Unterstützung während meiner Promotion.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Proteinspaltende Enzyme | 1 |
| 1.1.1 | Klassifizierung von proteinspaltenden Enzymen | 1 |
| 1.1.2 | Serin-Proteasen | 3 |
| 1.1.3 | Proteasen in der Lebensmitteltechnologie | 4 |
| 1.1.4 | Lysyl-Endopeptidase aus <i>Lysobacter enzymogenes</i> | 5 |
| 1.2 | Funktionelle Lebensmittel und bioaktive Peptide | 6 |
| 1.2.1 | Definition „Functional Food“ | 6 |
| 1.2.2 | Beispiele für funktionelle Peptide | 7 |
| 1.2.3 | Aufnahme funktioneller Peptide über die intestinalen Epithelien | 8 |
| 1.3 | Zielsetzung | 10 |
| 2 | Material und Methoden | 11 |
| 2.1 | Geräte | 11 |
| 2.2 | Chemikalien | 12 |
| 2.3 | Enzyme | 13 |
| 2.4 | Synthetisierte Nucleotidsequenzen | 14 |
| 2.4.1 | Gene | 14 |
| 2.4.2 | DNA-Primer | 14 |
| 2.5 | Mikroorganismen und Plasmide | 15 |
| 2.6 | Kulturmedien | 16 |
| 2.7 | Stammhaltung und –kultivierung | 19 |
| 2.7.1 | Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> | 19 |
| 2.7.2 | Kultivierung von <i>Lactobacillus sp.</i> | 20 |
| 2.7.3 | Kultivierung von <i>Xanthomonas campestris</i> | 20 |
| 2.7.4 | Kultivierung von <i>Lysobacter enzymogenes</i> | 21 |
| 2.8 | Molekularbiologische Methoden | 21 |
| 2.8.1 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 21 |
| 2.8.2 | Isolierung von Plamid-DNA aus <i>Lactobacillus sp.</i> | 21 |
| 2.8.3 | Isolierung von genomischer DNA aus <i>Lysobacter enzymogenes</i> | 22 |
| 2.8.4 | Extraktion von DNA aus Agarosegelen | 22 |
| 2.8.5 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von <i>lysC</i> und <i>Npro-lysC</i> | 22 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.8.6 | Ortsspezifische Mutagenese von <i>lac4</i> | 24 |
| 2.8.7 | Herstellung und Transformation hitzekompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 25 |
| 2.8.8 | Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>Lactobacillus</i> sp. Zellen | 27 |
| 2.8.9 | Restriktionsspaltung von DNA..... | 27 |
| 2.8.10 | Vektor-Dephosphorylierung..... | 28 |
| 2.8.11 | Ligation..... | 28 |
| 2.8.12 | DNA-Sequenzierung | 29 |
| 2.9 | Elektrophorese | 31 |
| 2.9.1 | Agarose-Gelelektrophorese | 31 |
| 2.9.2 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) | 32 |
| 2.10 | Bestimmung von Wachstumsparametern und Proteinkonzentration..... | 36 |
| 2.10.1 | Proteinbestimmung | 36 |
| 2.10.2 | Bestimmung der Glucosekonzentration | 36 |
| 2.10.3 | Messung der optischen Dichte | 37 |
| 2.10.4 | Bestimmung der Biotrockenmasse..... | 37 |
| 2.11 | Enzymassays | 38 |
| 2.11.1 | Bestimmung der Protease-Aktivität mit chromogenen Peptid-Substraten | 38 |
| 2.11.2 | Bestimmung der Protease-Aktivität mittels Ninhydrin-Reaktion | 39 |
| 2.11.3 | Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität | 41 |
| 2.12 | Kultivierung von <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> zur Bildung der Protease PRT1 (nach Dow et al., 1990)..... | 43 |
| 2.12.1 | Schüttelkolbenkultivierung von <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 43 |
| 2.12.2 | Aufarbeitung des proteasehaltigen Kulturüberstandes..... | 43 |
| 2.12.3 | Untersuchung der Substratspezifität von PRT1 | 44 |
| 2.13 | Herstellung rekombinanter Lysyl-Endopeptidase LysC mit <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC..... | 44 |
| 2.13.1 | Schüttelkolbenkultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC | 44 |
| 2.13.2 | Bioreaktorkultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC... | 45 |
| 2.14 | Herstellung rekombinanter LysC-Propeptide mit <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET20b- Npro-LysC bzw. pET20b-Cpro-LysC | 46 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.15 | Bioreaktorkultivierung von <i>Lysobacter enzymogenes</i> ssp. <i>enzymogenes</i> zur Bestimmung der LysC-Aktivität | 46 |
| 2.16 | Herstellung rekombinanter β -Galactosidase Lac4 in <i>Lactobacillus plantarum</i> NC8 | 47 |
| 2.17 | Zellaufschluss..... | 47 |
| 2.17.1 | Aufschluss von <i>E. coli</i> | 47 |
| 2.17.2 | Aufschluss von <i>Lactobacillus</i> sp..... | 48 |
| 2.18 | Aufarbeitung von <i>E. coli</i> „Inclusion Bodies“ | 48 |
| 2.18.1 | Solubilisierung der LysC „Inclusion Bodies“ und Protease-Renaturierung | 48 |
| 2.18.2 | Aufarbeitung der als „Inclusion Bodies“ gebildeten LysC-Propeptide.. | 51 |
| 2.18.3 | Renaturierung von LysC mit C- bzw. N-terminalem Propeptid als Faltungshilfe..... | 51 |
| 2.19 | Charakterisierung der rekombinanten Lysyl-Endopeptidase LysC | 52 |
| 2.19.1 | Bestimmung der Substratspezifität von LysC..... | 52 |
| 2.19.2 | Bestimmung des pH-Optimums von LysC | 52 |
| 2.19.3 | Bestimmung des Temperatur-Optimums von LysC..... | 53 |
| 2.19.4 | Bestimmung der pH-Stabilität von LysC..... | 53 |
| 2.19.5 | Bestimmung der Temperatur-Stabilität von LysC..... | 53 |
| 2.19.6 | Einfluss von Inhibitoren, Lösungsmittel und Ionen auf die LysC-Aktivität | 54 |
| 2.20 | Casein-Hydrolyse zur Generierung funktioneller Peptide..... | 55 |
| 2.20.1 | Casein-Hydrolyse mit Lysyl-Endopeptidase LysC | 55 |
| 2.20.2 | HPLC-Analyse des Casein-Hydrolysats..... | 55 |
| 2.20.3 | Massenspektrometrische Analyse des Casein-Hydrolysats | 57 |
| 2.21 | Assays zum Nachweis bioaktiver Eigenschaften des Casein-Hydrolysats. | 58 |
| 2.21.1 | Bestimmung von antioxidativer Wirksamkeit (Radikalfänger-Aktivität) | 58 |
| 2.21.2 | Bestimmung von Lipoxygenase-Inhibierung..... | 59 |
| 2.21.3 | Bestimmung von ACE-Inhibierung | 60 |
| 3 | Ergebnisse | 62 |
| 3.1 | Untersuchung der Substratspezifität von PRT1 aus <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> | 62 |
| 3.1.1 | Schüttelkolbenkultivierung von <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> und Aufarbeitung des Überstandes..... | 63 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.1.2 | Umsatz verschiedener Modellsubstrate mit PRT1 | 63 |
| 3.2 | Bioreaktor-Kultivierung von <i>Lysobacter enzymogenes</i> ssp. <i>enzymogenes</i> ATCC 27796..... | 64 |
| 3.3 | Klonierung des LysC-Gens aus <i>Lysobacter enzymogenes</i> ssp. <i>enzymogenes</i> und heterologe Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 66 |
| 3.3.1 | Konstruktion des Expressionsvektors pET20b-LysC..... | 67 |
| 3.3.2 | Schüttelkolben-Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET20b-LysC..... | 70 |
| 3.4 | Klonierung und Expression des MGSK-LysC Genkonstrukts in <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 70 |
| 3.4.1 | Konstruktion des Expressionsvektors pET20b-MGSK-LysC | 71 |
| 3.4.2 | Schüttelkolben-Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3)-MGSK-LysC..... | 73 |
| 3.4.3 | Solubilisierung der LysC „Inclusion Bodies“ und Renaturierung mit L-Arginin als Faltungshilfe | 74 |
| 3.4.4 | Bioreaktor-Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 DE3 pET20b-MGSK-LysC... | 76 |
| 3.5 | <i>In vitro</i> Renaturierung der Lysyl-Endopeptidase LysC unter Verwendung von N- und C-terminalem Propeptid als Faltungshilfe | 78 |
| 3.5.1 | Aufklärung der DNA-Prosequenzen von LysC | 78 |
| 3.5.2 | Konstruktion der Expressionsvektoren pET20b-Npro-LysC und pET20b-Cpro-LysC | 81 |
| 3.5.3 | Herstellung der rekombinanten LysC-Propeptide in <i>E. coli</i> BL21(DE3)85 | |
| 3.5.4 | Renaturierung von rekombinatem LysC mit N- und C-terminalem Propeptid als Faltungshilfe | 86 |
| 3.6 | Klonierung und Expression des MGSK-LysC Genkonstrukts in <i>Lactobacillus plantarum</i> NC8 und <i>Lactobacillus sakei</i> Lb790 | 88 |
| 3.6.1 | Konstruktion des <i>Lactobacillus</i> -Expressionsvektors pSIP409-MGSK-LysC | 89 |
| 3.6.2 | Heterologe Expression von <i>MGSK-lysC</i> in <i>Lactobacillus plantarum</i> NC8 und <i>L. sakei</i> Lb790..... | 89 |
| 3.7 | Untersuchung des Einflusses des tcc-Codons auf die heterologe Genexpression in <i>Lactobacillus plantarum</i> NC8..... | 91 |
| 3.7.1 | Mutagenese des β -Galactosidasegens <i>lac4</i> aus <i>Kluyveromyces lactis</i> .. | 92 |
| 3.7.2 | Heterologe Expression von <i>lac4.mut1</i> , <i>lac4.mut2</i> und <i>lac4.mut3</i> in <i>L. plantarum</i> NC8 | 92 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.8 | Charakterisierung der rekombinanten Lysyl-Endopeptidase LysC aus <i>Lysobacter enzymogenes</i> ssp. <i>enzymogenes</i> | 94 |
| 3.8.1 | Substratspezifität von LysC..... | 94 |
| 3.8.2 | pH-Optimum von LysC..... | 95 |
| 3.8.3 | pH-Stabilität von LysC..... | 97 |
| 3.8.4 | Temperatur-Optimum von LysC..... | 97 |
| 3.8.5 | Temperatur-Stabilität von LysC..... | 98 |
| 3.8.6 | Einfluss von Ionen, Lösungsmitteln und Inhibitoren auf LysC..... | 100 |
| 3.8.7 | Native PAGE mit LysC-Aktivfärbung..... | 101 |
| 3.9 | Casein-Hydrolyse mittels LysC zur Generierung funktioneller Peptide | 103 |
| 3.9.1 | Hydrolyse von bovinem Casein (nach Schopp, 2008)..... | 103 |
| 3.9.2 | HPLC-Chromatogramm des Caseinhydrolysats..... | 104 |
| 3.9.3 | Identifizierung bioaktiver Peptide mittels LC-ESI-MS/MS..... | 106 |
| 3.10 | <i>In vitro</i> Assays zur Bestimmung bioaktiver Eigenschaften des Casein-Hydrolysats..... | 110 |
| 3.10.1 | Bestimmung der antioxidativen (Radikalfänger-) Aktivität..... | 111 |
| 3.10.2 | Messung der Lipoxygenase-Inhibierung..... | 111 |
| 3.10.3 | Messung der ACE-Inhibierung..... | 112 |
| 4 | Diskussion | 114 |
| 4.1 | Auswahl einer sequenzspezifischen Protease..... | 114 |
| 4.2 | Herstellung und Charakterisierung von LysC aus <i>Lysobacter enzymogenes</i> ssp. <i>enzymogenes</i> | 115 |
| 4.3 | <i>Lactobacillus</i> als „Food-grade“ Expressionswirt..... | 122 |
| 4.4 | Hydrolyse von bovinem Casein mit LysC..... | 125 |
| 5 | Zusammenfassung | 131 |
| 6. | Abkürzungsverzeichnis | 135 |
| 7 | Literatur | 138 |
| 8 | Anhang | 151 |
| 8.1 | MGSK-LysC..... | 151 |
| 8.2 | MS/MS-Spektren der funktionellen Peptide des Casein-hydrolysats..... | 152 |
| 8.3 | Kalibriergeraden..... | 153 |
| 8.4 | Cpro-lysC (mit für <i>E. coli</i> optimierter „Codon-Usage“)..... | 156 |
| 8.5 | Bovines Casein (mit markierten LysC-Schnittstellen)..... | 157 |
| 8.6 | Verifizierung der <i>lac4</i> -Mutagenesen mittels DNA-Sequenzierung..... | 158 |

1 Einleitung

1.1 Proteinspaltende Enzyme

1.1.1 Klassifizierung von proteinspaltenden Enzymen

Enzyme aus der Gruppe der Hydrolasen, welche die Spaltung von Peptidbindungen katalysieren, werden als Peptidasen (auch Proteasen oder Proteinasen) bezeichnet. Peptidasen sind ubiquitär und erfüllen unterschiedliche, essentielle Aufgaben. Diese umfassen u.a. den zellulären Abbau nicht mehr benötigter Proteine (Proteasom), die Initiation und Ausführung der Apoptose und deren Signalkaskaden (Caspasen), Verdauung von Nahrungsproteinen (Trypsin, Pepsin, Chymotrypsin), Prozessierung anderer Enzyme (Signalpeptidasen) sowie die Lyse von Mikroorganismen (α -lytische Protease).

Die gemeinsame physiologische Bedeutung aller durch proteolytische Enzyme katalysierter Reaktionen besteht darin, Proteine zu Peptiden und freien Aminosäuren abzubauen. Diese können so als Nahrung verwertet und für Stoffwechsel und Biosynthesen erneut nutzbar gemacht werden (Ruttloff, 1993). In Abbildung 1.1 ist die Reaktionsgleichung der hydrolytischen Spaltung einer Peptidbindung dargestellt.

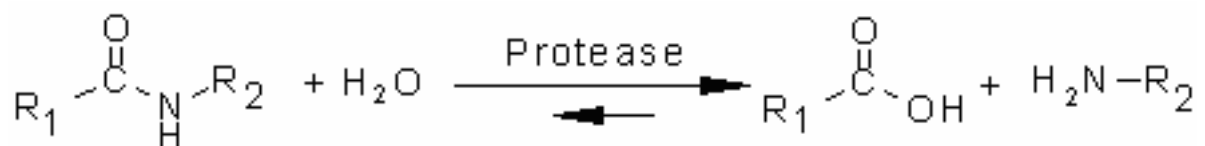


Abbildung 1.1: Reaktionsgleichung der proteolytischen Spaltung einer Peptidbindung (modifiziert nach Ruttloff, 1993).

Die Einteilung der proteolytischen Enzyme erfolgt zum Einen in Abhängigkeit von der Position der hydrolysierbaren Peptidbindungen in Exopeptidasen (EC 3.4.11-19) und Endopeptidasen (EC 3.4.21-25 und 3.4.99). Während Exopeptidasen Proteine unter Abspaltung von Dipeptiden oder Aminosäuren von einem Ende her hydrolysieren (Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen), spalten Endopeptidasen nichtterminale

Einleitung

Peptidbindungen. Zum Anderen werden proteolytische Enzyme nach dem Reaktionsmechanismus bzw. den Aminosäuren ihres aktiven Zentrums in Threonin-, Serin-, Cystein-, Metallo- und Asparaginsäure-Peptidasen unterteilt (Belitz et al., 2001). Dabei wurden folgende Peptidase-Unterklassen mit den zugehörigen EC-Nummern festgelegt: Aminopeptidasen (3.4.11), Dipeptidasen (3.4.13), Dipeptidyl-Peptidasen (3.4.14), Peptidyl-Dipeptidasen (3.4.15), Serin-Carboxypeptidasen (3.4.16), Metallo-Carboxypeptidasen (3.4.17), Cystein-Carboxypeptidasen (3.4.18), Omegapeptidasen (3.4.19), Serin-Endopeptidasen (3.4.21), Cystein-Endopeptidasen (3.4.22), Aspartat-Endopeptidasen (3.4.23), Metallo-Endopeptidasen (3.4.24), Threonin-Endopeptidasen (3.4.25), sonstige Endopeptidasen (3.4.99).

Abbildung 1.2 gibt eine Übersicht über die von den verschiedenen Peptidase-Unterklassen katalysierten Reaktionen.

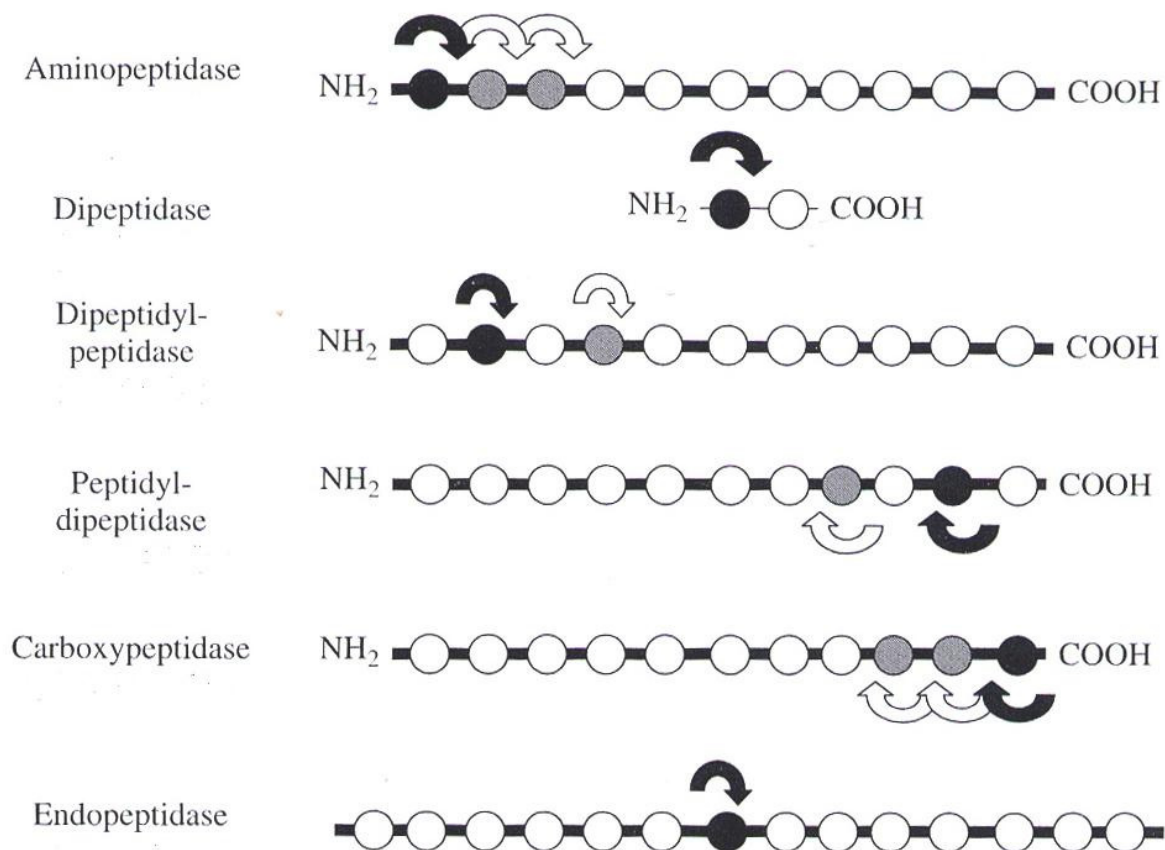
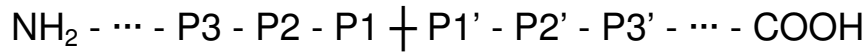


Abbildung 1.2: Peptidase-Klassifizierung nach den katalysierten Reaktionen (modifiziert nach Rawlings et al., 2007). Aminosäuren sind als Kreise dargestellt, Peptidaschnittstellen als Pfeile. Die jeweils zuerst hydrolysierte Peptidbindung bzw. die für die Spezifität entscheidende Aminosäure ist schwarz dargestellt, alle weiteren weiß bzw. grau.

Einleitung

Schechter und Berger (1967) führten erstmals eine einheitliche Nomenklatur für die Aminosäurepositionen von Proteasesubstraten in Bezug auf die zu hydrolysierende Peptidbindung ein:



Dabei werden alle Aminosäuren N-terminal der Spaltungsstelle (\mid) mit P1, P2 usw. bezeichnet, alle C-terminal der Spaltungsstelle mit P1', P2' usw. Diese Nomenklatur ist die bis heute gängige und wird daher auch in dieser Arbeit verwendet.

1.1.2 Serin-Proteasen

Fast ein Drittel aller Proteasen gehören aufgrund des nukleophilen Serin-Rests im aktiven Zentrum zur Gruppe der Serin-Proteasen bzw. Serin-Endopeptidasen, so auch die in dieser Arbeit näher untersuchte Lysyl-Endopeptidase (Hedstrom, 2002). Wirksam sind diese Enzyme in der Regel im pH-Bereich von 7-11, weshalb sie auch als alkalische Proteinasen bezeichnet werden (Belitz et al., 2001). Charakteristisch für diese Enzymgruppe ist eine katalytische Triade bestehend aus Asparaginsäure, Histidin und Serin (Blow, 1997), wobei mittlerweile auch Serin-Proteasen mit abweichenden katalytischen Triaden und auch Duaden beschrieben wurden (Dodson und Wlodawer, 1998). Bekannte Beispiele für klassische Serin-Proteasen sind Trypsin, Chymotrypsin und Subtilisin. Der Hydrolyse-Mechanismus der katalytischen Triade einer Protease des Chymotrypsin-Typs ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Der Serin-Rest des aktiven Zentrums überträgt ein Proton auf das benachbarte Histidin und das so entstandene Alkoholat greift nukleophil am Carbonyl des Substrats an. Der protonierte Histidin-Rest wird über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Aspartat stabilisiert. Auf diese Weise bildet sich eine tetraedrische Intermediärstruktur am C-Atom der zu spaltenden Peptidbindung. Nach Abspalten des aminoterminalen Substratrests, bei dem das protonierte Histidin als Säure reagiert, bildet sich ein Acyl-Enzym-Intermediat. Die Deacylierung und somit Freisetzung des carboxyterminalen Substratrests sowie Regenerierung des Enzyms erfolgt auf umgekehrtem Weg, wobei hier Wasser nukleophil am Carbonyl-Kohlenstoff angreift

Einleitung

Bezüglich der Substratspezifität gibt es innerhalb der Serin-Endopeptidasen sehr große Unterschiede. Während Trypsin Peptidbindungen nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin hydrolysiert, bevorzugt Chymotrypsin solche nach aromatischen Seitenketten. Die mikrobiellen Enzyme dieser Gruppe sind in den meisten Fällen wenig spezifisch (Belitz et al., 2001).

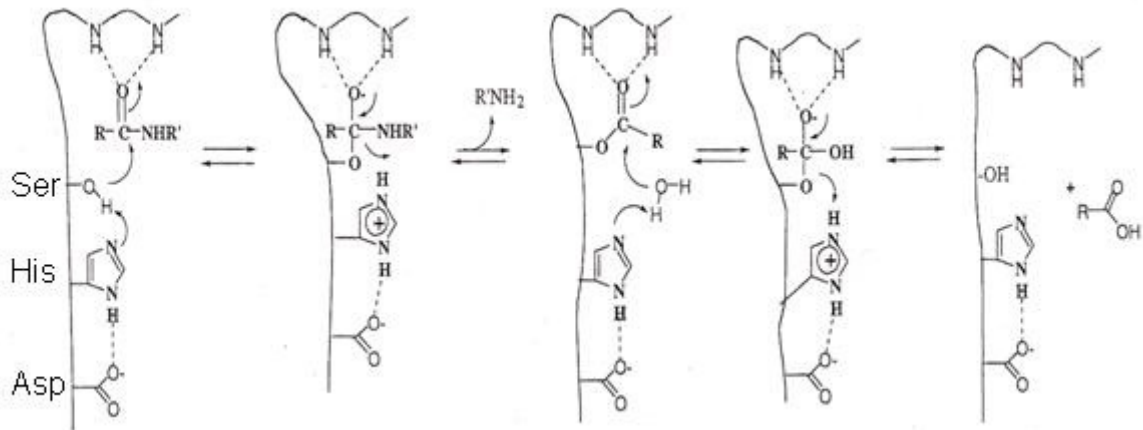


Abbildung 1.3: Hydrolyse-Mechanismus der katalytischen Triade einer Serin-Protease des Chymotrypsin-Typs (modifiziert nach Hedstrom, 2002).

1.1.3 Proteasen in der Lebensmitteltechnologie

Proteasen sind die industriell am häufigsten eingesetzten Enzyme. Anwendung finden sie in Waschmitteln, Kosmetika und Pharmazeutika ebenso wie in der Lederverarbeitung, Abfallentsorgung und Textilindustrie. Nicht zuletzt werden Proteasen in vielen verschiedenen, oftmals traditionellen Bereichen der Lebensmitteltechnologie eingesetzt (Grzonka et al., 2007).

Die fleischverarbeitende Industrie setzt eine Vielzahl unterschiedlicher Peptidasen als sog. „Tenderizer“ ein. Diese sollen die natürliche Fleischreifung unterstützen, die Zartheit erhöhen und so zu einer Qualitätsverbesserung führen. Bekanntestes Beispiel hierfür ist das Enzym Papain aus *Carica papaya* (Drenth et al., 1968). Des Weiteren erfolgt das Ablösen der Proteine vom Tierknochen ebenfalls durch Proteasen.

Einleitung

In der milchverarbeitenden Industrie gibt es für den Einsatz von Proteasen zwei Schwerpunkte. Zum einen die Fällung des Käsebruchs durch Chymosin (Dicklegung), zum anderen die Käsereifung. Zu letzterer tragen sowohl native Milch-Endopeptidasen als auch Endo- und Exopeptidasen von zugesetzten Starterkulturen oder Sekundärflora bei (Ruttloff, 1993).

Um in der Bierwürze genug Aminosäuren als Stickstoffquelle für das Hefewachstum zu erhalten, werden in einigen Fällen auch Peptidasepräparate zugesetzt. Hierbei finden sowohl pflanzliche als auch mikrobielle Enzyme Anwendung. Ein weiterer wichtiger Einsatzbereich für proteolytische Enzyme in der Brauereitechnologie ist die Verhinderung der Kältetrübung während der Lagerung (Ruttloff, 1993).

Peptidasepräparate, die in der Backwarenindustrie eingesetzt werden, dienen der Auflockerung der Kleberstruktur im Teig und erleichtern somit die Bearbeitung, erhöhen die emulgierenden Eigenschaften und haben positiven Einfluss auf Aroma und Rösche. Hierbei werden je nach Produkt weniger hitzestabile (Frischbackwaren) oder hitzestabilere (Dauerbackwaren) Peptidasen eingesetzt.

Pflanzenprotein-Hydrolysate werden traditionell als Würzmittel für z.B. Suppen eingesetzt (Ruttloff, 1993).

1.1.4 Lysyl-Endopeptidase aus *Lysobacter enzymogenes*

Bei der Endoproteinase LysC (EC 3.4.21.50), im folgenden auch als Lysyl-Endopeptidase oder kurz LysC bezeichnet, handelt es sich um eine sequenzspezifische, mikrobielle Serin-Protease, welche von den sie bildenden Bakterien in den extrazellulären Raum sekretiert wird. Das Enzym hydrolysiert Peptidbindungen am C-terminalen Ende der Aminosäure Lysin. Beschrieben wurde LysC bisher in *Pseudomonas aeruginosa* (Elliott und Cohen, 1986), *Achromobacter lyticus* (Masaki et. al., 1978), *Lysobacter* sp. IB-9374 (Chohnan et. al., 2002) und *Lysobacter enzymogenes* (Jekel et. al., 1983). Am besten hiervon untersucht wurde die Lysyl-Endopeptidase aus *A. lyticus*, auch *Achromobacter* Protease I (API) genannt (Masaki et al, 1981a; Masaki et al., 1981b; Masaki und Soejima, 1985; Ohara et al, 1989; Masaki et al., 1992). Praktische Anwendung findet LysC aus *L. enzymogenes*, welche zur Vorhydrolyse bei der Bestimmung von Protein-Primärstrukturen eingesetzt wird und zu diesem Zweck auch hochrein kommerziell zu

Einleitung

erwerben ist (Roche). Sowohl die Gewinnung und Reinigung der Lysyl-Endopeptidase aus dem *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* Wildstamm als auch die rekombinante Herstellung des Enzyms in *E. coli* wurden in entsprechenden Patentschriften der Fa. Roche beschrieben (Schrenk und Wunderwald, 1982; Kopetzki und Karcher, 1999).

Lysobacter enzymogenes (Typstamm ATCC 29487) ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges und gleitendes Bodenbakterium, welches auch als *Myxobacter* 495 beschrieben wurde (Christensen und Cook, 1978). Der nicht-pathogene Mikroorganismus sekretiert neben der Lysyl-Endopeptidase noch eine Arginyl-Endopeptidase sowie je eine α - und β -lytische Endopeptidase (Gillespie und Cook, 1965; Whitaker, 1965; Wright et al., 1998). Die biologische Funktion der beiden lytischen Proteasen besteht in der Lyse von Zellwänden anderer Bakterien, insbesondere der Gattung *Staphylococcus* und naher Verwandter (Kessler, 1995). Die physiologische Rolle der Arginyl- und Lysyl-Endopeptidase ist nicht näher beschrieben.

1.2 Funktionelle Lebensmittel und bioaktive Peptide

1.2.1 Definition „Functional Food“

Als funktionelle Lebensmittel („Functional Food“) werden Lebensmittel bezeichnet, die neben ihrem eigentlichen Zweck, der Zufuhr von Energie und Nährstoffen sowie der Sättigung, über einen oder mehrere potentielle Zusatznutzen für den Körper verfügen (Jones und Varaday, 2008). In erster Linie handelt es sich hierbei um positive physiologische oder gesundheitsfördernde Effekte, in deren Genuss der Konsument nach (regelmäßigem) Verzehr des entsprechenden Lebensmittels kommt. Bekannte Beispiele sind neben Pro- und Präbiotika zur Stärkung der Darmflora und für eine bessere Verdauung auch Omega-3-Fettsäuren zur Senkung des Cholesterinspiegels. Nicht unter diesen Begriff fallen Lebensmittelzusatzstoffe wie Vitaminpräparate etc., da diese kein eigenständiges Lebensmittel darstellen. Per Definition muss bei einem funktionellen Lebensmittel der positive Zusatznutzen bereits bei der Einnahme von realistischen Tagesdosen nachweisbar sein. Dies gilt

insbesondere für Milchprodukte, da diese auch in unveränderter Form bei Konsum großer Mengen einen positiven physiologischen Effekt zeigen können. Als erstes Land hat Japan den Begriff „Funktionelle Lebensmittel“ auf Gesetzesebene definiert (*Foshu*: Food for specific health use; Yamada et al., 2008). Für die EU soll die sog. Health-Claims-Verordnung gesetzliche Richtlinien für das Werben für funktionelle Lebensmittel aufzeigen.

1.2.2 Beispiele für funktionelle Peptide

In der Literatur ist eine Vielzahl von bioaktiven Peptiden, also Peptiden mit physiologischer Funktionalität, beschrieben. Zu den entsprechenden untersuchten Bioaktivitäten gehören u.a. antimikrobielle, antioxidative, opioide und antihypertensive (blutdrucksenkende) Wirksamkeit, die Modulation des Immunsystems sowie Cholesterin-senkende Effekte. Ein Großteil der bisher identifizierten bioaktiven Peptide konnte in Milchprodukten nachgewiesen bzw. durch proteolytische Spaltung von Milchproteinen generiert werden. Aber auch andere Proteinquellen wie Soja, Buchweizen, Ginseng, Ei oder Fischfleisch sind bekannt. Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht von Peptiden und Proteinhydrolysaten unterschiedlicher Herkunft und Funktionalität. Im ursprünglichen Lebensmittel, z.B. in der Milch, sind die bioaktiven Peptide in der Aminosäuresequenz der Proteinmatrix enthalten. Um ihre physiologische Wirkung entfalten zu können, müssen die Peptide zuerst hydrolytische aus der Lebensmittel-Proteinmatrix freigesetzt werden (Clare und Swaisgood, 2000). Dies kann entweder im Gastrointestinaltrakt (*in vivo*) durch Verdauungsenzyme (Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin) oder mikrobielle Enzyme der Darmbakterien geschehen oder durch eine proteolytische Prozessierung des Lebensmittels durch zugesetzte Proteasen/Peptidasen während der Herstellung und Reifung (*in vitro*). Auch fermentativ, das heißt durch den Zusatz von für die Lebensmittelproduktion zugelassenen Mikroorganismen, kann eine solche Generierung funktioneller Peptide stattfinden.

Tabelle 1.1: Überblick zu Bioaktivitäten von Peptiden bzw. Proteinhydrolysaten.

| Bioaktivität | Peptid/Hydrolysat | Referenz |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| antimikrobiell | Lactoferricin-B | Bellamy et al., 1992 |
| | Lactoferricin-C | Recio und Visser, 2000 |
| antihypertensive | β -Casokinin (IPP, VPP) | Nakamura et al., 1995 |
| | Lactokinin | Mullally et al., 1997 |
| immunmodulatorisch | Eidotterpeptide | Nelson et al., 2007 |
| | α_{S1} -Immunocasokinin | Maruyama et al., 1987 |
| opioid | Serorphin | Meisel, 1997 |
| | β -Casomorphin-5 | |
| antioxidativ | Molkeprotein-Hydrolysat | Cheison et al., 2007 |
| | Casein-Hydrolysat | Suetsuna et al., 2000 |
| Mineralstoff-bindend | Caseinphosphopeptid | Rutherford-Markwick und Moughan, 2005 |
| Cholesterin-senkend | Sojaprotein-Hydrolysat | Sugano et al., 1990 |
| anticarcinogen | Lunasin | Jeong et al., 2002 |
| | Buchweizenpeptide | Leung et al., 2007 |
| Gallensäure-bindend | Lupinenprotein-Hydrolysat | Yoshie-Stark und Wäsche, 2004 |

1.2.3 Aufnahme funktioneller Peptide über die intestinalen Epithelien

In der Regel bestehen bioaktive Peptide aus einer Kette von 3 bis 20 Aminosäuren (Möller et al., 2008) aber auch Dipeptide sind bereits als physiologisch aktiv identifiziert worden. Während einige Peptide, darunter solche mit antimikrobiellen, Mineralstoff-, Gallensäure- und Cholesterin-bindenden Eigenschaften diese Funktionen im Lumen des Gastrointestinaltrakts und an der apikalen Membranseite der angrenzenden Epithelien zur Wirkung bringen können, müssen viele andere bioaktive Peptide hierfür zuerst in die für sie bestimmten Gewebe oder Körperbereiche gelangen. Hierbei ist die Absorption in bzw. der Transport durch das Epithelgewebe des Gastrointestinaltrakts ein entscheidender, gut kontrollierter Schritt. Die zugehörigen zellbiologischen Mechanismen sind nur teilweise aufgeklärt

Einleitung

(Meredith und Boyd 1994). Abbildung 1.4 gibt eine schematische Übersicht über die verschiedenen bekannten Transportmechanismen. Di- und Tripeptide können aktiv mittels des protonenabhängigen Transporters PepT1 (POT: proton-dependent peptide transport) in die Epithelzellen gelangen (Ganapathy und Leibach, 1983; Hoshi, 1985; Fei et al., 1994). Auch viele oral verabreichten Antibiotika sowie der Krebswirkstoff Bestatin werden auf diesem Weg in Epithelzellen geschleust (Bai et al., 1992; Hori et al., 1993; Takano et al., 1994). Durch die größenregulierbaren Poren der „Tight Junctions“ zwischen den Epithelzellen können neben Ionen, Aminosäuren und Zuckern auch Oligopeptide parazellulär hindurchdiffundieren (Nusrat et al., 2000; Satake et al., 2002). Für bestimmte basische und hydrophobe Peptide ist ein vesikulärer Transport durch die Epithelzellschicht (Transzytose) beschrieben, bei dem die Aufnahme in die Zelle durch den Kontakt des Peptids mit der Membranoberfläche induziert wird (Shimizu et al., 1997). Dies wird als adsorptive Endozytose bezeichnet.

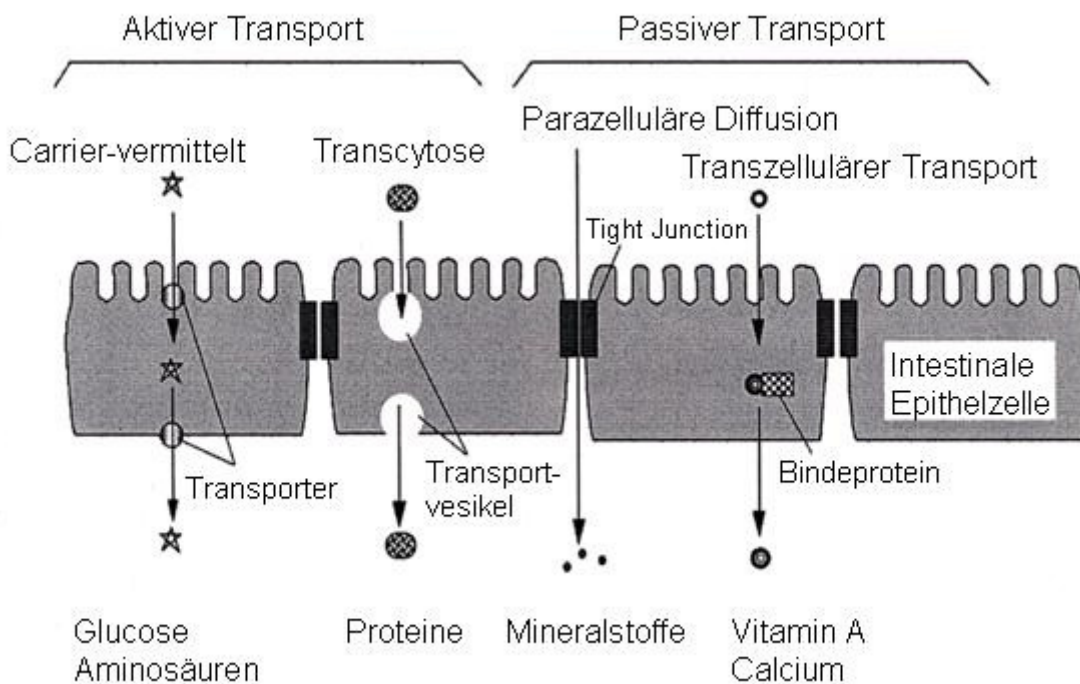


Abbildung 1.4: Hauptwege des intestinalen Transports von Nahrungsmittelkomponenten (modifiziert nach Shimizu und Son, 2007).

Obwohl der zelluläre Peptidtransport Gegenstand intensiver Forschung war und ist, beschreiben die meisten der auf diesem Gebiet publizierten Arbeiten entweder den Transport in humanen Modellzelllinien oder im Tiermodell. Der Nachweis für die Aufnahme und den Transport im Menschen *in vivo* konnte bis jetzt nur in Einzelfällen beschrieben werden (Satake et al., 2002). Diese Problematik darf im Bezug auf einen Einsatz von funktionellen Peptiden im Bereich der Lebensmittelindustrie nicht außer Acht gelassen werden.

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen des BMBF-Projekts „Universelle Hochdurchsatz-durchmusterungssysteme zum Auffinden und Verbessern industriell bedeutsamer Biokatalysatoren in Metagenom- und Zufallsmutagenese-Bibliotheken“ (BioChancePLUS-3 FKZ 0313137) bestand das Ziel dieser Arbeit darin, mittels einer sequenzspezifischen Modellprotease bzw. -peptidase eine Hydrolyse von Lebensmittelprotein, im speziellen von Casein, durchzuführen und so funktionelle Peptide zu generieren.

Hierfür sollte zuerst das Gen einer sequenzspezifischen Protease kloniert und das Enzym rekombinant in einem geeigneten Wirtsorganismus, z.B. *Escherichia coli*, quantitativ hergestellt werden. Nach der biochemischen Charakterisierung der Protease sollte mittels dieser eine Caseinhydrolyse erfolgen und das so erhaltene Proteinhydrolysat mittels chemisch-analytischer Methoden bezüglich generierter bioaktiver Peptide untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

| Gerät | | Hersteller |
|---|---------------------|--|
| Autoklav | | Gössner, Hamburg |
| Elektrophoresegerät Phast™ System | | Amersham Bioscience, Freiburg |
| Feinwaage Precisa 120 A | | PESA Waagen GmbH, Bisingen |
| Fermenter Biostat® E | | B. Braun, Melsungen |
| Gefriertrocknung Alpha 1 - 2 | | Christ, Osterode |
| Mehrfach-Fermentationssystem Multifors | | Infors AG, Bottmingen, Schweiz |
| Gelkammer Mini Protean 3 | | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| HPLC | SpectraSystem | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |
| | Surveyor | |
| Inkubationsschüttelschrank KF-3 | | Infors AG, Bottmingen, Schweiz |
| Digitalkamera TK-C1381 | | JVC, Japan |
| Magnetrührer IKAMAG REO | | IKA Labortechnik, Staufen |
| Heizplatte IKAMAG RCT | | |
| Mikroskop Laborlux K | | Leitz, Wetzlar |
| Elektrophorese-Netzteil Powerpac 300 System | | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Digital pH-Meter 646 | | Knick, Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin |
| Photometer Ultrospec 3000 | | Amersham Bioscience, Freiburg |
| Ultrospec 1000 | | |
| Schüttler Vibramax 100 | | Heidolph Instruments, Schwabach |
| Thermoschüttler Eppendorf Comfort | | Eppendorf AG, Hamburg |
| Trockenschrank Elektronik VT 5050 EK | | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |
| Ultraschallprozessor UPS 200S | | Dr. Hielscher, Teltow |
| Vakuumpumpe | | Vacuubrand GmbH, Wertheim |
| GelAir Drying Frame | | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Vortexer VV3 | | VWR, USA |
| Waagen | Presica 800M | PAG Oerlikon AG, Zürich |
| | Precisa 3000C-6000D | |
| Wasserbad Julabo-EH 5 | | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Zentrifugen 5804R, Rotor:F-34-6-38 5417R, Rotor: F-45-30-11 | | Eppendorf AG, Hamburg |

Fortsetzung Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

| | |
|---|---|
| Zentrifuge Sorvall RC5C SS34-Rotor GSA-Rotor GS3-Rotor | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |
| DNA Sequencer LONG READIR 4200 | LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg |
| Agarosegel-System MINI-SUB Cell GT | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| UV-Tisch High Performance Ultraviolet Transilluminator | UVP, USA |
| UV-Geldokumentationssystem Multimage Light Cabinet | Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf |
| Elektroporationsgerät MicroPulser | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Kugelmühle MM200 | Retsch GmbH, Haan |
| Scanner Perfection 1200 Photo | Epson, Meerbusch |
| Hybridisierungssofen OV5 | Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen |
| Titriergerät Titroline Alpha | Schott Instruments GmbH, Mainz |
| Thermocycler Gradient | Eppendorf AG, Hamburg |
| PCR System GeneAmp 9700 | Applied Biosystems Inc., Foster City, USA |
| LTQ Orbitrap XL Spektrometer | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |

2.2 Chemikalien

Von Bachem, Bubendorf, Schweiz wurden erworben:

Tos-Gly-Pro-Lys-*p*NA, Suc-Ala-Ala-Pro-*p*NA, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA, Z-Ala-Ala-Leu-*p*NA, Ala-Ala-Pro-Leu-*p*NA. Ala-Phe-Pro-*p*NA, Pyr-Phe-Leu-*p*NA

Von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg wurde erworben:

Bacto Trypton

Alle sonstigen Chemikalien wurden in mindestens analysenreiner Qualität von Fluka-Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Das Sakacin P induzierende Peptid (Spp-IP) wurde von EMC Microcollections (Tübingen) erworben. Die Aminosäuresequenz (MAGNSSNFIHKIKQIFTHR) wurde uns freundlicherweise von Dr. Lars Axelsson (Matforsk, Norwegian Food Research Institute) mitgeteilt.

2.3 Enzyme

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme

| Enzym(-präparat) | Aktivität nach Herstellerangabe | Hersteller |
|---|---------------------------------|-------------------------------------|
| <i>NcoI</i> | 10.000 U/mL | New England Biolabs GmbH, Frankfurt |
| <i>NdeI</i> | 20.000 U/mL | New England Biolabs GmbH, Frankfurt |
| <i>HindIII</i> | 20.000 U/mL | New England Biolabs GmbH, Frankfurt |
| <i>BamHI</i> | 20.000 U/mL | New England Biolabs GmbH, Frankfurt |
| Lysozym | 36.368 U/mg | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Benzonase | ≥25 U/mL | Merck KGaA, Darmstadt |
| Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase | 340 U/mL / 170 U/mL | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Lipoxygenase (aus Sojabohnen) | 9 U/mg | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Angiotensin-converting Enzyme (ACE) | 3,6 U/mg | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Calf Intestinal Phosphatase (CIP) | 10.000 U/mL | New England Biolabs GmbH, Frankfurt |
| T4-Ligase | 1 U/μL | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |

2.4 Synthetisierte Nucleotidsequenzen

2.4.1 Gene

Die für die „Codon Usage“ von *E. coli* angepassten Gene *MGSK-lysC* (Kopetzki und Karcher, 1999; siehe Anhang/Abbildung 8.1 und *Cpro-lysC* (Anhang 8.4) wurden von der Geneart AG (Regensburg) synthetisiert und kloniert (Vektoren siehe 3.4.1 und 3.5.2).

2.4.2 DNA-Primer

In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit eingesetzten DNA-Primer aufgeführt. Alle Primer wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) erworben. Die Sequenzierprimer trugen am 5'-Terminus eine IRD800-Markierung.

Tabelle 2.3: DNA-Sequenzen der PCR-Primer

| Primer | Sequenz (5'→3') | Verwendung |
|---------------|---|---|
| LysC_for | CGG GAT CCA TAT GAA ACG CAT TTG TGG TTC C | Amplifikation des LysC-Gens und der N-terminalen Prosequenz |
| LysC_rev | CGG GAT CCT CAG AAG GTG ATG CTC CAC TTG TC | Amplifikation des LysC-Gens |
| Npro-LysC_rev | CGG GAT CCT CAC TTC TCG CCG CTG GCC G | Amplifikation der N-terminalen Prosequenz von LysC |
| pET_for | GAC CAC AAC GGT TTC C | Sequenzierung des LysC-Gens aus <i>L. enzymogenes</i> |
| pET_rev | CTA GTT ATT GCT CAG C | |
| LysC_for_seq1 | CTA TCC GGC CAC CCA G | |
| LysC_rev_seq1 | CAC CAG GTC CAC CTT C | |
| Lac4_mut1_for | GAA TGG GAA CAC GAC TTT TTC CAC TAA AGA ATT TAT TTC C | Ortsspezifische Mutagenese des Lac4-Gens aus <i>K. lactis</i> (1. Mutation) |
| Lac4_mut1_rev | GGA AAT AAA TTC TTT AGT GGA AAA AGT CGT GTT CCC ATT C | |

Fortsetzung Tabelle 2.3: DNA-Sequenzen der PCR-Primer

| | | |
|---------------|--|---|
| Lac4_mut2_for | GTG ACT TGA ACG CTT TGT CCG CAG ATA TCT TTA GTT TC | Ortsspezifische Mutagenese des Lac4-Gens aus <i>K. lactis</i> (2. Mutation) |
| Lac4_mut2_rev | GAA ACT AAA GAT ATC TGC GGA CAA AGC GTT CAA GTC AC | |
| Lac4_mut3_for | TGT CTC AGT TGA ATC CTC CGG ATT GCA TTT TAT CTT G | Ortsspezifische Mutagenese des Lac4-Gens aus <i>K. lactis</i> (3. Mutation) |
| Lac4_mut3_rev | CAA GAT AAA ATG CAA TCC GGA GGA TTC AAC TGA GAC A | |
| Lac4_seq1 | GCC TAA GAA GGC CCA | Sequenzierung/Verifizierung der ortsspezifischen Mutagenesen des Lac4-Gens aus <i>K. lactis</i> |
| Lac4_seq2 | GCC CAT TAC TTA TCA G | |
| Lac4_seq3 | CAT CTT TAA AGC CAG AAG | |

2.5 Mikroorganismen und Plasmide

Für die Transformation von Ligationsansätzen, Plasmidamplifikation und Plasmidarchivierung in *Escherichia coli* wurde der Stamm *E. coli* XL-1 Blue (Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]) verwendet. Als *E. coli* Wirtsstamm für die heterologe Genexpression diente *E. coli* BL21(DE3) (Genotyp: F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal λ*(DE3)). Als *E. coli* Klonierungs- und Expressionsvektor wurde pET20b(+) (Novagen, USA) eingesetzt.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Stämme *Lactobacillus plantarum* NC8 (Aukrust und Blom, 1992) und *L. sakei* Lb790 (Schillinger und Lücke, 1989) sowie der zugehörige Expressionsvektor pSIP409 (Sørvig et al., 2005) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Lars Axelsson zur Verfügung gestellt.

Lysobacter enzymogenes ssp. *enzymogenes* (ATCC 27796; DSM 1895) sowie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (ATCC 33913; DSM 3586) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben.

Die beiden Plasmide pGA18-MGSK-LysC und pCR4-Npro-LysC (siehe 3.5.2) wurden von der Geneart AG (Regensburg) bezogen.

2.6 Kulturmedien

Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der Kulturmedien für *E. coli*, *Lactobacillus* sp., *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* und *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* angegeben. Alle Bestandteile wurden in dH₂O gelöst. Die Sterilisation erfolgte bei 121 °C und 1 bar für 20 min in einem Autoklaven (Gössner, Hamburg).

Für Nährböden wurden zusätzlich 15 g/L Agar eingesetzt. Gegebenenfalls benötigte Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

Minimalmedium für *E. coli* (modifiziert nach Riesenberg et al., 1991 bzw. Hellmuth et al., 1994)

27,5 g/L Glucose-Monohydrat
1,2 g/L MgSO₄ * 7 H₂O
1,3 g/L KH₂PO₄
1 g/L (NH₄)₂HPO₄
5 g/L NH₄Cl
1,7 g/L Citronensäure
60 mg/L Fe(III)-Citrat
3 mg/L H₃BO₃
1,5 mg/L MnCl₂ * 4 H₂O
8,4 mg/L Na₂-EDTA * 2 H₂O
1,5 mg/L CuCl₂ * 2 H₂O
2,5 mg/L Na₂MoO₄ * 2 H₂O
2,5 mg/L CoCl₂ * 6 H₂O
8 mg/L Zn(CH₃COO)₂ * 2 H₂O
2,67 mg/L Thiamin-Hydrochlorid
100 mg/L Ampicillin

Material und Methoden

Glucose-Monohydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 / $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ / NH_4Cl und die Spurenelemente des Minimalmediums wurden getrennt gelöst, autoklaviert und anschließend gemischt. Die Stammlösungen von Thiamin-Hydrochlorid und Ampicillin (jeweils 1000fach konzentriert) wurden nach Autoklavieren des Mediums steril zugegeben.

LB (Luria-Bertani)-Medium (pH 7,0±0,2)

10 g/L Trypton
5 g/L Hefeextrakt
5 g/L NaCl

MRS-Medium

22 g/L Glucose-Monohydrat
10 g/L Pepton aus Casein
10 g/L Fleischextrakt
5 g/L Natriumacetat
4 g/L Hefeextrakt
2 g/L K_2HPO_4
2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
1 g/L Tween 80
0,4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
0,045 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Glucose-Monohydrat wurde getrennt von den anderen Komponenten gelöst und autoklaviert und anschließend steril zugegeben.

NYG-Medium für *Xanthomonas campestris* (Daniels et al. 1984)

5 g/L Pepton
20 g/L Glycerol
3 g/L Hefeextrakt

Medium A für *Lysobacter enzymogenes*

- 5 g/L Casein
- 10 g/L Saccharose
- 10 g/L Fleischextrakt
- 0,1 g/L KH_2PO_4
- 0,1 g/L K_2HPO_4
- 0,1 g/L MgSO_4

Vor dem Autoklavieren wurde das Casein unter Rühren auf einem IKAMAG REO Magnetrührer (IKA Labortechnik, Staufen) gelöst.

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Mediumszusätze (Antibiotika, Induktoren) aufgeführt.

Tabelle 2.4: Mediumszusätze

| Zusatz | Abkürzung | Konzentration | gelöst in |
|--|-----------|--|--------------------|
| Ampicillin | Amp | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | ddH ₂ O |
| Erythromycin | Ery | 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MRS) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LB/MM*) | Ethanol |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid | IPTG | 0,4 mM | ddH ₂ O |
| Sakacin P induzierendes Peptid | Spp-IP | 50 ng/mL | ddH ₂ O |

*Minimalmedium

2.7 Stammhaltung und –kultivierung

2.7.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Glycerinkulturen

Zur Archivierung der Stämme wurden Glycerinkulturen hergestellt. Hierzu wurden die Zellen einer Übernachtskultur (37°C, 4-5 mL LB-Medium) durch Zentrifugieren (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg; 14000 x g, 2 min, 4°C) geerntet und in 1-2 mL frischem LB-Medium resuspendiert. 500 µL dieser Zellsuspension wurden zu 500 µL steriler 60 % (w/v) Glycerinlösung pipettiert, gemischt und bei -80°C eingefroren.

Agarplatten

Die kurzzeitige Lagerung der Mikroorganismen erfolgte auf LB-Agarplatten bei 4°C. Glycerinkultur-Zellen wurden durch Ausstrich mit einer sterilen Impföse vereinzelt. Positive Transformanten wurden durch Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum isoliert. Nach Übernachts-Inkubation bei 37°C wurden die Agarplatten mit Parafilm umwickelt und im den Kühlschrank für 2-4 Wochen gelagert.

Flüssigkulturen

Schüttelkolben-Kultivierungen von *E. coli* wurden aerob bei 37°C und 100-130 Upm in LB-Medium durchgeführt. Sterile Reagenzgläser wurden mit 4-10 mL Medium befüllt. Angeimpft wurde die Kultur mit Zellen einer Einzelkolonie, die mittels eines sterilen Zahnstochers von einer Agarplatte gepickt und in das Flüssigmedium überführt wurden. Kultivierungen mit Volumina größer 10 mL wurden in sterilen Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt. Die Inokulierung erfolgte hier nach Vortemperierung des Mediums (10-20 min) durch Zugabe einer Reagenzglas-Vorkultur (s.o.) in einem Verhältnis von 1:50 bis 1:100 (v:v).

Bei der Bioreaktor-Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3) pET20b-MGSK-LysC (siehe 2.13.2) wurde *E. coli* Minimalmedium verwendet.

2.7.2 Kultivierung von *Lactobacillus* sp.

Glycerinkulturen

Die Glycerinkulturen zur Archivierung der Stämme wurden wie für *E. coli* beschrieben (2.7.1) hergestellt. Hierzu wurden die Zellen einer Übernachtskultur (30 °C, 4-5 mL MRS-Medium) geerntet (14000 x g, 2 min, 4 °C) und in 1 mL frischem MRS-Medium resuspendiert.

Agarplatten

Das Ausstreichen zum Vereinzeln von Bakterienkolonien erfolgte wie für *E. coli* beschrieben (2.7.1). Nach Inkubation bei 30 °C für 16-48 h unter anaeroben Bedingungen (Anaerocult A, VWR, Darmstadt) wurden die Agarplatten mit Parafilm umwickelt und im Kühlschrank für 2-4 Wochen gelagert.

Flüssigkulturen

Flüssigkulturen von *Lactobacillus* sp. wurden bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C in MRS-Medium durchgeführt, wobei die Inkubation ohne Schütteln erfolgte. Sterile 14 mL Sarstedt-Röhrchen wurden mit bis zu 10 mL Medium befüllt. Angeimpft wurde die Kultur wie für *E. coli* beschrieben mit Zellen einer Einzelkolonie, die mittels eines sterilen Zahnstochers von einer Agarplatte gepickt und in das Flüssigmedium überführt wurden. Kultivierungen in größeren Arbeitsvolumina wurden entweder in sterilen 50 mL Sarstedt-Röhrchen oder sterilen Erlenmeyerkolben ohne Schikanen durchgeführt. Die Inokulierung erfolgte hier nach Vortemperierung des Mediums (10-20 min) wie für *E. coli* beschrieben (2.7.1).

2.7.3 Kultivierung von *Xanthomonas campestris*

Für Flüssigkulturen und Agarplatten von *Xanthomonas campestris* wurde NYG-Medium eingesetzt. Die Wachstumstemperatur lag bei 28 °C. Glycerinkulturherstellung, Kolonievereinzeln auf Agarplatten sowie Flüssigkultivierung wurden wie für *E. coli* beschrieben durchgeführt (2.7.1).

2.7.4 Kultivierung von *Lysobacter enzymogenes*

Für Flüssigkulturen und Agarplatten von *Lysobacter enzymogenes* wurde Medium A verwendet. Die Wachstumstemperatur betrug 30 °C (Fermentation, siehe 2.15) bzw. 37 °C (Schüttelkolben, Agarplatten). Glycerinkulturherstellung, Kolonievereinzelung auf Agarplatten sowie Flüssigkultivierung wurden wie für *E. coli* beschrieben durchgeführt (2.7.1).

2.8 Molekularbiologische Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle molekularbiologischen Methoden nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt.

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

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurden 1-4 mL einer Übernachtskultur mittels Zentrifugation geerntet (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Hamburg; 14000 x g, 1-2 min, 4 °C). Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit[®] (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Das Elutionsvolumen betrug 50 µL ddH₂O.

2.8.2 Isolierung von Plamid-DNA aus *Lactobacillus* sp.

Die Plasmid-Isolierung aus *Lactobacillus* sp. Zellen erfolgte nach verändertem QIAprep Spin Miniprep Kit[®] Protokoll. 1 mL Übernachtskultur wurden bei 14000 x g, und 4 °C für 1-2 min zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Hamburg) und das Zellpellet in 250 µL P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/mL Lysozym und 50 U/mL Mutanolysin wurde die Probe für 1 h bei 37 °C und 6 Upm in einem Hybridisierungsöfen (Biometra, Göttingen) inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µL P2-Puffer erfolgte eine Inkubation für 23 min bei 70 °C im Wasserbad. Nach Zugabe

von 300 μL P3-Puffer wurde wie im QIAprep Spin Miniprep Kit[®] Protokoll angegeben weiter verfahren. Das Elutionsvolumen betrug 50 μL ddH₂O.

2.8.3 Isolierung von genomischer DNA aus *Lysobacter enzymogenes*

Nach Ernten von 2 mL Übernachtskultur mit einer Zentrifuge 5417R (14000 x g, 1 min, 4°C, Eppendorf, Hamburg) wurde die genomische DNA von *Lysobacter enzymogenes* mit dem DNeasy Tissue Kit[®] (Qiagen, Hilden) nach dem Herstellerprotokoll für Gram-negative Mikroorganismen isoliert. Die Lysedauer betrug 1h, das Elutionsvolumen 100 μL ddH₂O.

2.8.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Das Ausschneiden von DNA-Banden bei präparativen Agarosegelen (zur Agarose-Gelelektrophorese siehe 2.9.1) erfolgte auf einem UV-Tisch (High Performance Ultraviolet Transilluminator, UVP, USA) mittels eines Skalpell. Das ausgeschnittene Gelstück wurde in ein vorgewogenes 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die gravimetrische Bestimmung der Masse des Gelstücks. Entsprechend dieser Masse erfolgte die Extraktion von DNA mit dem Perfectprep Gel Cleanup Kit[®] (Eppendorf, Hamburg) bzw. bei DNA-Fragmenten über 5 kb mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit[®] (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll. Die DNA wurde mit 30 μL ddH₂O eluiert.

2.8.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von *lysC* und *Npro-lysC*

Die DNA-Amplifikation mittels PCR wurde auf einem ThermoCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung des HotStar HiFidelity Polymerase Kits (Qiagen, Hilden) in 100 μL PCR-Röhrchen durchgeführt. Die eingesetzte *Pyrococcus* spp. Polymerase besaß sowohl Korrekturlese-Eigenschaft als auch terminale

Transferase-Aktivität. Das Pipettierschema der PCR-Ansätze ist in Tabelle 2.5 gezeigt, die PCR-Protokolle in Abbildung 2.1. Für die Amplifikation des *LysC*-Gens (*LysC*-PCR) wurde das Primerpaar *LysC_for/LysC_rev* verwendet, für die Amplifikation der N-terminalen *LysC*-Prosequenz (*Npro_LysC*-PCR) das Primerpaar *LysC_for/Npro-LysC_rev* (siehe Tabelle 2.3).

Tabelle 2.5: PCR-Pipettierschema für die Amplifikation von *lysC* und *Npro-lysC*.

| Reagenz | Volumen [μL] |
|---|---------------------------|
| 5x HotStar HiFidelity Puffer | 10 |
| 5x Q-Lösung | 0 / 10 |
| Forward-Primer (100 pmol/ μL) | 0,5 |
| Reverse-Primer (100 pmol/ μL) | 0,5 |
| HotStar DNA Polymerase | 1 |
| Genomische <i>L. enzymogenes</i> DNA | 1 |
| ddH ₂ O | ad 50 |

| | | | |
|-------------------------|------------------|---|-----------|
| 95 °C | 5 min | | |
| 94 °C | 15 s | } | 30 Zyklen |
| 61,6* / 65,5* / 65 °C** | 1 min | | |
| 72 °C | 2 min* / 1 min** | | |
| 72 °C | 10 min | | |
| 8 °C | ∞ | | |

Abbildung 2.1: PCR-Temperaturprotokoll zur Amplifikation von *lysC* (*) und *Npro-lysC* ().**

2.8.6 Ortsspezifische Mutagenese von *lac4*

Um an unterschiedlichen Stellen des β -Galactosidase-Gens *lac4* das Serin-Codon tca bzw. agt gegen das für die gleiche Aminosäure codierende tcc auszutauschen, wurden PCR-basierte ortsspezifische Mutagenesen durchgeführt.

Das PCR-Protokoll der Mutagenese PCR ist in Tabelle 2.6 gezeigt, das zugehörige Pipettierschema in Abbildung 2.2. Die PCR-Mutagenese wurde auf einem ThermoCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung des HotStar HiFidelity Polymerase Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Für Herstellung und Amplifikation des einfach mutierten Gens (*lac4.mut1*) wurde das Primerpaar lac4_mut1_for/lac4_mut1_rev und der Vektor pSIP409_lac4 als DNA-Template eingesetzt, für das zweifach mutierte Gen (*lac4.mut2*) das Primerpaar lac4_mut2_for/lac4_mut2_rev und der Vektor pSIP409_lac4.mut1 und für das dreifach mutierte Gen (*lac4.mut3*) das Primerpaar lac4_mut3_for/lac4_mut3_rev sowie der Vektor pSIP409_lac4.mut2.

Zu 20 μL eines PCR-Ansatzes wurde je 1 μL *DpnI* pipettiert und die methylierte Template-DNA danach für 1 h bei 37°C hydrolysiert. Die Kontrolle von PCR und *DpnI*-Spaltung erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.9.1).

Tabelle 2.6: PCR-Pipettierschema der *lac4*-Mutagenese.

| Reagenz | Volumen [μL] |
|---|---------------------------|
| 5x HotStar HiFidelity Puffer | 10 |
| 5x Q-Lösung | 10 |
| Forward-Primer (100 pmol/ μL) | 0,5 |
| Reverse-Primer (100 pmol/ μL) | 0,5 |
| HotStar DNA Polymerase | 2 |
| Template-DNA | 3 |
| ddH ₂ O | ad 50 |

4 μL jedes Ansatzes wurden zur Transformation hitzekompetenter *E. coli* XL-1 Blue Zellen eingesetzt (siehe 2.8.7), als Antibiotikum diente Erythromycin (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Nach Inokulierung einer 5 mL Übernachtskultur (siehe 2.7.1) wurden die Plasmide isoliert (siehe 2.8.1) und durch DNA-Sequenzierung erfolgte die Verifizierung des jeweiligen Basenaustauschs. Die Sequenzierung erfolgte wie unter 2.8.12 beschrieben mit den Primern lac4_seq1, lac4_seq2 oder lac4_seq3. Das PCR Protokoll ist in Abbildung 2.4 aufgeführt.

| | | |
|-----------------------|----------|-------------|
| 95 °C | 5 min | } 14 Zyklen |
| 94 °C | 15 s | |
| 63* / 64** / 66 °C*** | 1 min | |
| 68 °C | 18 min | |
| 72 °C | 18 min | |
| 8 °C | ∞ | |

Abbildung 2.2: PCR-Temperaturprotokoll für die ortsspezifischen Mutagenesen von lac4. (*: lac4.mut1; **: lac4.mut2; *: lac4.mut3)**

2.8.7 Herstellung und Transformation hitzekompetenter *E. coli* Zellen

Herstellung hitzekompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung erfolgte nach der Rubidium-Chlorid-Methode. 50 mL LB-Medium wurden mit 1 mL einer Übernachtskultur von *E. coli* inokuliert und bei 37 °C und 120 Upm inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,7 wurde die Kultur für 15 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5804R, Hamburg; 5000-8000 x g, 5-10 min) geerntet, das Pellet in 20 mL TfbI resuspendiert und 15 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugieren der Zellen (8000 x g, 5 min) wurde das Pellet in 2 mL TfbII resuspendiert, 15 min auf Eis gekühlt und nach Aliquotieren in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder bis zur Transformation bei -80 °C eingefroren.

Transformation hitzekompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden 1-3 μL DNA-Lösung (Miniprep) bzw. 7 μL Ligationsansatz zu 50-100 μL Zellsuspension pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis erfolgte die Hitzeschockbehandlung der Zellen im Wasserbad (Julabo-EH 5, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) bei 42°C für 90 s. Die Probe wurde 1-2 min auf Eis gekühlt und anschließend wurden zur Regeneration der Zellen 900 μL LB-Medium zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden 100-200 μL der Probe auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Tfbl (für 200 mL)

| | |
|---------|-------------------|
| 0,588 g | Kaliumacetat |
| 2,42 g | Rubidiumchlorid |
| 0,294 g | Calciumchlorid |
| 2,0 g | Mangan(II)chlorid |
| 30 mL | Glycerol |

mit verdünnter Essigsäure auf pH 5 einstellen

TfbII (für 100 mL)

| | |
|---------|------------------------------------|
| 0,21 g | MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) |
| 0,121 g | Rubidiumchlorid |
| 1,1 g | Calciumchlorid |
| 30 mL | Glycerol |

mit verdünnter NaOH auf pH 6,5 einstellen

2.8.8 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *Lactobacillus* sp. Zellen

Herstellung elektrokompetenter *Lactobacillus* sp. Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter *Lactobacillus* sp. Zellen wurde nach dem Protokoll von Aukrust und Blom (1992) durchgeführt. 5 mL MRS mit 1 % (w/v) Glycerin wurden mit einer Übernachtskultur von *Lactobacillus* sp. so inokuliert, dass die OD₆₀₀ zu Beginn 0,15-0,2 betrug. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 30°C ohne Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6. Nach Ernten der Zellen (Eppendorf-Zentrifuge 5804R, Hamburg; 5000 x g, 1-2 min) wurden diese je einmal mit 1 mM MgCl₂ und 30 % (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 1500 gewaschen, erneut zentrifugiert und in 50 µL 30 % (w/v) PEG 1500 resuspendiert. Bis zur Elektroporation (max. 2 h) wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Transformation elektrokompetenter *Lactobacillus* sp. Zellen

Die Transformation erfolgte nach Zugabe von 3,5 µL DNA-Lösung (Miniprep) zu 50 µL Zellsuspension und vorsichtigem Mischen des Ansatzes. Die Probe wurde in eine gekühlte, trockene 0,2 cm Elektroporations-Küvette (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) pipettiert. Die Elektroporation wurde mit einem MicroPulser (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt, die Impulsspannung betrug 1,5 kV, die Impulsdauer 5-6 ms (Programm Sc2). Sofort nach Impulsgabe wurden 500 µL MRS-Medium mit 1 % (w/v) Glycerin und 20 mM MgCl₂ zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei 30°C wurden 100-200 µL der Probe auf MRS-Agarplatten mit 10 µg/mL Erythromycin ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert.

2.8.9 Restriktionsspaltung von DNA

Die Spaltung von DNA durch Restriktions-Endonukleasen wurde entweder präparativ (40 µL Volumen) oder zur qualitativen Kontrolle (15 µL Volumen) in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 37°C durchgeführt. Dabei wurden pro Spaltungsansatz 0,1-10 µg DNA mit 5-20 U Restriktionsenzym behandelt. Alle

Spaltungsreaktionen wurden in jeweils dem Restriktionspuffer (New England Biolabs Puffer) durchgeführt, der laut Herstellerangaben für das eingesetzte Enzym bzw. die eingesetzten Enzyme die optimale Salzkonzentration enthielt. 100 µg/mL Bovines Serumalbumin (BSA) wurden nur eingesetzt, wenn mindestens eines der Restriktionsenzyme dies laut Herstellerangaben benötigte. Alle Restriktionsspaltungen wurden in einem Thermoschüttler Eppendorf Comfort (Eppendorf, Hamburg) für 1 h (Kontrollspaltung) oder 2-3 h (präparative Spaltung) durchgeführt. Die Hitzedenaturierung der Enzyme nach Spaltung erfolgte für 20 min bei 65 °C.

2.8.10 Vektor-Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung des 5'-Terminus von Vektoren nach der Restriktionsspaltung wurden zum präparativen Ansatz (siehe 2.8.9) 6 µL ddH₂O, 3 µL NEB Puffer 3 und 1 µL Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase, CIP) pipettiert. Die Probe wurde anschließend für 30-60 min bei 37 °C inkubiert.

2.8.11 Ligation

Alle DNA-Ligationsreaktionen (15 µL Gesamtvolumen) wurden in 100 µL PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 1 µL Ligase und 1,5 µL 10x Ligasepuffer eingesetzt. Die Volumina von Vektor- und Insertprobe wurden so gewählt, dass das molare Verhältnis von Vektor zu Insert bei der Ligation im Bereich von 1:2 bis 1:3 lag. Diese Abschätzung erfolgte anhand der DNA-Bandenintensität auf einem 1%igen Agarosegel. Das fehlende Volumen wurde ggf. mit ddH₂O aufgefüllt. Die Ligation erfolgte entweder für 1 h bei RT und über Nacht bei 4 °C oder ohne Vorinkubation über Nacht bei 16 °C.

2.8.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Inserts erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Methode von Sanger (1977).

Für die PCR-Amplifikation wurde das GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) sowie das Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB Corporation, USA) verwendet. Die verwendeten Primer besaßen eine 800IR-Markierung am 5'-Ende. Der Standardansatz für eine PCR-Reaktion war wie folgt:

| | |
|---------------------------------|-------------------|
| Plasmid-DNA | 10 μL |
| Reaktionspuffer | 2,5 μL |
| Primer (2 pmol/ μL) | 1 μL |
| Thermo Seq DNA Polymerase | 1,5 μL |
| ddH ₂ O | 2,5 μL |

Aus diesem Master-Ansatz wurden nach vortexen je 4 μL zu 3 μL eines der Terminations-Mischungen ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP pipettiert. Nach Ende der PCR wurden zu jedem Ansatz 3 μL Stopplösung zugegeben und die Probe wurde bis zum Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel bei -20°C gelagert. Das Protokoll der Touch-Down-Sequenzierungs-PCR für die LysC-Prosequenzen ist in Abbildung 2.3 dargestellt, das Protokoll der Sequenzierungs-PCR zur Verifizierung der *lac4*-Mutagenesen (vgl. 2.8.6) in Abbildung 2.4.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5 % [w/v] Acrylamid) erfolgte auf einen LI-COR IR² DNA Sequencer LONG READIR 4200 (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg) am Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte mit der zugehörigen e-seq DNA Sequencing and Analysis Software.

Material und Methoden

| | | |
|----------------------|-------|-------------|
| 95 °C | 4 min | |
| 95 °C | 30 s | } 16 Zyklen |
| 62 °C (-1 °C/Zyklus) | 30 s | |
| 72 °C | 1 min | |
| 95 °C | 30 s | } 25 Zyklen |
| 48 °C | 30 s | |
| 72 °C | 1 min | |
| 72 °C | 1 min | |
| 4 °C | ∞ | |

Abbildung 2.3: Protokoll der *lysC*-Sequenzierungs-PCR.

| | | |
|-------|------------------|-------------|
| 94 °C | 5 min | |
| 94 °C | 30 s | } 45 Zyklen |
| 50 °C | 30 s* / 1 min** | |
| 72 °C | 1 min* / 2 min** | |
| 72 °C | 2 min | |
| 8 °C | ∞ | |

Abbildung 2.4: Protokoll der Sequenzierungs-PCR zur Verifizierung der *lac4*-Mutagenesen (*: *lac4.mut1*; **: *lac4.mut2* und *lac 4.mut3*).

2.9 Elektrophorese

2.9.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen wurde das MINI-SUB Cell GT / Powerpac 200 System (BioRad Laboratories GmbH, München) verwendet. Das Lösen der Agarose in 1x TAE-Puffer wurde in einem Mikrowellengerät durchgeführt, die Agarosekonzentration der Gele betrug 1 % (w/v). 40 mL (6 x 10 cm Gele) bzw. 100 mL (15 x 10 cm Gele) Agaroselösung wurden in eine Gelkammer gegossen und ein Probenkamm für 8-20 Probenaschen wurde eingesetzt. Nach der Polymerisation der Agarose wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt, mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Vor dem Auftragen wurden 5-40 μL einer Probe mit 2-10 μL 6x DNA-Ladepuffer gemischt. Als Größenstandard dienten 5 μL der 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei 70-120 V für 30-120 min. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Gele für 2-10 min im Ethidiumbromid-Bad (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inkubiert. Nach Waschen der Gele in dH_2O wurde der mit der DNA interkalierende Farbstoff auf einem UV-Leuchttisch zur Fluoreszenz angeregt und die Dokumentation erfolgte mit dem Multimage Light Cabinet und der Alphalmager Software (Biozym Diagnostics GmbH, Hessisch Oldendorf).

1x TAE-Puffer (pH 8)

4,84 g/L Tris-HCl

0,11 % (v/v) Eisessig

1 mM EDTA

6x DNA-Ladepuffer (pH 7,5)

30 % (w/v) Glycerin

0,2 % (w/v) Bromphenolblau

5 mM EDTA

2.9.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970).

SDS-PAGE mit homogenem Gel (12 %) wurde in einer Mini-PROTEAN 3 Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Die Bestandteile des Trenngels (Tabelle 2.7) wurden in einem 14 mL Falcon-Reaktionsgefäß gemischt und nach Zugabe von APS sofort mittels einer Pasteurpipette zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Bis zur vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde die Lösung mit Ethanol überschichtet. Nach Entfernen des Ethanols erfolgten Herstellung und Gießen des Sammelgels (Tabelle 2.7) wie für das Trenngel beschrieben, wobei der Probenkamm luftblasenfrei in das noch nicht polymerisierte Sammelgel eingesetzt wurde.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel im Verhältnis 1:1 mit 1x SDS-Probenpuffer in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 5 min bei 95°C im Thermoschüttler denaturiert. Bei unlöslichen Proteinfractionen wurden vor der Denaturierung zusätzlich 5 μ L 6 M Harnstoff zugegeben. Pro Probe wurden 0,5-2 μ g (bei Silberfärbung) bzw. 2-5 μ g (bei Coomassiefärbung) Gesamtprotein auf ein Gel aufgetragen. Die Stromstärke während der Elektrophorese wurde 15 min konstant bei 20 mA und anschließend konstant bei 40-45 mA gehalten, bis der Abstand der Bromphenolblaubande zur Anode max. 2 cm betrug. Anschließend erfolgte die Färbung des Gels mittels Coomassie Brilliant Blue R-250 oder Silbernitrat. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sowie die Gelfärbeprotokolle sind in Tabelle 2.8 bis Tabelle 2.11 dargestellt.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung des 12 %igen SDS-Polyacrylamidgels.
 Angegeben sind die Mengen für 2 Gele.

| Reagenz | Volumen [mL] | |
|-----------------------------------|--------------|-----------|
| | Trenngel | Sammelgel |
| 1 M Tris-HCl (pH 8,8) | 3 | - |
| 1 M Tris-HCl (pH 6,8) | - | 0,425 |
| 10 % (w/v) SDS | 0,085 | 0,035 |
| dH ₂ O | 1,76 | 2,6 |
| 38 % Acrylamid / 2 % Bisacrylamid | 2,29 | 0,525 |
| 5 % (w/v) TEMED | 0,085 | 0,035 |
| 5 % (w/v) APS | 0,115 | 0,07 |

Tabelle 2.8: 1x Probenpuffer für SDS-PAGE

| Reagenz | Volumen [mL] |
|-----------------------------|--------------|
| 1 M Tris-HCl pH (6,8) | 0,5 |
| β -Mercaptoethanol | 0,4 |
| 10 % (w/v) SDS | 1,6 |
| 0,05 % (w/v) Bromphenolblau | 0,4 |
| Glycerin | 0,8 |

Tabelle 2.9: 1x Laufpuffer für SDS-PAGE

| Reagenz | Konzentration |
|----------|---------------|
| Tris-HCl | 0,3 % (w/v) |
| Glycin | 1,44 % (w/v) |
| SDS | 0,5 % (w/v) |

Tabelle 2.10: Protokoll zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.

Die Lösungen wurden vor jeder Färbung frisch hergestellt.

| Lösung | Inkubationsdauer |
|--|------------------------------|
| Fixierlösung 50 mL Ethanol 12 mL Eisessig 0,1 mM Formaldehyd ad 100 mL dH ₂ O | 1-24 h |
| 50 % (v/v) Ethanol | 3x 1-20 min |
| Thiosulfatlösung 20 mg Natriumthiosulfat-Pentahydrat 200 mL dH ₂ O | 1 min |
| dH ₂ O | 3x 20s |
| Imprägnierlösung 0,2 g Silbernitrat 75 µL Formaldehyd 100 mL dH ₂ O | 15-20 min |
| dH ₂ O | 2x 20 s |
| Entwickler 12 g Natriumcarbonat 100 µL Formaldehyd ad 100 mL dH ₂ O | bis Banden deutlich sichtbar |
| dH ₂ O | 10-20 s |
| Stopplösung 3,72 g EDTA ad 200 mL dH ₂ O | 10-20 s |
| ddH ₂ O | 1 min |

Tabelle 2.11: Protokoll zur Coomassiefärbung von Polyacrylamidgelen.

| Lösung | Inkubationsdauer |
|--|----------------------------|
| 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in 50 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure | 45 min |
| 20 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure | bis Banden sichtbar wurden |

SDS-PAGE mit Gradientengel (5-25 %) sowie native PAGE (20 % High Density Gel) wurden im PHAST System (Amersham Bioscience, Freiburg) durchgeführt. Probenvorbereitung, elektrophoretische Auftrennung und Silberfärbung in der angeschlossenen Färbekammer erfolgten nach den entsprechenden Herstellerprotokollen (Pharmacia Applikationen #110, #120 und #210).

Für die Aktivfärbung von LysC nach nativer PAGE wurden 10 mg Tos-Gly-Pro-Lys-pNA in 250 μ L DMF gelöst und mit 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) in einem Messkolben auf 10 mL aufgefüllt. Diese Substratlösung wurde in eine Petrischale (8,5 cm Durchmesser) gegeben und das Gel darin für 2 h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Umfärbung zur Farbtintensivierung erfolgte nach dem Protokoll von Božič und Vujčić (2005), dargestellt in Tabelle 2.12. Die Umfärbung lief bei RT ab.

Tabelle 2.12: Protokoll zur Umfärbung von pNA nach Polyacrylamidgel-Aktivfärbung (nach Božič und Vujčić, 2005).

| Lösung | Inkubationsdauer |
|--|------------------|
| 0,1 % (w/v) NaNO ₂ in 1 M HCl | 2 min |
| 1 % (w/v) Harnstoff in dH ₂ O | 30 s |
| 0,025 % N-1-Naphtyl-ethylendiamin-dihydrochlorid in 22 % (v/v) Ethanol | 10 min |

2.10 Bestimmung von Wachstumsparametern und Protein-konzentration

2.10.1 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die Methode von Bradford (1976) eingesetzt. In einer Halbmikro-Kunststoffküvette wurden 20 μL Probe mit 1 mL 1:5 verdünnter und vorfiltrierter Bradford-Lösung Roti-Quant (Roth, Karlsruhe) gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Mischen mittels Rührspatel wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch bestimmt (Ultrospec 1000, Amersham Bioscience, Freiburg). Als Referenz diente ein Ansatz mit ddH₂O bzw. Puffer anstatt Probe. Über eine Rinderserumalbumin-Kalibriergerade (Konzentrationsbereich 0 bis 0,8 g/L; siehe Anhang/Abbildung 8.3) wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

2.10.2 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Glucosekonzentration von Kulturmedien während der Kultivierung wurde enzymatisch mittels Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (HK/G6P-DH, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gemessen. Der verwendete TRA-Puffer (pH 7,6) enthielt 33,6 g/L Triethanolamin-HCl, 1,3 g/L NADP⁺, 2,15 g/L ATP und 0,9 g/L MgSO₄ * 7 H₂O. 1 mL des HK/G6P-DH Präparats (3 mg/mL) wurden vor Verwendung mit 0,47 mL ddH₂O in einem 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß verdünnt. Pipettierschema und Protokoll des Assays sind in Tabelle 2.13 gezeigt. Die jeweiligen Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, die Messung der Absorptionen bei 340 nm im Ultrospec 1000 Photometer (Amersham Biosciences, Freiburg). Mit Gleichung 2.1 wurde $\Delta A_{\text{Glucose}}$ errechnet, die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte über eine Glucose-Kalibriergerade (Konzentrationsbereich 0 bis 500 mg/L; siehe Anhang/Abbildung 8.3).

Tabelle 2.13: Pipettierschema und Protokoll des photometrischen Assays zur Bestimmung der Glucosekonzentration.

| Reagenz | Volumen |
|--|---------|
| TRA-Puffer | 0,5 mL |
| Probe oder ddH ₂ O | 0,4 mL |
| 3 min Inkubation, Absorptionsmessung bei 340 nm (A ₁) | |
| HK/G6P-DH | 10 µL |
| 25 min Inkubation, Absorptionsmessung bei 340 nm (A ₂) | |
| 5 min Inkubation, Absorptionsmessung bei 340 nm (A ₃) zur Kontrolle von Schleichreaktionen | |

$$\Delta A_{\text{Glucose}} = (A_2 - A_1)_{\text{Probe}} - (A_2 - A_1)_{\text{Referenz}}$$

A₁ Absorption nach 3 min bei 340 nm

A₂ Absorption nach 25 min bei 340 nm

Gleichung 2.1: Berechnung der Absorptionsänderung (λ = 340 nm) zur Bestimmung der Glucose-Konzentration.

2.10.3 Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) von Zellsuspensionen wurde mit einem Ultrospec 1000 Photometer (Amersham Biosciences, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm in Halbmikro-Küvetten bestimmt. Als Referenzprobe diente das entsprechende, nicht inokulierte Kulturmedium.

2.10.4 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße für 1 h bei 105-110°C inkubiert und anschließend gewogen. 1 mL der zu bestimmenden Probe wurde in einem vorgewogenen Eppendorf-

Reaktionsgefäß zentrifugiert (14000 x g, 2 min, Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg), der Überstand quantitativ entfernt und das Zellpellet für 1 h bei 105-110°C im Trockenschrank Elektronik VT 5050 EK (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) getrocknet. Danach folgte die gravimetrische Bestimmung der BTM an einer Precisa 120 A Feinwaage (PESA Waagen GmbH, Bisingen).

2.11 Enzymassays

2.11.1 Bestimmung der Protease-Aktivität mit chromogenen Peptid-Substraten

Die Proteaseaktivität wurde mittels eines photometrischen Assays gemessen. Als Substrate dienten Peptide, deren Carboxyterminus mit *para*-Nitroanilin (*p*NA) markiert war. Die hydrolytische Abspaltung des *p*NA wurde bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert. Über eine *p*NA-Kalibriergerade (Konzentrationsbereich 0 bis 0,2 mM; Anhang/Abbildung 8.5) wurde die Menge an freigesetztem *p*NA bestimmt und daraus mittels Gleichung 2.2 die Proteaseaktivität errechnet. 1 nkat Enzymaktivität ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die 1 nmol *p*NA in 1 s freisetzt.

Das Pipettierschema des Protease-Assays ist in Tabelle 2.14 dargestellt. Der Standardassay wurde im Thermoschüttler Eppendorf Comfort (Eppendorf, Hamburg) bei einer Temperatur von 37°C für 5 bis 30 min in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) mit Tos-Gly-Pro-Lys-*p*NA als Substrat in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nach Vorinkubation von Reaktionspuffer und Substrat für 2-5 min erfolgte die Zugabe der enzymhaltigen Probe. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µL 50 % (v/v) Essigsäure und anschließendem Abkühlen auf Eis. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg) bei 14000 x g und 4°C für 2 min abgetrennt, der Überstand in Halbmikro-Küvetten überführt und photometrisch bei 410 nm vermessen (Ultrospec 1000, Amersham Bioscience, Freiburg). Als Referenz diente ein Ansatz mit Puffer anstatt Probe.

Tabelle 2.14: Pipettierschema des Standardassays zur Bestimmung von Proteaseaktivität.

| Reagenz | Volumen [μL] |
|---------------------------------|---------------------------|
| Substratlösung (5 mg/mL in DMF) | 50 |
| Protease-Probe | 50-300 |
| 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) | ad 1000 |

$$EA = \frac{c(pNA) \cdot 1000}{t} \cdot \frac{V}{v}$$

| | |
|--------|--|
| EA | Enzymaktivität [nkat/mL] |
| c(pNA) | pNA-Konzentration [mM] |
| t | Assaydauer [s] |
| V | Volumen nach Abstoppen [μL] |
| v | Probenvolumen [μL] |

Gleichung 2.2: Berechnung der proteolytischen Enzymaktivität anhand der freigesetzten pNA-Menge.

2.11.2 Bestimmung der Protease-Aktivität mittels Ninhydrin-Reaktion

Die Proteaseaktivität des Kulturüberstandes von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* wurde über den Umsatz von Casein und anschließender Ninhydrin-Reaktion bestimmt. Bei der Ninhydrin-Reaktion entsteht in Gegenwart von Aminosäuren und Peptiden mit freier α -Aminogruppe ein violetter Farbstoff (Ruhemans-Violett). Die Absorption dieses gebildeten Farbstoffes bei 570 nm diente als Maß für die bei der enzymatischen Hydrolyse von Casein entstandenen freien α -Aminogruppen. Die Quantifizierung erfolgte über eine Tyrosin-Kalibriergerade

Material und Methoden

(Konzentrationsbereich 0 bis 0,55 mM; Anhang/Abbildung 8.7), die Berechnung der Proteaseaktivität mittels Gleichung 2.3. 1 nkat Enzymaktivität ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die 1 nmol Tyrosin in 1 s freisetzt.

Der Protease-Assay wurde in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 30 min bei 37°C im Thermoschüttler Eppendorf Comfort (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.15 dargestellt, Casein und Puffer wurden dabei vor Probenzugabe 2-5 min bei Reaktionstemperatur inkubiert. Abgestoppt wurde der Umsatz durch die Zugabe von 537 μL 0,35 M Trichloressigsäure (TCA). Als Referenz diente ein Ansatz, bei dem die Zugabe der TCA vor der Zugabe der Protease-Probe erfolgte. Für die anschließende Farbreaktion wurde der Ansatz gemäß Tabelle 2.16 pipettiert und für 20 min in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 95°C im Wasserbad inkubiert. Zum Abstoppen der Ninhydrin-Reaktion wurden die Proben in ein Eisbad überführt und für 2 min abgekühlt.

Für die Messung der Absorption bei 570 nm wurden 300 μL des Überstand in Halbmikro-Küvetten überführt, mit 1000 μL Isopropanol:dH₂O (1:1) gemischt und photometrisch vermessen (Ultrospec 1000, Amersham Bioscience, Freiburg).

Tabelle 2.15: Pipettierschema des Protease-Assays zur Bestimmung der Aktivität mit Casein als Substrat.

| Reagenz | Volumen [μL] |
|----------------------------|---------------------------|
| 0,5 % (w/v) bovines Casein | 225 |
| Protease-Probe | 112,5 |
| 50 mM Tris-HCl (pH 8) | 112,5 |

Tabelle 2.16: Pipettierschema der Ninhydrin-Reaktion.

| Reagenz | Volumen [μL] |
|--|---------------------------|
| Probe aus Casein-Umsatz | 250 |
| 4 M Acetat-Puffer (pH 5,5) | 250 |
| 1 M NaOH | 75 |
| 1,74 % (w/v) Ninhydrin und 0,28 % (w/v) Hydrindantin in Methoxyethanol | 250 |

$$EA = \frac{c(\text{Tyr}) \cdot 1000}{t} \cdot \frac{V}{v}$$

| | |
|--------|--|
| EA | Enzymaktivität [nkat/mL] |
| c(Tyr) | Tyrosin-Konzentration [mM] |
| t | Assaydauer [s] |
| V | Volumen nach Abstoppen [μL] |
| v | Probenvolumen [μL] |

Gleichung 2.3: Berechnung der proteolytischen Enzymaktivität anhand der freigesetzten Tyrosin-Menge.

2.11.3 Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität

Als Substrat für die photometrische Enzymaktivitätsbestimmung von β -Galactosidasen wurde *ortho*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (*o*NP-Gal) als Substrat eingesetzt. Die Detektion des hydrolytisch abgespaltenen *o*NP erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm. Das Pipettierschema des β -Galactosidase-Assays ist in Tabelle 2.17 dargestellt. Substrat und Puffer wurden in einer Halbmikro-Küvette gemischt und in einem Ultrospec 3000 Photometer (Amersham Bioscience, Freiburg) bei 37°C vorinkubiert. Die Temperierung erfolgte über ein angeschlossenes Julabo-EH 5 Wasserbad (Julabo Labortechnik, Seelbach). Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymlösung gestartet und der Verlauf der Absorptionzunahme bei 405 nm im Zeitraum von 5 bis 120 s nach Probenzugabe wurde aufgenommen. Aus der Steigung der aus der Initialgeschwindigkeit resultierenden Geraden wurde die Enzymaktivität mittels Gleichung 2.4 berechnet. 1 nkat Enzymaktivität ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die 1 nmol *o*NP in 1 s freisetzt.

Tabelle 2.17: Pipettierschema des Assays zur Bestimmung von β -Galactosidase-Aktivität.

| Reagenz | Volumen [μ L] |
|--|--------------------|
| oNP-Gal (50 mM in Reaktionspuffer) | 600 |
| Puffer (50 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,75, 12 mM Magnesiumchlorid, 15 mM Kaliumchlorid) | 500 |
| β -Galactosidase-Probe | 100 |

$$EA = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V}{v \cdot \epsilon \cdot d}$$

| | |
|---------------------|---|
| EA | Enzymaktivität [nkat/mL] |
| $\Delta A/\Delta t$ | Absorptionsänderung pro Zeit [s^{-1}] |
| V | Volumen nach Abstoppen [μ L] |
| v | Probenvolumen [μ L] |
| ϵ | Absorptionskoeffizient von oNP: 1,635 L/mmol*cm (Liu, 2008) |
| d | Schichtdicke der Küvette (= 1 cm) |

Gleichung 2.4: Berechnung der β -Galaktosidase-Aktivität mit oNP-Gal als Substrat.

2.12 Kultivierung von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* zur Bildung der Protease PRT1 (nach Dow et al., 1990)

2.12.1 Schüttelkolbenkultivierung von *X. campestris* pv. *campestris*

Animpfen und Kultivierung der Übernacht-Vorkultur (5 mL NYG-Medium) und der Hauptkultur (400 mL NYG-Medium) erfolgte wie unter 2.7.3 beschrieben. Die Wachstumstemperatur betrug 28°C und die Schüttelgeschwindigkeit 100 Upm. Die Hauptkultur wurde im Verhältnis 1:100 mit der Vorkultur inokuliert. 24 h nach Inokulierung wurden die Zellen bei 10000 Upm für 10 min mit einer Sorvall RC5C Zentrifuge (4°C, GSA-Rotor, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) geerntet.

2.12.2 Aufarbeitung des proteasehaltigen Kulturüberstandes

Die gelösten Proteine in 100 mL des Kulturüberstandes wurden auf Eis unter Rühren (Magnetrührer IKAMAG REO, IKA Labortechnik, Staufen) durch schrittweise Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 65 % (w/v) präzipitiert. Der Fällungsansatz wurde anschließend bei 19000 Upm und 4°C für 15 min zentrifugiert (Sorvall RC5C Zentrifuge, SS-34 Rotor, Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Nach Abdekantieren des Überstandes wurde das Protein-Pellet für 1 h bei 4°C unter Rühren auf einem Magnetrührer in 5 mL 10 mM Tris-HCl (pH 8) gelöst. Die Protease-Lösung wurde über Nacht bei 4°C gegen 1,5 L 3,5 mM Tris-HCl (pH 8) und anschließend für 5 h gegen 1,5 L 10 mM Tris-HCl (pH 8) dialysiert.

In 4 mL des Protease-Dialysats wurde der Metalloprotease-Inhibitor 1,10-Phenantrolin gelöst (Endkonzentration: 5 mM) und der Ansatz wurde für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Gesamt-Proteaseaktivität des Dialysats mit und ohne Phenantrolin wurde über die Ninhydrin-Reaktion bestimmt (2.11.2).

2.12.3 Untersuchung der Substratspezifität von PRT1

Das *Xanthomonas campestris* Protease-Dialysat mit 1,10-Phenanthrolin (2.12.2) wurde zur Bestimmung der Protease-Aktivität von PRT1 gegenüber verschiedenen chromogenen Peptidsubstraten eingesetzt. Der Assay wurde wie unter 2.11.1 beschrieben durchgeführt. Als Puffer wurde 50 mM Tris-HCl (pH 8) verwendet. Die bezüglich ihrer Umsetzung durch PRT1 untersuchten Modellsubstrate waren:

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA

Ala-Phe-pNA

Z-Ala-Ala-Leu-pNA

Z-Gly-Gly-Leu-pNA

Ala-Ala-Pro-Leu-pNA

Pyr-Phe-Leu-pNA

Ala-Phe-Pro-pNA

Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-pNA

Tos-Gly-Pro-Lys-pNA.

Als Referenz diente ein Ansatz mit Reaktionspuffer anstatt Protease-Dialysat.

2.13 Herstellung rekombinanter Lysyl-Endopeptidase LysC mit *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC

2.13.1 Schüttelkolbenkultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC

Animpfen und Kultivierung der Übernachtskultivierung (4 mL) und der Hauptkultur (200 mL) erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit 1 % (w/v) Glucose und 100 µg/mL Ampicillin. Die Induktion der Expression des MGSK-LysC-Genkonstrukts erfolgte bei einer optischen Zelldichte (OD₆₀₀) von 0,6 durch die sterile Zugabe von 0,4 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). 6 h

nach Induktion wurden die Zellen bei 8000 Upm und 4 °C für 5-8 min geerntet (F-34-6-38 Rotor, Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.13.2 Bioreaktorkultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC

Alle Vorkulturen wurden unter Schüttelkolbenbedingungen (2.7.1) durchgeführt. Die erste Vorkultur (Vk I) wurde in 5 mL LB-Medium mit 1 % (w/v) Glucose und 100 µg/mL Ampicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Inokulum diente eine frisch transformierte *E. coli* BL21 (DE3) pET20b-MGSK-LysC (vgl. 2.8.7) Einzelkolonie. Die zweite Vorkultur (Vk II) wurde in 50 mL des gleichen Mediums für 8 h bei 37 °C inkubiert. Als Inokulum dienten 4 mL aus Vk I. Die dritte Vorkultur (Vk III) wurde in 250 mL des gleichen Mediums über Nacht inkubiert und mit 25 mL von Vk II inokuliert. Dies erfolgte parallel in zwei Ansätzen.

Die Bioreaktorkultivierung wurde in einem Biostat E Rührkesselfermenter (B. Braun, Melsungen) mit einem Arbeitsvolumen von 5 L *E. coli* Minimalmedium (siehe 2.6) durchgeführt. Als Inokulum dienten 2 x 250 mL Vk III. Während der Fermentation wurde der pH durch NH₃-Titration (12,5 % [v/v]) auf 7,0 reguliert. Die Begasung erfolgte mit 0,3 vvm steriler Luft. Die anfängliche Drehzahl des 6-Blatt-Scheibenrührers von 300 Upm wurde schrittweise auf 1000 Upm erhöht, um zu jederzeit einen pO₂ von mindestens 40 % zu gewährleisten. Bei starker Schaumbildung wurden steril 1-2 Tropfen Antifoam Y-30 Emulsion (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugegeben. Die Induktion der heterologen MGSK-LysC-Genexpression erfolgte bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 2,5 durch sterile Zugabe von 0,4 mM IPTG. In regelmäßigen Abständen wurden steril Proben entnommen und OD₆₀₀, Biotrockenmasse und Glucosekonzentration bestimmt (vgl. 2.10.2, 2.10.3, 2.10.4). Zur Bestimmung der im Laufe der Fermentation gebildeten LysC-Aktivität wurden ab der Induktion zusätzlich Proben von 100 mL (bis OD₆₀₀ = 8,4) bzw. 50 mL entnommen, die darin enthaltenen Zellen wurden mit einer Eppendorfszentrifuge 5804R (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert (F-34-6-38 Rotor, 8000 Upm, 5-8 min, 4 °C) und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren. Das Ernten der Zellmasse erfolgte nach vollständigem Verbrauch der im Medium enthaltenen

Glucose und dem damit verbundenen sprunghaften Anstieg des pO_2 auf 100 %. mit einer Sorvall RC5C Zentrifuge (8000 Upm, 15 min, 4°C, GS-3 Rotor, Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Nach Waschen mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) wurden die Zellen bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.14 Herstellung rekombinanter LysC-Propeptide mit *E. coli* BL21 (DE3) pET20b-Npro-LysC bzw. pET20b-Cpro-LysC

Die Schüttelkolbenkultivierungen zur Herstellung der rekombinanten LysC-Propeptide erfolgten wie unter 2.7.1 beschrieben bei 37°C und 120 Upm.

Die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-Npro-LysC wurde in 200 mL LB-Medium mit 1 % (w/v) Glucose und 100 µg/mL Ampicillin durchgeführt, wobei ein 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet wurde. Die Induktion der Propeptidbildung erfolgte bei einer optischen Zelldichte (OD_{600}) von 0,6 durch die sterile Zugabe von 0,4 mM IPTG. 2,5 h nach Induktion wurden die Zellen mit einer Zentrifuge 5804R (Eppendorf, Hamburg) geerntet (F-34-6-38 Rotor, 8000 Upm, 5 min, 4°C) und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

E. coli BL21 (DE3) pET20b-Cpro-LysC wurde analog in 400 mL LB-Medium mit 1 % (w/v) Glucose und 100 µg/mL Ampicillin kultiviert (2 L Schikanenkolben). Das Ernten der Zellen erfolgte 23 h nach IPTG-Induktion durch Zentrifugation mit einer Sorvall RC5C Zentrifuge (8000 Upm, 15 min, 4°C, GS-3-Rotor, Thermo Fisher Scientific, Dreieich).

2.15 Bioreaktorkultivierung von *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* zur Bestimmung der LysC-Aktivität

Die Übernacht-Vorkultur (10 mL Medium A) wurde wie unter 2.7.4 beschrieben angeimpft und inkubiert. Der Multifors-Bioreaktor (Infors, Schweiz) wurde mit der gesamten Vorkultur inokuliert, das Arbeitsvolumen betrug 1 L Medium A. Die Rührerdrehzahl wurde von 300 Upm schrittweise auf 1000 Upm erhöht, sodass der pO_2 zu jedem Zeitpunkt mindestens 20 % betrug. Begast wurde mit steriler Luft, die

Begasungsrate war 0,2-0,3 vvm, eingestellt über einen Schwebekörper-Durchflussmesser. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden steril Aliquots entnommen (ca. 5 mL) und mit einer Zentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert (14000 x g, 4 min, 4 °C). Danach wurden Biotrockenmasse (siehe 2.10.4) und LysC-Aktivität des Überstandes (siehe 2.11.1) bestimmt. Aufgrund der Eigenfärbung des Mediums diente für den photometrischen Proteaseassay eine Probe mit inaktiviertem Enzym als Referenz, bei der die Essigsäurezugabe vor der Substratzugabe erfolgte. Die Untersuchung auf eventuelle Verkeimungen erfolgte mit einem Laborlux K Mikroskop (Leitz, Wetzlar). Beendet wurde die Fermentation nach 68 h.

2.16 Herstellung rekombinanter β -Galactosidase Lac4 in *Lactobacillus plantarum* NC8

Vorkultur (5 mL MRS-Medium) und Hauptkultur (100 mL MRS-Medium) wurden wie unter 2.7.2 beschrieben durchgeführt. Als Antibiotikum wurde Erythromycin (10 μ g/mL) steril zum Medium gegeben. Die Inokulierung der Hauptkultur erfolgte so, dass die Anfangs-OD₆₀₀ bei 0,1 lag. Die Induktion der heterologen Expression der Lac4-Genvarianten erfolgte bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,3 durch sterile Zugabe von 50 ng/mL Spp-IP (Sakacin P induzierendes Peptid). Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 1,8 mit einer Zentrifuge 5804R (Eppendorf, Hamburg) geerntet (F-34-6-38 Rotor, 8000 Upm, 8 min, 4 °C), einmal mit Kalium-Phosphatpuffer (pH 6,75) gewaschen, erneut zentrifugiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.17 Zellaufschluss

2.17.1 Aufschluss von *E. coli*

Der Zellaufschluss von *E. coli* Zellen erfolgte mittels Ultraschall (UPS 200S, Dr. Hielscher, Teltow) wie unter 2.18.1 angegeben.

2.17.2 **Aufschluss von *Lactobacillus* sp.**

Der Aufschluss von *Lactobacillus* sp. Zellen erfolgte mittels Glasperlen (Durchmesser <106 µm, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Retsch-Kugelmühle nach dem Protokoll von van de Guchte et al. (1990). 1,2 mL Zellsuspension wurden luftblasenfrei zu 2 g Glasperlen in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Aufschlussdauer der Zellsuspension (10-30 % [w/v]) betrug 20-60 min bei einer Schüttelfrequenz von 30 s⁻¹ und wurde im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Das Abtrennen der Kugeln und Zelltrümmer nach Aufschluss erfolgte durch Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C für 3 min (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg).

Beim Aufschluss von *L. plantarum* NC8 pSIP409-lac4.mut1 bis 3 wurden in einem 14 mL Sarstedt-Röhrchen 0,3-0,6 g Biofeuchtmasse in 3-5 mL 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,75) mit 12 mM MgCl₂ und 15 mM KCl resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 µg/mL Lysozym wurde der Ansatz für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Ultraschall für 10 x 2 min im Eisbad behandelt (Ultraschallprozessor UPS 200S, Dr. Hielscher, Teltow). Der anschließende Glaskugelaufschluss erfolgte nach Mischen von 1,2 mL Zellsuspension und 2 g Glaskugeln (s.o.) für insgesamt 30 min auf einem Vortexer VV3 (VWR, Darmstadt).

2.18 **Aufarbeitung von *E. coli* „Inclusion Bodies“**

2.18.1 **Solubilisierung der LysC „Inclusion Bodies“ und Protease-Renaturierung**

Zellaufschluss der *E. coli* Wirtszellen, Solubilisierung der LysC „Inclusion Bodies“ (IB) sowie Renaturierung des Enzyms erfolgten nach dem Protokoll von Kopetzki und Karcher (1999).

Das Zellpellet wurde in 5 mL 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) pro 1 g Biofeuchtmasse unter Rühren resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,25 mg/mL Lysozym wurde die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall-Behandlung (Ultraschallprozessor UPS 200S, Dr. Hielscher, Teltow) bei einer Intensität von 95 % und einem Impulsintervall von 0,5 für 10-30 x 1 min im

Material und Methoden

Eisbad. Die Kontrolle des Aufschlusses erfolgte unter dem Mikroskop (Labolux K, Leitz, Wetzlar). Anschließend wurde die Suspension mit 0,5 Vol. „Inclusion Body“ Waschpuffer gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei hoher Viskosität aufgrund von DNA wurden 10 μL Benzonase (Merck, Darmstadt) und MgCl_2 (Endkonzentration 1-2 mM) zupipettiert und die DNA für 20-30 min bei 4°C verdaut. Benzonase-Zugabe und Inkubation wurden bei Bedarf wiederholt. Nach Zentrifugation bei 12000 Upm und 4°C für 15 min (Sorvall RC5C Zentrifuge, GSA-Rotor, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) in vorgewogenen Zentrifugenbechern wurde der Überstand verworfen und dieser Waschschrift 1-2 Mal wiederholt. Das IB-Pellet wurde pro 1 g Biofeuchtmasse in 10 mL Solubilisierungspuffer für 1-3 h unter Rühren bei Raumtemperatur in Lösung gebracht. Nach Einstellen auf pH 5 mit 0,5-1 M HCl wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation für 10-12 min bei 16000 Upm und 4°C (SS34-Rotor) abgetrennt. Der Überstand wurde gegen das 100fache des Probenvolumens (100 Vol.) an 4-5 M Guanidinium-HCl (pH 5) für 20-24 h bei 4°C dialysiert. Zur Renaturierung der Protease wurde dieses Dialysat bei 4°C zu 100 Vol. Renaturierungspuffer gegeben. Bei Dialysat-Volumina bis 4 mL wurden 0,5-1 mL Aliquots im Abstand von 1-2 h zugegeben, bei größeren Volumina erfolgte die Zugabe mittels einer Peristaltikpumpe 101U (Watson-Marlow, Rommerskirchen) bei einer Flussrate von 1-3 mL/h. Anschließend wurde der Renaturierungsansatz über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Aufkonzentrierung (10-40fach) erfolgte über Vivaflow Crossflow Filtrationskassetten bzw. Vivaspin Zentrifugenröhrchen (Sartorius, Göttingen) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa nach Herstellerangaben. Das enzymhaltige Retentat wurde gegen mind. 100 Vol. 20 mM Tris-HCl (pH 9) über Nacht bei Raumtemperatur dialysiert, unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (23000-30000 x g, 20-25 min, 4°C) abgetrennt und das LysC-Dialysat bei -20°C gelagert.

Das Schema der „Inclusion Body“ Solubilisierung und *in vitro* Renaturierung (Abbildung 2.5) sowie die Zusammensetzung der eingesetzten Puffer und Lösungen ist im Folgenden dargestellt.

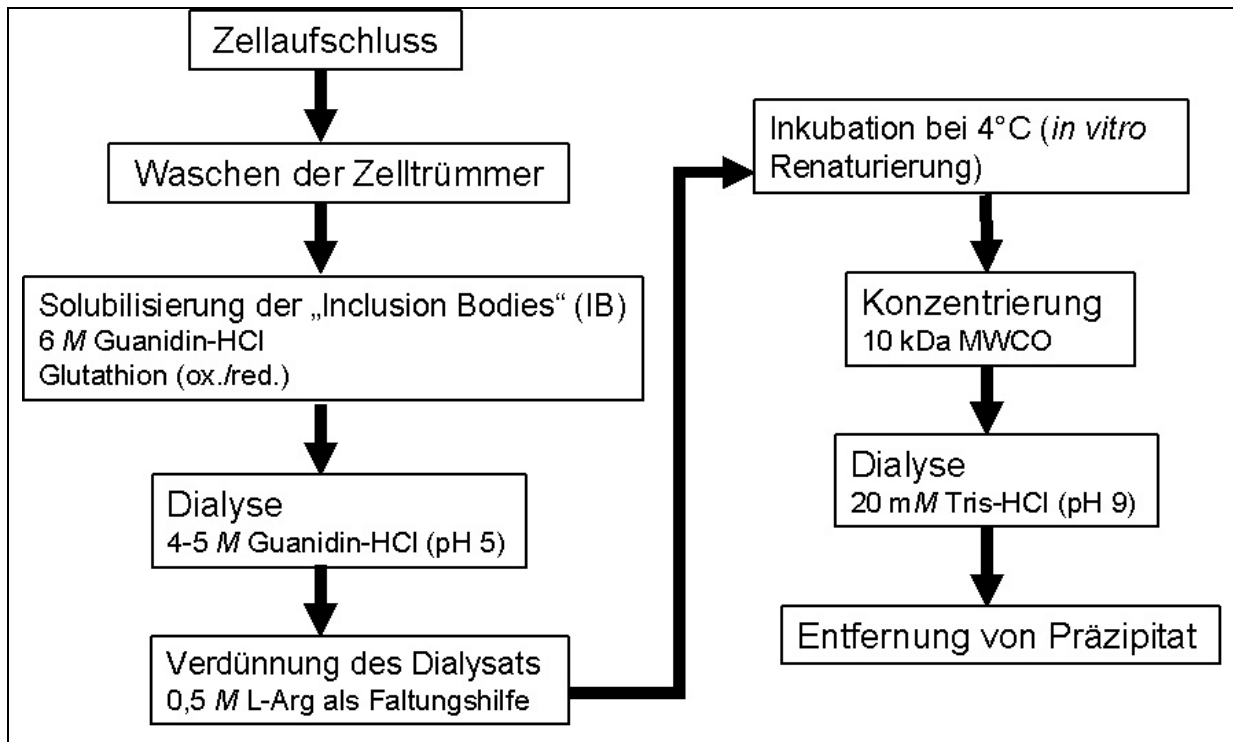


Abbildung 2.5: Schema der „Inclusion Body“ Solubilisierung und *in vitro* Renaturierung.

Inclusion Body Waschpuffer (pH 7,2)

50 mM Tris-HCl
60 mM EDTA
1,5 M NaCl
6 % (v/v) Triton-X

Solubilisierungspuffer (pH 8)

6 M Guanidinium-HCl
100 mM Tris-HCl
20 mM EDTA
150 mM oxidiertes Glutathion (GSSG)
15 mM reduziertes Glutathion (GSH)

Guanidinium-HCl (pH 5)

4-5 M Guanidinium-HCl

Renaturierungspuffer (pH 8,5)

50 mM Tris-HCl
0,5 M L-Arginin
0,4 M NaCl
20 mM CaCl₂
1 mM EDTA
0,5 mM L-Cystein

2.18.2 Aufarbeitung der als „Inclusion Bodies“ gebildeten LysC-Propeptide

Nach Ultraschall-Zellaufschluss (vgl. 2.18.1) und Kontrolle der Überexpression mittels SDS-PAGE (2.9.2) erfolgte die Solubilisierung der Npro-LysC- bzw. Cpro-LysC „Inclusion Bodies“ wie für LysC beschrieben (2.18.1). Nach dem Einstellen auf pH 5 mit 0,5-1 M HCl und dem Abtrennen von unlöslichen Bestandteile mit einer Sorvall RC5C Zentrifuge (16000 Upm, 10-12 min, 4°C, SS34-Rotor, Thermo Fisher Dreieich) wurde der Überstand bei 4°C für 20-24 h gegen 5-10 L 20 mM Tris-HCl (pH 9) dialysiert und bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

2.18.3 Renaturierung von LysC mit C- bzw. N-terminalem Propeptid als Faltungshilfe

Bis zur Dialyse gegen Guanidinium-HCl erfolgte die Aufarbeitung der LysC „Inclusion Bodies“ wie unter 2.18.1 beschrieben (vgl. Abbildung 2.5., Schritt 1-4). Für die Enzym-Renaturierung (vgl. Abbildung 2.5., Schritt 5) wurden LysC-Dialysat (in 5 M Guanidinium-HCl) und Propeptid-Dialysat (in 20 mM Tris-HCl [pH 9]) in einem Proteinmengenverhältnis von 1:1 zum Renaturierungspuffer ohne L-Arginin zugegeben. Das Gesamtvolumen der Renaturierung betrug 100 Vol. des eingesetzten LysC-Dialysats. Zugabe, Inkubation, Aufkonzentrierung und Dialyse

gegen 20 mM Tris-HCl (pH 9) wurden wie unter 2.18.1 angegeben durchgeführt (vgl. Abbildung 2.5., Schritt 6-9).

2.19 Charakterisierung der rekombinanten Lysyl-Endopeptidase LysC

Alle pNA-Assays zur Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften von LysC wurden wie unter 2.11.1 beschrieben durchgeführt, Abweichungen sind im Einzelnen angegeben.

2.19.1 Bestimmung der Substratspezifität von LysC

Zur Untersuchung der Substratspezifität wurden folgende chromogenen Peptide als Substrate für LysC eingesetzt und die entsprechende Enzymaktivität unter Standardbedingungen (T = 37 °C, pH 8,5) bestimmt:

Tos-Gly-Pro-Lys-pNA (Standardsubstrat)

Suc-Ala-Ala-Pro-pNA

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

Z-Ala-Ala-Leu-pNA

Ala-Ala-Pro-Leu-pNA

Ala-Phe- Pro-pNA

Bz-Arg-pNA

Pyr-Phe-Leu-pNA.

2.19.2 Bestimmung des pH-Optimums von LysC

Das pH-Optimum wurde im Bereich von pH 6-11 ermittelt. Als Reaktionspuffer dienten hierzu 25 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6–7), 25 mM Tris-HCl (pH 7–10) und 20 mM Citrat-Phosphat-Borat-HCl (pH 10–11) nach Teorell und Stenhagen

(1938). Enzymlösung und Puffer wurden 1 min bei 37°C vorinkubiert, danach wurde die Reaktion durch die Zugabe des Standardsubstrats gestartet.

2.19.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums von LysC

Das Temperatur-Optimum von LysC wurde in einem Bereich zwischen 22,5°C (Raumtemperatur) und 60°C bestimmt. Alle Inkubationen über 22,5°C wurden im Thermoschüttler Comfort (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Standardreaktionspuffer und Standardsubstrat wurden 2 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert und anschließend erfolgte die Zugabe der Enzymlösung zum Start der Reaktion.

2.19.4 Bestimmung der pH-Stabilität von LysC

Für die Ermittlung der pH-Stabilität wurden je 50 µL des Protease-Dialysats zu 450 µL 25 mM Acetatpuffer (pH 4,5), 25 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,5), 25 mM Tris-HCl (pH 8,5-9) oder 20 mM Citrat-Phosphat-Borate-HCl (pH 10,5) gegeben. Sofort nach Zugabe und nach 22 h bei 4°C wurden 50 µL jedes Ansatzes entnommen und unter Standardbedingungen (2.11.1) die Enzymaktivität von LysC bestimmt. Der Quotient aus 22 h-Aktivität und 0 h-Aktivität ergab die prozentuale Restaktivität.

2.19.5 Bestimmung der Temperatur-Stabilität von LysC

Um die Stabilität von LysC bei unterschiedlichen Temperaturen zu bestimmen, wurden je 2 mL des Protease-Dialysats bei 4°C (Kühlschrank), 37°C und 45°C (Thermoschüttler Comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 100 µL Probe entnommen und unter Standardbedingungen (2.11.1) wurde die Aktivität bestimmt. Die Berechnung der

Halbwertszeit der Enzymaktivität erfolgte über die Gleichungen 2.5 (a) und (b) durch Gleichsetzen an k_T .

$$\frac{EA}{EA_0} = e^{k_T \cdot t} \quad \text{(a)}$$

$$t_H = \frac{\ln 2}{k_T} \quad \text{(b)}$$

EA: Enzymaktivität zum Zeitpunkt t

EA₀: Enzymaktivität zum Zeitpunkt 0

k_T: Geschwindigkeitskonstante [min⁻¹]

t: Zeit [min]

t_H: Halbwertszeit [min]

Gleichungen 2.5: Berechnung der Halbwertszeit von Enzymaktivitäten.

2.19.6 Einfluss von Inhibitoren, Lösungsmittel und Ionen auf die LysC-Aktivität

Die Wirkung von verschiedenen Protease-Inhibitoren, Lösungsmitteln und Ionen auf die LysC-Aktivität wurde untersucht. Dazu wurden 100 µL Inhibitor- bzw. Salzlösung oder Lösungsmittel zusammen mit 100 µL LysC-Dialysat und 750 µL 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) für 20 min bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µL Tos-Gly-Pro-Lys-pNA (5 mg/mL) erfolgte der Umsatz für 25 min bei 37°C wie unter 2.11.1. beschrieben. Untersucht wurden die Protease-Inhibitoren PMSF (1 mM, 10 mM) und EDTA (1 mM), die Kationen Ba²⁺, Ca²⁺, Na⁺, NH₄⁺ und Mn²⁺ (jeweils als Chlorid-Salz, 1 mM) sowie die Alkohole Isopropanol und Ethanol (jeweils 10% [v/v]). Als Blank diente ein Ansatz mit 100 µL ddH₂O anstatt Inhibitorlösung.

2.20 Casein-Hydrolyse zur Generierung funktioneller Peptide

2.20.1 Casein-Hydrolyse mit Lysyl-Endopeptidase LysC

Das LysC-Dialysat (2.18.1) wurde zur Hydrolyse von bovinem Casein (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingesetzt. Dazu wurden 100 mL Dialysat mittels einer Ultrafiltrationszelle (Amicon Modell 402, Millipore, Schwalbach) und Vivaspin-Säulen (Sartorius, Göttingen) mit einer Ausschlussgrenze von jeweils 10 kDa auf 5 mL ($8,44 \text{ nkat}_{\text{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}}/\text{mL}$) konzentriert.

Die Hydrolyse wurde mit 30 mL Arbeitsvolumen in einem 50 mL Glas-Bioreaktor unter Rühren durchgeführt. 0,65 % (w/v) Casein und 0,065 % (w/v) NaN_3 (zur Vermeidung von mikrobiellen Kontaminationen) wurden ca. 1 h in 27,5 mL 25 mM Tris-HCl (pH 9) bei 37°C vorinkubiert und gelöst. Durch Zugabe von 2,5 mL ($21,1 \text{ nkat}_{\text{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}}$) LysC-Lösung wurde die Hydrolyse gestartet. Der pH wurde mittels Titration von 0,1 N NaOH konstant gehalten (Titroline Alpha, Schott Instruments, Mainz). Die Hydrolysetemperatur lag konstant bei 37°C. Nach 4 h Hydrolysedauer wurden 0,15 g Casein und 0,015 g NaN_3 zugegeben, nach 24 h nochmals die gleichen Mengen und 2,5 mL ($21,1 \text{ nkat}_{\text{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}}$) LysC-Lösung. Nach 48 h wurde die Hydrolyse durch Zentrifugation (8000 Upm, 10 min, 4°C; Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) und Cross Flow Filtration durch eine 10 kDa Vivaflow-Kassette (Sartorius, Göttingen) abgebrochen. Das Hydrolysat wurde anschließend aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.20.2 HPLC-Analyse des Casein-Hydrolysats

Mittels hydrophober Interaktions-Chromatographie (HIC) wurden die Fragmente des Casein-Hydrolysats (2.20.1) aufgetrennt und so ein „Fingerprint“ erstellt. HPLC-System und Trennprotokoll sind im Folgenden aufgeführt.

HPLC System

| | |
|-------------|--------------------------|
| Firma | Thermo Fisher Scientific |
| Degaser | SCM 1000 |
| Autosampler | AS 1000 |
| Pumpe | P 2000 |
| Detektor | UV 1000 |
| Software | ChromQuest 4.2 |

Trennprotokoll

| | | | |
|-----------------------|--|----------|---------|
| Säule | Aqua C18 200A; 150 x 4,6 mm; 5 μ m; Phenomenex, Niederlande | | |
| Injektionsvolumen | 20 μ L | | |
| Detektionswellenlänge | 220 nm | | |
| Mobile Phase | 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH ₂ O (A) bzw. in Acetonitril (B). | | |
| Flussrate | 0,5 mL/min | | |
| Gradient | 0-5 min (konst.) | A: 100 % | B: 0 % |
| | 5-45 min (lin. Grad.) | A: 40 % | B: 60 % |
| | 45-55 min (konst.) | A: 40 % | B: 60 % |
| | 55-57 min (lin. Grad.) | A: 100 % | B: 0 % |
| | 57-65 min (konst.) | A: 100 % | B: 0 % |

Vor der massenspektrometrischen Untersuchung wurden die Salze des Casein-Hydrolysats chromatographisch abgetrennt (Retentionszeit des Salzpeaks ca. 2,5 min). HPLC-System und Trennprotokoll sind im Folgenden aufgeführt.

HPLC System

| | |
|----------|------------------------------------|
| Firma | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |
| Degaser | SpectraSystem |
| Pumpe | SpectraSystem 4000 |
| Detektor | SpectraSystem UV 2000 |
| Software | ChromQuest 4.2.34 |

Trennprotokoll

| | | | |
|-----------------------|--|---------|---------|
| Säule | Gromsil 120 ODS 3CP; 125 x 4,6 mm; 3 μm ; Grom, Rottenburg | | |
| Injektionsvolumen | 50 μL | | |
| Detektionswellenlänge | 220 nm | | |
| Mobile Phase | 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH ₂ O (A) bzw. in Acetonitril (B). | | |
| Flussrate | 0,6 mL/min | | |
| Gradient | 0-10 min (konst.) | A: 90 % | B: 10 % |
| | 10-15 min (lin. Grad.) | A: 20 % | B: 80 % |
| | 15-25 min (konst.) | A: 20 % | B: 80 % |
| | 25-26 min (lin. Grad.) | A: 90 % | B: 10 % |
| | 26-36 min (konst.) | A: 90 % | B: 10 % |

2.20.3 Massenspektrometrische Analyse des Casein-Hydrolysats

Nach der Entsalzung (2.20.2) wurde die Caseinhydrolysat-Probe in flüssigem N₂ gefroren und über Nacht lyophilisiert (Alpha 1-2, Christ, Osterode). Die LC-ESI-MS/MS-Analyse (liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry) wurde im Life Science Center der Universität Hohenheim durchgeführt. Das HPLC-Protokoll ist im Folgenden gezeigt.

Trennprotokoll

| | |
|-------------------|--|
| Vorsäule | nano Aquity UPLC Symmetry C18; 20 mm x 180 μm ; 5 μm Waters, USA |
| Säule | nano Aquity UPLC; 200 mm x 75 μm ; 1,7 μm Waters, USA |
| Injektionsvolumen | 4 μL |

Material und Methoden

| | | | |
|--------------|--|---------|---------|
| Mobile Phase | 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH ₂ O (A) bzw. in Acetonitril (B). | | |
| Flussrate | 250 nL/min | | |
| Gradient | 0-1 min (konst.) | A: 99 % | B: 1 % |
| | 1-90 min (lin. Grad.) | A: 60 % | B: 40 % |
| | 90-95 min (lin. Grad.) | A: 15 % | B: 85 % |
| | 95-100 min (konst.) | A: 15 % | B: 85 % |
| | 100-101 min (lin. Grad.) | A: 99 % | B: 1 % |

Die Tandem-MS wurde mit einem LTQ Orbitrap XL Spektrometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) durchgeführt. Die Kapillartemperatur betrug 200°C, die Ionisierungs-Spannung 1,5 kV. Massenspektren wurden im Bereich von 250-1800 Da mit einem Orbitrap Massen-Analysator bei einer Massenauflösung von 60000 (bei $m/z = 400$) aufgenommen. Die normalisierte Kollisionsenergie war 35 eV in N₂. Die Datenauswertung erfolgte mit der Xcalibur Software V2.0 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Für die Recherche in Peptidatenbanken wurden Mascot 2.2 (www.matrixscience.com) und SEQUEST in der BioWorks Software V3.3.1 (Thermo Finnigan, USA) verwendet.

2.21 Assays zum Nachweis bioaktiver Eigenschaften des Casein-Hydrolysats

2.21.1 Bestimmung von antioxidativer Wirksamkeit (Radikalfänger-Aktivität)

Zur Bestimmung der antioxidativen Wirksamkeit (Radikalfänger-Aktivität) des Casein-Hydrolysats wurde ein Decolorisations-Assay nach Re et al. (1999) durchgeführt. Zur Bildung des benötigten ABTS^{•+}-Radikals wurden 7 mM ABTS (2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) mit 2,45 mM Ammoniumpersulfat in 30 mL PBS gelöst und für 12-16 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Assay wurde 1 mL dieser ABTS^{•+}-Lösung mit 10 µL Casein-Hydrolysat-Probe in einer

Halbmikro-Küvette gemischt und im Dunkeln für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 734 nm im Ultrospec 3000 Photometer (Amersham Bioscience, Freiburg) gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz mit 10 μL dH_2O anstatt Casein-Hydrolysat-Probe. Die prozentuale Inhibition wurde über Gleichung 2.6 berechnet. Anhand dieser prozentualen Inhibition wurde mittels einer Kalibriergeraden des wasserlöslichen Vitamin-E-Derivats Trolox (Konzentrationsbereich 0-3 mM, siehe Anhang/Abbildung 8.3) die antioxidative Wirkung in TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) quantifiziert.

$$\text{Inhibition}[\%] = \left(1 - \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Ref}}} \right) \cdot 100\%$$

A_{Probe} : Absorption der Probe bei $\lambda = 734$ nm

A_{Ref} : Absorption der Referenzprobe bei $\lambda = 734$ nm

Gleichung 2.6: Berechnung der prozentualen antioxidativen Inhibition.

2.21.2 Bestimmung von Lipoxygenase-Inhibition

Die inhibitorische Wirksamkeit des Casein-Hydrolyсата gegenüber dem Enzym Lipoxygenase (LOX-1 aus Sojabohnen, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde mit dem Assay nach Somvanshi et al. (2008) untersucht.

800 μL Substratlösung wurden zusammen mit 100 μL Probe für 5 min bei 25 °C im Ultrospec 3000 Photometer (Amersham Bioscience, Freiburg) vorinkubiert. Nach der Zugabe von 100 μL Lipoxygenase-Lösung (1 mg LOX/mL Borax-Puffer; 9 U/mL) und kurzem Mischen durch Pipettieren wurde die Absorptionsänderung bei 234 nm in Quarzküvetten aufgenommen. Als Referenz diente ein Ansatz mit Puffer anstatt Probe. Dieser Ansatz wurde jeweils direkt nach der Casein-Hydrolysat-Probe vermessen. Die prozentuale Inhibition errechnete sich aus dem Quotienten der Steigungen $\Delta A/\Delta t$ im linearen Bereich.

Borax-Puffer

100 mM Borsäure
mit 100 mM NaOH auf pH 8 titriert

Substratlösung

100 mM Borax-Puffer (pH 8)
10 mM Linolensäure
0,1 % (v/v) Tween 20

2.21.3 Bestimmung von ACE-Inhibierung

Der Assay zur Bestimmung der ACE-inhibierenden Aktivität wurde nach Cushman und Cheung (1971) durchgeführt. 75 μL Substratlösung in 100 mM Na-Boratpuffer wurden mit 10 μL Hydrolysat-Probe für 5 min bei 37°C vorinkubiert (Thermoschüttler Comfort, Eppendorf, Hamburg). Nach der Zugabe von 10 μL ACE (0,1 U/mL in ddH₂O) erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde der Umsatz mit 20 μL 1 M HCl abgestoppt. Als Referenz diente ein Ansatz mit ddH₂O anstatt Probe. 100 μL jedes Ansatzes wurden in ein HPLC-Vial überführt und nach unten aufgeführter HPLC-Methode vermessen. Die Berechnung der ACE-inhibitorischen Aktivität erfolgte nach Gleichung 2.7.

$$\text{Inhibition}[\%] = \left(\frac{HA_{\text{Ref}} - HA_{\text{Probe}}}{HA_{\text{Ref}}} \right) \cdot 100\%$$

HA_{Ref}: Fläche unter dem Hippurysäure-Peak der Referenzprobe

HA_{Probe}: Fläche unter dem Hippurysäure-Peak der Probe

Gleichung 2.7: Berechnung der prozentualen ACE-Inhibierung.

Na-Borat-Puffer

100 mM Na-Borat

400 mM NaCl

mit 0,1-1 M NaOH auf pH 8,3 titriert

Substratlösung

5 mM Hippuryl-L-histidyl-L-leucin (Hip-His-Leu) in Na-Borat-Puffer

HPLC System

| | |
|-------------|--------------------------|
| Firma | Thermo Fisher Scientific |
| Degaser | SCM 1000 |
| Autosampler | AS 1000 |
| Pumpe | P 2000 |
| Detektor | UV 1000 |
| Software | ChromQuest 4.2 |

HPLC-Trennprotokoll

| | | | |
|-----------------------|--|----------|---------|
| Säule | Aqua C18 200A; 150 x 4,6 mm; 5 μ m; Phenomenex, Niederlande | | |
| Injektionsvolumen | 20 μ L | | |
| Detektionswellenlänge | 228 nm | | |
| Mobile Phase | 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH ₂ O (A) bzw. in Acetonitril (B). | | |
| Flussrate | 0,5 mL/min | | |
| Gradient | 0-5 min (konst.) | A: 100 % | B: 0 % |
| | 5-27 min (lin. Grad.) | A: 67 % | B: 33 % |
| | 27-30 min (konst.) | A: 67 % | B: 33 % |
| | 30-32 min (lin. Grad.) | A: 100 % | B: 0 % |
| | 32-37 min (konst.) | A: 100 % | B: 0 % |

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, eine sequenzspezifische Protease in quantitativen Mengen herzustellen, um anschließend neben der biochemischen Charakterisierung der Protease auch eine enzymatische Hydrolyse von bovinem Casein zur Generierung funktioneller Peptide durchführen zu können. Hierfür wurden in Vorarbeiten mögliche Zielenzyme bzw. Bakterienstämme über eine Literaturrecherche festgelegt, welche sowohl wissenschaftliches als auch technologisches Potential für eine entsprechende Arbeit versprachen. Neben Proteasen aus verschiedenen *Xanthomonas*-Stämmen wurde auch eine Endopeptidase aus *Lysobacter enzymogenes* ausgewählt.

Es wurde zu Beginn die Serinprotease PRT1 aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* auf ihre Substratspezifität hin untersucht. Des Weiteren wurden Kultivierungen zur Bildung von nativer und rekombinanter Lysyl-Endopeptidase LysC aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* durchgeführt und verglichen.

3.1 Untersuchung der Substratspezifität von PRT1 aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Für das Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* wurde beschrieben, dass es die Serinprotease PRT1 und die Metalloprotease PRT2 bildet und diese ins Kulturmedium sekretiert (Dow et al., 1990). Beide Enzyme gemeinsam bilden den Hauptanteil der extrazellulären Proteaseaktivität dieses Organismus. Über die Substratspezifität von PRT1 war bekannt, dass dieses Enzym eine Peptidbindung mit hydrophobem Aminosäurerest an P1-Position besser hydrolysiert als solche mit einem positiv geladenen Rest an dieser Position. Um das Substratspektrum von PRT1 genauer zu beschreiben und so zu untersuchen, ob es sich hierbei um eine sequenzspezifische Protease handelt, wurde *X. campestris* pv. *campestris* im Schüttelkolben kultiviert. Der Überstand einer Übernachtskultur wurde aufgearbeitet, die Metalloprotease PRT2 inhibiert und die Substratspezifität gegenüber 8 chromogenen Modellsubstraten untersucht.

3.1.1 Schüttelkolbenkultivierung von *X. campestris* pv. *campestris* und Aufarbeitung des Überstandes

Die Schüttelkolbenkultivierung wurde bei 28°C und 100 Upm in 400 mL NYG-Medium durchgeführt (2.6). Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen ($OD_{600} = 2,9$) durch Zentrifugation abgetrennt und die Proteine des Überstandes durch Zugabe von 65 % (w/v) Ammoniumsulfat präzipitiert. Nach Lösen des Präzipitats in 10 mM Tris-HCl (pH 8), Dialyse gegen 3,5 mM Tris-HCl (pH 8) und anschließend gegen 10 mM Tris-HCl (pH 8) wurde einem Teil des Protease-Dialysats der Metalloprotease-Inhibitor 1,10-Phenantrolin zugesetzt, um so PRT2 zu inhibieren. Die Gesamt-Proteaseaktivität des Dialysats vor und nach Phenantrolinzugabe wurde über die Hydrolyse von Casein mittels Ninhydrin-Reaktion bestimmt (2.11.2). Dabei ergab sich für das Dialysat ohne Phenantrolin eine Aktivität von 0,5 $\text{nkcat}_{\text{Casein}}/\text{mL}$, für das mit Phenantrolin eine Aktivität von 0,34 $\text{nkcat}_{\text{Casein}}/\text{mL}$. Diese Inhibierung um ca. 30 % zeigte, dass die im Dialysat enthaltene Metalloprotease PRT2 durch die Zugabe von Phenantrolin deutlich gehemmt wurde.

Das PRT1-Dialysat wurde daraufhin für den Umsatz verschiedener chromogener Peptidsubstrate eingesetzt, um die Substratspezifität dieser Protease zu untersuchen.

3.1.2 Umsatz verschiedener Modellsubstrate mit PRT1

Das *Xanthomonas* PRT1-Dialysat (siehe 3.1.1) wurde eingesetzt, um verschiedene chromogene Modellpeptide auf ihre Eignung als PRT1-Substrat zu untersuchen. Die Messungen der Proteaseaktivitäten wurden bei 37°C in 50 mM Tris-HCl (pH 8) durchgeführt (2.12.3). Hierbei wurde bei den Umsätzen mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (0,65 nkcat/mL), Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA (0,55 nkcat/mL) und Ala-Phe-pNA (1,1 nkcat/mL) die höchsten Aktivitäten bestimmt (Abbildung 3.1). Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass PRT1 eine Präferenz für hydrophobe, aromatische Aminosäureseitenketten an Position P1 zeigt, während positiv geladene sowie kleine, ungeladene Reste an dieser Position in einer niedrigeren Aktivität beim Umsatz des Substrats resultieren. Allerdings wurden die Substrate Ala-Ala-Pro-Leu-pNA

Ergebnisse

(0,15 nkat/mL) und Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-pNA (0,24 nkat/mL) ebenfalls von PRT1 umgesetzt, so dass es sich bei diesem Enzym nicht um eine sequenzspezifische Protease handelt.

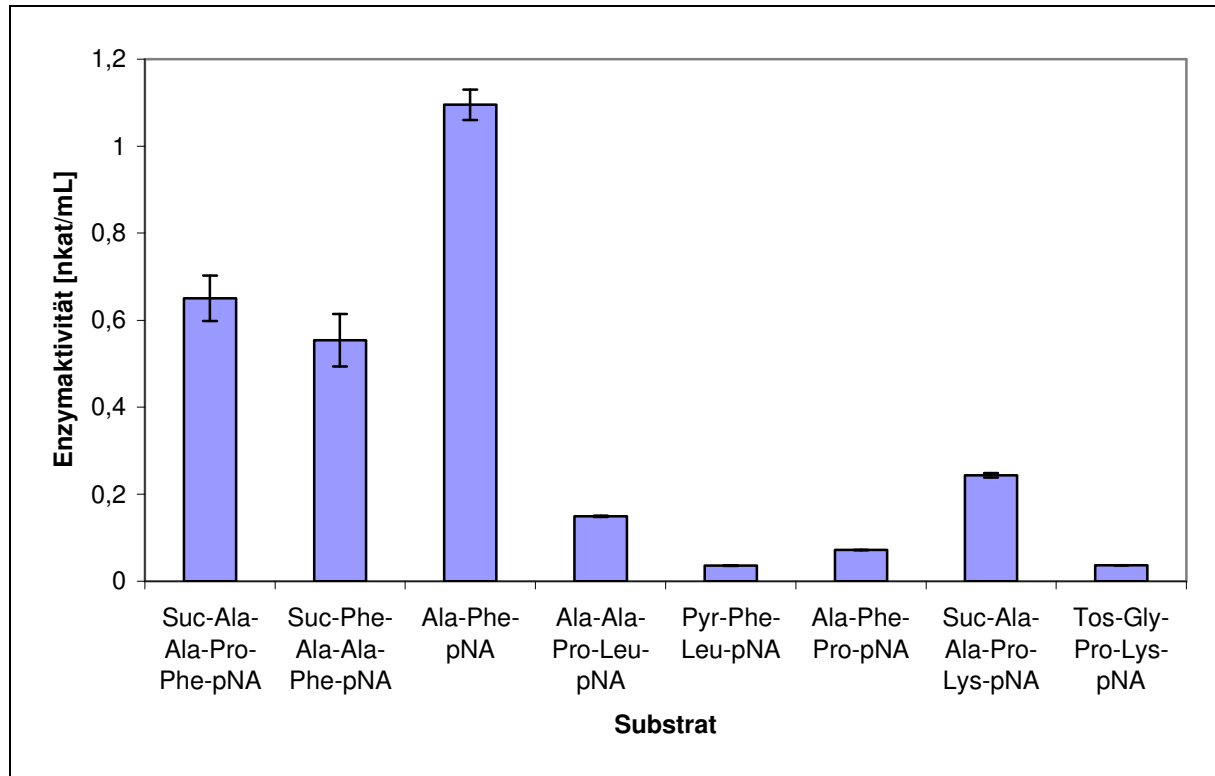


Abbildung 3.1: Aktivität von PRT1 aus *X. campestris* gegenüber verschiedenen Modellsubstraten. Die Umsätze erfolgten bei 37°C in 50 mM Tris-HCl (pH 8). Dargestellt sind die Ergebnisse von Doppelbestimmungen.

3.2 Bioreaktor-Kultivierung von *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* ATCC 27796

Da die Serinprotease PRT1 aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* nicht die gewünschte Substratspezifität zeigte (vgl. 3.1.2), wurde für die weitere Arbeit die Lysyl-Endopeptidase LysC aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* untersucht. Bei Lysyl-Endopeptidasen ist eine hohe Substratspezifität für die Hydrolyse von Peptidbindungen nach Lysinresten beschrieben.

Ergebnisse

Es wurde bereits gezeigt, dass *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* ATCC 27796 die Lysyl-Endopeptidase LysC bildet und sekretiert (Schrenk und Wunderwald, 1982). Um den Verlauf der LysC-Aktivität im Kulturüberstand aufzunehmen, quantifizieren und so den optimalen Zeitpunkt zum Beenden der Fermentation bestimmen zu können, wurde dieser Stamm unter aeroben Bedingungen in 1 L Medium A (2.6) bei 30°C in einem Multifors-Fermentersystem kultiviert (2.15). Inokuliert wurde mit 10 mL einer Vorkultur im gleichen Medium. Nach 0, 20, 28, 43, 45, 53 und 68 h wurden steril Proben entnommen und sowohl Biotrockenmasse (BTM, siehe 2.10.4) als auch LysC-Aktivität (siehe 2.11.1) im Kulturüberstand bestimmt. Letzteres erfolgte unter Standardbedingungen bei 37°C in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) mit dem von Schrenk und Wunderwald (1982) beschriebenen Substrat Tos-Gly-Pro-Lys-pNA. Alle entnommenen Proben wurden unter dem Mikroskop auf mikrobielle Kontaminationen untersucht, wobei zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung Fremdorganismen detektiert werden konnten.

In Abbildung 3.2 ist der Verlauf der Fermentation von *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* dargestellt. Nach einem Wachstumsverlauf zu Beginn wurde die maximale LysC-Aktivität von 0,084 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/mL nach 45 h bei der maximalen Biotrockenmasse von 7,8 g/L erreicht. Bereits nach 53 h nahmen sowohl Enzymaktivität als auch Biotrockenmasse deutlich ab und nach 68 h wurde die Fermentation abgebrochen, da sowohl BTM als auch LysC-Aktivität nur noch weniger als 20 % des entsprechenden Maximalwertes betragen. Die apparente Biotrockenmasse von ca. 2 g/L zu Beginn der Kultivierung (0 h) ist durch ungelöste Mediumbestandteile, insbesondere Casein, zu erklären. Da während der Fermentation ständig Casein hydrolysiert und nachgelöst wurde, konnte die tatsächliche BTM nicht durch Abziehen der anfänglichen 2 g/L von den späteren Messwerten erfolgen. Der Verlauf der LysC-Aktivität entspricht dem aus Schüttelkolben-Vorversuchen, wobei hier die maximale Aktivität aufgrund der limitierenden Zellwachstumsbedingungen (mangelnde O₂-Zufuhr) erst nach ca. 5 Tagen erreicht wurde (nicht dargestellt).

L. enzymogenes ssp. *enzymogenes* sekretierte zwar während des Wachstums detektierbare Mengen an Lysyl-Endopeptidase ins Kulturmedium, jedoch lag dabei die maximal erreichte LysC-Aktivität bei nur 0,084 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/mL. Um

Ergebnisse

größere Mengen dieses Enzyms zu erhalten, wurde alternativ zur Wildtyp-Kultivierung die rekombinante Herstellung von LysC in *E. coli* untersucht.

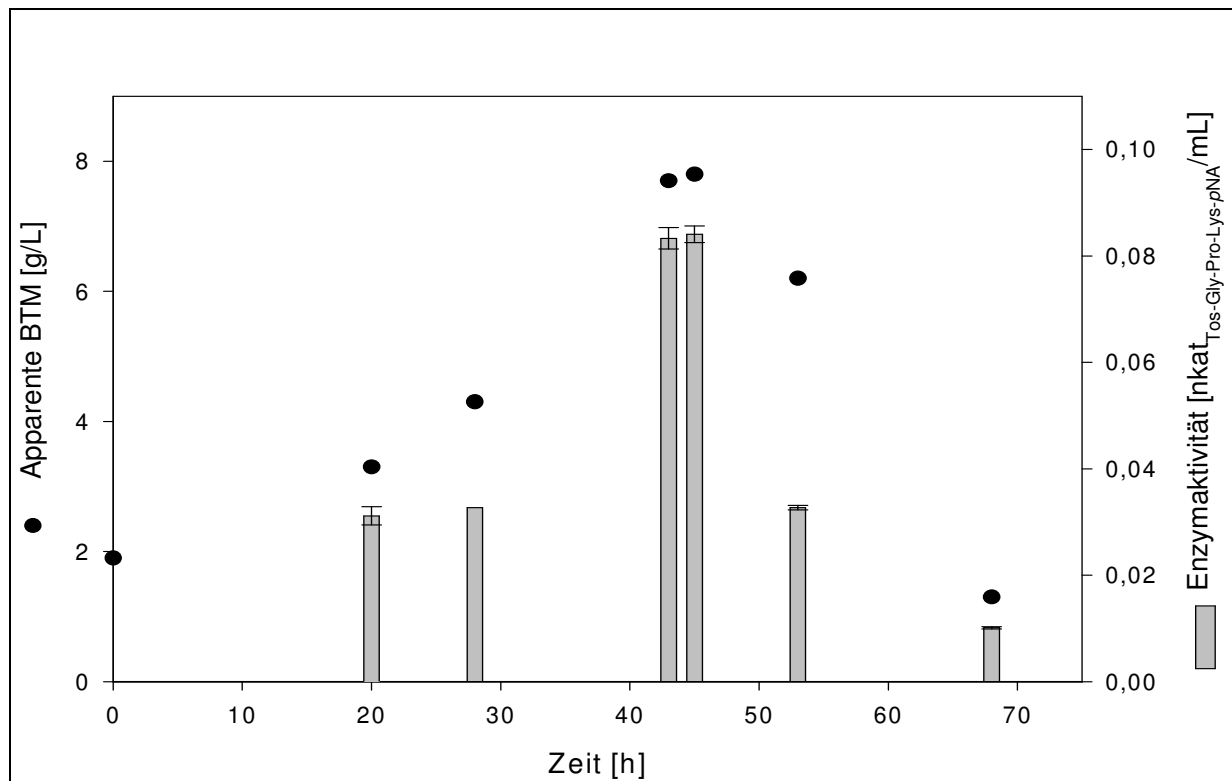


Abbildung 3.2: Verlauf der Bioreaktor-Kultivierung von *Lysobacter enzymogenes ssp. enzymogenes*. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C in 1 L Medium A. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte unter Standardbedingungen (vgl. 2.11.1) in Doppelbestimmung.

3.3 Klonierung des LysC-Gens aus *Lysobacter enzymogenes ssp. enzymogenes* und heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3)

Um die gebildete Menge an Lysyl-Endopeptidase gegenüber der Wildtyp-Kultivierung (3.2) zu erhöhen, wurde das LysC-Gen in den *E. coli* Expressionsvektor pET20b(+) kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimiert.

3.3.1 Konstruktion des Expressionsvektors pET20b-LysC

Für die Herstellung von rekombinanter Lysyl-Endopeptidase in *E. coli* wurde zuerst die Expression des Volllängen-Gens untersucht. Dieses codiert für ein Zymogen, welches eine Signalsequenz, eine N-terminale Prosequenz, die Protease selbst und eine C-terminale Prosequenz umfasst (Abbildung 3.3). Hierfür wurde das LysC-Gen aus *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* (2025 bp) mittels PCR (2.8.5) aus genomischer DNA amplifiziert. Die Sequenzen der eingesetzten Primer LysC_for und LysC_rev (Tabelle 2.3) wurden anhand des homologen Gens der *Achromobacter lyticus* Protease I (API, Accession Nr. J05128; ca 86 % Übereinstimmung) konstruiert. Auf dem entsprechenden Agarosegel (Abbildung 3.4) ist bei allen PCR-Ansätzen eine einzelne, ca. 2 kb große DNA-Bande zu erkennen. Nach *NdeI*/*BamHI*-Restriktionsspaltung von PCR-Amplicon und *E. coli* Expressionsvektor pET20b(+) (2.8.9), Dephosphorylierung des Vektors (2.8.10) und anschließender Gelaufreinigung der DNA-Fragmente (2.8.4) erfolgte die Ligation für 1 h bei 20°C, 2,5 h bei 16°C und anschließend über Nacht bei 4°C. Das entsprechende Klonierungsschema ist in Abbildung 3.5 dargestellt, die Expression in pET20b(+) unterliegt der Kontrolle des T7-Promotors. Hitzekompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert (vgl. 2.8.7). Auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin gewachsene Kolonien wurden im entsprechenden Flüssigmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach der Plasmid-Isolation von pET20b-LysC (siehe 2.8.1) erfolgte die Verifizierung der positiven Transformanden über einen Kontroll-Restriktionsspaltung mit *BamHI*/*NdeI* und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (nicht dargestellt).

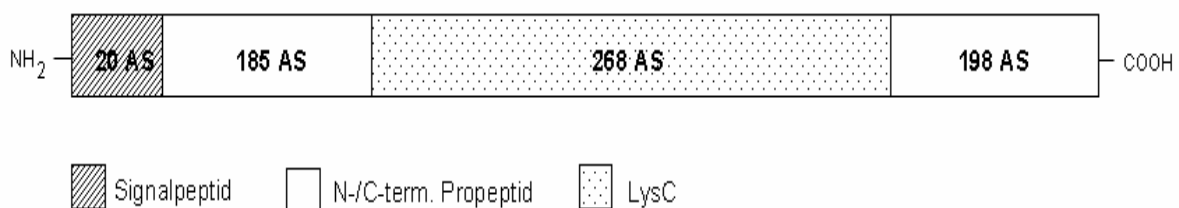


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau des LysC-Zymogens. Angegebenen sind die Größen für LysC aus *Lysobacter* sp. IB-9374 (MERO16072). AS: Aminosäuren

Ergebnisse

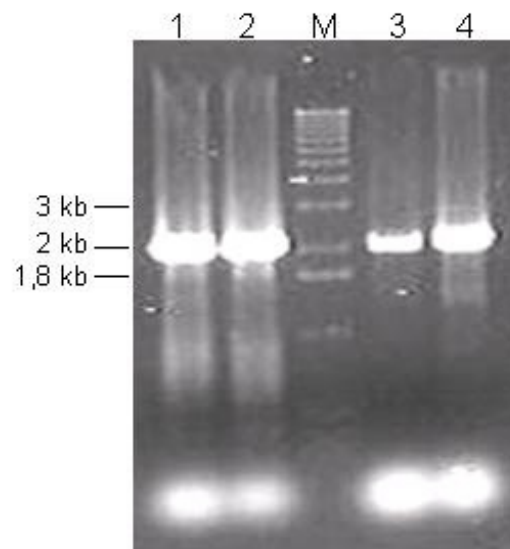


Abbildung 3.4: Agarosegel-Elektrophorese der *lysC*-PCR-Ansätze. Die Annealing-Temperaturen lagen bei 61,6°C (1 und 2) und 65,5°C (3 und 4). Ansatz 1 und 3 enthielten Q-Solution. Die Gelkonzentration betrug 1 % (w/v), die angelegte Spannung 100 V (siehe 2.9.1). Links sind die Größen der entsprechenden Banden des DNA-Markers (M) angegeben.

Ergebnisse

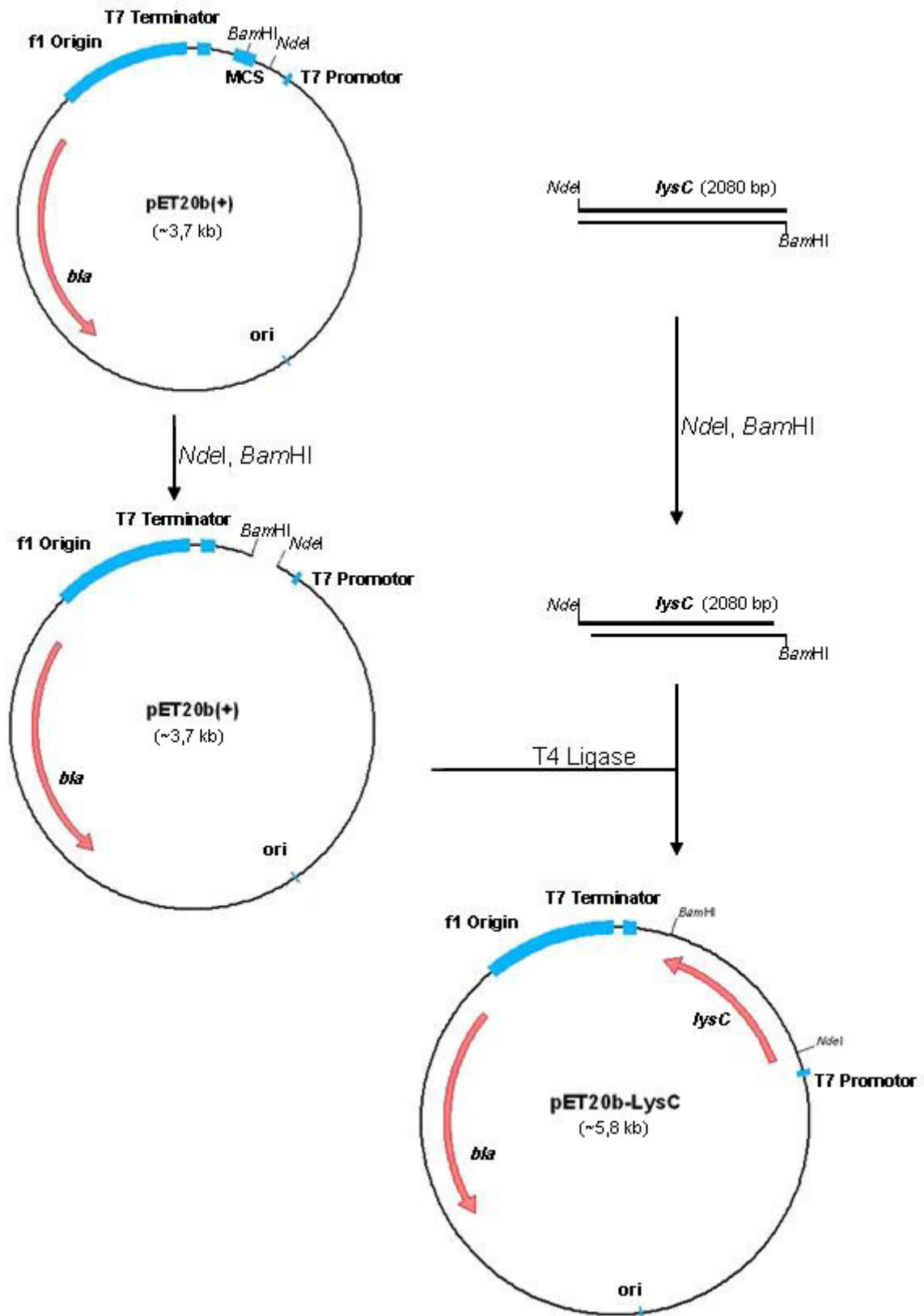


Abbildung 3.5: Klonierungsschema von pET20b-LysC. *ori*: Replikationsursprung; *bla*: Ampicillinresistenz-Gen; MCS: Multiple Cloning Site; *lysC*: Lysyl-Endopeptidase-Gen [Prä-Po(N)-LysC-Pro(C)]

3.3.2 Schüttelkolben-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-LysC

Der Expressionsvektor pET20b-LysC wurde in hitzekompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert (siehe 2.8.7). Die Schüttelkolben-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-LysC in 100 mL LB-Medium mit 1 % (w/v) Glucose und 100 µg/mL Ampicillin wurde durch Zugabe von 1 % (v/v) einer entsprechenden Vorkultur gestartet. Die Expression des heterologen *lysC* wurde durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG bei $OD_{600} = 0,5$ induziert. Nach Kultivierung für 6 h bei 37°C und anschließendem Ultraschallzellaufschluss (2.17.1) wurden der Kulturüberstand, der Überstand des Zellaufschlusses sowie die resuspendierten Zelltrümmer auf LysC-spezifische Proteaseaktivität untersucht (vgl. 2.11.1) und die Proteine der jeweiligen Fraktionen über eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung aufgetrennt und sichtbar gemacht (2.9.2). Dabei konnte weder in einer der untersuchten Fraktionen eine LysC-spezifische Enzymaktivität festgestellt werden, noch zeigte sich nach Gelelektrophorese die Überexpression eines Proteins mit der apparenten Größe von LysC (~31 kDa) (nicht dargestellt). Mögliche Gründe hierfür waren neben der deutlich abweichenden „Codon Usage“ von *E. coli* und *L. enzymogenes* vermutlich auch Probleme bei der Prozessierung des LysC-Zymogens zur aktiven Protease.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Herstellung von rekombinanter Lysyl-Endopeptidase über die Expression eines bereits beschriebenen LysC-Genkonstrukts erreicht.

3.4 Klonierung und Expression des MGSK-LysC Genkonstrukts in *E. coli* BL21(DE3)

Da die heterologe Expression des LysC-Precursorgens zu keiner nachweisbaren rekombinanten Protease geführt hatte (siehe 3.3.2), wurde die Expression nach einem Patent von Kopetzki und Karcher (1999) durchgeführt.

Das darin beschriebene, an die *E. coli* „Codon Usage“ angepasste Genkonstrukt *MGSK-lysC* (Sequenz siehe Anhang/Abbildung 8.1) wurde von Geneart (Regensburg) synthetisiert (vgl. 2.4.1). Diese DNA-Sequenz codiert nur für die mature Lysyl-Endopeptidase und für eine 4 Aminosäuren (Met-Gly-Ser-Lys) lange,

Ergebnisse

artifizielle Prosequenz, welche eine autokatalytische Schnittstelle enthält. Signalsequenz und C-terminale Prosequenz sind nicht enthalten bzw. im Patent beschrieben. Auch die nativen Gensequenzen von N-terminalem Propeptid und LysC wurden im Patent nicht dargestellt. Ziel dieser Expression ist die Bildung von inaktiver und unlöslicher Protease („Inclusion Bodies“). Die Solubilisierung dieser „Inclusion Bodies“ sowie die *in vitro* Renaturierung zu aktiver Protease wurden ebenfalls von Kopetzki und Karcher (1999) beschrieben.

3.4.1 Konstruktion des Expressionsvektors pET20b-MGSK-LysC

Die Vektoren pET20b(+) und pGA18-MGSK-LysC (Geneart, Regensburg) wurden jeweils mit *Nco*I und *Hind*III gespalten (vgl. 2.8.9). Das dabei ausgeschnittene MGSK-LysC Genkonstrukt sowie der linearisierte pET20b(+) Vektor wurden nach Extraktion aus einem präparativen Agarosegel (2.8.4) für 30 min bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C ligiert (Klonierungsschema siehe Abbildung 3.6). Anschließend wurden hitzekompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert (2.8.7). Auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin gewachsene Kolonien wurden im entsprechenden Flüssigmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach der Plasmid-Isolierung (siehe 2.8.1) erfolgte die Verifizierung der positiven Transformanden über einen Kontroll-Restriktionsspaltung mit *Nco*I/*Hind*III und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (nicht dargestellt). Der daraus resultierende Expressionsvektor pET20b-MGSK-LysC wurde für die heterologe Expression in hitzekompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert.

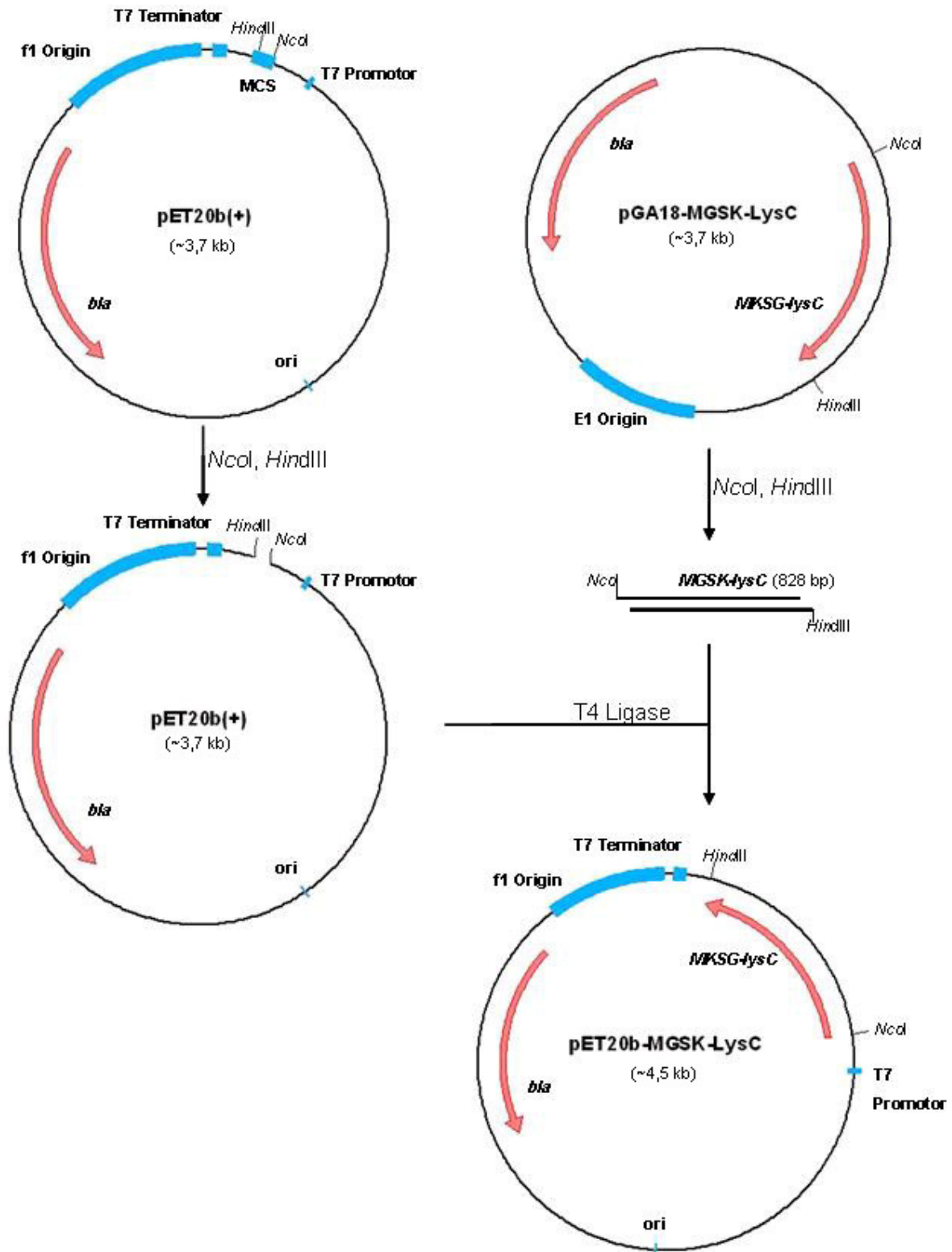


Abbildung 3.6: Klonierungsschema von pET20b-MGSK-LysC. Der Vektor pGA18-MGSK-LysC wurde von Geneart (Regensburg) bezogen. ori: Replikationsursprung; bla: Ampicillinresistenz-Gen; MCS: Multiple Cloning Site; MGSK-LysC: Lysyl-Endopeptidase-Genkonstrukt.

3.4.2 Schüttelkolben-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)-MGSK-LysC

Die Schüttelkolben-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC bei 37°C in 100 mL LB-Medium mit 1 % (w/v) Glucose und 100 µg/mL Ampicillin wurde durch Zugabe von 1 % (v/v) einer entsprechenden Übernachtskultur gestartet. Als Kontrolle diente ein untransformierter *E. coli* BL21(DE3) Stamm. Induziert wurde die Expression des heterologen *MGSK-lysC* durch Zugabe von 0,4 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6. 6 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet (2.13.1), mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. 2.17.1) und die unlösliche Fraktion nach Zentrifugation zweimal mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) gewaschen. Zur Expressionskontrolle wurden die unlöslichen Zellfragmente in 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) resuspendiert. Jeweils 2 µg Protein (bestimmt über Bradford-Methode, 2.10.1) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.9.2) und die Proteine über Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 3.7). Hierbei zeigte sich ausschließlich in den Zellfragmenten des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC eine deutliche Proteinbande von ~31 kDa Größe, was der apparenten Größe der Lysyl-Endopeptidase LysC entspricht (errechnete Größe: 29 kDa). Dies bestätigte, dass die rekombinante Protease wie erwartet in Form von unlöslichen „Inclusion Bodies“ in den Zellen gebildet wurde.

Da im Gegensatz zur heterologen Expression des gesamten LysC-Gens (3.3.2) die Expression von *MGSK-lysC* zu einer nachweisbaren Bildung von rekombinanter Lysyl-Endopeptidase in *E. coli* geführt hatte, wurden die dabei gebildeten „Inclusion Bodies“ für die Solubilisierung und Protease-Renaturierung verwendet.

Ergebnisse

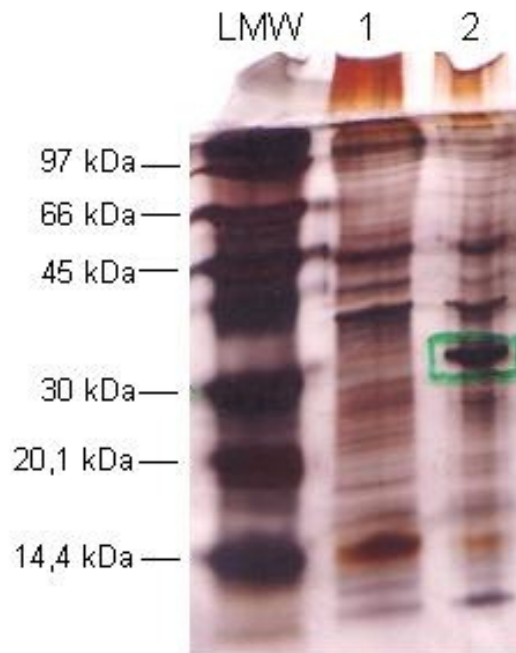


Abbildung 3.7: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle von LysC. Es wurden jeweils 2 μg Protein der resuspendierten unlöslichen Zellaufschlussfraktionen von *E. coli* BL21(DE3) pET20b(+) (1) und *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC (2) nach Induktion und Schüttelkolbenkultivierung aufgetragen. Die LysC-Bande (~ 31 kDa) ist markiert. Links sind die Bandengrößen des Low Molecular Weight Markers (LMW) angegeben. Die Trennung erfolgte in einem 12 %igen Gel bei 40 mA, die Färbung mittels AgNO_3 .

3.4.3 Solubilisierung der LysC „Inclusion Bodies“ und Renaturierung mit L-Arginin als Faltungshilfe

Die Standard-Aufarbeitung der LysC „Inclusion Bodies“ erfolgte nach der Vorschrift von Kopetzki und Karcher (1999, siehe 2.18.1). Bei diesem Protokoll wurden die unlöslichen „Inclusion Body“-Proteine in Guanidinium-HCl haltigem Puffer unter Rühren solubilisiert. Nach Dialyse gegen 4 M Guanidinium-HCl erfolgte die Renaturierung des vollständig entfalteten Enzyms durch langsame Zugabe und somit Verdünnung des Dialysats in 0,5 M L-Arginin enthaltendem Faltungspuffer. Die Aminosäure sollte dabei als unspezifische Faltungshilfe dienen.

Ergebnisse

Als Kontrolle wurde parallel zum Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC auch *E. coli* BL21(DE3) pET20b(+) nach gleichem Protokoll aufgearbeitet. Die Proteaseaktivität der Protein-Dialysate mit den chromogenen LysC-Modellsubstraten Tos-Gly-Pro-Lys-pNA und Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-pNA wurde bestimmt. Nur die Probe des Expressionsstamms zeigte Proteaseaktivität, wobei das Substrat Tos-Gly-Pro-Lys-pNA besser umgesetzt wurde (Abbildung 3.8). Der Ansatz, der aus den Zelltrümmern des Kontrollstamms *E. coli* BL21(DE3) pET20b(+) aufgearbeitet worden war, wies keine LysC-spezifische Aktivität auf. Somit konnte gezeigt werden, dass das beschriebene Protokoll für die „Inclusion Body“-Solubilisierung und Protease-Renaturierung zu enzymatisch aktiver Lysyl-Endopeptidase führte. Da der Kontrollansatz keine Proteaseaktivität aufwies, kann davon ausgegangen werden, dass die detektierte Enzymaktivität tatsächlich auf die rekombinante Lysyl-Endopeptidase zurückzuführen war und nicht auf unspezifische, endogene Proteasen des Wirtsorganismus.

Um größere Mengen an LysC zu erhalten, wurde anschließend eine Bioreaktorkultivierung mit *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC durchgeführt.

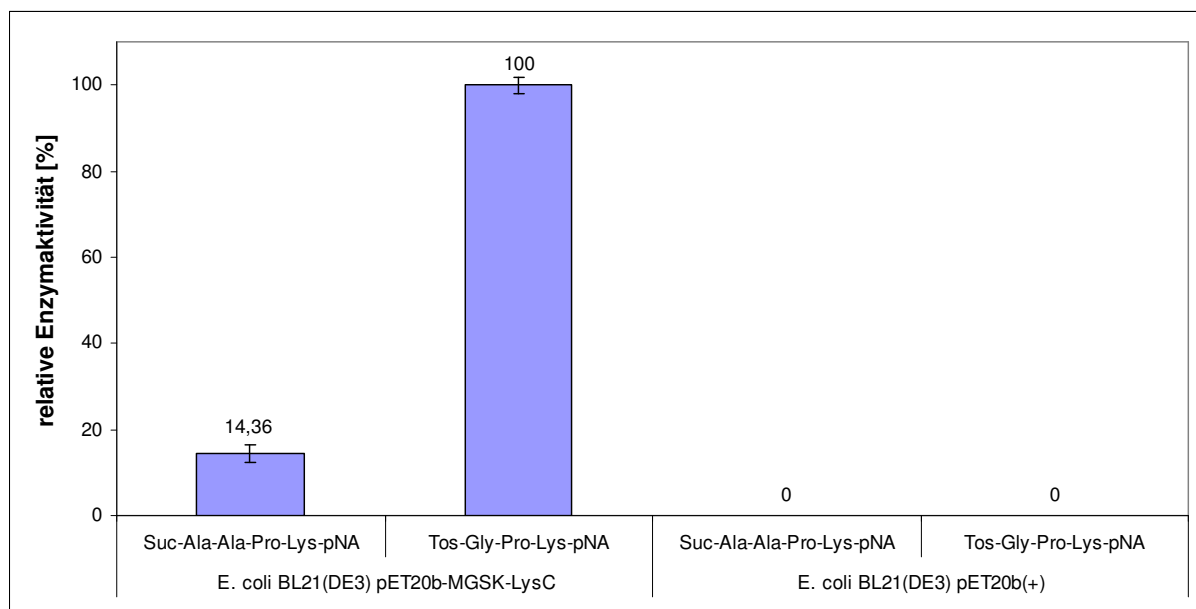


Abbildung 3.8: Proteaseaktivität nach Aufarbeitung der LysC „Inclusion Bodies“. Der Umsatz wurde bei 37°C in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Doppelbestimmung (100 % = 0,05 nkat/mL).

3.4.4 Bioreaktor-Kultivierung von *E. coli* BL21 DE3 pET20b-MGSK-LysC

In 3.4.2 konnte gezeigt werden, dass die Expression des heterologen Genkonstrukts *MGSK-lysC* in *E. coli* BL21(DE3) zur rekombinanten Lysyl-Endopeptidase führte. Um eine größere Menge an Zellmasse für die Aufarbeitung von LysC aus den proteolytisch inaktiven „Inclusion Bodies“ zu produzieren und um den Verlauf der Bildung der Protease während des Zellwachstums bestimmen zu können, wurde eine Fermentation im Bioreaktor durchgeführt.

Die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC erfolgte im 5 L-Bioreaktor in Minimalmedium mit 100 µg/mL Ampicillin bei 37°C (2.13.2). Die Hauptkultur wurde mit 10 % (v/v) einer LB-Vorkultur inokuliert. Durch Zugabe von 0,4 mM IPTG bei OD₆₀₀ = 2,5 wurde die Expression von *MGSK-lysC* induziert. Während der Fermentation wurden die Wachstumsparameter Biotrockenmasse (BTM, 2.10.4), optische Dichte (OD₆₀₀, 2.10.3) und Glucosekonzentration im Kulturmedium (2.10.2) bestimmt. Die LysC-„Inclusion Bodies“ in den zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3,5 h, 5 h und 6,8 h nach Induktion genommenen Proben wurden solubilisiert und renaturiert (siehe 2.18.1) und anschließend wurde unter Standardbedingungen die Enzymaktivität der rekombinanten Protease bestimmt (2.11.1). Die Zellernte erfolgte nach vollständigem Verbrauch der im Medium gelösten Glucose.

Der Verlauf der Wachstumsparameter BTM, OD₆₀₀ und Glucosekonzentration sowie der Aktivität der gebildeten rekombinanten Lysyl-Endopeptidase über den Fermentationsverlauf ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Die maximale LysC-Aktivität von ca. 0,06 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/mL_{Kultur} (60 nkat/L) wurde 5 h nach Induktion bei einer OD₆₀₀ von 13 bzw. einer BTM von 6,6 g/L erreicht. Vor der Induktion wurde kaum rekombinante Protease gebildet (0,19 nkat/L). Die gesamte bis zum Zeitpunkt der Zellernte gebildete Biotrockenmasse betrug ca. 59 g. Die maximal gebildete LysC-Gesamtaktivität lag bei ca. 300 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}.

Da die bei der Bioreaktor-Kultivierung erhaltene LysC-Aktivität unter der der Wildtyp-Kultivierung (vgl. 3.2) lag, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit eine Optimierung der Enzym-Renaturierung für eine Erhöhung der Aktivitätsausbeute erzielt werden.

Ergebnisse

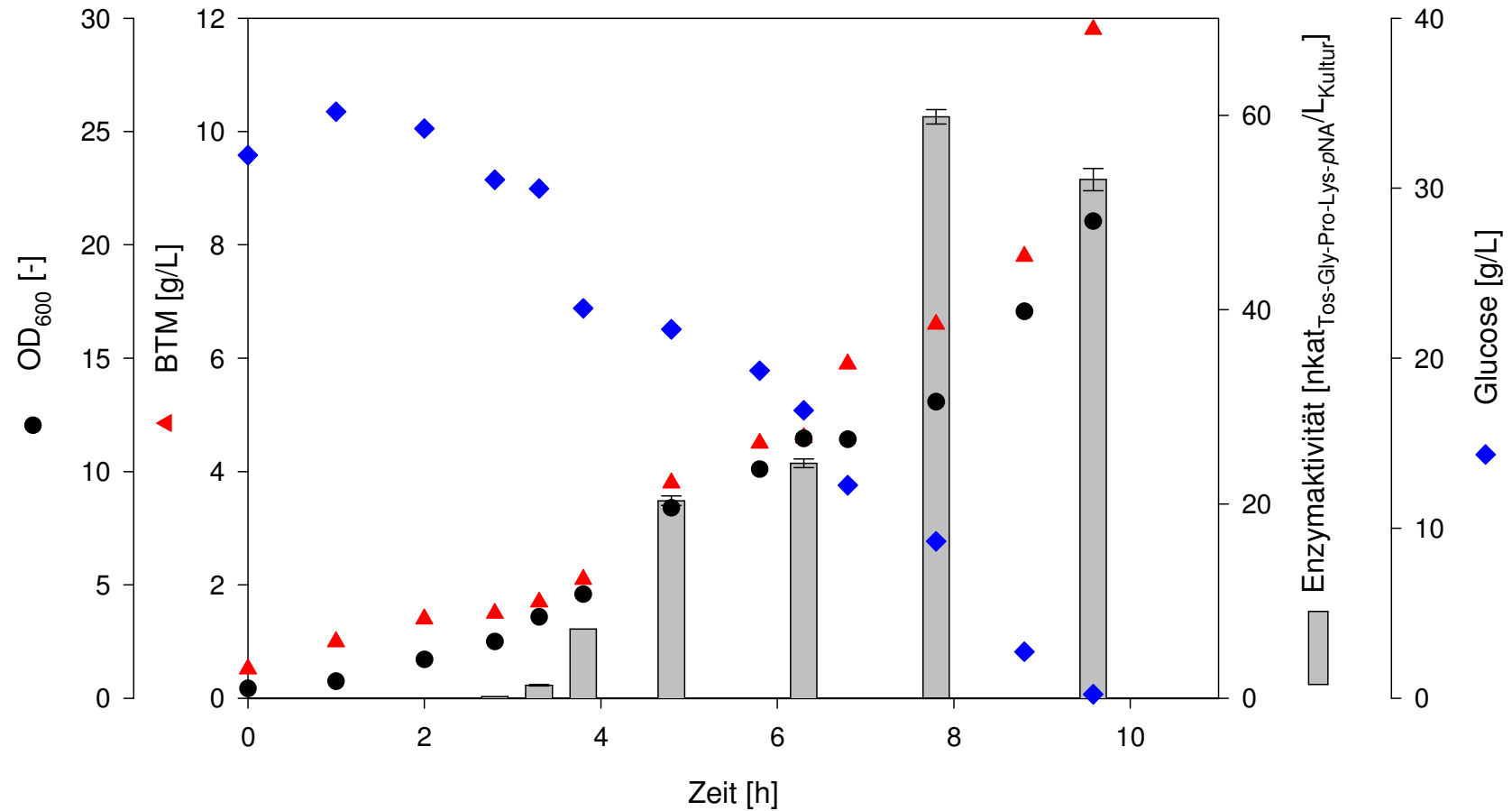


Abbildung 3.9: Verlauf der Bioreaktor-Fermentation von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in 5 L Minimalmedium. Die Messung der LysC-Aktivität erfolgte in Doppelbestimmung nach Aufarbeitung der „Inclusion Bodies“ unter Standardbedingungen mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA als Substrat.

3.5 *In vitro* Renaturierung der Lysyl-Endopeptidase LysC unter Verwendung von N- und C-terminalem Propeptid als Faltungshilfe

Zwar konnte, wie unter 3.4.4 beschrieben, die Lysyl-Endopeptidase aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* in *E. coli* BL21(DE3) rekombinant produziert werden, jedoch lag dabei die Aktivitätsausbeute unter der der Wildtyp-Kultivierung (vgl. 3.2). Da dies trotz Überexpression der Fall war (SDS-PAGE siehe Abbildung 3.7), war davon auszugehen, dass der limitierende Schritt der LysC-Aufarbeitung in der Renaturierung bzw. Faltung der denaturierten Protease lag. Daher wurde alternativ zu L-Arginin der Einsatz von N- und C-terminalem LysC-Propeptid als Faltungshilfe untersucht. Diese Prosequenzen sind bei verschiedenen anderen mikrobiellen Proteasen als intramolekulare Chaperone beschrieben.

3.5.1 Aufklärung der DNA-Prosequenzen von LysC

Um die DNA-Prosequenzen des Lysyl-Endopeptidase-Gens aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* klonieren und heterolog exprimieren zu können, wurden zunächst die Basenabfolgen von N-terminaler (*Npro-lysC*) und C-terminaler (*Cpro-lysC*) Prosequenz aufgeklärt.

Für die DNA-Sequenzierung wurden die Primer pET_for und LysC_for_seq1 (*Npro-lysC*) bzw. pET_rev und LysC_rev_seq1 (*Cpro-lysC*) und pET20b-LysC als PCR-Template eingesetzt (2.8.12). Die jeweiligen DNA-Konsensussequenzen (5'→3') aus mindestens zwei untersuchten Klonen sind nachfolgend dargestellt (Abbildung 3.10; Abbildung 3.11) Die dargestellten Aminosäuresequenzen wurden aus den ermittelten Basensequenzen abgeleitet.

Ergebnisse

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Met | Lys | Arg | Ile | Cys | Gly | Ser | Leu | Leu | Leu | Leu | Gly | Leu | Ser | Ile |
| 1 | ATG | AAA | CGC | ATT | TGT | GGT | TCC | TTG | TTG | TTG | CTC | GGA | CTC | TCG | ATC |
| | Ser | Ala | Ala | Leu | Ala | Ala | Pro | Ala | Ser | Arg | Pro | Ala | Ala | Phe | Asp |
| 46 | AGC | GCC | GCA | CTC | GCC | GCG | CCG | GCC | TCG | CGC | CCG | GCG | GCT | TTC | GAT |
| | His | His | Asn | Ile | Ser | Ser | Val | Asp | Lys | Ile | Ala | Val | Arg | Ala | Met |
| 91 | CAT | CAC | AAT | ATT | TCC | AGC | GTG | GAC | AAG | ATC | GCC | GTG | CGC | GCC | ATG |
| | Pro | Ala | Val | Asp | Val | Ala | Lys | Leu | Lys | Ala | Glu | Asn | Val | Leu | Arg |
| 136 | CCC | GCG | GTC | GAT | GTG | GCC | AAG | CTG | AAG | GCC | GAA | GAC | GTG | CTG | CGC |
| | Asp | Lys | Arg | Gly | Asn | Ile | Pro | Arg | Phe | Ala | Phe | Pro | Ile | Lys | Val |
| 181 | GAC | AAG | CGC | GGC | GAC | ATC | CCG | CGC | TTC | GCC | TTC | CCG | ATC | AAG | GTC |
| | Asp | Met | Thr | Pro | Leu | Asn | Ser | Gly | Val | Trp | Glu | Asp | Leu | Asp | Ala |
| 226 | GAC | ATG | ACC | CCG | CTC | AAC | TCG | GGC | GTG | TGG | GAA | GAC | CTC | GAT | GCC |
| | Asp | Asn | Val | Ile | Trp | Arg | Gln | Arg | Val | Arg | Ser | Glu | Lys | Ala | Leu |
| 271 | GAC | AAC | GTC | ATC | TGG | CGT | CAG | CGC | GTG | CGC | TCG | GAA | AAA | GCG | CTG |
| | Ser | Leu | Asn | Phe | Gly | Phe | Thr | Gln | Tyr | His | Met | Pro | Ala | Gly | Gly |
| 316 | TCG | CTG | AAC | TTC | GGT | TTC | ACC | CAA | TAC | CAC | ATG | CCG | GCA | GGC | GGC |
| | Arg | Leu | Leu | Val | Tyr | Pro | Ala | Thr | Gln | Ala | Ala | Ala | Gly | Asp | Arg |
| 361 | CGT | CTG | CTG | GTC | TAT | CCG | GCC | ACC | CAG | GCC | GCC | GCC | GGC | GAC | CGC |
| | Cys | Phe | Ile | Ser | Glu | Tyr | Thr | Ala | Arg | Asp | Asn | Asn | Ala | Gln | Gly |
| 406 | TGC | TTC | ATC | AGC | GAA | TAC | ACC | GCG | CGC | GAC | AAC | AAC | GCG | CAG | GGC |
| | Glu | Leu | Trp | Thr | Ala | Ile | Val | Pro | Gly | Gln | Glu | Ala | Val | Ile | Glu |
| 451 | GAG | CTG | TGG | ACG | GCG | ATC | GTG | CCG | GGC | CAG | GAA | GCG | GTG | ATC | GAA |
| | Val | Val | Val | Pro | Arg | Ala | Lys | Leu | Gly | Glu | Leu | Lys | Leu | Lys | Leu |
| 496 | GTG | GTG | GTG | CCG | CGC | GCC | AAG | CTC | GGC | GAA | CTC | AAG | CTC | AAG | CTG |
| | Gly | Gln | Val | Gly | His | Asp | Tyr | Val | Gly | Phe | Gly | Pro | Leu | Ala | Arg |
| 541 | GGC | CAG | GTC | GGC | CAC | GAC | TAC | GTC | GGT | TTC | GGT | CCG | CTC | GCG | CGC |
| | Arg | Leu | Ala | Ala | Ala | Ser | Gly | Glu | Lys | | | | | | |
| 586 | CGT | CTG | GCC | GCG | GCC | AGC | GGC | GAG | AAG | | | | | | |

Abbildung 3.10: Sequenz von Npro-LysC (204 AS, 612 bp). Dargestellt ist die Konsensussequenz aus mindestens zwei untersuchten Klonen.

Ergebnisse

```
Ala Asn Phe Thr Ser Thr Thr Ser Gly Leu Thr Ala Thr Phe Thr
1 GCG AAC TTC ACT TCG ACC ACC AGC GGC CTG ACC GCG ACC TTC ACC
Asp Ser Ser Thr Asp Ser Asp Gly Ser Ile Ala Ser Arg Ser Trp
46 GAC AGC TCC ACC GAC AGC GAC GGC AGC ATC GCC TCG CGC AGC TGG
Asn Phe Gly Asp Gly Thr Thr Ser Thr Ala Thr Asn Pro Ser Lys
91 AAC TTC GGC GAC GGC ACC ACC TCG ACC GCG ACC AAC CCG TCC AAG
Thr Tyr Ser Ala Ala Gly Thr Tyr Thr Val Thr Leu Thr Val Thr
136 ACC TAC AGC GCC GCC GGT ACT TAC ACC GTC ACG CTG ACC GTC ACC
Asp Asn Gly Gly Ala Thr Asn Thr Lys Thr Gly Ser Val Thr Val
181 GAC AAC GGC GGC GCC ACC AAC ACC AAG ACC GGT TCG GTC ACG GTG
Ser Gly Thr Pro Gly Ser Gln Thr Tyr Thr Asn Glu Thr Asp Val
226 TCC GGC ACT CCG GGT TCG CAG ACC TAC ACG AAC GAA ACC GAC GTC
Ala Ile Pro Asp Asn Ala Thr Val Glu Ser Pro Ile Thr Val Ser
271 GCC ATT CCC GAC AAC GCC ACG GTC GAA AGC CCG ATC ACC GTG TCC
Gly Arg Thr Gly Asn Gly Leu Pro Ser Thr Ser Ile Gln Val Thr
316 GGC CGC ACC GGC AAC GGT CTG CCG AGC ACG TCG ATT CAG GTG ACG
Ile Tyr His Thr Tyr Lys Ser Asp Leu Lys Val Asp Leu Val Ala
361 ATC TAC CAC ACC TAC AAG AGC GAT CTG AAG GTG GAC CTG GTG GCT
Pro Asp Gly Thr Val Tyr Ser Leu His Asn Arg Thr Gly Gly Ser
406 CCG GAC GGC ACG GTC TAC AGC CTG CAC AAC CGC ACC GGC GGC AGC
Ala Asp Asn Val Ile Gly Thr Tyr Thr Lys Asp Leu Ser Ser Glu
451 GCC GAC AAC GTC ATC GGC ACC TAC ACC AAA GAT CTG TCG AGC GAG
Pro Leu Asn Gly Val Trp Lys Cys Ala Ser Thr Thr Met Arg Pro
496 CCG CTC AAC GGC GTG TGG AAG TGC GCG TCA ACG ACA ATG CGA CCA
Ser Ile Pro Ala Ala Ser Thr Ser Gly Ala Ser Pro Ser Glu
541 TCG ATA CCG GCC GCA TCG ACA AGT GGA GCA TCA CCT TCT GAG
```

Abbildung 3.11: Sequenz von Cpro-LysC (194 AS, 582 bp). Dargestellt ist die Konsensussequenz aus mindestens zwei untersuchten Klonen.

3.5.2 Konstruktion der Expressionsvektoren pET20b-Npro-LysC und pET20b-Cpro-LysC

Nachdem die DNA-Sequenzen der LysC-Propeptide aufgeklärt werden konnten (siehe 3.5.1), erfolgte ihre Klonierung in den *E. coli* Expressionsvektor pET20b(+).

Der für das N-terminale Propeptid von LysC codierende Genabschnitt *Npro-lysC* (612 bp) wurde über PCR mit den Primern LysC_for und Npro-LysC_rev aus genomischer *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* DNA amplifiziert (2.8.5). Das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Ansätze ist in Abbildung 3.12 gezeigt. *Npro-lysC* wurde nur im Ansatz mit Q-Solution amplifiziert. Aufgrund der Differenz von Annealing-Temperatur (65,5°C) und Npro-LysC_rev-Schmelztemperatur (>75°C) wurden auch unspezifische PCR-Nebenprodukte gebildet. Nach Restriktionsspaltung von PCR-Amplicon und *E. coli* Expressionsvektor pET20b(+) mit *NdeI/BamHI* (vgl. 2.8.9), Dephosphorylierung des Vektors (vgl. 2.8.10) und anschließender Gelaufreinigung der DNA-Fragmente (2.8.4) erfolgte die Ligation für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Der PCR-Primer Npro-LysC_rev wurde anhand der durch Sequenzierung ermittelten DNA-Sequenz (siehe 3.5.1) entworfen. Die Verifizierung der klonierten Gensequenz erfolgte durch DNA-Sequenzierung (siehe 2.8.12).

Der Vektor pCR4-Cpro-LysC enthielt die für das C-terminale Propeptid von LysC codierende Gensequenz, wobei ein Startcodon und zwei Stopcodons angefügt wurden (resultierende Größe: 591 bp). Die „Codon Usage“ wurde an *E. coli* angepasst (Geneart, Regensburg). Nach *NcoI/HindIII*-Spaltung von pCR4-Cpro-LysC und pET20b(+) und Gelextraktion der entsprechenden DNA-Fragmente erfolgte die Ligation für 1 h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C. Das Klonierungsschema von *Cpro-lysC* in pET20b(+) ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Nach Transformation von hitzekompetenten *E. coli* XL-1 Blue Zellen (vgl. 2.8.7) mit dem Ligationsansatz wurden die auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin gewachsene Kolonien gepickt und im entsprechenden Flüssigmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach Plasmid-Isolierung (2.8.1) wurden positive Transformanden über eine Kontroll-Restriktionsspaltung mit *NcoI/HindIII* und anschließender Agarose-Gelelektrophorese verifiziert (nicht dargestellt).

Ergebnisse

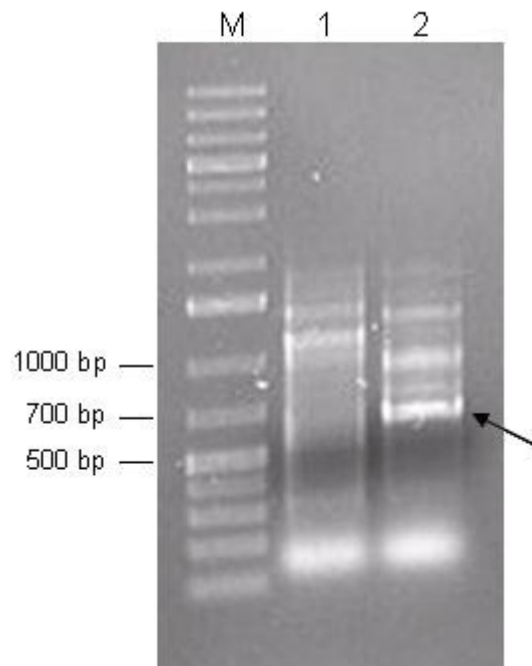


Abbildung 3.12: Agarosegel-Elektrophorese der *Npro-lysC* PCR-Ansätze. Die Annealing-Temperatur der Ansätze mit (1) und ohne (2) Q-Solution war 65°C. Die Gelkonzentration betrug 1 % (w/v), die angelegte Spannung 100 V. Links sind die Größen der entsprechenden Banden des DNA-Markers (M) angegeben. *Npro-lysC* (612 bp) ist markiert.

Ergebnisse

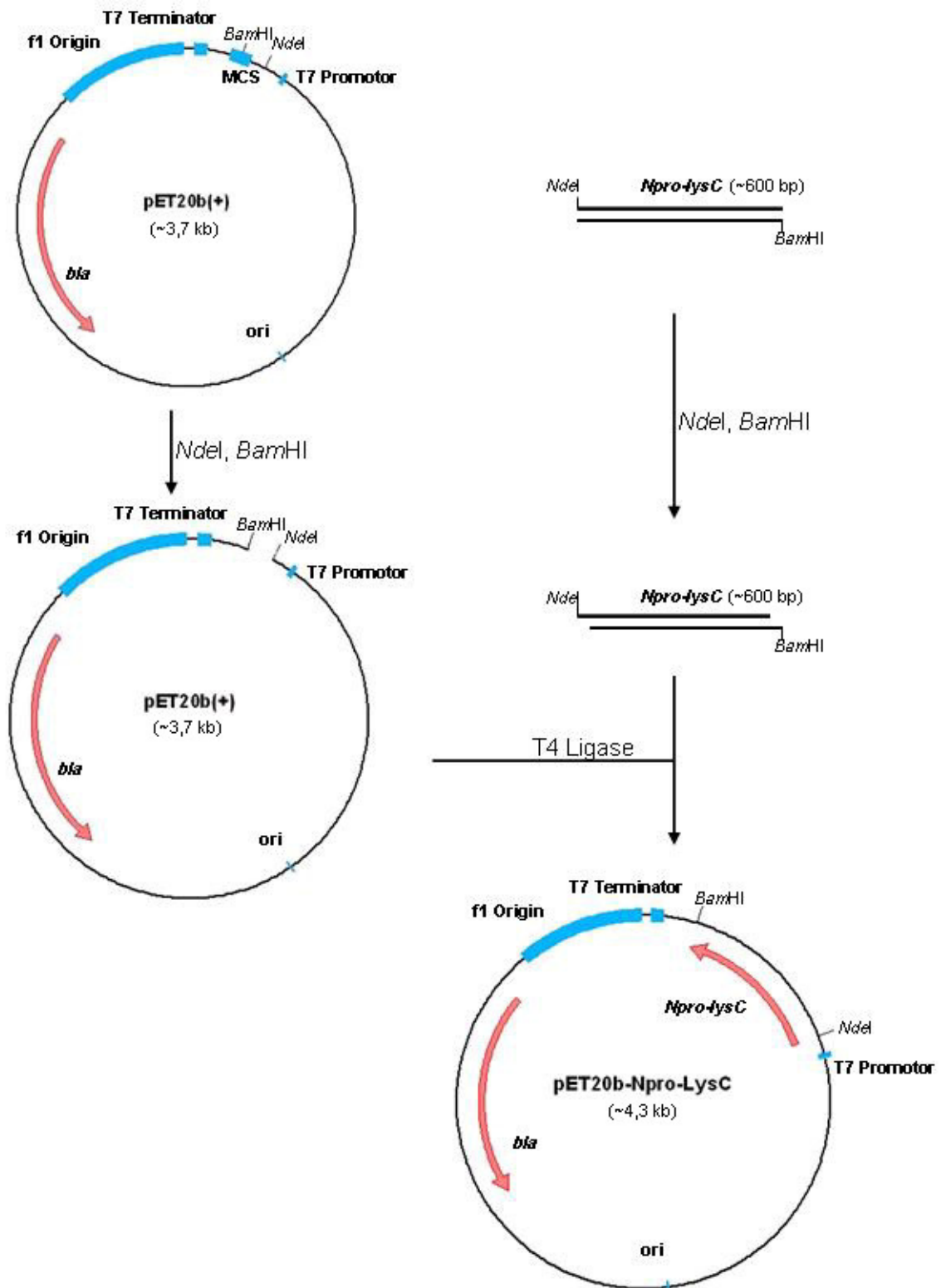


Abbildung 3.13: Klonierungsschema von pET20b-Npro-LysC. ori: Replikationsursprung; *bla*: Ampicillinresistenz-Gen; MCS: Multiple Cloning Site; *Npro-lysC*: Gensequenz des N-terminalen Propeptids von LysC.

Ergebnisse

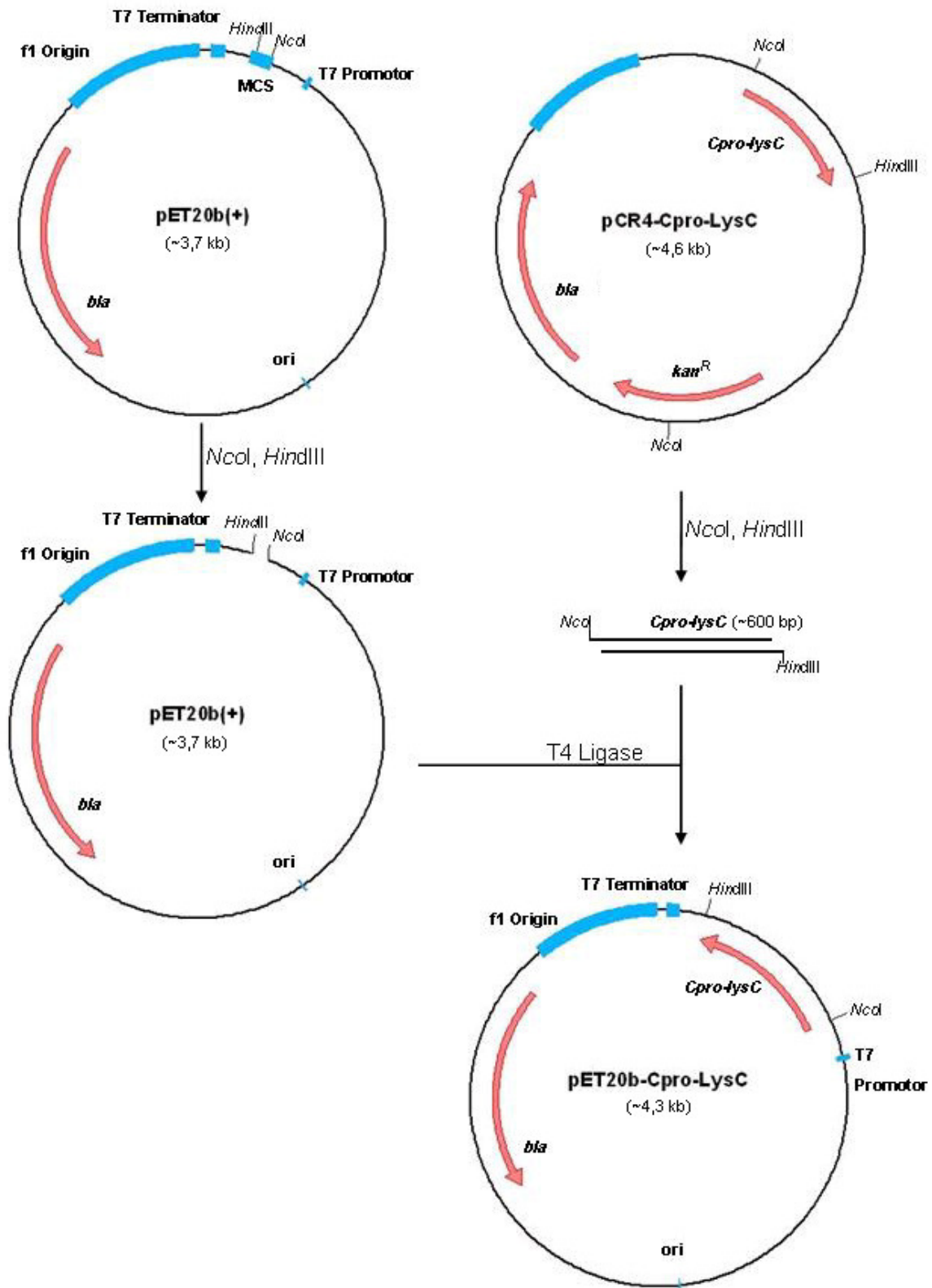


Abbildung 3.14: Klonierungsschema von pET20b-Cpro-LysC. Der Vektor pCR4-Cpro-LysC wurde von Geneart (Regensburg) bezogen. ori: Replikationsursprung; *bla*: Ampicillinresistenz-Gen; *kan^R*: Kanamycinresistenz-Gen; MCS: Multiple Cloning Site; *Cpro-lysC*: Gensequenz des C-terminalen Propeptids von LysC.

3.5.3 Herstellung der rekombinanten LysC-Propeptide in *E. coli* BL21(DE3)

Nach der Transformation hitzekompetenter *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit pET20b-Npro-LysC bzw. pET20b-Cpro-LysC (2.8.7) wurden mit den resultierenden Expressionsstämmen Kultivierungen im Schüttelkolben durchgeführt, und die LysC-Propeptide rekombinant herzustellen.

Die Schüttelkolben-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-Npro-LysC und *E. coli* BL21(DE3) pET20b-Cpro-LysC erfolgte in LB-Medium mit 1 % (w/v) Glucose und 100 µg/mL Ampicillin bei 37°C. Induziert wurde die heterologe Genexpression jeweils mit 0,4 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6. Die Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-Npro-LysC wurde durch Zugabe von 2 % (v/v) einer entsprechenden Übernachtskultur gestartet, die Inokulierung der *E. coli* BL21(DE3) pET20b-Cpro-LysC Kultivierung erfolgte mit 1 % (v/v) einer entsprechenden Vorkultur. Als Kontrollstamm diente untransformierter *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* BL21(DE3) pET20b(+). Nach Ultraschallzellaufschluss (vgl. 2.17.1) und Waschen der unlöslichen Fraktionen wurden die Zellfragmente resuspendiert und zur Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.9.2). Anschließend wurden die Proteine über Silberfärbung bzw. Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 3.15). Es zeigte sich, dass beide Propeptide (errechnete Größe Npro-LysC: ~22 kDa; Cpro-LysC: ~20 kDa;) in Form von unlöslichen „Inclusion Bodies“ in den Wirtszellen gebildet wurden.

Die Gensequenzen der N- und C-terminalen Prodomänen von LysC wurden kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert, was zu rekombinanten Propeptid „Inclusion Bodies“ führte. Um diese in Renaturierungsversuchen von LysC einsetzen zu können, erfolgte zuerst ihre Solubilisierung.

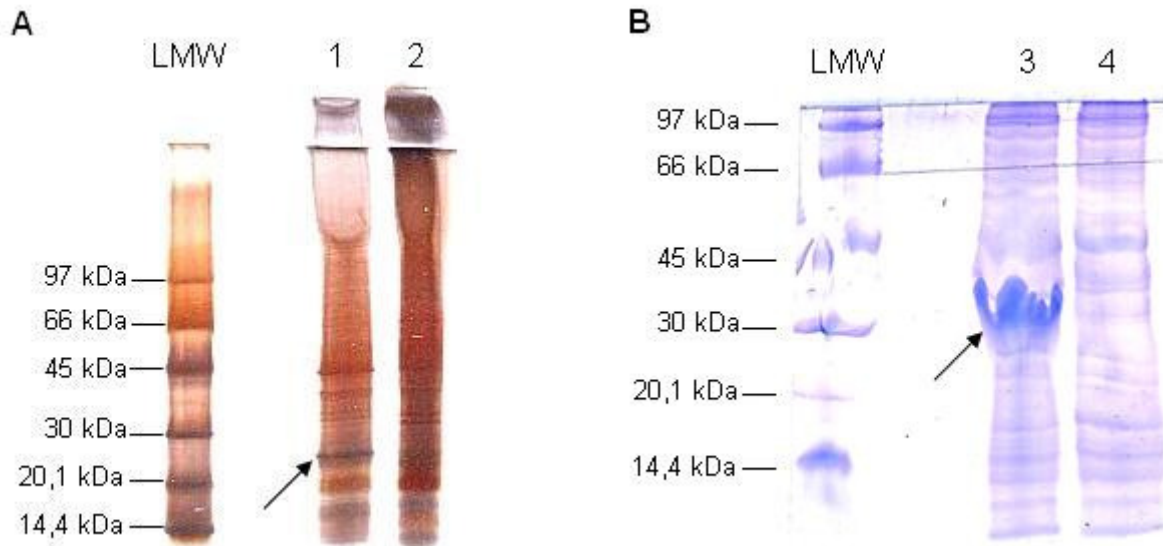


Abbildung 3.15: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle von *Npro-lysC* und *Cpro-lysC*. **(A):** PHAST[®] Gradientengel (5-25 %) der resuspendierten unlöslichen Zellaufschlussfraktionen von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-Npro-LysC (1) und *E. coli* BL21(DE3) (2) nach Silberfärbung. **(B):** Homogenes 12 %iges Gel der resuspendierten unlöslichen Zellaufschlussfraktionen von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-Cpro-LysC (3) und *E. coli* BL21(DE3) pET20b(+) (4) nach Coomassiefärbung. Die Npro-LysC-Bande sowie die Cpro-LysC-Bande sind markiert. Links sind die Bandengrößen des Low Molecular Weight Markers (LMW) angegeben.

3.5.4 Renaturierung von rekombinantem LysC mit N- und C-terminalem Propeptid als Faltungshilfe

Die beiden Propeptide der Lysyl-Endopeptidase von *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* wurden rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) produziert (siehe 3.5.3). Die gebildeten Propeptid „Inclusion Bodies“ wurden wie unter 2.18.1 beschrieben solubilisiert, um anschließend den Einfluss auf die *in vitro* Renaturierung von LysC zu untersuchen.

Für die *in vitro* Renaturierung und somit Aktivierung der unlöslichen Lysyl-Endopeptidase mit den LysC-Propeptiden als Faltungshilfe wurden Enzym-Dialysat (0,15 bis 2,5 mg Gesamtprotein) und Propeptid-Dialysat (0,15 bis 2,5 mg

Ergebnisse

Gesamtprotein) im Proteinverhältnis 1:1 zum Faltungsansatz gegeben. Als Referenz diente ein Faltungsansatz nach Kopetzki und Karcher (1999), bei dem 0,5 M L-Arginin als unspezifische Faltungshilfe eingesetzt wurde. Nach Dialyse gegen 20 mM Tris-HCl (pH 9) und Aufkonzentrierung (vgl. 2.18.1) auf jeweils gleiche Endvolumina von 1-5 mL erfolgte die Bestimmung der Proteaseaktivität bei 37°C mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA als Substrat (2.11.1). Dabei zeigte sich, dass der Ansatz mit Cpro-LysC als Faltungshilfe zu einer ca. 2,7-fachen Steigerung der Proteaseaktivität gegenüber dem Referenzansatz führte, während Npro-LysC die Enzymaktivität um den Faktor 27 erhöhte. Die Kombination aus beiden Propeptiden (Gesamtproteinverhältnis 1:1) führte zu einem ca. 10fachen Aktivitätsanstieg (Abbildung 3.16). Da in Vorversuchen bestätigt werden konnte, dass keine der beiden Prosequenzen selbst proteolytische Aktivität besitzt (nicht dargestellt), ist diese Steigerung der LysC-Aktivität vermutlich auf eine effizientere Protein-Renaturierung *in vitro* durch die Verwendung der Propeptide als Faltungshilfe zurückzuführen.

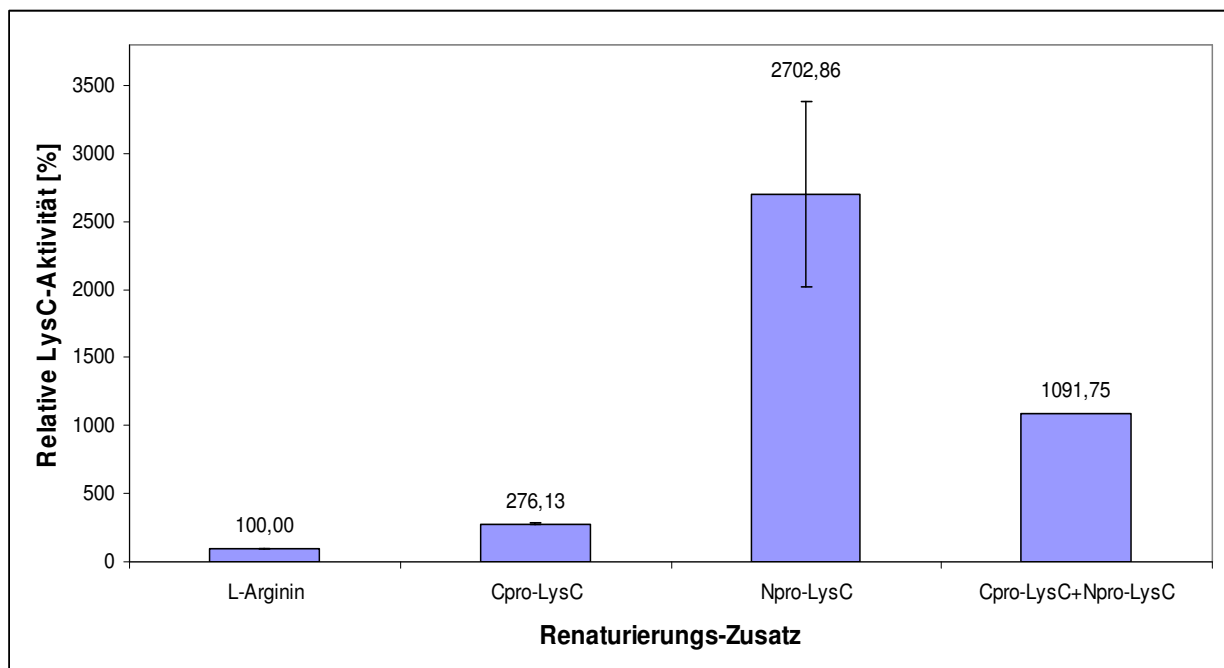


Abbildung 3.16: Einfluss von Npro-LysC und Cpro-LysC auf die *in vitro* Renaturierung der Lysyl-Endopeptidase. Die Proteaseaktivität wurde nach Aufkonzentrierung der Faltungsansätze auf das gleiche Volumen mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA unter Standardbedingungen bestimmt (100 % = 0,05 nkat/mL). Für Cpro-LysC bzw. Npro-LysC ist das Ergebnis von Doppelbestimmungen angegeben.

Der deutliche Einfluss des N-terminalen Propeptids lässt den Schluss zu, dass diese Sequenz auch *in vivo* eine spezifische intramolekulare „Chaperonfunktion“ für die korrekte Faltung der Protease besitzt. Die schwächere Wirkung des C-terminalen Propeptids hingegen ist evtl. mit unspezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Propeptid und Protease zu erklären, wie sie z.B. auch mit bovinem Serumalbumin (BSA) auftraten (nicht dargestellt). Die Tatsache, dass der positive Effekt beim gemeinsamen Einsatz beider Propeptide schwächer war als bei Npro-LysC allein erklärt sich zum Einen durch eine gegenseitige Beeinträchtigung beider Sequenzen zu Ungunsten der Faltungseffektivität, zum Anderen durch die höhere Proteinkonzentration im Faltungsansatz, was zu Protein-Aggregation führen kann.

3.6 Klonierung und Expression des MGSK-LysC Genkonstrukts in *Lactobacillus plantarum* NC8 und *Lactobacillus sakei* Lb790

Nachdem die heterologe Expression des *MGSK-lysC* Genkonstrukts in *E. coli* BL21(DE) etabliert werden konnte (siehe 3.4.2), sollte dies für einen Einsatz im Lebensmittelbereich auch in einem „Food-grade“ Expressionssystem erfolgen. Ausgewählt wurde hierfür das gut untersuchte Expressionssystem von *Lactobacillus plantarum* NC8 und *L. sakei* Lb790 mit einem *E. coli*-*Lactobacillus* Shuttle-Expressionsvektor der pSIP-Serie (Sørvig et al., 2003). Die heterologe Expression der Reportergene *gusA* (β -Glucuronidase aus *E. coli*) und *pepN* (Aminopeptidase aus *Lactococcus lactis*) konnte mit diesem System bereits gezeigt werden (Sørvig et al., 2005).

Im Folgenden ist die Klonierung von *MGSK-lysC* in pSIP409 sowie der Expressionsversuch in *L. plantarum* NC8 und *L. sakei* Lb790 beschrieben.

3.6.1 Konstruktion des *Lactobacillus*-Expressionsvektors pSIP409-MGSK-LysC

Die Vektoren pGA18-MGSK-LysC (Geneart, Regensburg) und pSIP409 wurden mit *Nco*I und *Hind*III gespalten (vgl. 2.8.9). Die Ligation des dabei ausgeschnittenen MGSK-LysC Genkonstrukts mit dem linearisierten pSIP409 Vektor erfolgte nach der DNA-Extraktion aus einem präparativen Agarosegel (2.8.4) für 1 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C. Das Klonierungsschema ist in Abbildung 3.17 gezeigt. Hitze-kompetente *E. coli* XL-1 Blue Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert (siehe 2.8.7). Kolonien, welche auf LB-Agarplatten mit 200 µg/mL Erythromycin gewachsen waren, wurden gepickt und im entsprechenden Flüssigmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach der Plasmid-Isolation (2.8.1) erfolgte die Verifizierung der positiven Transformanten über einen Kontroll-Restriktionsspaltung mit *Nco*I/*Hind*III und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (nicht dargestellt).

3.6.2 Heterologe Expression von *MGSK-lysC* in *Lactobacillus plantarum* NC8 und *L. sakei* Lb790

Nach der Konstruktion des *Lactobacillus*-Expressionsvektors pSIP409-MGSK-LysC (3.6.1) sollte die heterologe Expression von *lysC* in zwei *Lactobacillus*-Stämmen untersucht werden.

Die Elektroporation von *Lactobacillus plantarum* NC8 sowie *L. sakei* Lb790 wurde wie unter 2.8.8 beschrieben durchgeführt. Die Kultivierung im Erlenmeyerkolben wurde in MRS-Medium mit 1 % (v/v) Glycerin und 10 µg/mL Erythromycin durchgeführt. Inokuliert wurde diese Expressionskultur mit 2 % (v/v) einer entsprechenden Übernachtskultur. Durch Zugabe von 50 ng/mL Spp-IP (Sakacin P induzierendes Peptid) bei einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,3 wurde die heterologe Expression induziert. Nach dem Ernten wurden die Expressionsstämme *Lactobacillus plantarum* NC8 pSIP409-MGSK-LysC und *L. sakei* Lb790 pSIP409-MGSK-LysC sowie die Kontrollstämme *L. plantarum* NC8 pSIP409 und *L. sakei*

Ergebnisse

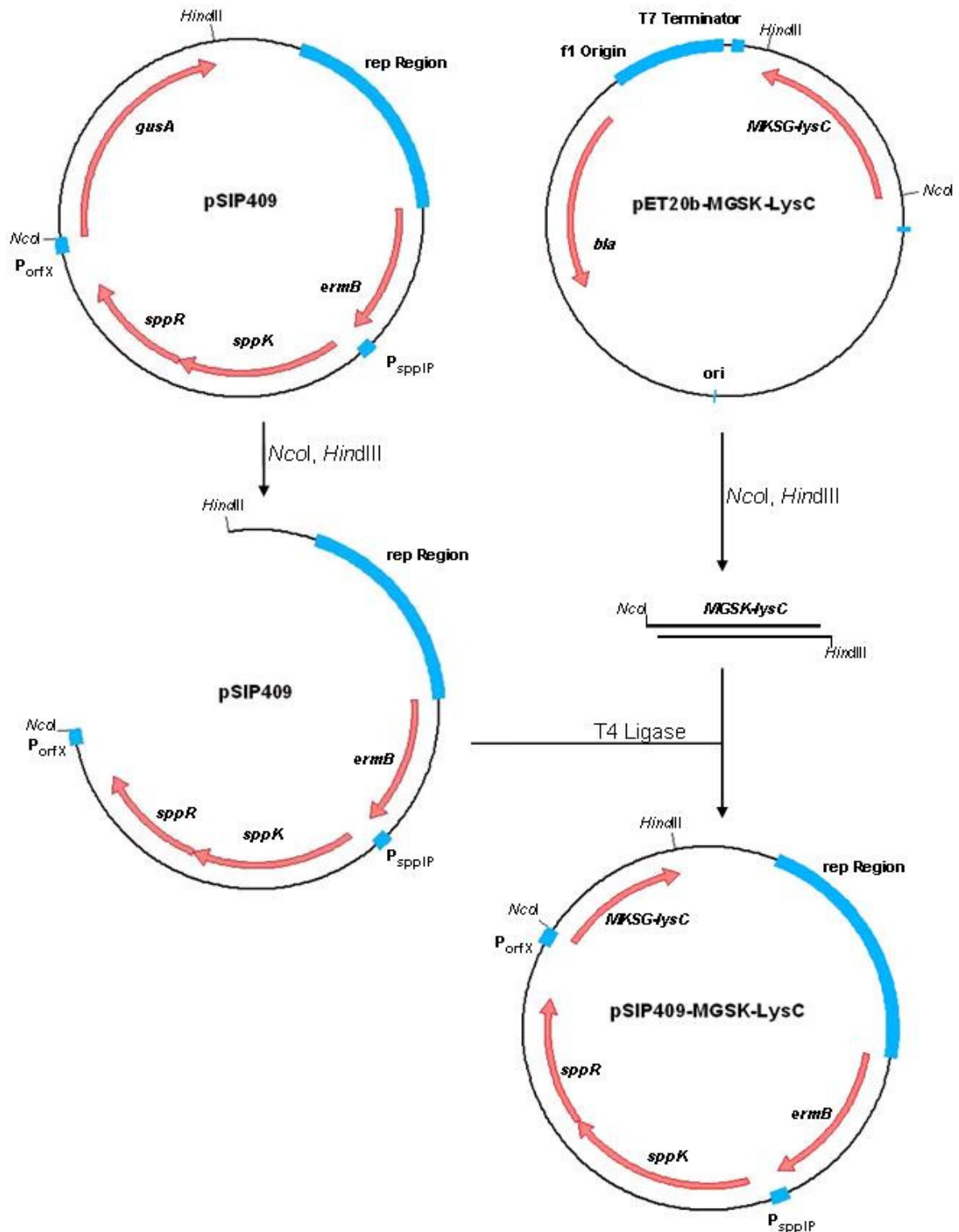


Abbildung 3.17: Klonierungsschema von pSIP409-MGSK-LysC. *ori*: Replikationsursprung; *bla*: Ampicillinresistenz-Gen; *ermB*: Erythromycinresistenz-Gen; *gusA*: Glucuronidase-Gen; *MGSK-lysC*: Lysyl-Endopeptidase-Genkonstrukt; *sppK*: Histidin-Kinase-Gen; *sppR*: Antwortregulator-Gen; *P_{sppIP}*: Promotor, induzierbar durch Sakacin P induzierendes Peptid; *P_{orfX}*: Sakacin P Promotor.

Ergebnisse

Lb790 pSIP409 mittels Glasperlen aufgeschlossen (siehe 2.17.2). Die lösliche Fraktion des Zellaufschlusses wurde unter Standardbedingungen auf LysC-Aktivität untersucht (2.11.1). Jeweils 0,5 µg sowohl der löslichen als auch der resuspendierten unlöslichen Fraktionen wurden zur Expressionskontrolle über SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.9.2) und die Proteine durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Dabei konnte in keinem der Expressionsstämme weder LysC-spezifische Enzymaktivität noch eine Proteinbande entsprechender Größe (~31 kDa) nach SDS-PAGE nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Als möglicher Grund hierfür wurde die unterschiedliche „Codon Usage“ von *L. plantarum* bzw. *L. sakei* und *E. coli* vermutet. Im für *E. coli* angepassten Genkonstrukt *MGSK-lysC* codiert z. B. ausschließlich das Codon tcc für Serin (vgl. Anhang/Abbildung 8.1), während *Lactobacillus*-Stämme andere Basen-Triplets statistisch häufiger für diese Aminosäure verwenden (*L. plantarum*: 4 % tcc; 14,1 % tca; 16,9 % agt; www.kazusa.or.jp/codon/). Um zu untersuchen, ob diese Problematik einen negativen Einfluss auf die heterologe Genexpression in *L. plantarum* NC8 hat, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Versuche mit punktmutierten Genvarianten des Modellenzym β -Galactosidase aus *Kluyveromyces lactis* durchgeführt.

3.7 Untersuchung des Einflusses des tcc-Codons auf die heterologe Genexpression in *Lactobacillus plantarum* NC8

Die Expressionsversuche des *MGSK-LysC*-Genkonstrukts in *Lactobacillus plantarum* NC8 führten zu keiner nachweisbaren Lysyl-Endopeptidase (3.6.2). Als ein möglicher Grund hierfür wurde die ausschließliche Verwendung des tcc-Codons für die Aminosäure Serin im für *E. coli* optimierten Genkonstrukt angenommen, da sich die „Codon Usage“ von *L. plantarum* und *L. sakei* deutlich hiervon unterscheidet.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurden Expressions-Experimente mit punktmutierten Varianten des β -Galactosidasegens aus *K. lactis* durchgeführt. Dieses Gen wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits eingesetzt, um aktives, rekombinantes Enzym in *L. plantarum* NC8 herzustellen (Liu, 2008).

3.7.1 Mutagenese des β -Galactosidasegens *lac4* aus *Kluyveromyces lactis*

Um den Einfluss der „Codon Usage“ auf die heterologe Genexpression in *Lactobacillus plantarum* NC8 zu untersuchen, wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese an drei Positionen im β -Galactosidasegen *lac4* aus *Kluyveromyces lactis* (GenBank: M84410.1) das Serin-Codon tca (Basen Nr. 814-816) bzw. agt (Basen Nr. 1543-1545 und Nr. 2260-2262) gegen das für die gleiche Aminosäure codierende tcc ausgetauscht (2.8.6). Als Ausgangsvektor für die Mutagenese-PCR diente pSIP409-lac4, der bereits erfolgreich für die heterologe Expression *lac4* in *L. plantarum* NC8 eingesetzt wurde (Liu, 2008). Nach der Verifizierung der einzelnen Mutagenesen durch DNA-Sequenzierung (siehe Anhang 8.6) erfolgte die Transformation der hierbei erhaltenen Expressionsvektoren pSIP409-lac4.mut1 (mit einem Basenaustausch), pSIP409-lac4.mut2 (mit 2 Basenaustauschen) und pSIP409-lac4.mut3 (mit 3 Basenaustauschen) in *L. plantarum* NC8 (vgl. 2.8.8).

3.7.2 Heterologe Expression von *lac4.mut1*, *lac4.mut2* und *lac4.mut3* in *L. plantarum* NC8

Die Kultivierungen der Expressionsstämme *L. plantarum* NC8 pSIP409-lac4.mut1, *L. plantarum* NC8 pSIP409-lac4.mut2 und *L. plantarum* NC8 pSIP409-lac4.mut3 wurden in MRS-Medium mit 10 μ g/mL Erythromycin durchgeführt (2.16). Die Inokulierung erfolgte zu einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,1. Die Induktion der heterologen Expression der *lac4*-Genvarianten erfolgte bei einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0,3 durch sterile Zugabe von 50 ng/mL Spp-IP (Sakacin P induzierendes Peptid). Nach Zellernte bei einer OD₆₀₀ von 1,8 erfolgte der Aufschluss mittels Glaskugeln und Ultraschall (2.17.2).

Die Messung der β -Galactosidaseaktivität (2.11.3) in den zellfreien Rohextrakten nach Kultivierung und Zellaufschluss zeigte eine Abnahme der spezifischen Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Anzahl der eingefügten tcc-Codons. Während der einfache Tripletaustausch in *lac4.mut1* zu einer Restaktivität von 92 % bezogen

Ergebnisse

auf *lac4* führte, bewirkte der dreifache Austausch in *lac4.mut3* eine Restaktivität von nur 62 % (Abbildung 3.18).

Dies bestätigte die Annahme, dass aufgrund der statistisch unterschiedlichen Verwendung bestimmter Codons innerhalb des degenerierten DNA-Codes von *E. coli* und *L. plantarum* die Translation bei der Bildung rekombinanter Proteine negativ beeinflusst werden kann.

Zur Herstellung von rekombinanter Lysyl-Endopeptidase LysC in *L. plantarum* sollte demzufolge ein Genkonstrukt kloniert werden, dessen Basen-Triplets die „Codon Usage“ des Wirtsorganismus berücksichtigt.

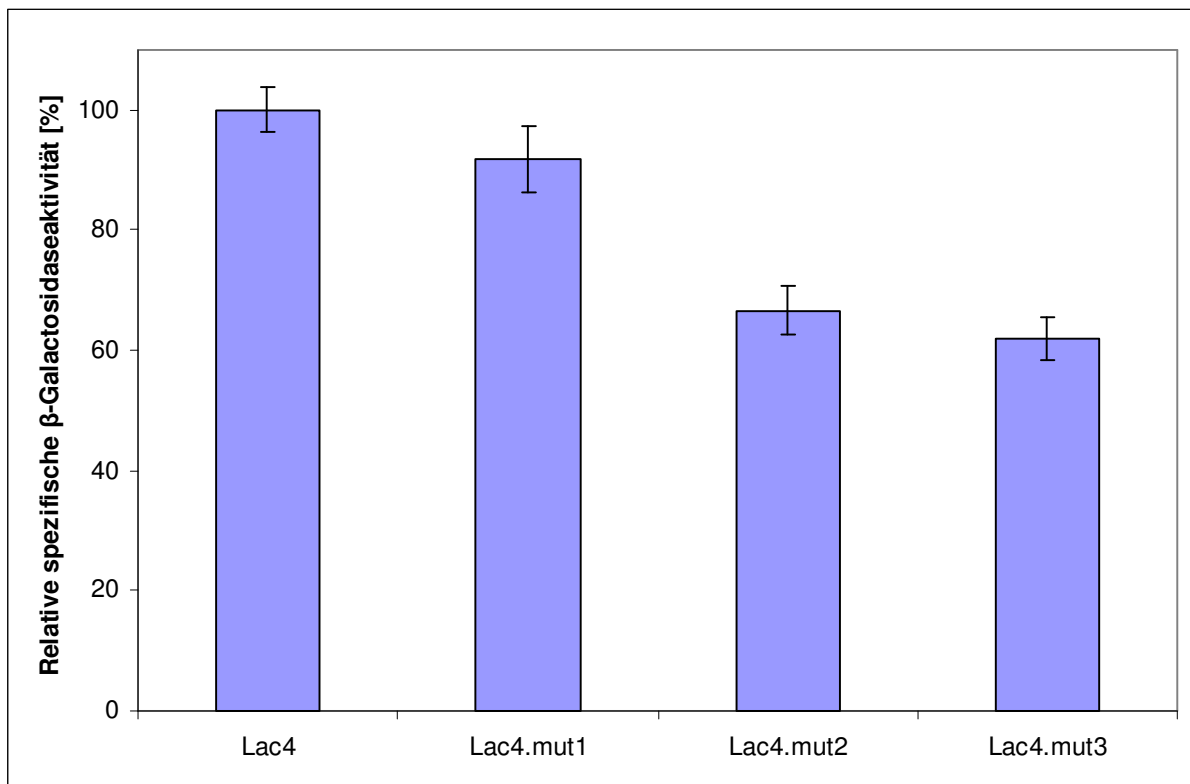


Abbildung 3.18: β -Galactosidaseaktivität von Lac4 und seinen Mutagenesevarianten. Die Expression wurde in *L. plantarum* NC8 mit dem Expressionsvektor pSIP409 durchgeführt. Die Messung erfolgte bei 37°C mit oNP-Gal als Substrat. Dargestellt sind die Ergebnisse von Doppelbestimmungen (100 % = 53,37 nkat_{oNP-Gal}/mg_{Gesamtprotein}).

3.8 Charakterisierung der rekombinanten Lysyl-Endopeptidase LysC aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes*

Nachdem die Lysyl-Endopeptidase rekombinant in *E. coli* BL21(DE3) produziert und anschließend aus „Inclusion Bodies“ zu proteolytisch aktivem Enzym aufgearbeitet werden konnte (siehe 3.4.4), sollten die enzymatischen Eigenschaften der Protease untersucht werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Bestimmungen von Substratspezifität, pH-Optimum, Temperatur-Optimum, pH-Stabilität, Temperatur-Stabilität sowie der Einfluss von Ionen, Lösungsmitteln und Inhibitoren dargestellt. Diese Daten sind insbesondere für einen Einsatz von LysC im lebensmitteltechnologischen Bereich von Interesse. Außerdem wurde eine native PAGE mit anschließender LysC-Aktivfärbung durchgeführt.

3.8.1 Substratspezifität von LysC

Für die Bestimmung der Substratspezifität von LysC aus *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* wurden verschiedene chromogene Peptide bezüglich ihrer Eignung als Substrate untersucht (siehe 2.19.1). Die Bestimmung der Proteaseaktivitäten erfolgte unter Standardbedingungen (vgl. 2.11.1). Wie erwartet, hydrolysierte das Enzym bevorzugt die Peptidbindung zwischen Lysin und *p*-Nitroanilin der Substrate Tos-Gly-Pro-Lys-*p*NA und Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-*p*NA, wobei ersteres ca. fünfmal besser umgesetzt wurde (Abbildung 3.19). Die Enzymaktivitäten gegenüber allen anderen untersuchten Substraten lagen unter 3,5 % dieses Maximalwertes. Eines dieser chromogenen Peptide war Bz-Arg-*p*NA (Handelsname BAPNA), ein Standardsubstrat der Serinprotease Trypsin. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Lysin und Arginin setzen viele proteolytischen Enzyme, u.a. auch Trypsin, sowohl Substrate mit Lysin als auch solche mit Arginin an der P1-Position mit vergleichbarer Effizienz um. Die Protease LysC dagegen zeigt eine hohe Spezifität für Lysinreste.

Ergebnisse

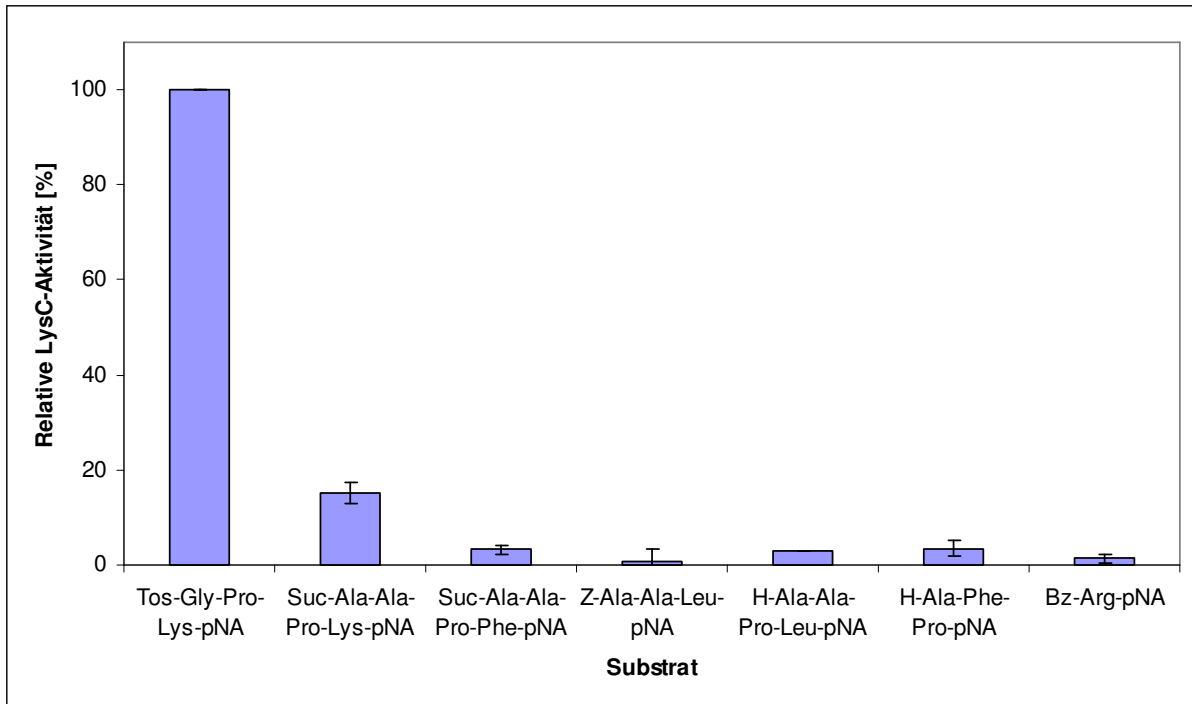


Abbildung 3.19: Umsatz verschiedener chromogener Peptide mit LysC. Die Umsätze wurden in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) unter Standardbedingungen durchgeführt (siehe 2.11.1). Dargestellt sind die Ergebnisse von Doppelbestimmungen (100 % = 0,38 nkat/mL).

3.8.2 pH-Optimum von LysC

Für die Bestimmung des amidolytischen pH-Optimums von LysC wurde das chromogene Modellpeptid Tos-Gly-Pro-Lys-pNA bei 37 °C in verschiedenen Puffern umgesetzt (2.19.2). Dies waren 25 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6–7), 25 mM Tris-HCl (pH 7–10) und 20 mM Citrat-Phosphat-Borat-HCl (pH 10–11).

Die höchste amidolytische Aktivität gegenüber dem Modellsubstrat wurde bei pH 8,5 (in 25 mM Tris-HCl) gemessen. Im pH Bereich von 8 bis 10 wurden jeweils mindestens 88 % dieser Aktivität, bei pH 7 nur noch ca. 40 % detektiert (Abbildung 3.20). LysC toleriert demzufolge alkalische pH-Werte wesentlich besser als neutrale oder saure, da die Enzymaktivität in diesem Bereich stark abnimmt. Anhand der Aktivitätsunterschiede bei den mit jeweils zwei unterschiedlichen Puffern untersuchten pH-Werte 7 und 10 ist zu erkennen, dass die Ionenzusammensetzung

Ergebnisse

und –stärke des Reaktionspuffers starken Einfluss auf die proteolytische Aktivität von LysC hat. So war bei pH 7 die LysC-Aktivität in 25 mM Tris-HCl um zwei Drittel höher als in 25 mM Kalium-Phosphat-Puffer und bei pH 10 dreimal so hoch wie in 20 mM Citrat-Phosphat-Borat-HCl.

Aufgrund des Ergebnisses der pH-Optimumsbestimmung wurden alle Aktivitätsassays mit LysC in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) durchgeführt und dieser als Standardpuffer definiert.

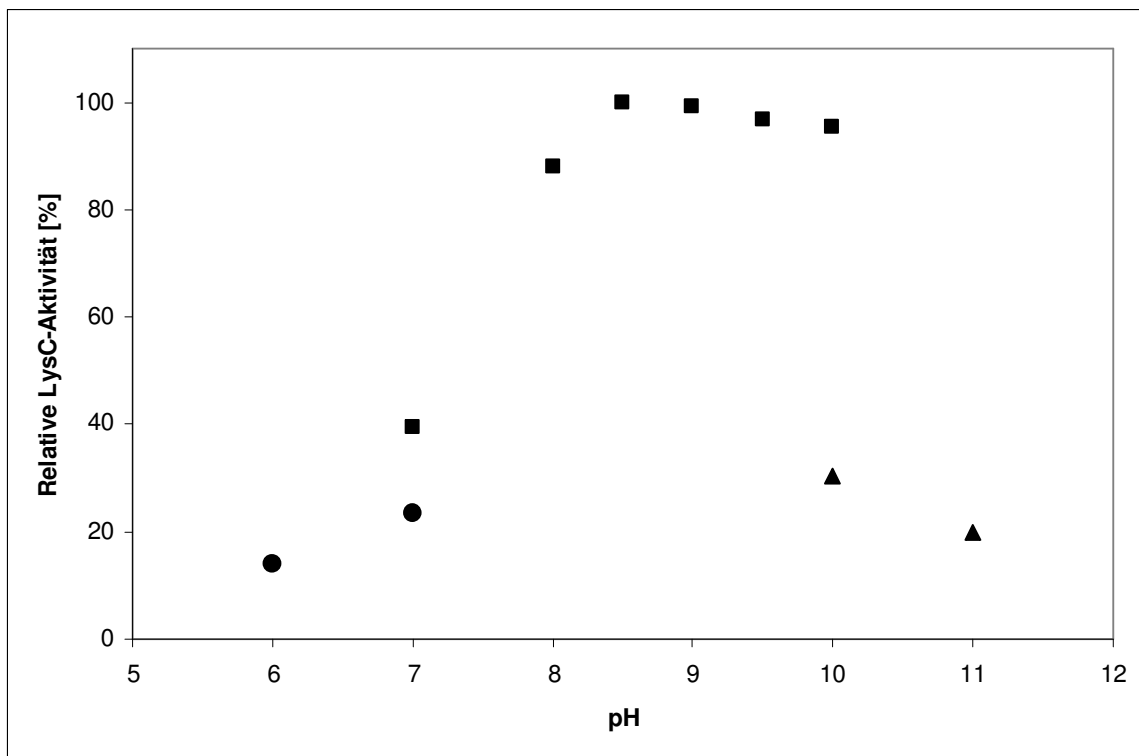


Abbildung 3.20: pH-Optimum (amidolytisch) von LysC. Die Umsätze wurden in 25 mM Kalium-Phosphat-Puffer (●), 25 mM Tris-HCl (■) und 20 mM Citrat-Phosphat-Borat-HCl (▲) durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse von Doppelbestimmungen der Umsätze bei 37 °C mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA als Substrat (100 % = 1,63 nkat/mL). Die Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte lagen unter 5 %.

3.8.3 pH-Stabilität von LysC

Für die Bestimmung der pH-Stabilität wurde LysC bei unterschiedlichen pH-Werten und 4°C inkubiert (siehe 2.19.4). Die eingesetzten Inkubationspuffer waren 25 mM Acetatpuffer (pH 4,5), 25 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,5), 25 mM Tris-HCl (pH 8,5-9) und 20 mM Citrat-Phosphat-Borate-HCl (pH 10,5). Die Protease-Aktivität wurde unter Standardbedingungen mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA als Substrat gemessen (vgl. 2.11.1). Die Restaktivität ergab sich aus dem Verhältnis von anfänglicher LysC-Aktivität und der Aktivität nach 22 h Inkubation im entsprechenden Puffer. Im untersuchten pH-Bereich (pH 4,5 bis 10,5) konnten bei jeder Probe mindestens 94 % der gemessenen Anfangsaktivität nachgewiesen werden. Am pH-Optimum von 8,5 konnte keinerlei Aktivitätsverlust nach 22 h gezeigt werden (nicht dargestellt). Somit zeigt die Lysyl-Endopeptidase aus *L. enzymogenes* eine hohe Stabilität sowohl im sauren als auch im basischen pH-Bereich.

3.8.4 Temperatur-Optimum von LysC

Die Messung des Temperatur-Optimums von LysC wurde mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA als Substrat bei verschiedenen Temperaturen in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) durchgeführt (siehe 2.19.3).

Das bestimmte Temperatur-Optimum der Lysyl-Endopeptidase lag bei 45°C (Abbildung 3.21). Bei 37°C zeigte LysC 79 % dieser Maximalaktivität, bei 50°C noch 97 %. Der Umsatz bei 60°C ergab nur noch eine Restaktivität von ca. 15 %.

Da Enzymaktivitäten aufgrund von thermodynamischen Eigenschaften mit zunehmender Reaktionstemperatur steigen, weist dieses Ergebnis auf einen Aktivitätsverlust aufgrund thermischer Denaturierung des Enzyms oberhalb von 45°C hin. Um dies zu bestätigen, wurde zusätzlich die Temperaturstabilität von LysC untersucht.

Ergebnisse

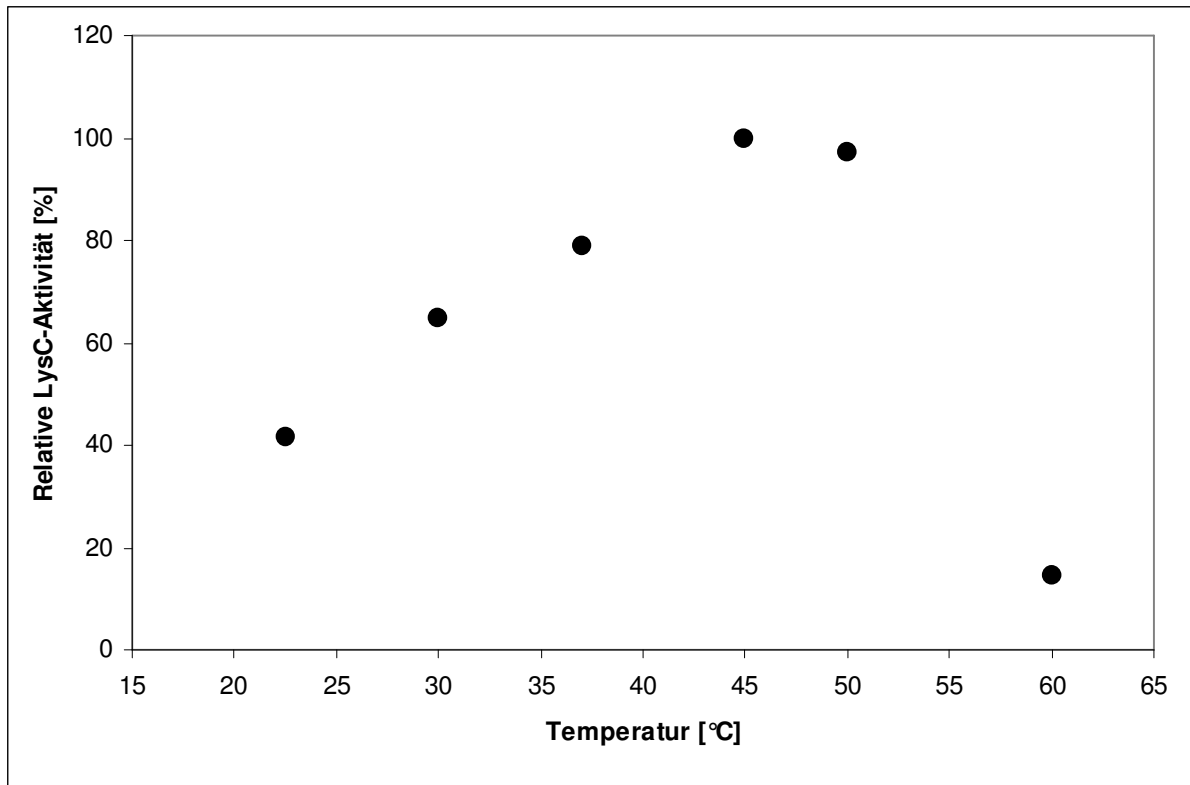


Abbildung 3.21: Temperatur-Optimum von LysC. Die Umsätze wurden in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse von Doppelbestimmungen der Umsätze mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA als Substrat (100 % = 1,9 nkat/mL). Die Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte lagen unter 5 %.

3.8.5 Temperatur-Stabilität von LysC

Um die Temperaturstabilität von LysC zu bestimmen, wurde das Enzym-Dialysat (20 mM Tris-HCl, pH 9) bei drei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, 37°C, 45°C) inkubiert. Zu mehreren Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Restaktivität wurde unter Standardbedingungen mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA als Substrat gemessen (siehe 2.19.5). Bei 4°C war das Enzym für mindestens 20,5 h stabil (Abbildung 3.22). Bei 37°C zeigte sich eine Stabilitätsdauer von 30 min und nach 20,5 h blieben noch 75 % der Anfangsaktivität erhalten. Am Temperaturoptimum von 45°C nahm die Aktivität schnell ab, so dass nach 1 h nur noch 40 % Restaktivität gemessen werden konnten.

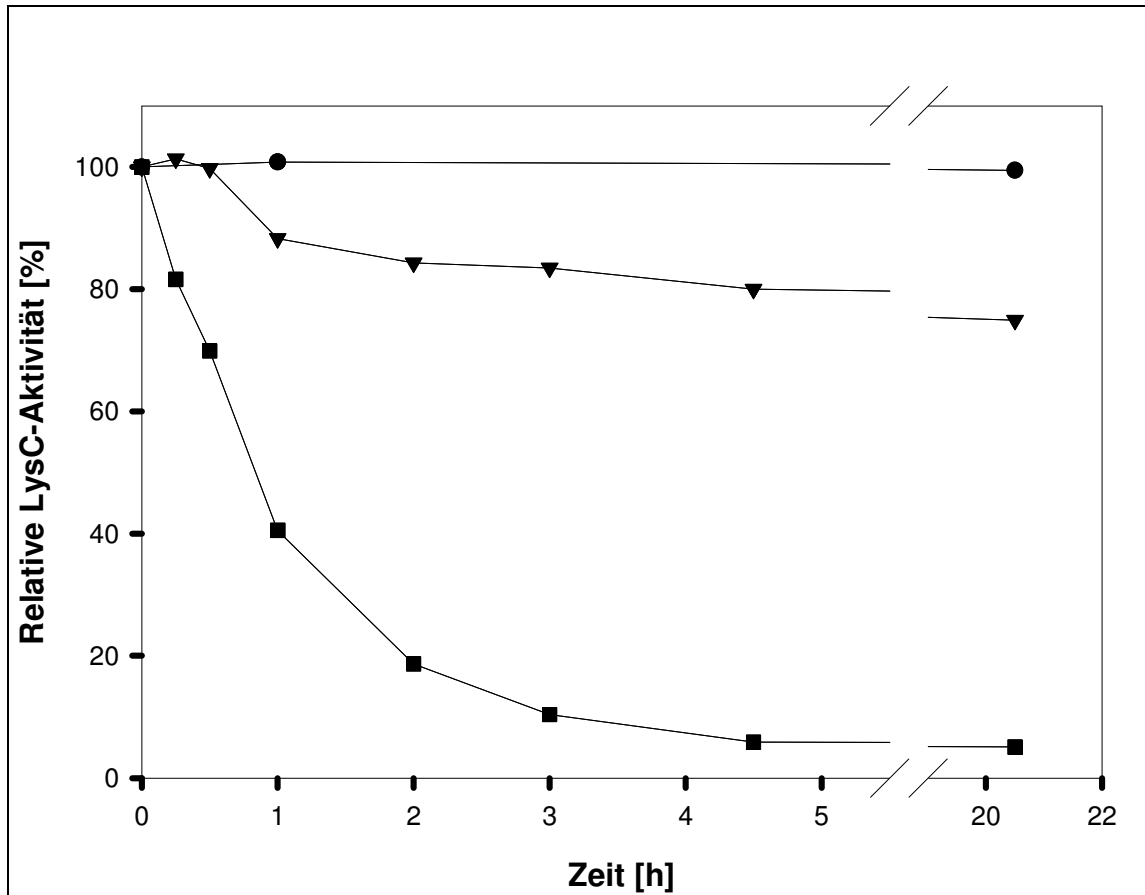


Abbildung 3.22: Temperatur-Stabilität von LysC. Das Enzym wurde bei 4°C (●), 37°C (▼) und 45°C (■) inkubiert. Die Umsätze von Tos-Gly-Pro-Lys-pNA wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse von Doppelbestimmungen (100 % = 0,4 nkat/mL). Die Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte lagen unter 5 %.

Die errechnete Halbwertszeit (t_H) der LysC-Aktivität bei 45°C betrug 50 min. Nach 4,5 h war das Enzym fast vollständig inaktiviert. Dies bestätigt die Vermutung nach Bestimmung des Temperaturoptimums, dass ab einer Temperatur von maximal 45°C aufgrund schneller thermischer Denaturierung die gemessene Enzymaktivität deutlich abnimmt.

3.8.6 Einfluss von Ionen, Lösungsmitteln und Inhibitoren auf LysC

Um den Einfluss von verschiedenen metallischen und nicht-metallischen Ionen, organischen Lösungsmitteln und Enzyminhibitoren auf die Proteaseaktivität zu untersuchen, wurde LysC mit den entsprechenden Reagenzien bei 37 °C für 20 min vorinkubiert, bevor die Aktivitätsmessung unter Standardbedingungen durchgeführt wurde (siehe 2.19.6). Untersucht wurde hierbei der Effekt von einwertigen Kationen (Na^+ , NH_4^+), von zweiwertigen Kationen (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}), des Metalloprotease-Inhibitors EDTA, des Serinprotease-Inhibitors PMSF (Phenylmethylsulfonyl-fluorid) sowie der Alkohole Ethanol und Isopropanol. 1 mM Ba^{2+} und NH_4^+ führten zu einer Reduktion der Aktivität von ca. 50 % bzw. 13 % (Tabelle 3.1). Der Serinprotease-Inhibitor PMSF zeigte einen nur schwachen inhibitorischen Effekt (90 % Restaktivität) bei einer Konzentration von 1 mM, die zehnfache Konzentration führte zu einer

Tabelle 3.1: Einfluss von Inhibitoren, Ionen und Lösungsmitteln auf die Aktivität von LysC. Die Protease wurde für 20 min bei 37 °C mit dem jeweiligen Reagenz inkubiert. Die Enzymaktivität wurde mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA unter Standardbedingungen in Doppelbestimmung gemessen. Die Standardabweichung lag jeweils unter 2 % (100 % = 0,71 nkat/mL).

| Reagenz | Konzentration | Relative Aktivität ^a [%] |
|------------------------|---------------|-------------------------------------|
| Wasser | 100 % | 100 |
| EDTA | 1 mM | 100 |
| PMSF ^b | 1 mM | 90 |
| | 10 mM | 12 |
| BaCl_2 | 1 mM | 54 |
| CaCl_2 | 1 mM | 102 |
| NaCl | 1 mM | 101 |
| NH_4Cl | 1 mM | 87 |
| MnCl_2 | 1 mM | 100 |
| Isopropanol | 10 % | 107 |
| Ethanol | 10 % | 100 |

^a: bezogen auf das entsprechende Lösungsmittel

^b: gelöst in Isopropanol

Ergebnisse

Restaktivität von 12 %. 10 % (v/v) Isopropanol bewirkte einen leichten Aktivitätsanstieg um 7 %; alle anderen eingesetzten Reagenzien zeigten keinen Einfluss auf die LysC-Aktivität. Da es sich bei LysC um eine Serin-Protease handelt, war eine Inhibierung durch PMSF zu erwarten und auch für Ba^{2+} und NH_4^+ sind vergleichbare Effekte auf die Aktivität dieser Enzymgruppe beschrieben.

3.8.7 Native PAGE mit LysC-Aktivfärbung

Die apparente Molekülgröße der renaturierten, rekombinanten Lysyl-Endopeptidase wurde über eine native PAGE mit anschließender Aktivfärbung bestimmt.

Vor dem Auftragen auf das High Density PHAST Gel (2.9.2) wurde das LysC-Dialysat mittels Ultrafiltration (Ausschlussgrenze: 10 kDa) 5fach konzentriert, so dass die Proteaseaktivität der Probe $2,1 \text{ nkat}_{\text{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}}/\text{mL}$ betrug. Die Aktivfärbung wurde bei 37°C in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) mit dem Substrat Tos-Gly-Pro-Lys-pNA durchgeführt. Nach Intensivierung der pNA-Färbung durch Umfärbung mit N-(1-Naphtyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid (siehe Tabelle 2.12) erfolgte die Gel-Dokumentation. Für den Größenvergleich wurde im PHAST System parallel eine zweite native PAGE durchgeführt, bei der ein molekularer Größenstandard (66-669 kDa) aufgetrennt und anschließend über Silberfärbung sichtbar gemacht wurde.

Das LysC-Dialysat zeigte nach Aktivfärbung und Umfärbung nur eine Farbbande mit einer apparenten Größe von ca. 120-140 kDa (Abbildung 3.23). Dieses Molekulargewicht entspricht in etwa der Größe eines LysC-Tetramers. Hierbei handelt es sich um eine der beiden bereits beschriebenen aktiven Quartärstrukturen der Lysyl-Endopeptidase aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes*. Dass die Aktivfärbung mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA zu keinen weiteren Farbbanden führte, zeigte, dass das LysC-Dialysat keine weitere aktive Protease mit vergleichbarer Substratspezifität enthielt. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass es bei der biochemischen Charakterisierung von LysC nicht zu einer Verfälschung der entsprechenden Parameter durch weitere im Dialysat enthaltene Proteasen kam.

Ergebnisse

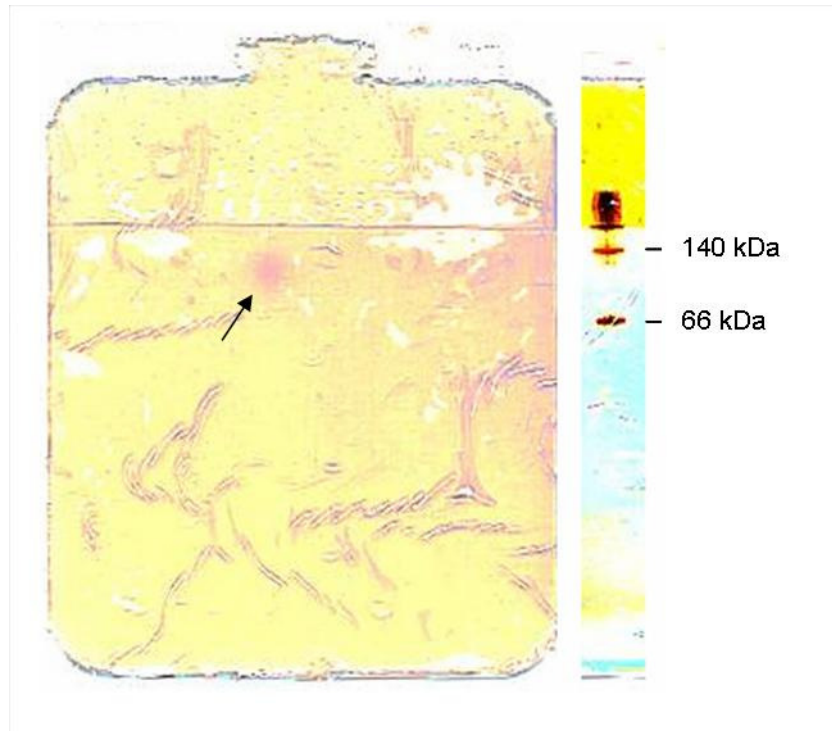


Abbildung 3.23: Native PAGE zur Bestimmung der apparenten Molekülgröße von aktiver LysC durch Aktivfärbung. Die aufgetragene Probe hatte eine Proteaseaktivität von $2,1 \text{ nkat}_{\text{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA/mL}}$. Die Aktivfärbung des High Density PHAST Gels wurde bei 37°C in 25 mM Tris-HCl (pH 8,5) durchgeführt. Der Pfeil markiert die LysC-Farbbande. Rechts ist der silber-gefärbte HMW-Größenstandard abgebildet.

Anhand der Ergebnisse, die bei der Enzymcharakterisierung erhalten wurden, erfolgte die Festlegung der Bedingungen für die Hydrolyse von bovinem Casein mit LysC (siehe 2.20).

3.9 Casein-Hydrolyse mittels LysC zur Generierung funktioneller Peptide

Die in dieser Arbeit rekombinant produzierte und charakterisierte Lysyl-Endopeptidase LysC aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* sollte als sequenzspezifische Modellprotease für die Generierung bioaktiver Peptide in einer Lebensmittelmatrix dienen. Deshalb wurde das LysC-Dialysat für die Hydrolyse von bovinem Casein eingesetzt, um dieses Hydrolysat anschließend bezüglich eventuell entstandener funktioneller Peptide zu analysieren.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von bovinem Casein mit LysC und das HPLC-Peptidmuster („Fingerprint“) des Hydrolysats dargestellt. Die Identifizierung der während der Hydrolyse generierten Peptide erfolgte mittels massenspektrometrischer Analyse (LC-ESI-MS/MS).

3.9.1 Hydrolyse von bovinem Casein

Die Hydrolyse wurde in einem 50 mL Glasbioreaktor durchgeführt (30 mL Arbeitsvolumen). Aufgrund der besseren Löslichkeit des Caseins bei höherem pH-Wert wurde 25 mM Tris-HCl (pH 9) als Reaktionspuffer gewählt, obwohl der pH über dem pH-Optimum der Protease lag (vgl. 3.8.2). Aufgrund der deutlich höheren Stabilität des Enzyms bei 37°C gegenüber dem Temperaturoptimum bei 45°C (siehe 3.8.5) wurde die Reaktion bei der niedrigeren Temperatur durchgeführt. Nach Konzentrierung des LysC-Dialysats wurde eine Anfangsaktivität von 21,1 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA} zur Hydrolyse von 0,65 % (w/v) bovinem Casein eingesetzt (2.20.1; nach Schopp, 2008). Nach 24 h wurden nochmals 21,1 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA} LysC zugegeben, um die Reaktion möglichst vollständig ablaufen zu lassen und so die Peptidausbeute zu erhöhen. Während der gesamten Hydrolysedauer von 48 h wurden ca. 3,9 mL 0,1 N NaOH zutitriert, um den pH-Wert konstant bei 9,0 zu halten. Dies diente zur Kontrolle des Verlaufs der Hydrolysereaktion. Da zwischen den Messpunkten nach 45 h und 48 h nur noch 0,06 mL Lauge verbraucht wurden, erfolgte danach der Abbruch der Reaktion durch Zentrifugation und Ultrafiltration

Ergebnisse

(Ausschlussgrenze: 10 kDa). Aufgrund der Zugabe von NaN_3 enthielt das Hydrolysat zu keinem Zeitpunkt mikrobielle Kontaminationen, was die mikroskopische Kontrolle zeigte. Dies war von Bedeutung, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch den Einfluss von mikrobiellen Fremdproteasen zu minimieren. Die Trockenmasse des Hydrolysats wurde nach Gefriertrocknung bestimmt und betrug 1,08 mg/mL. Abzüglich der Massen der darin enthaltenen Salze (Tris , Na^+ , N_3^-) wurde daraus rechnerisch eine Peptid-Trockenmasse von 0,401 mg/mL ermittelt. Dieser Wert wurde bei der Berechnung der IC_{50} -Werte für die biofunktionellen Eigenschaften des Hydrolysats (3.10) eingesetzt.

Nach Beendigung der Casein-Hydrolyse wurde mittels HPLC ein Peptidmuster („Fingerprint“) der generierten Peptide erstellt.

3.9.2 HPLC-Chromatogramm des Caseinhydrolysats

Nachdem das mittels Lysyl-Endopeptidase-Spaltung hergestellte Casein-Hydrolysat (3.9.1) zentrifugiert und filtriert worden war (siehe 2.20.1), erfolgte eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC). Die HPLC-Chromatogramme („Fingerprints“) des Caseinhydrolysats sowie der Referenzprobe (unhydrolysiertes Casein) sind in Abbildung 3.24 dargestellt. Die UV-Signale im Bereich von 3,5 min bis 8 min sind durch die Elution von ddH_2O und Salzen zu erklären. Unhydrolysiertes Casein wurde nach 33 bis 38 min eluiert. Somit repräsentieren alle ca. 20 Peaks des Hydrolysats, die zwischen 12,5 min und 33 min Retentionszeit eluiert wurden, durch LysC generierte Peptide. Anhand der Aminosäuresequenz von bovinem Casein kann von theoretisch 54 Peptiden ausgegangen werden, welche durch die vollständige Hydrolyse mit Lysyl-Endopeptidase entstehen können (siehe Anhang 8.5). Da bei $\lambda = 220 \text{ nm}$ die Peptidbindungen detektiert werden und somit größere Peptide ein vergleichsweise stärkeres Signal geben als kleinere, muss davon ausgegangen werden, dass insbesondere Di- und Tripeptide nur ein sehr schwaches oder nicht detektierbares UV-Signal geben und somit evtl. von keinem der dargestellten Peaks repräsentiert werden. Vorangegangene Arbeiten (Schopp, 2008) hatten außerdem gezeigt, dass ein Peak im HPLC-Chromatogramm mehr als ein Peptid repräsentieren kann.

Ergebnisse

Um die während der Casein-Hydrolyse generierten funktionellen Peptide zu identifizieren, wurde das Hydrolysat mittels Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) analysiert.

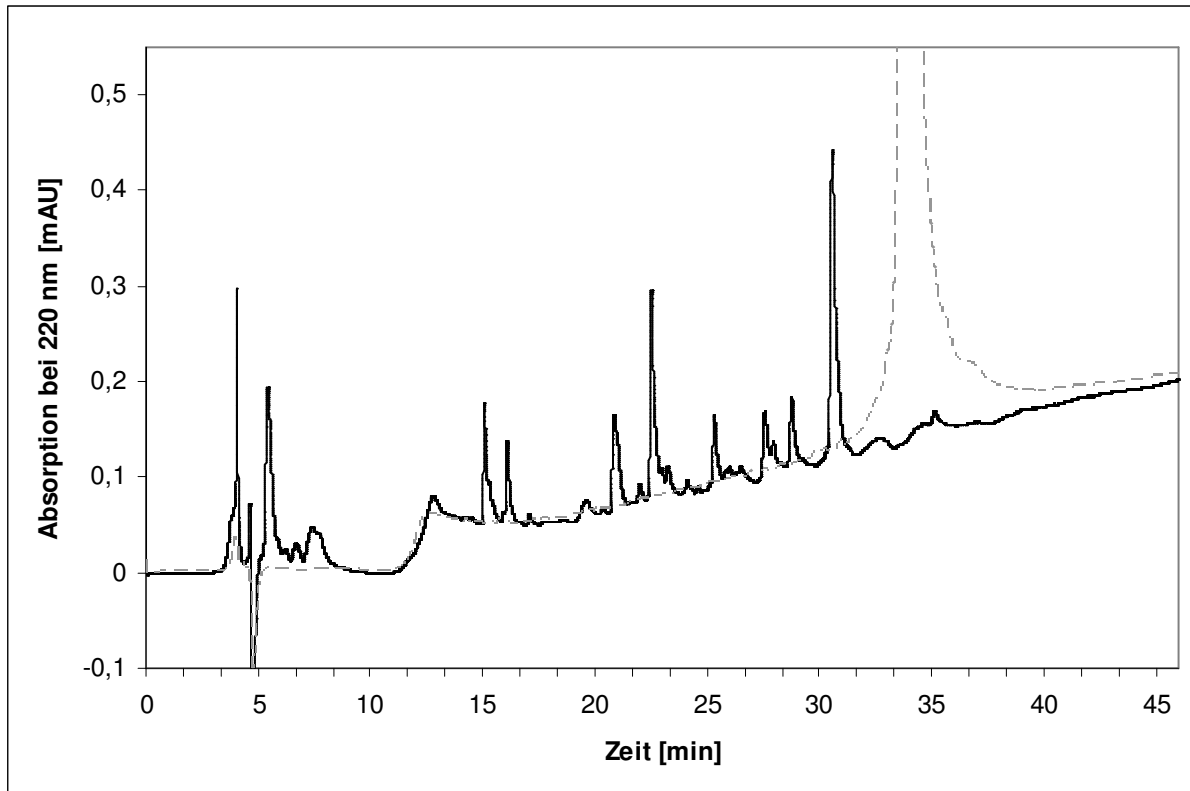


Abbildung 3.24: HPLC-Chromatogramm von Casein-Hydrolyse mit LysC (–) und unhydrolysiertem Casein (– –). Die Auftrennung erfolgte auf einer Aqua Phenomenex C18 200A Säule unter reversed-phase Bedingungen mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH₂O bzw. Acetonitril als Fließmittel. Die Flussrate betrug 0,5 mL/min.

3.9.3 Identifizierung bioaktiver Peptide mittels LC-ESI-MS/MS

Um generierte Peptide mit funktioneller Eigenschaft im LysC-Casein-Hydrolysat zu identifizieren, wurde eine Untersuchung mittels LC-ESI-MS/MS durchgeführt.

Vor der Massenspektrometrie-Analyse wurde das Casein-Hydrolysat mittels HPLC (Grom-Sil 120 Säule) entsalzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht lyophilisiert (siehe 2.20.2, 2.20.3). Nach der jeweiligen Elution des Salzpeaks (Retentionszeit ca. 1,9-2,5 min) wurde das gesamte Eluat aus fünf HPLC-Läufen in einer Fraktion gesammelt (nicht dargestellt).

Die LC-ESI-MS/MS Analyse wurde am Life Science Center der Universität Hohenheim durchgeführt. Die Flüssigchromatographie (LC) wurde mit einer nano Aquity Säule (75 μm x 200 mm) durchgeführt, die (Tandem-)Massenspektrometrie (MS/MS) mit einem LTQ Orbitrap XL Spektrometer (2.20.3).

Für einige der theoretisch mittels LysC-Hydrolyse aus α_{s1} -, α_{s2} -, β - und κ -Casein generierbaren 54 Peptide (siehe Anhang 8.5) wurde bereits eine biologische Funktionalität beschrieben. Diese sind TT MPLW (immunomodulierend), NMAINPSK, FALPQYLK, ALNEINQFYQK, EMPFPK (jeweils ACE-inhibierend) und VLPVPQK (antioxidativ). Daher wurde bei der Auswertung der massenspektrometrischen Analyse des Casein-Hydrolysats insbesondere nach den Massen dieser Zielpeptide bzw. deren Ionisierungsfragmente gesucht.

Anhand der MS-Übersichtsspektren konnten 5 der oben genannten bioaktiven Zielpeptide aufgrund ihrer Molekülmassen identifiziert werden (Tabelle 3.2). Zusätzlich wurden NMAINPSK, FALPQYLK, ALNEINQFYQK und VLPVPQK durch Nachweis ihrer Ionisierungsfragmente nach MS/MS bestätigt. Abbildung 3.26 zeigt beispielhaft das MS/MS-Spektrum des als ACE-inhibierend beschriebenen FALPQYLK ($m = 490.2846$ Da, $z = +2$). Die entsprechenden Massen der Ionisierungsfragmente von FALPQYLK sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. 13 der 14 möglichen *b*- und *y*-Ionen wurden detektiert, 9 davon sind im zugehörigen Spektrum dargestellt. Die entsprechenden Ergebnisse für die ACE-inhibierenden Peptide NMAINPSK ($m = 437.7264$ Da; $z = +2$) und ALNEINQFYQK ($m = 684.3517$; $z = +2$) sowie für das antioxidativ wirkende VLPVPQK ($m = 390.7532$; $z = +2$) befinden sich in Anhang/Abbildung 8.2.

Ergebnisse

Das MS-Übersichtsspektrum von EMPFPK ist in Abbildung 3.25 gezeigt. Die niedrige Signalstärke im Größenbereich von unter 10^6 (relative Signalstärke) erklärt, weshalb nach MS/MS keine zugehörigen Ionisierungsfragmente detektiert werden konnten.

Anhand der detektierten Peptid-Massen und der daraus errechneten möglichen Aminosäuresequenzen (nicht dargestellt) zeigte sich, dass bei der Caseinhydrolyse durch die Lysyl-Endopeptidase LysC ausschließlich Peptidbindungen am C-Terminus von Lysin gespalten wurden. Dies bestätigt die bereits über den Umsatz chromogener Peptidsubstrate gezeigte hohe Substratspezifität dieser Protease (siehe 3.8.1) für Lysinreste an P1-Position.

Während andere Lys-X-Peptidbindungen quantitativ hydrolysiert wurden, erfolgte die Spaltung von Lys-Lys-Bindungen sowie nach Lys-X-Lys-Motiven weniger effizient. So wurden bei der Hydrolyse z.B. sowohl das Peptid VIQVPPK als auch VIQVPPKK generiert. Zudem konnte neben dem Zielpeptid EMPFPK auch das Peptid HKEMPFPK nachgewiesen werden, welches eine Fehlschnittstelle nach einem solchen Lys-X-Lys-Motiv enthält.

Ergebnisse

Tabelle 3.2: Über MS identifizierte bioaktive Peptide im LysC-Casein-Hydrolysat.

| Peptidsequenz | aus Casein- fraktion | Theoretische Masse bei $z = +2$ [Da] | Detektierte Masse bei $z = +2$ [Da] | beschriebene Funktionalität | Referenz |
|---------------|--------------------------|---|--|--------------------------------|--------------------------------|
| EMPFPK | β f(108-113) | 382,6864 | 382,68607 | ACE-Inhibitor | Pihlanto-Leppälä et al. (1998) |
| FALPQYLK | α_{s2} f(174-181) | 490,2846 | 490,2842 | ACE-Inhibitor | Tauzin et al. (2002) |
| NMAINPSK | α_{s2} f(25-32) | 437,7264 | 437,72607 | ACE-Inhibitor | Tauzin et al. (2002) |
| ALNEINQFYQK | α_{s2} f(81-91) | 684,3517 | 684,35089 | ACE-Inhibitor | Tauzin et al. (2002) |
| VLPVPQK | β f(170-176) | 390,7532 | 390,7525 | antioxidativ | Rival et al. (2001) |

Ergebnisse

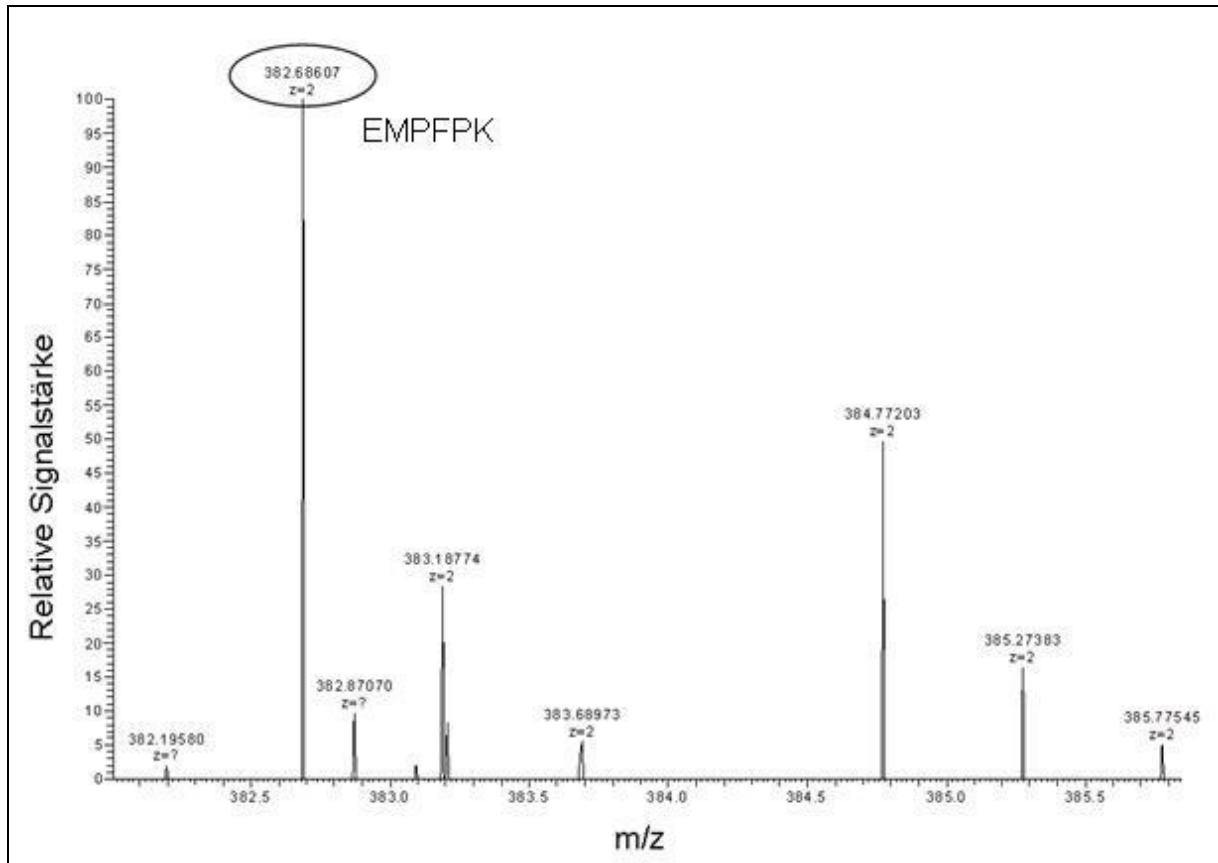


Abbildung 3.25: MS-Nachweis von EMPFPK. Der berechnete m/z-Wert von EMPFPK betrug 382,6864, verwendet wurde ein LTQ Orbitrap XL Spektrometer. (100 % = $7,72 \cdot 10^5$)

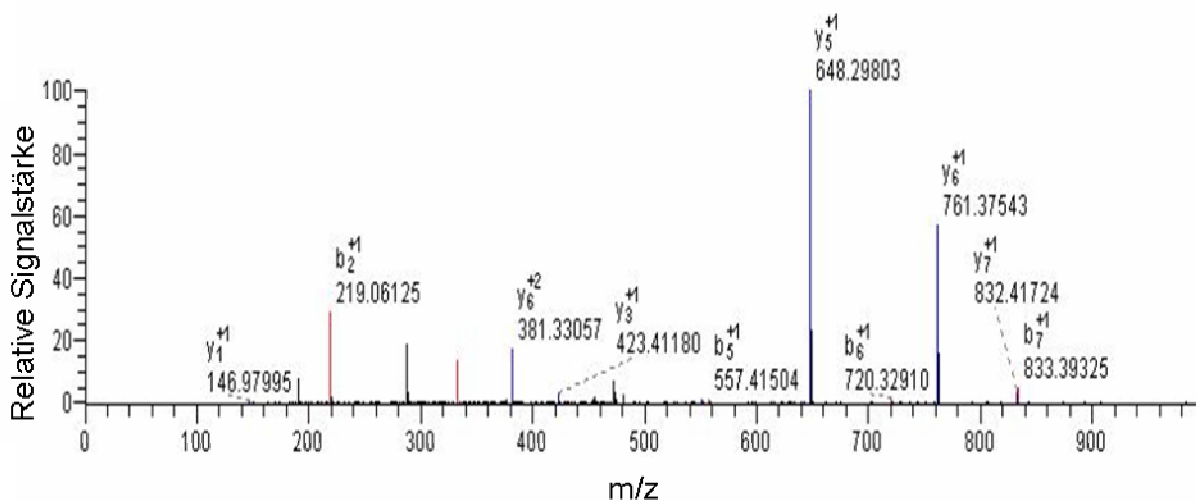


Abbildung 3.26: MS/MS-Spektrum von FALPQYLK. Die b- und y-Nomenklatur erfolgte nach Roepstorff und Fohlman (1984). Es wurde ein LTQ Orbitrap XL Spektrometer eingesetzt. Zur Identifizierung der Fragmente siehe Tabelle 3.3. (100 % = $4,65 \cdot 10^3$)

Tabelle 3.3: Übersicht der berechneten *b*- und *y*-Ionenmassen von FALPQYLK.

| Aminosäure-Sequenz | Masse der <i>b</i> -Ionen [Da] | Masse der <i>y</i> -Ionen [Da] |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| F | 148,07569 | - |
| A | 219,1128 | 832,49272 |
| L | 332,19687 | 761,4556 |
| P | 429,24963 | 648,37154 |
| Q | 557,30821 | 551,31877 |
| Y | 720,37154 | 423,2602 |
| L | 833,4556 | 260,19687* |
| K | - | 147,1128 |

* nicht über MS/MS detektiert

Die rekombinant hergestellte Lysyl-Endopeptidase aus *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* wurde eingesetzt, um bovines Casein zu hydrolysieren. Der HPLC „Fingerprint“ des Hydrolysats zeigte ca. 20 Peptid-Peaks mit Retentionszeiten zwischen 12,5 min und 36 min, welche im Referenz-Chromatogramm von unhydrolysiertem Casein nicht detektiert wurden. Mittels LC-ESI-MS/MS wurden 5 als bioaktiv beschriebene Peptide im Casein-Hydrolysat identifiziert, darunter solche mit ACE-inhibitorischer und antioxidativer Wirkung.

3.10 *In vitro* Assays zur Bestimmung bioaktiver Eigenschaften des Casein-Hydrolysats

Wie unter 3.9.3 gezeigt, konnten mittels massenspektrometrischer Analyse des Caseinhydrolysats Peptide mit beschriebener bioaktiver Funktionalität identifiziert werden. Es handelte sich hierbei um Peptide mit entweder antioxidativer (Lipoxygenase-inhibierender bzw. Radikalfänger-) oder ACE-inhibierender Wirkung. Um das Casein-Hydrolysat bezüglich dieser Eigenschaften zu untersuchen, wurden die entsprechenden *in vitro* Assays durchgeführt.

3.10.1 Bestimmung der antioxidativen (Radikalfänger-) Aktivität

Zur Bestimmung der Radikalfänger-Aktivität wurde der Decolorisations-Assay nach Re et al. (1999) durchgeführt (siehe 2.21.1). Das Prinzip dieses Assays besteht darin, dass in Gegenwart von antioxidativ wirksamen Substanzen das ABTS^{•+}-Radikal reduziert wird. Dies resultiert in einer Abnahme der Grünfärbung der Reaktionslösung, was photometrisch quantifizierbar ist.

Nach Inkubation der Probe bzw. Referenzprobe (dH₂O) mit ABTS^{•+} für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 734 nm gemessen. Nach Berechnung der prozentualen Inhibierung (Gleichung 2.6) erfolgte die Quantifizierung der antioxidativen Wirkung im Bezug auf die Wirkung des wasserlöslichen Vitamin E Derivats Trolox. Die entsprechende Kalibriergerade ist in Anhang/Abbildung 8.6 dargestellt. Die Angabe der antioxidativen Wirksamkeit erfolgte in TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).

Die ermittelte prozentuale Inhibition des Gesamtcasein-Hydrolysats betrug 41,3 % bezogen auf dH₂O. Unter Berücksichtigung der Protein- bzw. Peptid-Trockenmasse des Hydrolysats ergab sich daraus eine antioxidative Wirksamkeit von 2,86 TEAC/mg. Unhydrolysiertes Casein zeigt im Vergleich hierzu eine antioxidative Wirksamkeit von 0,38 TEAC/mg. Somit führte die Hydrolyse von bovinem Casein mit der Lysyl-Endopeptidase zu einer 6,5fachen Erhöhung der Radikalfänger-Aktivität.

Der IC₅₀-Wert der antioxidativen Aktivität wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung im Assay-Ansatz mit der in 3.9.1 bestimmten Trockenmasse des Hydrolysats berechnet und lag bei 4,85 µg/mL.

3.10.2 Messung der Lipoxygenase-Inhibierung

Lipoxygenasen (LOX) sind Enzyme, die u.a. bei der Entstehung von Krebs, Asthma und inflammatorischen Krankheiten sowie beim Verderb von Lebensmitteln eine wichtige Rolle spielen. Daher ist die Inhibierung dieser Enzymgruppe eine gewünschte bioaktive bzw. technofunktionale Eigenschaft von funktionellen Lebensmitteln. Für *in vitro* Assays zur Untersuchung von LOX-inhibitorischer

Ergebnisse

Wirksamkeit wird aufgrund ihrer Verfügbarkeit und struktureller Ähnlichkeit zum humanen Enzym LOX aus Sojabohnen eingesetzt.

Die LOX-Inhibierung des LysC-Casein-Hydrolysats wurde nach der Methode von Somvanshi et al. (2008) bestimmt (siehe 2.21.2). Hierbei diente die Absorptionsänderung $\Delta A/\Delta t$ ($\lambda = 234$ nm) im linearen Bereich nach Zugabe von LOX-Lösung zur Linolensäure-Substratlösung als relatives Maß für die Enzymaktivität. Die relative LOX-Inhibition errechnete sich als Quotient der Steigungen aus Referenzansatz und Probenansatz. Die eingesetzte Enzymlösung sowie Hydrolysat-Probe wurden so verdünnt, dass $\Delta A/\Delta t$ jeweils zwischen 0,2 und 0,4 betrug. Alle Messungen wurden mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Zugabe von 1:4 verdünntem Gesamtcasein-Hydrolysat zum Reaktionsansatz bewirkte eine 21,1%ige Inhibierung der Lipoxygenase bezogen auf den Referenzansatz, zu dem das gleiche Volumen 25 mM Tris-HCl (pH 9) gegeben wurde. Unter Einberechnung der Trockenmasse des Hydrolysats (siehe 3.9.1) ergab sich daraus eine IC_{50} -Konzentration der LOX-Inhibierung von 23,6 $\mu\text{g/mL}$.

3.10.3 Messung der ACE-Inhibierung

Die physiologische Funktion des ACE (Angiotensin-converting enzyme) besteht u.a. darin, die Spaltung von Angiotensin I zu Angiotensin II zu katalysieren. Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch und führt so zu einer Erhöhung des Blutdrucks. Für eine Vielzahl von Peptiden konnte bereits eine ACE-inhibitorische und somit blutdrucksenkende Wirkung beschrieben werden.

Der *in vitro* Assay zur Bestimmung der ACE-inhibierenden Aktivität des Casein-Hydrolysats wurde nach verändertem Protokoll von Cushman und Cheung (1971) durchgeführt (siehe 2.21.3). Es diente Hippuryl-L-histidyl-L-leucin (Hip-His-Leu) als Substrat für das ACE. Die dabei hydrolytisch freigesetzte Hippurysäure wurde nach HPLC (Phenomenex Aqua C18 200A Säule) bei $\lambda = 228$ nm detektiert. Anhand der Flächen unter dem Hippurysäure-Peak (Retentionszeit: 22,15 min) von Casein-Hydrolysatprobe und Referenzprobe wurde über Gleichung 2.7 die ACE-inhibitorische Wirkung des Hydrolysats bestimmt. Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C in 100 mM Na-Borat-Puffer (pH 8,3) mit 400 mM NaCl.

Ergebnisse

Die ACE-inhibitorische Wirkung von 1:10 verdünntem LysC-Casein-Hydrolysat betrug $75,92 \pm 5,85$ %, ermittelt nach einer Dreifachbestimmung. Unter Berücksichtigung der Verdünnung im Assay-Ansatz führte dies mit der in 3.9.1 bestimmten Trockenmasse des Hydrolysats zu einem IC_{50} -Wert der ACE-Inhibierung von $2,78 \mu\text{g/mL}$.

Die *in vitro* Assays zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften des Caseinhydrolysats wiesen ACE-Inhibierung ($IC_{50} = 2,78 \mu\text{g/mL}$), Radikalfänger-Aktivität ($IC_{50} = 4,85 \mu\text{g/mL}$) und Lipoxygenase-Inhibierung ($IC_{50} = 23,6 \mu\text{g/mL}$) nach.

4 Diskussion

4.1 Auswahl einer sequenzspezifischen Protease

In dieser Arbeit sollte eine sequenzspezifische, mikrobielle Protease hergestellt werden. Das Enzym sollte anschließend zur Hydrolyse von bovinem Casein eingesetzt werden, um die Generierung von funktionellen Peptiden zu untersuchen. Da vor dem Einsatz zur Hydrolyse auch eine biochemische Charakterisierung des Enzyms durchgeführt werden sollte, kamen nur solche Proteasen in Betracht, bei denen dies in der Literatur noch nicht oder nur teilweise beschrieben war. Nach entsprechender Literaturrecherche wurden proteolytische Enzyme aus *Xanthomonas* sp. und *Lysobacter* sp. ausgewählt.

Die Enzymgruppe der Aspartat-(Carboxyl-)Proteinasen findet man in vielen verschiedenen Organismen, darunter Pflanzen, Tiere und Bakterien (Kay, 1985). In der Literatur wird diese Enzymgruppe, abhängig von ihren Inhibitoren, in (isovaleryl-)pepstatinsensitiv einerseits und –insensitiv andererseits unterteilt (Murao und Oda, 1985). Eine der ersten prokaryotischen pepstatinsensitiven Carboxyl-Proteinasen wurde in *Xanthomonas* sp. T-22 nachgewiesen und teilweise charakterisiert (Oda et al., 1987; Oda et al., 1996).

Der Wildtyp-Stamm von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sekretiert als Hauptproteasekomponente die Calcium-abhängige Serinprotease PRT1 sowie die Zink-abhängige Metalloprotease PRT2 in den Kulturüberstand (Dow et al., 1990). Für die Serinprotease wurde dabei anhand von Inhibitorstudien vermutet, dass dieses Enzym eine Präferenz für die Spaltung von Peptidbindungen nach hydrophoben Aminosäuren aufweist. Um die Substratspezifität von PRT1 zu untersuchen und so eine Aussage über seine Eignung als sequenzspezifische Protease zur Casein-Hydrolyse treffen zu können, wurde der Wildtyp-Stamm *X. campestris* pv. *campestris* DSM 3586 kultiviert. Die gesamte proteolytische Aktivität im Kulturüberstand nach 24 h betrug $0,43 \text{ nkat}_{\text{Casein}}/\text{mL}$, während die von Dow et al. (1990) beschriebene Rifampin-resistente Mutante unter vergleichbaren Bedingungen ca. $26,6 \text{ nkat}_{\text{Casein}}/\text{mL}$ sekretierte. Nach Inaktivierung von PRT2 im Dialysat des Kulturüberstandes und Untersuchung der Substratspezifität der Serinprotease PRT 1

mit verschiedenen chromogenen Peptidsubstraten zeigte sich zwar die bereits vermutete Präferenz für hydrophobe Aminosäurereste an P1-Position (siehe 3.1.2), jedoch wurden auch andere Substrate, darunter solche mit Lysin und Prolin an dieser Position, in detektierbaren Mengen umgesetzt. Da es sich somit bei der Serinprotease PRT1 aus *X. campestris* pv. *campestris* nicht um ein sequenzspezifisches Enzym handelte, wurden keine weiteren Experimente mit dieser Protease durchgeführt.

Lysyl-Endopeptidasen (EC 3.4.21.50) werden von verschiedenen Mikroorganismen gebildet, darunter *Achromobacter lyticus* (Masaki et al., 1978), *Pseudomonas aeruginosa* (Elliott und Cohen, 1986) *Lysobacter* sp. (Chohnan et al., 2002) und *Lysobacter enzymogenes* (Jekel et al., 1983). Hierbei wurde das Enzym *Achromobacter* Protease I (API) aus *A. lyticus* am besten untersucht und charakterisiert (Masaki et al., 1981a; Masaki et al., 1981a; Masaki und Soejima, 1985; Masaki et al., 1992). Die Enzymunterklasse zeichnet sich insbesondere durch ihre hohe Spezifität für die Hydrolyse von Peptidbindungen am C-terminalen Ende von Lysin aus. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde die Lysyl-Endopeptidase LysC aus *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* DSM 1895 für eine biochemische Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt.

4.2 Herstellung und Charakterisierung von LysC aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes*

Für die Herstellung der Lysyl-Endopeptidase aus *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* wurde sowohl die Kultivierung des Wildtyp-Stammes als auch die rekombinante Bildung in *E. coli* BL21(DE3) untersucht (3.2, 3.4).

Die Bioreaktor-Kultivierung von *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* führte zu einer maximalen LysC-Aktivität von $84 \text{ nkat}_{\text{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA/L}_{\text{Kultur}}}$ nach 45 h. Chohnan et al. (2002) beschrieben für *L. enzymogenes* ATCC 29487 und *A. lyticus* maximale sekretierte Proteaseaktivitäten von 249 bzw. 531 $\text{nkat}_{\text{Bz-Lys-pNA/L}_{\text{Kultur}}}$ nach 225 h Kultivierung. Die Herstellung von rekombinanter Lysyl-Endopeptidase in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte über die Expression eines synthetischen Genkonstrukts nach Kopetzki und Karcher (1999) mit angepasster „Codon-Usage“ und einer 4

Diskussion

Aminosäuren langen N-terminalen Prosequenz. Nach ca. 8 h Bioreaktor-Kultivierung und anschließender „Inclusion Body“ Solubilisierung und Enzym-Renaturierung mit L-Arginin als Faltungshilfe ergab sich eine maximale LysC-Aktivität von $60 \text{ nkat}_{\text{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA/LKultur}}$. Somit lag die bei der Wildtyp-Kultivierung erreichte LysC-Aktivität 40 % über der der rekombinanten Herstellung. Nach Aufarbeitung der unlöslichen Protease zeigte das LysC-Dialysat beim Umsatz von verschiedenen chromogenen Modellsubstraten nur sehr geringe Nebenaktivitäten (siehe 3.8.1), weshalb es im weiteren Verlauf der Arbeit für die Hydrolyse von Casein eingesetzt wurde.

L. enzymogenes ssp. *enzymogenes* sekretiert neben LysC noch weitere Proteasen, darunter die α -lytische Protease (Epstein und Wensink, 1988) sowie die Endoprotease ArgC (Wright et al., 1998). Aus diesem Grund müsste die Lysyl-Endopeptidase im *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* Kulturüberstand vermutlich vor der Verwendung in einer Caseinhydrolyse aufgereinigt werden, um die durch die anderen proteolytisch aktiven Enzyme verursachten Nebenaktivitäten auszuschließen. Dies wäre durch den Vergleich mit dem kommerziell erhältlichen, hochreinen Enzym überprüfbar.

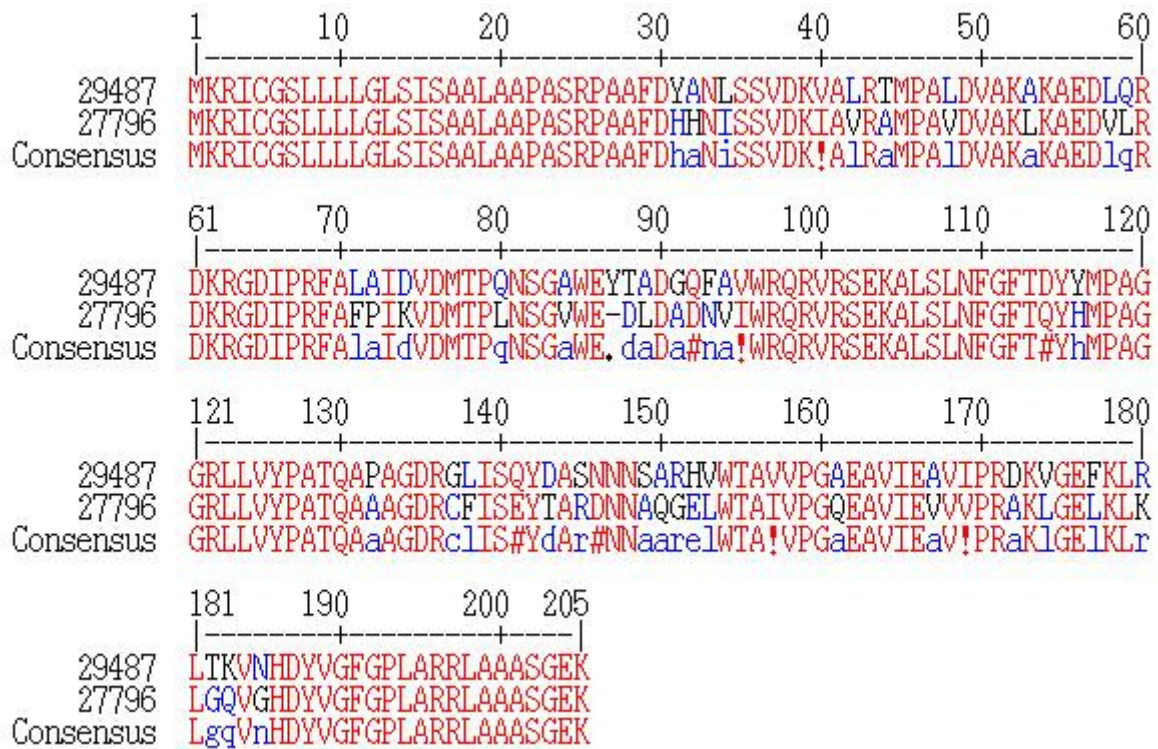
Die Lysyl-Endopeptidase wird als inaktives Zymogen in der Zelle gebildet. Dieses enthält neben der Aminosäuresequenz der maturen Protease sowohl ein N- als auch ein C-terminales Propeptid. Erst die Abspaltung dieser Sequenzen führt zum proteolytisch aktiven Enzym. Bei vielen Enzymen mit N- und/oder C-terminalem Propeptid wurde eine „Chaperonfunktion“ dieser Pro-Regionen untersucht, welche für die korrekte Faltung des aktiven Enzyms von großer Bedeutung ist. Die Serin-Protease aus *Serratia marcescens* z.B. wird als Zymogen mit C-terminalem Propeptid gebildet, wobei dieses eine essentielle Rolle als intramolekulares Chaperon spielt (Ohnishi und Horinouchi, 1996). Für das C-terminale Propeptid der Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* wird eine ähnliche Funktion diskutiert (Conesa et al., 2001). Für die Pro-Aminopeptidase-prozessierende Protease (PA Protease) aus *Aeromonas caviae*, deren Zymogen sowohl ein N- als auch ein C-terminales Propeptid enthält, konnte eine faltungsunterstützende Wirkung der N-terminalen Pro-Region *in vitro* gezeigt werden (Tang et al., 2002). Die bereits erwähnte α -lytische Protease aus *Lysobacter enzymogenes* benötigt *in vivo* eine N-terminale Pro-Region, um korrekt gefaltet und somit in die aktive Form überführt zu

Diskussion

werden. Jedoch ist hierfür keine kovalente Bindung zwischen Pro-Region und Enzym notwendig (Silen und Agard, 1989).

Die DNA-Sequenzen von *Npro-lysC* und *Cpro-lysC* des Stammes *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* DSM 1895 (ATCC 27796) konnten in dieser Arbeit aufgeklärt werden (3.5.1). Die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz von Npro-LysC zeigte eine Sequenzübereinstimmung von 77% mit dem entsprechenden Propeptid von *L. enzymogenes* ATCC 29487 (Accession Nr. D23664). Dieser Stamm wurde von Chohnan et al. (2002) kultiviert und die LysI-Endopeptidase-Aktivität quantifiziert (s.o.). Die Übereinstimmung in den Cpro-LysC Sequenzen lag bei 86%, allerdings besitzt die in dieser Arbeit ermittelte Sequenz 19 zusätzliche Aminosäuren am COOH-Terminus. Das zugehörige Alignment der Sequenzen ist in Abbildung 4.1 gezeigt.

A



B

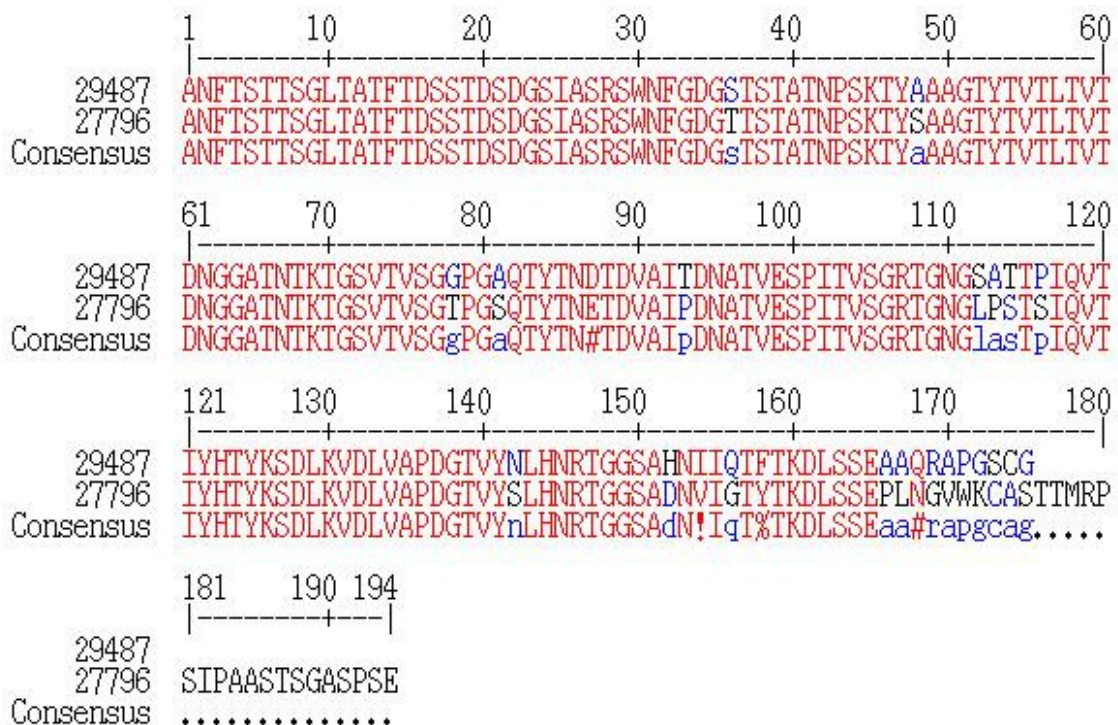


Abbildung 4.1: Alignments der Aminosäuresequenzen von Npro-LysC (A) und Cpro-LysC (B) der Stämme *Lysobacter enzymogenes* ATCC 29487 und *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* ATCC 27796 (diese Arbeit).

Diskussion

Die *in vitro* Renaturierungsversuche von LysC mit seinen Propeptiden als Faltungshilfen führten zu einer 27fachen Steigerung der Enzymaktivität bei der Zugabe von N-terminalem Propeptid zum LysC-Faltungsansatz verglichen mit dem L-Arginin-Standardansatz (vgl. 3.5.4). Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass bei der Renaturierung des Enzyms *in vitro* und vermutlich auch während der Sekretion und Prozessierung *in vivo* die N-terminale Pro-Region eine essentielle Chaperonfunktion übernimmt.

Die Verwendung des C-terminalen Propeptids resultierte in einer 2,7fachen Steigerung der LysC-Aktivität. Dieser Effekt konnte *in vitro* noch bei keiner Protease nachgewiesen werden, dessen Zymogen sowohl über ein C- als auch ein N-terminales Propeptid verfügt. Allerdings ist davon auszugehen, dass diese faltungsunterstützende Wirkung von Cpro-LysC *in vitro* auf unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der Protease zurückzuführen ist.. Für die Funktion dieser Pro-Region *in vivo* wurde bei API die Translokation durch Zellemembranen diskutiert (Ohara et al., 1989).

Für eine technische Anwendung der rekombinanten Lysyl-Endopeptidase kann durch die Propeptid-unterstützte *in vitro* Renaturierung die Gesamtaktivität des gebildeten Enzyms deutlich gesteigert werden. Während die rekombinante Herstellung von LysC in *E. coli* BL21(DE3) im Bioreaktor zu einer maximalen LysC-Aktivität von 60 nkat/L nach „Inclusion Body“ Solubilisierung und *in vitro* Renaturierung mit dem L-Arginin-Standardansatz führte (vgl. 0), ergäbe die beschriebene Aufarbeitung bzw. Renaturierung mittels Npro-LysC theoretisch eine Aktivität von $1,56 \mu\text{kat}_{\text{Tos-Gly-Pro-Lys-}}^{\text{pNA/L}_{\text{Kultur}}}$ bzw. eine Gesamtaktivität in 5 L Arbeitsvolumen von $7,8 \mu\text{kat}$. Verglichen mit der bei der Kultivierung des *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* Wildtyps gemessenen Aktivität (84 nkat/L) bedeutet dies, dass die rekombinante Bildung in *E. coli* zu einer ca. 18fach höheren Aktivität von LysC führt.

In der Literatur ist beschrieben, dass Propeptide die zugehörigen Proteasen kompetitiv inhibieren können. So nimmt die Aktivität von PA Protease aus *Aeromonas caviae* bei einem Propeptid zu Protease Verhältnis über 4:1 deutlich ab (Tang et al., 2002). Des Weiteren hat das molare Verhältnis zwischen Propeptid und Protease bei der *in vitro* Renaturierung starken Einfluss auf die Faltungseffizienz und somit auf die Enzymaktivität. Dies konnte für Subtilisin E aus *Escherichia coli* gezeigt werden (Ohta et al., 1991). Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Propeptid-

Diskussion

unterstützten *in vitro* Renaturierung von LysC wurde weder eine Optimierung des Verhältnisses von Propeptid zu Protease durchgeführt noch eine Entfernung des Propeptids nach abgeschlossener Faltungsreaktion. Folglich besteht die Möglichkeit, dass entsprechende Experimente zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute an Proteaseaktivität führen könnten.

Die heterologe Expression der DNA-Prosequenzen wurden im gleichen Wirtssystem wie die Expression von *MGSK-lysC* durchgeführt und auch die Solubilisierung der unlöslichen „Inclusion Bodies“ lief in beiden Fällen nach dem gleichen Protokoll ab. Auf diese Weise kann davon ausgegangen werden, dass durch die Zugabe des Propeptid-Dialysats zum Faltungsansatz des Protease-Dialysats keine zusätzlichen Fremdproteine zugeführt wurden. Insbesondere im Falle einer weiteren Aufreinigung der Lysyl-Endopeptidase aus dem Dialysat mittels Präzipitation und chromatographischen Trennmethode zur Gewinnung möglichst reiner Protease ist dies ein großer Vorteil gegenüber unspezifischen Renaturierungshilfen wie z.B. bovinem Serumalbumin.

Die biochemische Charakterisierung von Endoproteinase LysC aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* ergab eine maximale amidolytische Aktivität bei pH 8,5 in 25 mM Tris-HCl, zwischen pH 8 und 10 blieb die gemessene Aktivität über 88 % dieses Wertes (siehe 3.8.2). Chohnan et al. (2002) ermittelten für die Lysyl-Endopeptidase aus *Lysobacter* sp. IB-9374 das entsprechende Optimum zwischen pH 9 und 9,6, Masaki et al. (1981) beschrieben für die stark homologe Protease API aus *Achromobacter lyticus* die höchste Aktivität bei pH 9 bis 9,5, wobei das Enzym zwischen pH 8,5 und 10,5 aktiv war. Schrenk und Wunderwald (1982) gaben das pH-Optimum der aus dem Kulturüberstand von *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* isolierten Lysyl-Endopeptidase mit 7,7 an, bestimmt nach der Azocoll(agen)-Methode. Die Messung der Aktivität von rekombinanter LysC mit Tos-Gly-Pro-Lys-pNA wurde jedoch bei pH 8,5 beschrieben (Kopetzki und Karcher, 1999), was auf eine maximale amidolytische Aktivität unter diesen Bedingungen schließen lässt. Für den Einsatz von LysC aus *L. enzymogenes* bei der Ermittlung von Proteinsequenzen wurde die Proteinhydrolyse bei pH 9 durchgeführt (Jekel et al., 1983).

Diskussion

Das in dieser Arbeit ermittelte Temperatur-Optimum von LysC lag bei 45 °C, wobei eine Reaktionstemperatur von 60 °C zu nur noch ca. 15 % Restaktivität aufgrund schneller thermischer Denaturierung führte (siehe 3.8.4). LysC aus *Lysobacter* sp. IB-9374 und API aus *A. lyticus* besitzen ein Temperaturoptimum von 50 °C, verlieren ihre Aktivität aber bei Inkubation über 60 °C vollständig (Masaki et al., 1981; Chohnan et al., 2002).

Die Bestimmung der pH-Stabilität der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten LysC ergab, dass das Enzym ebenso wie API aus *Achromobacter lyticus* und Ls-LEP aus *Lysobacter* sp. IB-9374 (Masaki et al., 1981; Chohnan et al. 2002) zwischen pH 4,5 und pH 10,5 stabil ist. Wie bereits von Jekel et al. (1983) beschrieben, konnte in dieser Arbeit auch für chromogene Modellsubstrate eine Spezifität von LysC für die Hydrolyse von Peptidbindungen C-terminal von Lysin gezeigt werden, wobei es sich um das Hauptmerkmal von Lysyl-Endopeptidasen handelt. Strukturell liegt dieser Eigenschaft zum Einen eine hochkonservierte katalytische Triade aus Histidin (His-57), Asparaginsäure (Asp-113) und Serin (Ser-194) zugrunde (vgl. Anhang/Abbildung 8.1), zum Anderen ein Asparaginsäurerest in der S₁-Bindungstasche, welcher als entscheidend für eine Lysinspezifität beschrieben wurde (Norioka et al., 1994). Bei den Inhibitorstudien (3.8.6) zeigte sich eine hemmende Wirkung von NH₄⁺ und Ba²⁺. Beiden Ionen konnte bereits eine solche Wirkung auf Lysyl-Endopeptidasen nachgewiesen werden (Masaki et al., 1981; Chohnan et al., 2002). LysC wurde leicht durch Isopropanol aktiviert und nur teilweise (10 %) von 1 mM PMSF inhibiert, einem starken Serinprotease-Inhibitor. Ps-1, die Lysyl-Endopeptidase aus *Pseudomonas aeruginosa*, ist ähnlich insensitive gegenüber diesem Protease-Inhibitor. 1 mM PMSF inhibierte die Aktivität hier um 22 % (Elliott und Cohen, 1986). Dieses Enzym, auch als Protease IV bezeichnet (Accession Nr. Q9HWK6), besitzt 31 % Sequenz-Übereinstimmung mit der in dieser Arbeit ermittelten Sequenz von LysC aus *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* (nicht dargestellt). Für Ps-1 wurde eine nicht weiter beschriebene ungewöhnliche Konformation des Aktiven Zentrums in Betracht gezogen, die für die Resistenz gegen PMSF verantwortlich sein könnte (Elliott und Cohen, 1986). Da es sich bei LysC um eine Serinprotease handelt und nicht um eine PMSF-resistente Cysteinprotease, könnte die PMSF-Resistenz auch hier auf eine ungewöhnliche Konformation des Aktiven Zentrums zurückzuführen sein. Ein weiteres Beispiel für eine PMSF-insensitive Serinprotease ist die Glutamyl-Endopeptidase aus *Staphylococcus*

epidermidis, welche in Gegenwart von 1 mM PMSF keinerlei Inhibierung zeigt (Ohara-Nemoto et al., 2002).

Die hier dargestellten Ergebnisse für pH- und Temperatur-Optimum bzw. -stabilität und Inhibitorstudien von LysC aus *L. enzymogenes* DSM 1895 zeigten nur leichte Unterschiede im Vergleich mit entsprechenden Enzymen aus anderen Mikroorganismen (Tabelle 4.1). Eine exakte Übereinstimmung diesbezüglich zwischen der hier beschriebenen Lysyl-Endopeptidase und z.B. *Achromobacter lyticus* Protease I war nicht zu erwarten, da die Sequenzübereinstimmung beider als stark homolog bezeichneter Enzyme auf Aminosäureebene ca. 77% beträgt (Swiss Prot Accession Nr. P15636; Alignment nicht dargestellt) und daher von Unterschieden in den biochemischen Eigenschaften auszugehen war.

Tabelle 4.1: Vergleich der biochemische Eigenschaften von Lysyl-Endopeptidasen.

| Organismus | <i>Achromobacter lyticus</i> / <i>Lysobacter</i> sp. | <i>L. enzymogenes</i> ssp. <i>enzymogenes</i> (diese Arbeit) |
|-----------------------|---|---|
| pH-Optimum | 9 - 9,5 | 8,5 (-9,5) |
| Temperatur-Optimum | 50 °C | 45 °C |
| pH-Stabilität | 4 - 11 | 4,5 - 10,5 |
| Temperatur-Stabilität | 24 h bei 4 °C 30 min bei 45 °C | 20,5 h bei 4 °C 30 min bei 37 °C |
| Inhibitoren | NH ₄ ⁺ , Ba ²⁺ , PMSF | NH ₄ ⁺ , Ba ²⁺ , PMSF |
| Substratspezifität | Lysin an P1-Position | Lysin an P1-Position |

4.3 *Lactobacillus* als „Food-grade“ Expressionswirt

Da für einen Einsatz in der Lebensmittelindustrie Wirtsorganismen mit „Food-grade“ Status von besonders großem Interesse sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Lysyl-Endopeptidase rekombinant in *Lactobacillus plantarum* NC8 sowie *L. sakei* Lb790 herzustellen. Mittels Vektoren der pSIP400-Reihe (Axelsson et al., 2003; Sørvig et al., 2003) wurde in diesen Organismen bereits u.a. die

Diskussion

Aminopeptidase PepN aus *Lactococcus lactis* rekombinant hergestellt, wobei der Anteil des Enzyms am Gesamtproteingehalt in *L. sakei* Lb790 ca. 46 % betrug (Sørvig et al., 2005). Abbildung 4.2 zeigt den Induktionsmechanismus der heterologen Genexpression in den entsprechenden pSIP-Vektoren. Die Zugabe von Pheromon, z.B. Sakacin P induzierendem Peptid, führt zur Phosphorylierung der Histidin-Kinase (HPK). Diese wiederum phosphoryliert den Response Regulator (RR), welcher in dieser Form an die Promotoren P_{sppIP} und P_{orfX} binden und diese so aktivieren kann. Dadurch kommt es einerseits zur verstärkten Bildung von HPK und RR, was schließlich zur Transkription des nachgeschalteten Reportergens führt. Ein sehr häufig eingesetztes System zur heterologen Genexpression in *Lactobacillus*

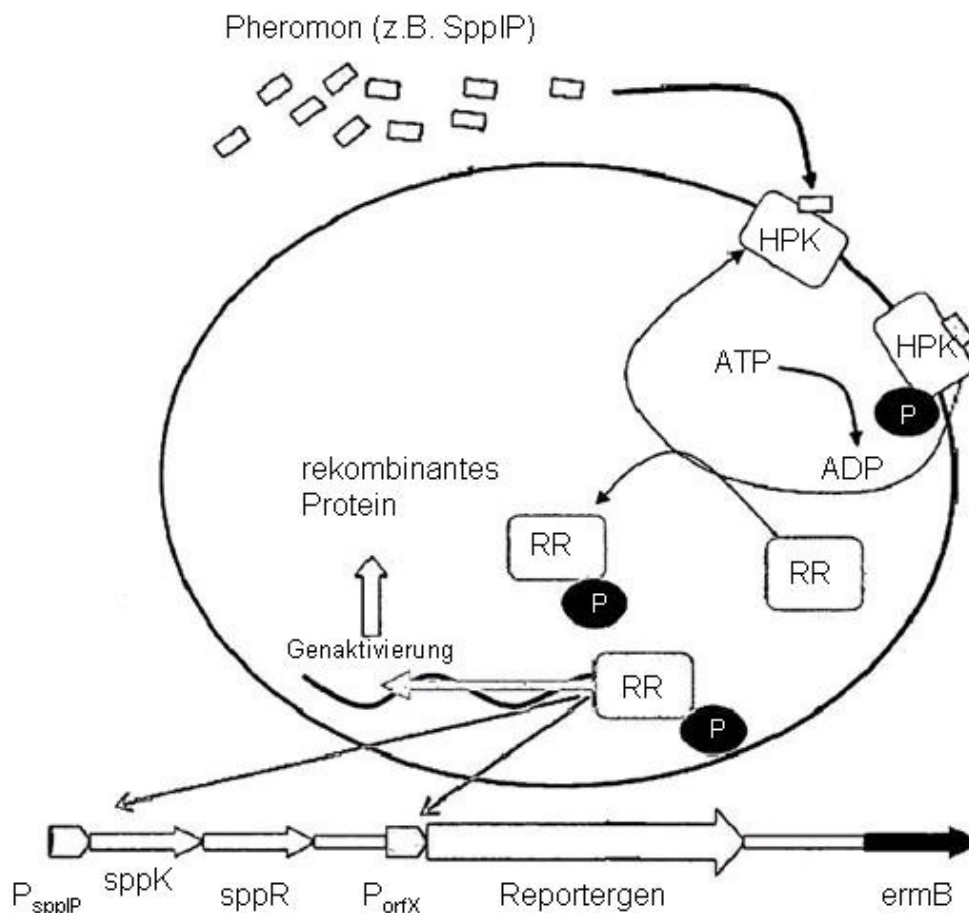


Abbildung 4.2: Schema der Induktion von Vektoren der pSIP-Reihe (modifiziert nach Haltmayr, 2007). Spp-IP: Sakacin P induzierendes Peptid; HPK: Histidin-Kinase; RR: Response Regulator; P: Phosphat; P_{sppIP} : Promotor, induzierbar durch Spp-IP; *sppK*: Histidin-Kinase Gen; *sppR*: Response Regulator Gen; P_{orfX} : Sakacin Promotor; *ermB*: Erythromycin-Resistenzgen.

Diskussion

und *Lactococcus* ist das NICE System (nisin-controlled gene expression system). Dieses verwendet die Gene und Promotoren, welche an der Produktion des Nisins in *Lactococcus lactis* beteiligt sind (de Ruyter et al., 1996; Pavan et al., 2000). Das Bacteriocin Nisin findet bereits als Konservierungsstoff E 234 in Lebensmittel Anwendung. Der Vorteil des Sakacin-basierenden Expressionssystem gegenüber dem NICE System besteht in einer deutlich geringeren Hintergrundexpression und somit höheren Induktionsfaktoren von bis zu 80 (Sørvig et al., 2005).

Zu beachten ist, dass zwar alle Komponenten der Induktionskaskade aus Milchsäurebakterien stammen und somit als „Food-grade“ einzustufen sind, die Verwendung einer Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker ist in diesem Zusammenhang jedoch nicht zulässig und müsste für einen Einsatz in der Lebensmittelindustrie durch alternative Marker wie z.B. Auxotrophien ersetzt werden.

Nachdem der Versuch zur heterologen Expression des *MGSK-lysC* Genkonstrukts in diesem Expressionssystem zu keiner nachweisbaren Bildung der rekombinanten Protease geführt hatte (vgl. 3.6.2), wurden 33 *Lactobacillus*-Stämme der institutseigenen Stammsammlung ausgewählt und mit pSIP403-MGSK-LysC bzw. pSIP409-MGSK-LysC transformiert, kultiviert, induziert und auf LysC-Aktivität untersucht (nicht dargestellt). Dies sollte zeigen, ob das pSIP-Vektorsystem in Verbindung mit einem anderen Expressionswirt besser zur Bildung von rekombinanter LysC geeignet ist. Jedoch konnte auch hierbei keine Bildung der Lysyl-Endopeptidase festgestellt werden.

Als kritischer Punkt dieser heterologen Genexpression wurden Unterschiede in der „Codon Usage“ von *E. coli*, an welchen das LysC-Genkonstrukt angepasst wurde, und den *Lactobacillus*-Wirtsorganismen angenommen. Das Problem der statistisch unterschiedlichen Verwendung von bestimmten Codons bei der heterologen Genexpression in Milchsäurebakterien wurde für *Lactobacillus plantarum* und insbesondere *Lactococcus lactis* von Fuglsang (2003) beschrieben. Im ebenfalls Gram-positiven Bakterium *Bacillus megaterium* konnte die *Thermobifida fusca* Hydrolase erst nach Anpassung der „Codon Usage“ an den Wirtsorganismus erfolgreich rekombinant produziert werden (Yang et al., 2006). Zwar verwenden sowohl *E. coli* als auch *L. plantarum* die meisten Basen-Triplets mit vergleichbaren Häufigkeiten, jedoch bestehen punktuell deutliche Unterschiede (Codon Usage Datenbank: www.kazusa.or.jp/codon/). So verwenden *L. plantarum* und *L. sakei* das

Diskussion

Codon tcc für Serin nur zu 7 bzw. 5 %. Dieses Codon kommt im verwendeten 273 Aminosäuren langen *MGSK-lysC* Genkonstrukt 31 mal vor (vgl. Anhang/Abbildung 8.1), dabei auch bis zu viermal direkt hintereinander (AS 89–92). Dies lässt als Folge eine negative Beeinträchtigung der Translation vermuten. Einen weiteren Hinweis auf diese Problematik gaben die Ergebnisse von Sørvig et al. (2005). Deren heterologe Expression des β -Glucuronidasegens aus *E. coli* führte zu einer deutlich schwächeren rekombinanten Proteinbande nach SDS-PAGE als dies im gleichen Expressionssystem für die bereits genannte Aminopeptidase aus dem Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* der Fall war. Bei der rekombinanten Bildung der LysC-Propeptide in *E. coli* (3.5.3) führte die Expression des Codon-angepassten *Cpro-lysC* zu einer stärkeren Überexpression als das nicht angepasste *Npro-lysC*, was diese Vermutung ebenfalls unterstützt.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die β -Galactosidase Lac4 aus der Milchhefe *Kluyveromyces lactis* als Modellenzym eingesetzt (vgl. 3.7). *Lac4* konnte in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich in den Expressionsvektor pSIP409 kloniert und im Wirtsorganismus *L. plantarum* NC8 heterolog exprimiert werden (Liu, 2008). Der mittels ortsspezifischer Mutagenese an verschiedene Positionen des *lac4*-Gens durchgeführte Austausch der Serin-Codons tca bzw. agt gegen tcc führte nach Expression zu einer erkennbaren Reduktion der gebildeten Lac4-Aktivität um bis zu 38 % im Falle der Dreifachmutante (siehe 3.7.2).

Somit ist davon auszugehen, dass Unterschiede in der „Codon-Usage“ von heterologem Gen und *Lactobacillus*-Wirt tatsächlich einen für die Expression limitierenden Schritt darstellen, welcher bei der weiteren Etablierung dieses „Food-grade“ Expressionssystems beachtet werden muss.

4.4 Hydrolyse von bovinem Casein mit LysC

Die im Verlauf dieser Arbeit rekombinant hergestellte und charakterisierte Lysyl-Endopeptidase wurde als sequenzspezifische Modellprotease zur Casein-Hydrolyse eingesetzt. Dabei bestand das Ziel darin, funktionelle bzw. bioaktive Peptide zu generieren und diese im Hydrolysat nachzuweisen.

Diskussion

In der Literatur ist eine Vielzahl verschiedener bioaktiver Eigenschaften von Peptidgemischen bzw. Proteinhydrolysaten unterschiedlichen Ursprungs beschrieben worden, darunter u.a. antimikrobielle, antioxidative und Cholesterin-senkende Wirksamkeit, immunmodulatorische Effekte sowie Angiotensin-converting Enzyme (ACE) Inhibition (Shahidi und Zhong, 2008). Als Matrix sind dabei insbesondere Milchproteine aufgrund ihres breiten Einsatzgebietes im Lebensmittelbereich sowie ihrer guten Verfügbarkeit bezüglich der aus ihnen generierbaren bioaktiven Peptide sehr gut untersucht (Meisel und Bockelmann, 1999). So wurde ein Großteil der bisher beschriebenen ACE-inhibitorisch wirksamen Peptide entweder nach tryptischem Verdau, *Lactobacillus*-Proteasehydrolyse oder Milchsäurebakterien-Fermentation von Casein(-Fraktionen) identifiziert (Yamamoto et al., 1999; Korhonen und Pihlanto, 2003; Haque und Chand, 2008). Bis jetzt wurden nur wenige proteolytische Enzyme aus anderen Mikroorganismen in vergleichbaren Prozessen eingesetzt. Das wohl bekannteste Beispiel hierfür ist eine *Aspergillus oryzae* Protease, deren Caseinhydrolyse zu den ACE-inhibierenden Tripeptiden IPP und VPP führte (Mizuno et al., 2004; Matsuura et al., 2005). In Rattenmodellstudien führte das Verabreichen dieses Hydrolysats zu suppressiven Effekten auf die arthritische Inflammation (Hatori et al., 2008).

Das HPLC-Chromatogramm („Fingerprint“) der Casein-Hydrolyse mit LysC aus *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* ergab ca. 20 meist klar voneinander getrennte Peaks (Abbildung 3.24). Anhand der Primärstruktur von bovinem Casein konnte vorausgesagt werden, dass bei der Hydrolyse aller Lys-X Peptidbindungen theoretisch 54 unterschiedliche Peptide generiert werden können. Die Analyse eines Casein-Hydrolysats, welches mittels des Enzympräparats BLAP (*Bacillus lentus* alkalischer Phosphatase) hergestellt wurde, zeigte, dass ein Peak im HPLC-Chromatogramm mehrere unterschiedliche Peptide repräsentieren kann (Schopp, 2008). Dies erklärt, weshalb weniger UV-Signale detektiert werden konnten, als Peptide bei vollständiger Hydrolyse zu erwarten gewesen wären. Für den tryptischen Verdau von bovinem Casein wurden aufgrund der Substratspezifität dieser Standardprotease (Peptidbindungen nach Arginin oder Lysin) 72 mögliche Peptide nach vollständiger Hydrolyse vorausgesagt. Im entsprechenden HPLC-Chromatogramm konnten anschließend ca. 50 Peptid-Peaks detektiert werden (Léonil et al., 1994).

Diskussion

Nach Datenbankrecherche wurden die sechs Zielpeptide TTMLPW (immunomodulierend), NMAINPSK, FALPQYLK, ALNEINQFYQK, EMPFPK (ACE-inhibierend) und VLPVPQK (antioxidativ) festgelegt. Bis auf TTMLPW (α_{s1} -Immunocasokinin; Maruyama et al., 1987) konnten alle genannten Peptide über eine massenspektrometrische Analyse mittels LC-ESI-MS/MS im Casein-Hydrolysat identifiziert werden (vgl. 3.9.3). Die IC_{50} -Werte der identifizierten ACE-inhibierenden Peptide sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Da TTMLPW als einziges nicht detektiert werden konnte, kann für dieses Peptid eine schlechte Ionisierbarkeit unter den verwendeten Bedingungen angenommen werden. Ein Verlust während der Probenvorbereitung oder Chromatographie ist bei einem Peptid dieser Größe unwahrscheinlich. Vergleichbare Arbeiten wurden bisher u.a. von Hernández-Ledesma et al. (2004) durchgeführt. Dabei wurde ultrahoherhitzte Milch mit *Lactobacillus rhamnosus* fermentiert bzw. mit Pepsin und Corolase PP hydrolysiert. Dabei konnten mittels Tandem-Massenspektrometrie ein antioxidatives und drei ACE-inhibierende Peptide identifiziert werden, darunter auch EMPFPK. Nachdem die eindeutige Identifizierung der funktionellen Peptide erfolgt war, sollten die diesen Peptiden zugeschriebenen Eigenschaften im LysC-Casein-Hydrolysat nachgewiesen werden.

Tabelle 4.2: IC_{50} -Werte der identifizierten ACE-inhibierenden Peptide

| Peptid | IC_{50} [μM] | IC_{50} [$\mu g/mL$] | Referenz |
|-------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|
| EMPFPK | 564 | 423 | Pihlanto-Leppälä et al., 1998 |
| FALPQYLK | 4,3 | 4,2 | Tauzin et al., 2006 |
| NMAINPSK | 60 | 52,2 | |
| ALNEINQFYQK | 26,4 | 36,2 | |

Die Quantifizierung von ACE-Inhibierung (3.10.3), Lipxygenase-Inhibierung (3.10.2) und Radikalfänger-Aktivität (3.10.1) des Casein-Hydrolysats erfolgte über *in vitro* Assays (Cushman und Cheung, 1971; Re et al., 1999; Somvanshi et al., 2008).

Der in dieser Arbeit für das LysC-Casein-Hydrolysat bestimmte IC_{50} -Wert der ACE-Inhibition lag bei 2,78 $\mu g/mL$. Miguel et al. (2009) untersuchten nach derselben Methode bovines Casein, welches mittels Pepsin hydrolysiert worden war. Während

Diskussion

sich für das Gesamthydrolysat hier ein IC_{50} von $52,8 \mu\text{g/mL}$ ergab, lag der entsprechende Wert für die Fraktion über 3000 Da bei $242 \mu\text{g/mL}$, für die Fraktion unter 3000 Da bei $5,5 \mu\text{g/mL}$. Daran ist zu erkennen, dass kleinere Peptide bei der ACE-Inhibition eine stärkere Rolle spielen als größere. In RP-HPLC Fraktionen von Erdnussprotein-Hydrolysat nach Alcalase- oder Pepsin-Pancreatin-Behandlung wurden für die ACE-Inhibition IC_{50} -Werte zwischen $7,9 \mu\text{g/mL}$ und $235 \mu\text{g/mL}$ ermittelt (Quist et al., 2009). Die Hydrolyse von Hühnercollagen mit einer unspezifischen *Aspergillus oryzae* Protease führte zu einer Hydrolysat-Fraktion (kleiner 3000 Da) mit einem IC_{50} -Wert von $130 \mu\text{g/mL}$ für die ACE-Inhibition (Saiga et al., 2008). Nach der Fermentation von Milch mit *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SS1 und *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* FT4 und RP-HPLC-Fraktionierung der pH 4,6-löslichen Stickstofffraktion lagen die niedrigsten IC_{50} -Werte der ACE-Inhibition bei $8,0 \mu\text{g/mL}$ bis $11,2 \mu\text{g/mL}$ (Gobbetti et al., 2000). Die Untersuchung einzelner in diesen Fraktionen enthaltener Peptide ergaben IC_{50} -Werte, die deutlich (mehr als 17fach) höher als die der Hydrolysefraktionen lagen. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass das durch die Lysyl-Endopeptidase hergestellte Casein-Hydrolysat eine stärkere ACE-inhibitorische Wirkung aufweist als andere, in der Literatur beschriebene Proteinhydrolysat-Proben. Zum anderen liefern Gobbetti et al. (2000) als Erklärungsansatz hierfür, dass aufgrund des Zusammenwirkens verschiedener Peptide mit gleicher Funktionalität die bioaktiven Eigenschaften eines Peptidgemischs stärker sein können als die der einzelnen Peptide. Außerdem bestätigen die Ergebnisse, dass sich Milchproteine und dabei insbesondere Casein als Lebensmittelmatrix zur Generierung ACE-inhibierender Peptide eignen (Michaelidou, 2008).

Der für das LysC-Casein-Hydrolysat bestimmte IC_{50} -Wert der antioxidativen Radikalfänger-Aktivität betrug $4,85 \mu\text{g/mL}$. Vergleichbare Arbeiten wurden von Kim et al. (2009) durchgeführt. Hier zeigten Fraktionen eines Papain-Hydrolyсата von Rehfleisch IC_{50} -Werte für Radikalfänger-Aktivität von $782 \mu\text{g/mL}$ und $896 \mu\text{g/mL}$, während die in diesen Fraktionen identifizierten Peptide in Abhängigkeit des freien Radikals entsprechende Werte von $44 \mu\text{g/mL}$ bis $217 \mu\text{g/mL}$ aufwiesen. Die Hydrolyse von ovinem Casein bzw. seiner α_s -, β - und κ -Fraktion mit Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin führte zu einer Verdreifachung der Radikalfänger-Aktivität bei κ -Casein und zu einer Verdopplung beim Gesamtcasein bezogen auf die nicht-

Diskussion

hydrolysierten Proben (Gómez-Ruiz et al., 2008). Die LysC-Hydrolyse von bovinem Casein führte zu einer 6,5fachen Steigerung dieser antioxidativen Wirkung.

Für die Inhibition des Enzyms Lipoxygenase (LOX) wurde für das LysC-Casein-Hydrolysat eine IC_{50} -Konzentration von $23,6 \mu\text{g/mL}$ bestimmt. In einer kürzlich publizierten Arbeit (Yoshie-Stark et al., 2009) wurde die LOX-Inhibition von unterschiedlich vorbehandeltem und Protease-verdaulichem Surimi (Fischfleisch) untersucht. Dabei ergab sich der niedrigste IC_{50} -Wert der LOX-Inhibition von $3,93 \text{ mg/mL}$ für eine erhitzte, Pepsin-Pancreatin-verdaute Probe. Der entsprechende Wert der Referenzsubstanz Ascorbinsäure lag bei $6,54 \mu\text{g/mL}$.

Alle durchgeführten *in vitro* Assays bestätigten die bioaktiven Wirkungen, welche anhand der mittels MS identifizierten Peptide im Casein-Hydrolysat zu erwarten gewesen waren. Die ermittelten IC_{50} -Werte für ACE-Inhibition, LOX-Inhibition und Radikalfänger-Aktivität lagen alle deutlich unter den entsprechenden in der Literatur genannten Werten. Da in dieser Arbeit nur jeweils das Gesamthydrolysat für diese Versuche eingesetzt wurde, ist es denkbar, dass eine Fraktionierung z.B. nach Peptidgröße zu einer weiteren Steigerung der funktionellen Eigenschaften des LysC-Casein-Hydrolysats führt.

Zu beachten ist, dass es sich bei allen nachgewiesenen Eigenschaften um *in vitro* Effekte handelt. Diese geben zwar einen Hinweis auf das biochemische Potential des Hydrolysats bzw. der darin enthaltenen Peptide und in einigen Fällen konnten auch bereits im Tiermodell entsprechende physiologische Wirkungen gezeigt werden (Fujita und Yoshikawa, 1999; Hatori et al., 2008; Saiga et al., 2008), jedoch ist eine Übertragbarkeit dieser Effekte und Studien auf den Menschen schwierig.

Die Inhibition von Lipoxygenase ist darüber hinaus noch als technofunktionelle Eigenschaft des Hydrolysats zu betrachten, da dies einen konservierenden Effekt des Lebensmittels mit sich bringt. Andere technofunktionelle Eigenschaften wie der Einfluss auf die Schaumbildung und -stabilität oder die Süßkraft wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, sind aber aus lebensmitteltechnologischer Sicht interessant.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigten, dass die Lysyl-Endopeptidase aus *L. enzymogenes* ssp. *enzymogenes* als sequenzspezifische

Diskussion

Protease großes Potential für einen Einsatz im Bereich der Lebensmitteltechnologie bietet, insbesondere bei der Generierung funktioneller Peptide aus Lebensmittelproteinen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang die Hydrolyse mit mehreren Proteasen unterschiedlicher Sequenzspezifität, um gezielt gewünschte funktionelle Peptide aus einer entsprechend ausgewählten Lebensmittelmatrix freisetzen zu können.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine sequenzspezifische, mikrobielle Protease herzustellen, biochemisch zu charakterisieren und mittels dieses Enzyms aus Lebensmittelprotein hydrolytisch bioaktive Peptide zu generieren.

Um die Serin-Protease PRT1 aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* bezüglich ihrer Substratspezifität zu untersuchen, wurde dieser Stamm im Schüttelkolben kultiviert. Nach Dialyse des Kulturüberstandes und Zugabe von 1,10-Phenantrolin zur Inaktivierung der Metalloprotease PRT2 konnte eine Enzymaktivität von 0,34 nkat_{Casein}/mL detektiert werden. Der Umsatz verschiedener chromogener Peptidsubstrate zeigte, dass PRT1 keine eindeutige Substratspezifität aufweist.

Die Lysyl-Endopeptidase LysC aus *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* wurde durch Kultivierung des Wildstamms (ATCC 27796) gewonnen. Im Bioreaktor (1 L Arbeitsvolumen) konnte nach 45 h eine maximale Protease-Aktivität von 0,084 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/mL im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Das LysC-Gen wurde mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert und in den *E. coli* Expressionsvektor pET20b(+) kloniert. Die Expression in *E. coli* BL21(DE3) führte jedoch zu keiner nachweisbaren Bildung von rekombinanter Protease. Daher wurde ein bereits in der Literatur beschriebenes, synthetisches Genkonstrukt mit verkürzter N-terminaler Prosequenz (MGSK) und an *E. coli* angepasster „Codon Usage“ für die heterologe Expression untersucht. Die Bioreaktor-Kultivierung (5 L Arbeitsvolumen) von *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC führte zu rekombinanter LysC, welche in Form von „Inclusion Bodies“ in den Zellen gebildet wurde. Die Solubilisierung der „Inclusion Bodies“ und anschließende Renaturierung des Enzyms mit L-Arginin als unspezifischer Faltungshilfe ergab eine maximale Proteaseaktivität von 0,06 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/L_{Kultur} 5 h nach IPTG-Induktion.

Um die Ausbeute an rekombinanter Proteaseaktivität steigern zu können, wurde der Einfluss der beiden LysC-Propeptide auf die *in vitro* Renaturierung der Protease untersucht. Hierfür wurden die Propeptid-DNA-Sequenzen aufgeklärt, kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert. Die Zugabe von C-terminalem und N-terminalem Propeptid zur LysC-Renaturierung führte zu einer bis zu 27fachen (1,56 μ kat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/L_{Kultur}) Steigerung der LysC-Aktivität bezogen auf die Renaturierung mit L-Arginin.

Zusammenfassung

Als alternatives „Food-grade“ Expressionssystem wurde das in der Literatur etablierte Expressionssystem von *Lactobacillus plantarum* NC8 bzw. *L. sakei* Lb790 und dem *E. coli*-*Lactobacillus* Shuttle-Vektor pSIP409 eingesetzt. Jedoch konnte weder bei der Schüttelkolben-Kultivierung von *L. plantarum* NC8 pSIP409-MGSK-LysC noch von *L. sakei* Lb790 pSIP409-MGSK-LysC rekombinante Lysyl-Endopeptidase nachgewiesen werden. Da als möglicher Grund hierfür die unterschiedliche „Codon Usage“ von *E. coli* und *Lactobacillus* angenommen wurde, wurden Expressions-Experimente mit punktmutierten Varianten des β -Galactosidasegens aus *Kluyveromyces lactis* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der Austausch des Serin-Codons tca bzw. agt gegen tcc einen deutlichen Einfluss auf die resultierende Enzymaktivität hatte. So führte der dreifache Codon-Austausch zu einer Verringerung der β -Galactosidase-Aktivität um 38 %.

Die Charakterisierung der rekombinanten Lysyl-Endopeptidase LysC bestätigte die hohe Substratspezifität für Lysinreste an P1-Position. Das pH- bzw. Temperatur-Optimum lag bei 8,5 bzw. 45°C. Bei 4°C und pH 9 war das Enzym für mindestens 20,5 h stabil, während bei 45°C nach 1 h nur noch 40 % Restaktivität gemessen werden konnten. Eine inhibierende Wirkung auf LysC zeigten Ba^{2+} , NH_4^+ und PMSF.

Die Hydrolyse von bovinem Casein mit LysC generierte die ACE-inhibierenden Peptide EMPFPK, FALPQYLK, NMAINPSK und ALNEINQFYQK sowie das antioxidativ wirkende VLPVPQK, die alle eindeutig mittels LC-ESI-MS/MS detektiert werden konnten. Über entsprechende *in vitro* Assays wurden die Radikalfänger-Aktivität ($IC_{50} = 4,85 \mu\text{g/mL}$), die Lipoxygenase-Inhibierung ($IC_{50} = 23,6 \mu\text{g/mL}$) sowie die ACE-Inhibierung ($IC_{50} = 2,78 \mu\text{g/mL}$) des Casein-Hydrolysat quantifiziert.

Abstract

The aim of the present thesis was the production and biochemical characterization of a sequence specific microbial protease. This enzyme should be applied in food protein hydrolyzation in order to generate bioactive peptides. To determine the substrate specificity of serine protease PRT1 from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* this strain was cultivated in a shaking flusk. After dialysis of the culture broth and addition of 1,10-phenantroline for metalloprotease PRT2 inactivation an enzyme activity of 0,34 nkat_{Caseine}/mL was detected. The conversion of several chromogenic peptide substrates revealed that PRT1 does not offer a clear substrate specificity.

The lysyl endopeptidase LysC from *Lysobacter enzymogenes* ssp. *enzymogenes* was obtained by cultivation of the wild type strain (ATCC 27796). In a bioreactor (1 L scale) a maximum protease activity of 0,084 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/mL in the culture broth was detected after 45 h. The LysC gene was amplified by PCR using genomic template DNA and was cloned into the *E. coli* expression vector pET20b(+), leading to no detectable recombinant protease when expressed in *E. coli* BL21(DE3). Thus for the heterologous expression a synthetic gene construct was applied which was formerly described in literature. It contained a short N-terminal pro-sequence (MGSK) and a codon usage adapted to *E. coli*. The bioreactor cultivation (5 L scale) of *E. coli* BL21(DE3) pET20b-MGSK-LysC led to LysC inclusion bodies. The solubilization of the inclusion bodies and the following enzyme renaturation using L-arginine as an unspecific folding additive resulted in a maximum protease activity of 0,06 nkat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/L_{Culture} 5h after IPTG induction.

To increase the yield of recombinant protease activity the influence of the LysC pro-peptides on the *in vitro* renaturation of the protease was investigated. For this purpose both pro-peptide DNAs were sequenced, cloned and heterologously expressed in *E. coli* BL21(DE3). The addition of C-terminal and N-terminal pro-peptide to the LysC renaturation led to a maximum of 27fold (1.56 μ kat_{Tos-Gly-Pro-Lys-pNA}/L_{Culture}) LysC activity increasion compared to the L-arginine renaturation.

As an alternative food-grade expression system the in the literature already established system of *Lactobacillus plantarum* NC8, *L. sakei* Lb790 and the *E. coli*-*Lactobacillus* shuttle vector pSIP409 was tested. However, the shaking flusk

Zusammenfassung

cultivations of neither *L. plantarum* NC8 pSIP409-MGSK-LysC nor *L. sakei* Lb790 pSIP409-MGSK-LysC led to detectable recombinant lysyl endopeptidase. As a possible reason therefor the different codon usage of *E. coli* and *Lactobacillus* was assumed. So expression experiments were performed using point mutated variants of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis*. It could be shown that the exchange of the serine codons tca/agt and tcc had a significant effect on the resulting enzyme activity. The exchange of three codons led to a decreation of β -galactosidase activity of 38 %.

The characterization of the recombinant lysyl endopeptidase LysC confirmed the high substrate specificity for lysine residues at P1 position. The pH and temperature optimum was 8.5 and 45 °C, respectively. At 4 °C and pH 9 the enzyme was stable for at least 20.5 h, whereas at 45 °C only 40 % residual activity were detected after 1 h. An inhibiting effect on LysC was demonstrated for Ba²⁺, NH⁺ and PMSF.

Hydrolysis of bovine caseine by LysC for generated the ACE inhibiting peptides EMPFPK, FALPQYLK, NMAINPSK and ALNEINQFYQK as well as the antioxidative VLPVPQK, which all were unambiguously identified by LC-ESI-MS/MS. Performing appropriate *in vitro* assays, the radical scavenging acticity (IC₅₀ = 4,85 µg/mL), lipoxygenase inhibition (IC₅₀ = 23,6 µg/mL) and ACE inhibition (IC₅₀ = 2,78 µg/mL) of the caseine hydrolysate were quantified.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|---|
| A | Absorption; Ampère |
| ABTS | 2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure |
| ACE | Angiotensin Converting Enzyme |
| ad | aufgefüllt auf |
| APS | Ammoniumperoxosulfat |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BFM | Biofeuchtmasse |
| BMBF | Bundesministerium für Bildung und Forschung |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BTM | Biotrockenmasse |
| Bz | Benzoyl-Schutzgruppe |
| °C | Grad Celsius |
| CIP | Calf Intestinal Phosphatase |
| cm | Zentimeter |
| Da | Dalton (g/mol) |
| ddH₂O | bidestilliertes Wasser |
| dH₂O | destilliertes Wasser |
| DMF | Dimethylformamid |
| DSM | Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen |
| EA | Enzymaktivität |
| EC | Enzyme Commission |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ESI | Elektrospray Ionisierung |
| et al. | et alii |
| eV | Elektronenvolt |
| FA | Ameisensäure |
| g | Gramm; Beschleunigungskonstante |
| GSH | reduziertes Glutathion |
| GSSG | oxidiertes Glutathion |
| h | Stunde |
| HAc | Essigsäure |
| HMW | Hochmolekulargewichtsmarker |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| IB | Inclusion Bodies |
| IC₅₀ | Inhibitorische Konzentration |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| kat | Katal [mol/s] |

Abkürzungen

| | |
|-----------------------|--|
| L | Liter |
| LB | Luria Bertani (Medium) |
| LC-ESI-MS/MS | Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry |
| LMW | Niedermolekulargewichtsmarker |
| M | molar [mol/L] |
| min | Minuten |
| m/z | Masse-zu-Ladungs-Verhältnis |
| MS | Massenspektrometrie |
| MW | Molekulargewicht [g/mol] |
| NADP | Nicotinamiddinucleotidphosphat |
| nm | Nanometer |
| OD | optische Dichte |
| oNP-Gal | <i>ortho</i> -Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl-fluorid |
| pNA | <i>para</i> -Nitroanilin |
| pO₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| pv. | Pathovar |
| Pyr | Pyridin(-Schutzgruppe) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sp. | Species |
| ssp. | Subspecies |
| Spp-IP | Sakacin P induzierendes Peptid |
| Suc | Succinyl(-Schutzgruppe) |
| t | Zeit |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEAC | Trolox equivalent antioxidant capacity |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin |
| Tos | Tosyl(-Schutzgruppe) |
| U | Unit (μ mol/min) |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| Vk | Vorkultur |
| Vol. | Volumen |
| vvm | Volumen pro Volumen pro Minute |

Abkürzungen

| | |
|------------|-----------------------|
| w/v | weight per volume |
| w/w | weight per weight |
| Z | Benzyl(-Schutzgruppe) |

7 Literatur

Aukrust, T. und Blom, H. 1992. Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. Food Res. Int. **25**(4): 253-261.

Axelsson, L., Lindstad, G. und Naterstad, K. 2003. Development of an inducible gene expression system for *Lactobacillus sakei*. Lett. Appl. Microbiol. **37**(2): 115-120.

Bai, J.P.F., Hu, M., Subramanian, P., Mosberg, H.I. und Amidon, G.L. 1992. Utilization of peptide carrier system to improve intestinal absorption: targeting prolidase as a prodrug-converting enzyme. J. Pharm. Sci. **81**(2): 113-116.

Belitz, H.D., Grosch, W. und Schieberle, P. 2001. Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5.Auflage, S. 73. Springer, Berlin.

Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. und Tomita, M. 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. Biochim. Biophys. Acta **1121**(1-2): 130-136.

Blow, D.M. 1997. The tortuous story of Asp...His...Ser: structural analysis of α -chymotrypsin. Trends Biochem. Sci. **22**(10): 405-408.

Božić, N. und Vujčić, Z. 2005. Detection and quantification of leucyl aminopeptidase after native electrophoresis using leucine-*p*-nitroanilide. Electrophoresis **26**(12): 2476-2480.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**(1-2): 248-254.

Cheison, S.C., Wang, Z. und Xu, S.-Y. 2007. Preparation of whey protein hydrolysates using a single- and two-stage enzymatic membrane reactor and their immunological and antioxidant properties: Characterization by multivariate data analysis. *J. Agric. Food Chem.* **55**(10): 3896-3904.

Chohnan, S., Nonaka, J., Teramoto, K., Taniguchi, K., Kameda, Y., Tamura, H., Kurusu, Y., Norioka, S., Masaki, T. und Sakiyama, F. 2002. *Lysobacter* strain with high lysyl endopeptidase production. *FEMS Microbiol. Lett.* **213**(1): 13-20.

Christensen, P und Cook, F.D. 1978. *Lysobacter*, a New Genus of Nonfruiting, Gliding Bacteria with a High Base Ratio. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**(3): 367-393.

Clare, D.A. und Swaisgood, H.E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *J. Dairy Sci.* **83**(6):1187-1195.

Conesa, A., Weelink, G., van den Hondel, C.A.M.J.J. und Punt, P.J. 2001 C-terminal propeptide of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase: an intramolecular chaperone? *FEBS Lett.* **503**(2,3): 117-120.

Cushman, D.W. und Cheung, H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* **20**(7): 1637-1648.

Daniels, M.J., Barber, C.E., Turner, P.C., Cleary, W.G. und Sawczyc, M.K. 1984. Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* showing altered pathogenicity. *J. Gen. Microbiol.* **130**(9): 2447-2455.

de Ruyter, P.G., Kuipers, O.P. und de Vos, W.M. 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(10): 3662-3667.

Dodson, G. und Wlodawr, A. 1998. *Trends Biochem. Sci.*, **23**: 347-352.

- Dow, J.M., Clarke, B.R., Milligan, D.E., Tang, J.L. und Daniels, M.J.** 1990. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(10): 2994-2998.
- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M. und Wolthers, B.G.** 1968. Structure of papain. *Nature* **218**(5145): 929-932.
- Elliott, B.W. und Cohen, C.** 1986. Isolation and characterization of a lysine-specific protease from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **261**(24): 11259-11265.
- Epstein, D.M. und Wensink, P.C.** 1988. The alpha-lytic protease gene of *Lysobacter enzymogenes*. The nucleotide sequence predicts a large prepro-peptide with homology to pro-peptides of other chymotrypsin-like enzymes. *J. Biol. Chem.* **263**(32): 16586-16590.
- Fei, Y.J., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F.H., Romero, M.F., Singh, S.K., Boron, W.F. und Hediger, M.A.** 1994. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* **368**(6471): 563-566.
- Fuglsang, A.** 2003. Lactic acid bacteria as prime candidates for codon optimization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**(2): 285-291.
- Fujita, H. und Yoshikawa, M.** 1999. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology* **44**(1-2): 123-127.
- Ganapathy, V. und Leibach, F.H.** 1983. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycyl-L-proline. *J. Biol. Chem.* **258**(23): 14189-14192.
- Gillespie, D.C. und Cook F.D.** 1965. Extracellular enzymes from strains of *Sorangium*. *Can. J. Microbiol.* **11**: 109-118.

- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. und Addeo, F.** 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(9): 3898-3904.
- Gómez-Ruiz, J.A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M. und Recio, I.** 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Eur. Food Res. Technol.* **227**(4): 1061-1067.
- Grzonka, Z., Kasprzykowski, F. und Wiczak, W.** 2007. *Cysteine Proteases*, S. 181-195. In Polaina, J., MacCabe, A.P., (eds.), *Industrial Enzymes*. Springer, Dordrecht.
- Haltmayr, E.** 2007. Cloning, expression, purification and characterization of β -galactosidases from probiotic strains of *Lactobacillus* ssp. in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and *Lactobacillus sakei* Lb790. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur, Wien.
- Haque, E. und Chand, R.** 2008. Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.* **227**: 7-15.
- Hatori, M., Ohki, K., Hirano, S., Yang, X.-P., Kuboki, H. und Abe, C.** 2008. Effects of a casein hydrolysate prepared from *Aspergillus oryzae* protease on adjuvant arthritis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**(8): 1983-1991.
- Hedstrom, L.** 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.*, **102**(12): 4501-4523.
- Hellmuth, K., Korz, D.J., Sanders, E.A. und Deckwer, W.-D.** 1994. Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *J. Biotechnol.* **32**(3): 289-298.
- Hernández-Ledesma, B., Lourdes, A., Ramos, M. und Recio, I.** 2004. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *J. Chromatogr. A* **1049**(1-2): 107-114.

- Hori, R., Tomita, Y., Katsura, T., Yasuhara, M., Inui, K. und Takano, M.** 1993. Transport of bestatin in rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochem. J. Pharmacol.* **45**(9): 1763-1768.
- Hoshi, T.** 1985. Proton-coupled transport of organic solutes in animal cell membranes and its relation to sodium transport. *Jpn. J. Physiol.* **35**(2): 179-91.
- Jeong, H.J., Lam, Y. und de Lumen, B.O.** 2002. Barley Lunasin Suppresses ras-Induced Colony Formation and Inhibits Core Histone Acetylation in Mammalian Cells. *J. Agric. Food Chem.* **50**(21): 5903-5908.
- Jekel P.A., Weijer W.J. und Beintema J.J.** 1983. Use of endoproteinase Lys-C from *Lysobacter enzymogenes* in protein sequence analysis. *Anal. Biochem.* **134**(2): 347-354.
- Jones, P.J. und Varady, K.A.** 2008. Are functional foods redefining nutritional requirements?. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **33**(1):118-123.
- Kay J.** 1985. *Aspartic proteinases and their inhibitors*, S. 1-17 in Kotska, V. (ed.), *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Kessler, E.** 1995. β -lytic endopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**: 740-756.
- Kim, E.-K., Lee, S.-J., Jeon, B.-T., Moon, S.-H., Kim, B. K., Park, T.-K.; Han, J.-S. und Park, P.-J.** 2009. Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chem.* **114**(4): 1365-1370.
- Kopetzki, E. und Karcher, A.** 1999. Protease precursors that can be autocatalytically activated and their use. PCT Int Appl WO99010483A2.
- Korhonen, H. und Pihlanto, A.** 2003. Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* **9**(16): 1297-1308.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680-685.

Liu, L. 2008. Untersuchungen zur heterologen Enzymherstellung in *Lactobacillus* spec. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.

Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S. and Henry, G. 1994. Precipitation of hydrophobic peptides from tryptic casein hydrolysate by salt and pH. *Enzyme Microb. Technol.* **16**(7): 591-595.

Leung, E.H.W. und Ng, T.B. 2007. A relatively stable antifungal peptide from buckwheat seeds with antiproliferative activity toward cancer cells. *J. Pept. Sci.* **13**(11): 762-767.

Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. und Suzuki, H. 1987. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from an enzymic hydrolysate of casein. Part V. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of α_{s1} -casein. *Agric. Biol. Chem.* **51**(9): 2557-2561.

Masaki, T., Nakamura, K., Isono, M. und Soejima, M. 1978. A new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M497-1. *Agric. Biol. Chem.* **42**(7):1443-1445.

Masaki, T., Tanabe, M., Nakamura, K. und Soejima, M. 1981. Studies on a new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M497-1. I. Purification and some enzymatic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **660**(1): 44-50.

Masaki, T., Fujihashi, T., Nakamura, K. und Soejima, M. 1981. Studies on a new proteolytic enzyme from *Achromobacter lyticus* M497-1. II. Specificity and inhibition studies of *Achromobacter* protease I. *Biochim. Biophys. Acta* **660**(1): 51-55.

Masaki, T. und Soejima, M. Actions of *Achromobacter* protease I on some zymogens and dimethylcasein. 1985 *Agric. Biol. Chem.* **49**(6): 1867-1868.

Masaki, T., Tanaka, T., Tsunasawa, S., Sakiyama, F. und Soejima, M. 1992. Inhibition of *Achromobacter* protease I by lysinal derivatives. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(10): 1604-1607.

Matsuura, K., Gotou, T., Mizuno, S., Nishimura, S. und Yamamoto, N. 2005. Quantitative analysis of antihypertensive peptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in casein hydrolyzate using an *Aspergillus oryzae* protease: an LC-MS method. *Milchwissenschaft* **60**(1): 24-27.

Meisel, H. 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livest. Prod. Sci.* **50**(1-2): 125-138.

Meisel, H. und Bockelmann, W. 1999. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**(1-4): 207-215.

Meredith, D. und Boyd, C.A.R. 1995. Oligopeptide transport by epithelial cells. *J. Membrane Biol.* **145**(1): 1-12.

Michaelidou, A.M. 2008. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Rumin. Res.* **79**(1): 42–50.

Miguel, M., Contreras, M.M., Recio, I. und Aleixandre, A. 2009. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate. *Food Chem.* **112**(1): 211-214.

Mizuno, S., Nishimura, S., Matsuura, K., Gotou, T. und Yamamoto, N. 2004. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolyzate with an *Aspergillus oryzae* protease. *J. Dairy Sci.* **87**(10): 3183-3188.

Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. und Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur. J. Nutr.* **47**(4):171-182.

Mullally, M.M., Meisel, H. und FitzGerald, R.J. 1997. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett.* **402**(2,3): 99-101.

- Murao, S. und Oda, K.** 1985. *Pepstatin-insensitive acid proteinases*, S. 379-399. In Kotska, V. (ed.), *Aspartic Proteinases and Their Inhibitors*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. und Takano, T.** 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* **78**(4): 777-783.
- Nelson, R., Katayama, S., Mine, Y., Duarte, J. und Matar, C.** 2007. Immunomodulating effects of egg yolk low lipid peptic digests in a murine model. *Food Agric. Immunol.* **18**(1): 1-15.
- Norioka, S., Ohta, S., Ohara, T., Lim, S.I. und Sakiyama, F.** 1994. Identification of three catalytic triad constituents and Asp-225 essential for function of lysine-specific serine protease, *Achromobacter* protease I. *J. Biol. Chem.* **269**(25): 17025-17029.
- Nusrat, A., Turner, J.R. und Madara, J.L.** 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am. J. Physiol.* **279**(5, Pt. 1): G851-G857.
- Oda, K., Nakazima, T., Terashita, T., Suzuki, K. und Murao, S.** 1987. Purification and properties of an S-PI(pepstatin Ac)-insensitive carboxyl proteinase from a *Xanthomonas* sp. bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **51**(11): 3073-3080.
- Oda, K., Ito, M., Uchida, K.-i., Shibano, Y., Fukuhara, K.-i. und Takahashi, S.** 1996. Cloning and expression of an isovaleryl pepstatin-insensitive carboxyl proteinase gene from *Xanthomonas* sp. T-22. *J. Biochem.* **120**: 564-572
- Ohara, T., Makino, K., Shinagawa, H., Nakata, A., Norioka, S. und Sakiyama, F.** 1989. Cloning, nucleotide sequence, and expression of *Achromobacter* protease I gene. *J. Biol. Chem.* **264**(34): 20625-20631.
- Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S. und Kimura, S.** 2002. Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Pathog.* **33**(1): 33-41.

Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. 1996. Extracellular production of a *Serratia marcescens* serine protease in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **60**(10): 1551-1558.

Ohta, Y., Hojo, H., Aimoto, S., Kobayashi, T., Zhu, X., Jordan, F. und Inouye, M. 1991. Pro-peptide as an intermolecular chaperone: renaturation of denatured subtilisin E with a synthetic pro-peptide. Mol. Microbiol. **5**(6): 1507-1510.

Pavan, S., Hols, P., Delcour, J., Geoffroy, M.C., Granette, C., Kleerebezem, M. und Mercenier, A. 2000. Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. Appl. Environ. Microbiol. **66**(10): 4427-4432.

Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. und Korhonen, H. 1998. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. Int. Dairy. J. **8**(4): 325-331.

Quist, E.E., Phillips, R.D. und Saalia, F.K. 2009. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of proteolytic digests of peanut (*Arachis hypogaea* L.) flour. LWT Food Sci. Technol. **42**(3): 694-699.

Rawlings, D.R., Fraser, R.M. und Barrett, A.J. 2007. *An introduction to peptidases and the MEROPS database*, S. 161-179. In Polaina, J., MacCabe, A.P., (eds.), Industrial Enzymes. Springer, Dordrecht.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. und Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. **26**(9/10): 1231-1237.

Recio, I. und Visser, S. 2000. Antibacterial and binding characteristics of bovine, ovine and caprine lactoferrins: a comparative study. Int. Dairy J. **10**(9): 597-605.

Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W.A., Pohl, H.D., Korz, D., Sanders, E.A., Ross, A. und Deckwer, W.D. 1991. High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. J. Biotechnol. **20**(1): 17-27.

Rival, S.G., Fornaroli, S., Boeriu, C.G. und Wichers, H.J. 2001. Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase Inhibitory Properties. J. Agr. Food Chem. **49**(1): 287-294.

Roepstorff, P. und Fohlman, J. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed. Mass Spectrom. **11**(11): 601.

Rutherford-Markwick, K.J. und Moughan, P.J. 2005. Bioactive Peptides derived from Food. J. AOAC Int. **88**(3): 955-966.

Ruttloff, H. 1993. Industrielle Enzyme, 2. Auflage, S. 779. Behr's Verlag, Hamburg.

Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T. und Morimatsu, F. 2008. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. J. Agric. Food Chem. **56**(20): 9586-9591.

Sambrook, J. und Russell, D.W. 2001. Molecular cloning; a laboratory manual, 3. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. **74**(12): 5463-5467.

Satake, M., Enjoh, M., Nakamura, Y., Takano, T., Kawamura, Y., Arai, S. und Shimizu, M. 2002. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, val-pro-pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. Biosci. Biotechnol. Biochem. **66**(2): 378-384.

Schechter, I. und Berger, A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**(2): 157-162.

Schillinger, U. und Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. **55**(8): 1901-1906.

Schopp, S. 2008. Hydrolasen in der Lebensmittelindustrie. Dissertation, Universität Hohenheim.

Schrenk, J., Wunderwald, P. 1982. Endoproteinase-Lys-C aus Bakterien, Verfahren zu ihrer Gewinnung und Verwendung. Patentschrift DE3034045A1.

Shahidi, F. und Zhong, Y. 2008. Bioactive peptides. J. AOAC Int. **91**(4): 914-931.

Shimizu, M. und Son, D.O. 2007. Food-derived peptides and intestinal functions. Curr. Pharm. Des. **13**(9):885-895.

Shimizu, M., Tsunogai, M. und Arai, S. 1997. Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. Peptides **18**(5): 681-687.

Silen, J.L. und Agard, D.A. 1989. The α -lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*. Nature **341**(6241): 462-464.

Somvanshi, R.K., Singh, A.K., Saxena, M., Mishra, B. und Dey, S. 2008. Development of novel peptide inhibitor of Lipoxygenase based on biochemical and BIAcore evidences. Biochim. Biophys. Acta **1784**(11): 1812-1817.

Sørvig, E., Gronqvist, S., Naterstad, K., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H. und Axelsson, L. 2003. Construction of vectors for inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *L. plantarum*. FEMS Microbiol. Lett. **229**(1), 119-126.

Sørvig, E., Mathiesen, G., Naterstad, K., Eijsink, V.G.H. und Axelsson, L. 2005. High-level, inducible gene expression in *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* using versatile expression vectors. Microbiology **151**(7): 2439-2449.

Suetsuna, K., Ukeda, H. und Ochi, H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. J. Nutr. Biochem. **11**(3): 128-131.

Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T. und Kimoto, M. 1990. Cholesterol-lowering activity of various undigested fractions of soybean protein in rats. *J. Nutr.* **120**(9): 977-985.

Takano, M., Tomita, Y., Katsura, T., Yasuhara, M., Inui, K. und Hori, R. 1994. Bestatin transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **47**(6): 1089-1090.

Tang, B., Nirasawa, S., Kitaoka, M. und Hayashi, K. 2002. The role of the N-terminal propeptide of the pro-aminopeptidase processing protease: refolding, processing, and enzyme inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**(1): 78-84.

Tauzin, J., Miclo, L. und Gaillard, J.L. 2002. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α_{S2} -casein. *FEBS Lett.* **531**(2): 369-374.

Tauzin, J., Miclo, L., Lefranc, C., Boudier, J.-F. und Gaillard, J.-L. 2006. Use of at least one $\$G(A)62$ casein peptide with Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity for preparing medicines, food products and food complements. Patentschrift US2006/0234942A1.

Teorell, T. und Stenhagen, E. 1938. Universal buffer over the pH range 2.0 to 12.0. *Biochem. Z.* **299**: 416-419.

Van de Guchte, M., Kodde, J., van der Vossen, JM., Kok, J. und Venema, G. 1990. Heterologous gene expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Synthesis, secretion, and processing of the *Bacillus subtilis* Neutral Protease. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(9):2606-11.

Whitaker, D.R. 1965. Lytic enzymes of *Sorangum* species. Isolation and enzymatic properties of the α - and β -lytic proteases. *Can. J. Biochem. Physiol.* **43**(12): 1935-1954.

Wright, D.S., Graham, L.D. und Jennings, P.A. 1998. Cloning of a *Lysobacter enzyrogenes* gene that encodes an arginyl endopeptidase (endoproteinase Arg-C). *Biochim. Biophys. Acta* **1443**(3): 369-374.

Yamada, K., Sato-Mito, N., Nagata, J. und Umegaki, K. 2008. Health claim evidence requirements in Japan. *J. Nutr.* **138**(6S-1): 1192S-1198S.

Yamamoto, N., Maeno, M. und Takano, T. 1999. Purification of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.* **82**(7): 1388-1393.

Yang, Y., Malten, M., Grote, A., Jahn, D. und Deckwer, W.D. 2007. Codon optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. *Biotechnol. Bioeng.* **96**(4): 780-794.

Yoshie-Stark, Y. und Wäsche, A. 2004. *In vitro* binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food Chem.* **88**(2): 179-184.

Yoshie-Stark, Y., Tsukamoto, M., Futagawa, K., Kubota, M. und Ogushi, M. 2009. Bioactivities of surimi from southern blue whiting prepared by different ways. *Food Chem.* **113**(1): 47-52.

8 Anhang

8.1 MGSK-LysC

CAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCGCGCCATGGGTTCTAA
M G S K

AGGTGTTTTCCGGTTCCTGCAACATCGATGTTGTTTGTCCGGAAGGTAACGGTCACCGTGA
G V S G S C N I D V V C P E G N G H R D

CGTTATCCGTTCCGTTGCTGCTTACTCCAAACAGGGCACCATGTGGTGCACCGTTCCCT
V I R S V A A Y S K Q G T M W C T G S L

GGTTAACAACCTCCGCTAACGACAAAAAATGTACTTCCTGACCGCTAACCACTGCGGTAT
V N N S A N D K K M Y F L T A N H C G M

CTGGTGCCGGCGATAGCGAAGGAGATACCAACAAATGACCTTGATGGTCTTGAGGTGGAC
T T A A I A S S M V V Y W N Y Q N S T C

CCGCGCGCCGGGTTCCCTCCTCCTCCGGTGCTAACGGTGACGGTTCCTGGCTCAGTCCCA
R A P G S S S S G A N G D G S L A Q S Q

CTGGCCGCGCAACAAGCACGATGGTTGCGACGAAGGCTGAAGTGGGACGACCTTGACTT
T G A V V R A T N A A S D F T L L E L N

CACTGCAGCTAACCCGGCTTACAACCTGTTCTGGGCCGGCTGGGACCGTCGTGACCAGAA
T A A N P A Y N L F W A G W D R R D Q N

CTTTCGCTGGTGTCTACCGCTATCCACCACCCGAACGTTGCTGAAAAACGTATCTCCCACTC
F A G A T A I H H P N V A E K R I S H S

CACCGTTGCTACCGAGATCTCCGGTTACAACGGTGCTACCGGCACCTCCCACCTGCACGT
T V A T E I S G Y N G A T G T S H L H V

TTTCTGGCAGGCCTCCGGTGGTGTACCGAACCCGGGAGCTCCGGTTCCTCCGATCTACTC
F W Q A S G G V T E P G S S G S P I Y S

CCCGGAAAAACGTGTTCTGGGTCAGCTGCACGGTGGGCCCTCCTCCTGCTCCGCTACCGG
P E K R V L G Q L H G G P S S C S A T G

TGCTGACCGTTCCGACTACTACGGTTCGTGTTTTACCTCCTGGACCGGTGGTGGGACCTC
A D R S D Y Y G R V F T S W T G G G T S

CGCTACCCGTCTGTCCGACTGGCTGGACCCGCGGGCACCGGTGCTCAGTTCATCGACGG
A T R L S D W L D A A G T G A Q F I D G

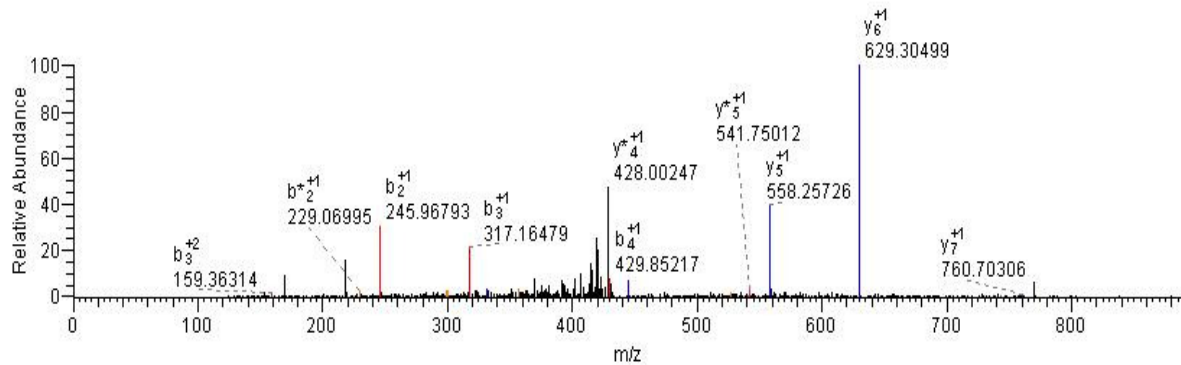
TCTGGACTCCACCGGTACCCCGCCGGTTTAATGAAAGCTTAATTAACAGCTTTTGTTCCTC
L D S T G T P P V * *

Abbildung 8.1: DNA- und Aminosäuresequenz des MGSK-lysC Genkonstrukts bzw. seines Proteinprodukts. Die überzähligen Basen stammen vom Klonierungsvektor pGA18 der Fa. Geneart.

8.2 MS/MS-Spektren der funktionellen Peptide des Caseinhydrolysats

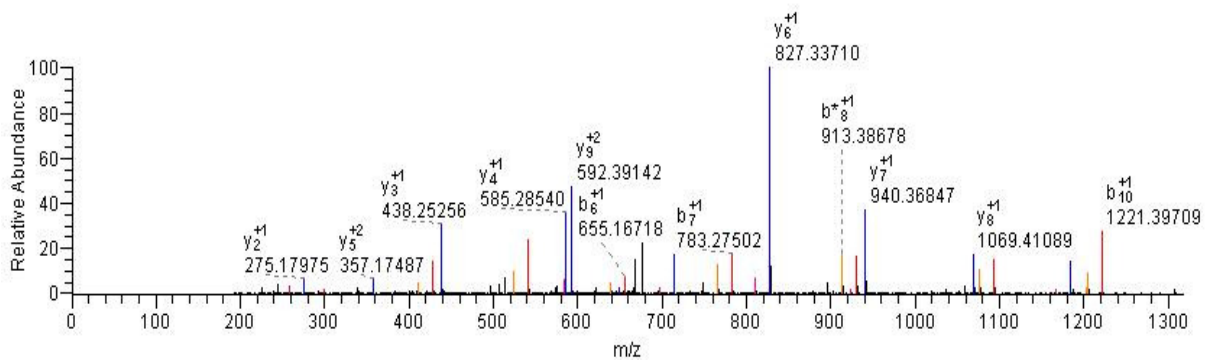
A

#1287-1287 RT:21.67-21.67 NL: 2.42E3



B

#3091-3091 RT:41.61-41.61 NL: 2.90E4



C

#1678-1678 RT:25.97-25.97 NL: 1.86E4

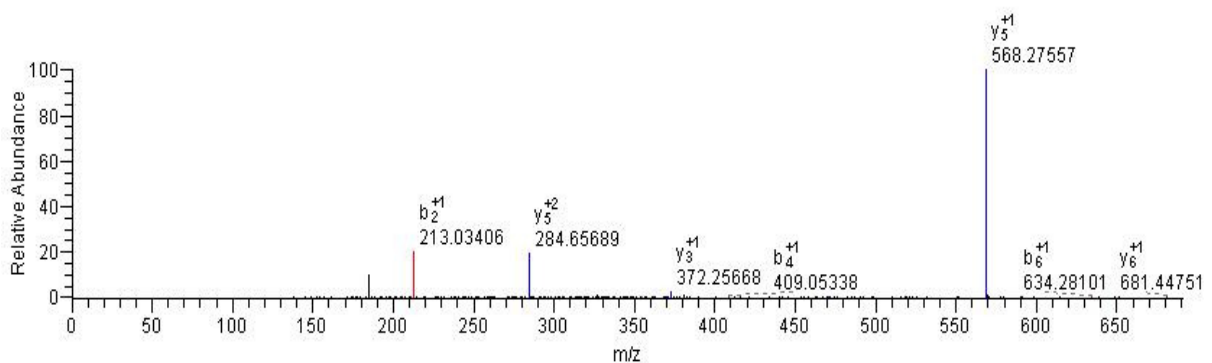


Abbildung 8.2: MS/MS-Ionisierungsspektren von NMAINPSK (A), ALNEINQFYQK (B) und VLPVPQK (C).

8.3 Kalibriergeraden

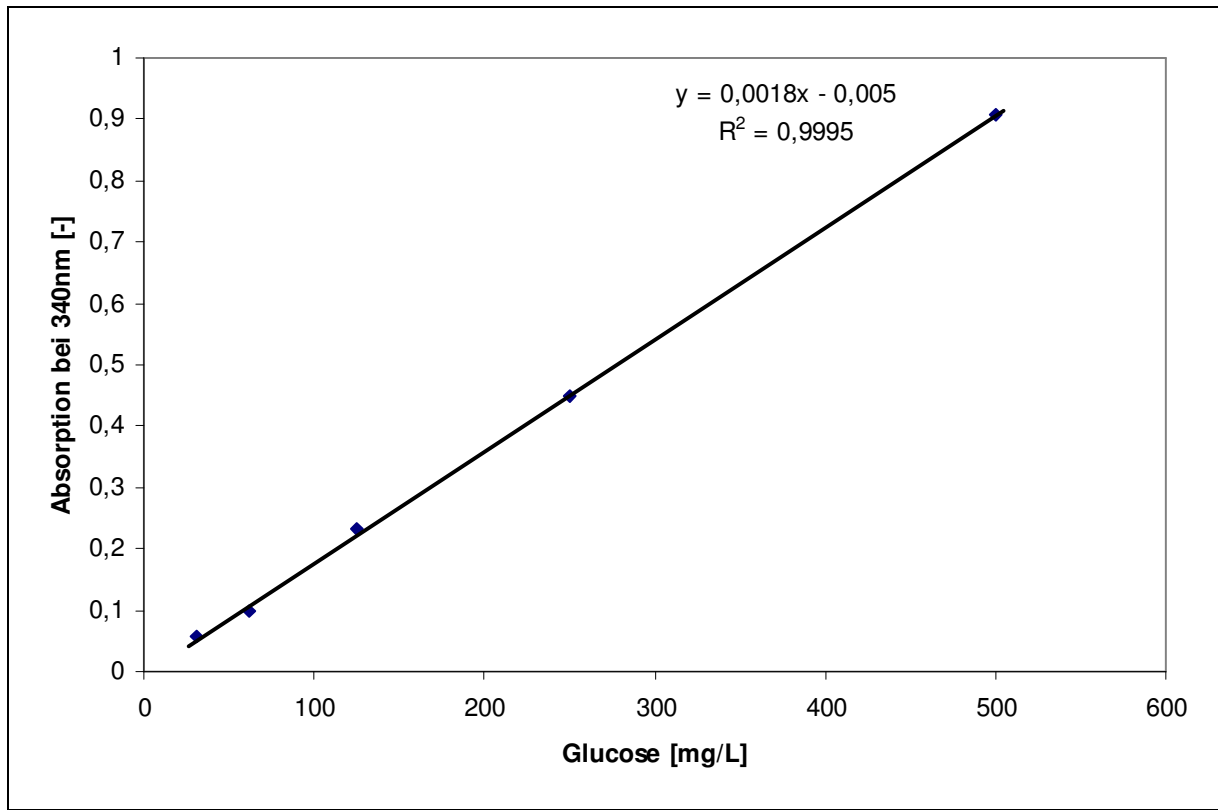


Abbildung 8.3: Kalibriergerade zur enzymatischen Glucosebestimmung.

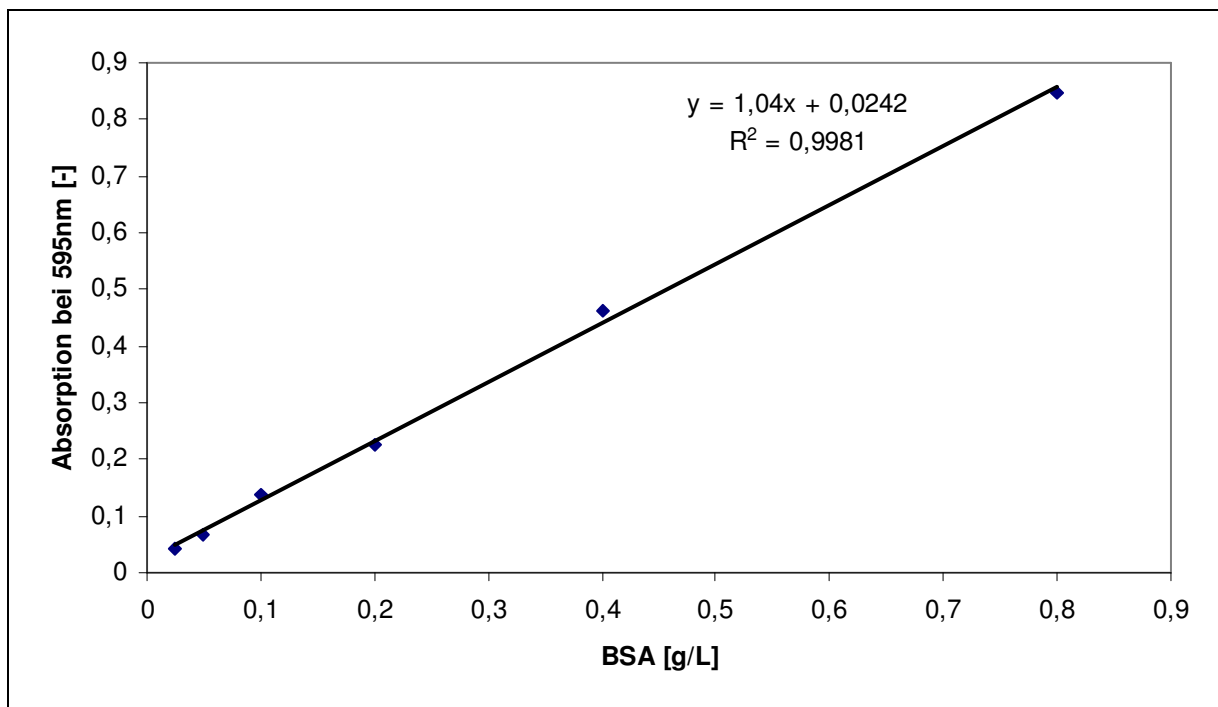


Abbildung 8.4: BSA-Kalibriergerade zur Proteinbestimmung nach Bradford.

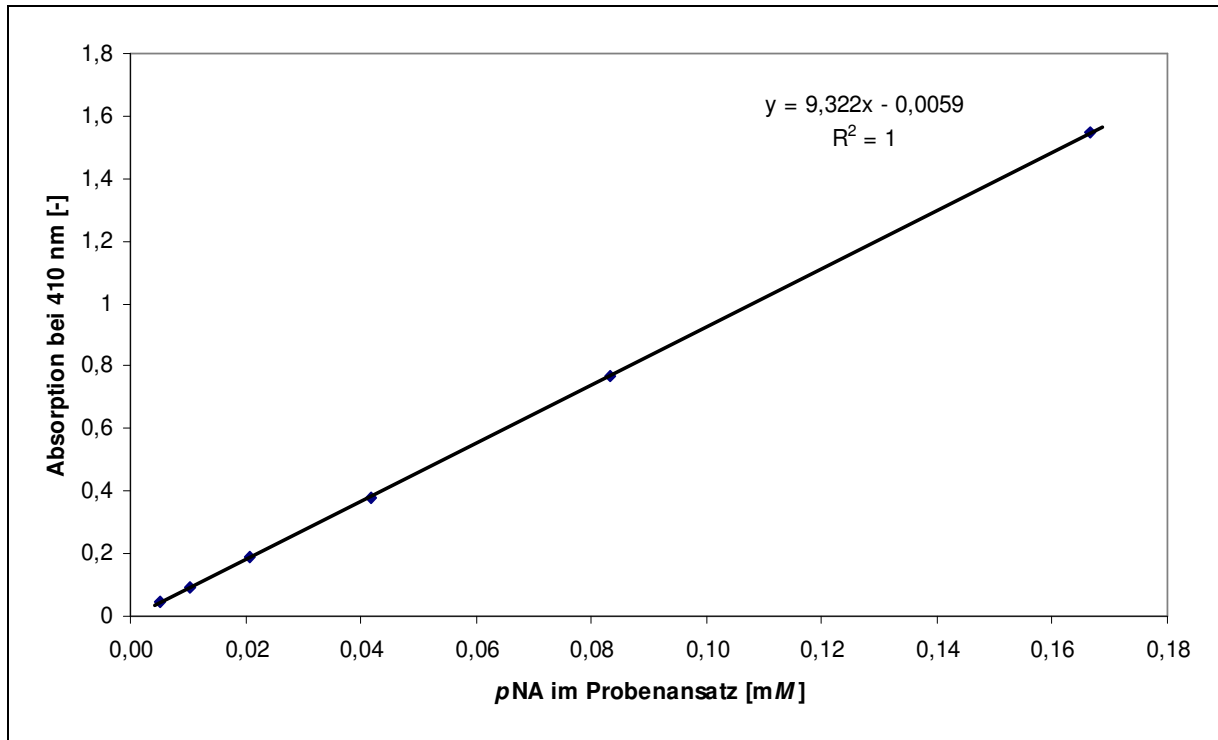


Abbildung 8.5: pNA-Kalibriergerade zur Bestimmung der Proteaseaktivität mit chromogenen Peptidsubstraten.

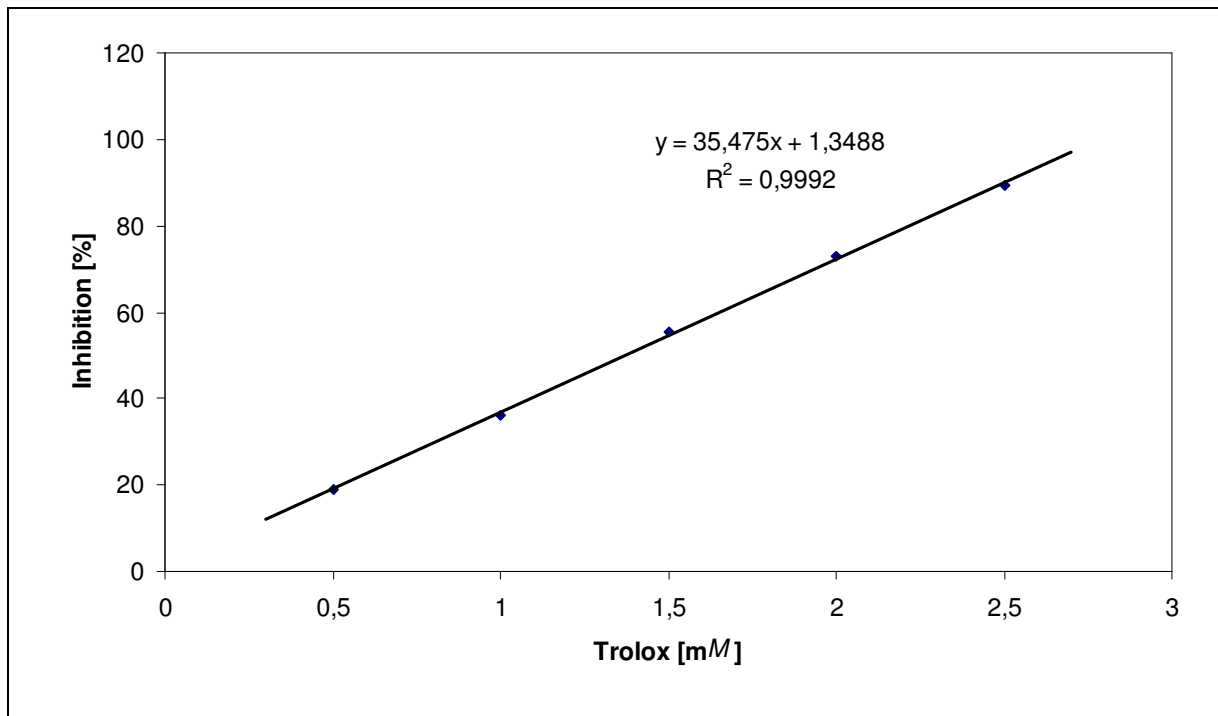


Abbildung 8.6: Trolox-Kalibriergerade zur Bestimmung der antioxidativen Wirkung.

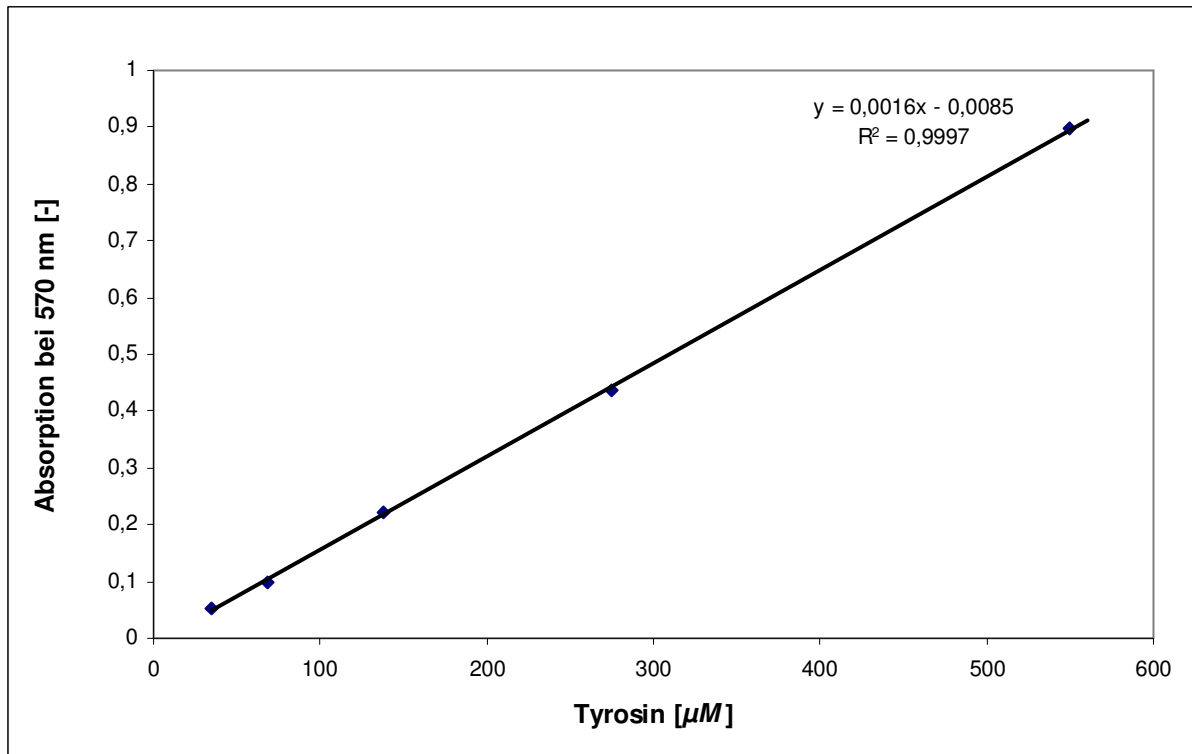


Abbildung 8.7: Tyrosin-Kalibriergerade zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität mittels Ninhydrin-Reaktion.

8.4 *Cpro-lysC* (mit für *E. coli* optimierter „Codon-Usage“)

Angefügte Start- und Stopp-Codons sind markiert. Überzählige Basen stammen vom Klonierungsvector pCR4 (Geneart).

```
GTTTAAACGAATTCGCCCTTGAGGTACCATGGCGAACTTTACCAGCACCCACGAG
CGGTCTGACCGCGACCTTTACCGATAGCAGCACCGATAGCGATGGCAGCATTG
CGAGCCGTAGCTGGAACCTTGGTGTATGGCACCACCTCTACCGCGACCAATCCG
AGCAAACCTATAGCGCAGCGGGCACCTATAACCGTGACCCTGACCGTGACCGA
TAACGGCGGTGCGACCAACACCAAAACCGGCAGCGTGACCGTTAGCGGCACCC
CGGGCAGCCAGACCTATAACCAACGAAACCGATGTGGCGATTCCGGATAACGCG
ACCGTGGAAGCCCGATTACCGTGAGCGGCCGTACCGGTAATGGTCTGCCGAG
CACCAGCATTGAGGTGACCATCTATCACACCTATAAAAGCGATCTGAAAGTGGA
TCTGGTGGCGCCGGATGGCACCGTGTATAGCCTGCATAACCGTACCGGCGGCA
GCGCGGATAACGTGATTGGCACCTACACCAAAGATCTGAGCAGCGAACCGCTG
AACGGCGTGTGGAAATGCGCGAGCACCAACCATGCGTCCGAGCATTCCGGCAGC
GAGCACCGCGGTGCGAGCCCGAGCGAATAATAAAAGCTTGAGCTCAAAGGGC
GAATTCGCGGCCGC
```

8.5 Bovines Casein (mit markierten LysC-Schnittstellen)

α_1 -Casein

RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDI
KQMEAESISSSEIIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNS
AEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGT
QYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW

α_2 -Casein

KNTMEHVSSSEESIISQETYKQEKNMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEYSIGSS
SEESAEVATEEVKITVDDKHYPKALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLPWDQVKR
NAVPIPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVEFTKKTKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQ
KFALPQYLKTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL

β -Casein

RELEELNVPGEIVESLSSSEESITRINKKIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHPFAQTQSL
VYPPFGPIPNSLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAMAPKHKEMPFKY
PVEPFTEQSLLTLDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKV
LPVPQKAVPYPQRDMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV

κ -Casein

QEQNQEQPIRCEKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPY
PYYAKPAAVRSPAQILQWQVLSNTVPAKSCQAQPTTMARHPHPLSFMAIPPCKKNQ
DKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPEVIESPPEINTVQVTSTAV

8.6 Verifizierung der *lac4*-Mutagenesen mittels DNA-Sequenzierung

lac4.mut1

CGACTTTT**TCC**ACTAAAG

lac4.mut2

CGCTTTG**TCCG**

lac4.mut3

AGTTGAATC**CTCC**GGATT