

Isolierung und Charakterisierung thermophiler Proteasen aus Bakterien

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von
Christa Steinbrenner

Tag der mündlichen Prüfung:

28. November 2003

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Bisswanger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. U. Weser

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. H. Bisswanger im Zeitraum von 1998 bis 2003 am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Bisswanger danke ich für die Bereitstellung des Themas sowie für seine stets freundliche Betreuung und Unterstützung.

Für die Arbeitsmöglichkeit am Lehrstuhl II des Physiologisch-chemischen Instituts bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Mecke und Herrn Prof. Dr. H. Probst.

Herrn Prof. Dr. U. Weser danke ich für Prüfung und Berichterstattung meiner Arbeit.

Dank gilt Herrn Dr. H. Kalbacher für die Synthese und Bereitstellung von Peptiden.

Herrn Priv. Doz. Dr. S. Stevanovic danke ich für die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen von Sequenzierarbeiten.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung danke ich Herrn Dr. Alexander Beck und Herrn Klaus Möschel.

Meinen Arbeitskollegen Xiaoqing Liu, Rainer Figura, Meriem Nouaimi-Bachmann, Saida Senhaji, Christine Theiss und Eva Galinsky danke ich für Anregungen, Diskussionsbereitschaft sowie für das angenehme Arbeitsklima. Für Ihre Assistenz danke ich Frau A. Hanika und Frau U. Wöll. Weiterer Dank gilt den Laboranten Markus Braun, Sven Schaaf, Meike Kovallik und Philipp Schuhman.

Für die langjährige Zusammenarbeit im Rahmen des Papierspaltprojekts bedanke ich mich bei Frau Dr. A. Haberditzl.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Förderung und Finanzierung des Papierspaltprojekts.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Leben in extremer Umwelt	1
1.2	Einordnung der untersuchten Bakterienarten	4
1.3	Stabilität thermophiler Enzyme	10
1.4	Anwendungen thermophiler Enzyme	14
1.5	Proteolytische Enzyme	16
1.6	Aufgabenstellung	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Bakterienstämme	23
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zellkultivierung und Stammhaltung der Bakterienstämme	23
2.2.2	Zellaufschluß	24
2.2.3	Fällung mit Streptomycinsulfat	24
2.2.4	Chromatographische Methoden	25
2.2.4.1	Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose	25
2.2.4.2	Gelchromatographie an Sepharose CL-6B	26
2.2.4.3	Gelchromatographie an TSK G 3000 SW	26
2.2.4.4	Gelchromatographie an Sephadex G-25	26
2.2.4.5	Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25	27
2.2.4.6	Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60	28
2.2.5	Ultrazentrifugation	28
2.2.5.1	Saccharose-Gradienten-Zentrifugation	28

2.2.6	Proteinkonzentrierung	29
2.2.6.1	Proteinkonzentrierung mit Ultrafiltration	29
2.2.7	Proteinbestimmung	29
2.2.7.1	Proteinbestimmung nach Bradford	29
2.2.8	Elektrophoretische Methoden	30
2.2.8.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	30
2.2.8.2	Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.2.9	Enzymatische Bestimmungsmethoden	32
2.2.9.1	Proteolytische Aktivitätsbestimmung nach Anson	32
2.2.9.2	Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Ala-Ala-Phe-AMC	34
2.2.9.3	Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Glutaryl-Phe-AMC	35
2.2.9.4	Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Suc-Phe-p-nitroanilid	35
2.2.9.5	Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid	36
2.2.9.6	Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Benzoyl-Arg-p-nitroanilid	37
2.2.9.7	Hydrolytische Aktivitätsbestimmung mit Benzoyl-Tyr-ethylester	37
2.2.9.8	Hydrolytische Aktivitätsbestimmung mit Benzoyl-Arg-ethylester	37
2.2.9.9	Aktivitätsbestimmung mit Furylacryloyl-Gly-Leu-amid	38
2.2.9.10	Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys	38
2.2.9.11	Bestimmung der Katalaseaktivität	39
2.2.9.12	Bestimmung der Fumaraseaktivität	39
2.2.9.13	Bestimmung der Lactat-Dehydrogenaseaktivität	40
2.2.9.14	Bestimmung der α -Amylaseaktivität	40
2.2.10	Nachweis von Glycoproteinen	41
2.2.11	Größenbestimmung an Sepharose CL-6B	41
2.2.12	Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat	42
2.2.13	Elektrotransfer von Protein (Westernblot)	42
2.2.14	Bestimmung der N-terminalen Sequenz der Primärstruktur der Protease aus <i>T. thermophilus</i> HB8	43
2.2.15	Gelverdau der Protease aus <i>T. thermophilus</i> HB8	44

2.2.16	Bestimmung von Teilsequenzen der Primärstruktur der Protease aus <i>T. thermophilus HB8</i> mit Massenspektrometrie	46
2.2.17	Isolierung der genomischen DNA aus <i>T. thermophilus HB8</i>	47
2.2.18	Kinetik	48
2.2.18.1	pH-Optimum	48
2.2.19	Immunisierung	48
2.2.19.1	Immunisierung eines Kaninchens mit Antigen aus <i>B. caldolyticus</i>	48
2.2.19.2	Immunodiffusion nach Ouchterlony	49
2.2.19.3	Antigen-Antikörperkomplexe in Lösung	50
2.2.20	Antikörperreinigung	50
2.2.20.1	Ammoniumsulfat-Fraktionierung	50
2.2.20.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose	51
2.2.20.3	Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60	51
2.2.21	Immunoreinigung	52
2.2.21.1	Immobilisierung von Antikörpern an CNBr-aktivierter Sepharose	52
2.2.21.2	Affinitätschromatographie	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Zellkultivierung von <i>T. thermophilus HB8</i>	54
3.1.1	Zellkultivierung	54
3.1.2	Stammhaltung	55
3.2	Entwicklung eines Reinigungsverfahrens für thermophile Proteasen aus <i>T. thermophilus HB8</i>	56
3.2.1	Zellaufschluß	56
3.2.2	Fällung mit Streptomycinsulfat	57
3.2.3	Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose	58
3.2.4	Gelchromatographie an Sepharose CL-6B	61
3.2.5	Gelchromatographie an TSK G 3000 SW	62
3.2.6	Gelchromatographie an Sephadex G-25	64
3.2.7	Saccharose-Gradienten-Zentrifugation	66

3.2.8	Reinigungstabellen	68
3.2.9	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	70
3.2.10	Nicht-dissoziierende diskontinuierliche Polyacrylamidgel- elektrophorese	74
3.3	Entwicklung eines Aktivitätstests für die isolierte Protease aus <i>T. thermophilus HB8</i>	75
3.3.1	Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit synthetischen Substraten	75
3.3.2	Vergleich der Substrate Glutaryl-Phe-AMC und Ala-Ala-Phe-AMC	78
3.3.3	Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys	84
3.4	Größenbestimmung der thermophilen Protease aus <i>T. thermophilus HB8</i>	88
3.4.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	88
3.4.2	Nachweis von Glycoproteinen	90
3.4.3	Größenbestimmung an Sepharose CL-6B	92
3.4.4	Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat	97
3.5	Untersuchungen zur Primärstruktur der isolierten Protease aus <i>T. thermophilus HB8</i>	102
3.5.1	Bestimmung der N-terminalen Sequenz	102
3.5.2	Bestimmung von Teilsequenzen der Primärstruktur	103
3.6	Isolierung der genomischen DNA aus <i>T. thermophilus HB8</i>	113
3.6.1	Extraktion der genomischen DNA	113
3.7	Kinetik der isolierten Protease aus <i>T. thermophilus HB8</i>	114
3.7.1	Inkubationszeit	114
3.7.2	Substratkonzentration	116
3.7.3	Enzymaktivität	118
3.7.4	Temperaturmaximum	119
3.7.5	pH-Optimum	121
3.7.6	Enzymhemmung	122
3.8	Zellkultivierung und Stammhaltung von <i>B. caldolyticus</i>	124
3.8.1	Zellkultivierung und Stammhaltung	124

3.9	Entwicklung eines Reinigungsverfahrens für extrazelluläre Proteasen aus <i>B. caldolyticus</i>	125
3.9.1	Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25	125
3.9.2	Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60	127
3.9.3	Reinigungstabelle	129
3.9.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	131
3.9.5	Nicht-dissoziierende diskontinuierliche Polyacrylamidgel-elektrophorese	134
3.9.6	Größenbestimmung der extrazellulären Proteasen mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	135
3.10	Immunisierung eines Kaninchens mit Antigen aus <i>B. caldolyticus</i>	138
3.10.1	Immunisierung	138
3.10.2	Immunodiffusion nach Ouchterlony	139
3.10.3	Antigen-Antikörperreaktion in Lösung	140
3.11	Antikörperreinigung	141
3.11.1	Ammoniumsulfat-Fraktionierung	142
3.11.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose	143
3.11.3	Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60	145
3.12	Immunoreinigung	148
3.12.1	Immobilisierung von Antikörpern an CNBr-aktivierter Sepharose	148
3.12.2	Affinitätschromatographie	148
4	Diskussion	153
4.1	Reinigungsverfahren für intrazelluläre Proteasen aus <i>T. thermophilus HB8</i>	153
4.2	Optimierung des Aktivitätstests	156
4.3	Untersuchungen zur Spezifikation der isolierten Protease	157
4.4	Größenbestimmung	157
4.5	Sequenzanalyse nach Edman und mit Massenspektrometrie	159
4.6	Reindarstellung extrazellulärer Proteasen aus <i>B. caldolyticus</i>	161

4.7	Immunsisierung	162
4.8	Immunoreinigung	163
4.9	Ausblick	164
5	Zusammenfassung	165
6	Literaturverzeichnis	167

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Absorption
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluoridhydrochlorid
Ala-Ala-Phe-AMC	Alanyl-alanyl-phenylalanin-7-amino-4-methyl-cumarin
AMC	7-Amino-4-methyl-cumarin
AU	Anson-Unit
BPC	Base-Peak-Chromatogramm
Benzoyl-Arg-ethylester	N α -Benzoyl-arginin-ethylester
Benzoyl-Arg-p-nitroanilid	N α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid
Benzoyl-Tyr-ethylester	N α -Benzoyl-L-tyrosin-ethylester
CID	Kollisionsaktivierung (collision induced dissociation)
CNBr	Bromcyan
d	Schichtdicke der Küvette
Da	Dalton
DE	Diethylamino-ethyl
DFP	Diisopropylfluorophosphat
ΔA	Absorptionsänderung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSZM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ϵ	Absorptionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Furylacryloyl-Gly-Leu-amid	N-[3-(2-Furyl)-acryloyl]-glycyl-L-leucinamid
Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys	Glutamyl-glycyl-tyrosyl-alanyl-lysin
Glutaryl-Phe-AMC	Glutaryl-phenylalanin-7-amino-4-methyl-cumarin
HCl _{konz.}	Konzentrierte Salzsäure
H ₂ O _{bidest.}	Bidestilliertes Wasser
H ₂ O _{deion.}	Deionisiertes Wasser

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

H ₂ O _{dest.}	Destilliertes Wasser
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high pressure liquid chromatography)
IgG	Immunglobuline der G-Klasse
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
K-Na-Tartrat	Kaliumnatriumtartrat
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
N	Normal
NADH+H ⁺	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
n.m.	nicht meßbar
OD	Optische Dichte
p.a.	Pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Perjodat-Schiff-Färbung
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
pH	Potentia Hydrogenii
PM	Membran mit Polyethersulfonbeschichtung
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Poly-(vinylidendifluorid)
RNase	Ribonuclease
RP	Reversed phase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sp.	Spezies
ssp.	Subspezies
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid	N-Succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanin-p-nitroanilid

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Suc-Phe-p-nitroanilid	N-Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TES	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Saccharose
TFA	Trifluoressigsäure
TSK	Toyo-Soda-Company, Japan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
Ve	Elutionsvolumen
V _(Küvette)	Küvettenvolumen
V _o	Ausschlußvolumen
V _(Probe)	Probenvolumen
v/v	Volumenanteile
w/v	Gewichtsanteile
YM	Membran mit Cellulosebeschichtung

1 Einleitung

1.1 Leben in extremer Umwelt

Mikroorganismen sind konkurrenzlos in ihrer Anpassung an verschiedene Formen von umweltbedingtem physikalischen und chemischen Streß. Es finden sich hochspezialisierte Extremophile oft obligat an den extremsten Standorten.

So vollziehen sich unterschiedliche Möglichkeiten von Leben, beispielsweise unter außergewöhnlichen Temperaturen, lediglich mit der Einschränkung, daß Wasser vorhanden und darin gelöste Nährstoffe verfügbar bzw. physiologische Reaktionen möglich sind (Singleton und Amelunxen, 1973).

Die Differenzierung dieser Mikroorganismen entsprechend ihrer Temperaturansprüche reicht von den Psychrophilen, kälteliebenden Organismen, über gemäßigte Temperaturen liebende Organismen, den Mesophilen, hin zu den hitzeresistenten Thermophilen. Während das Wachstumsoptimum psychrophiler Organismen unterhalb von 20°C und das von mesophilen Organismen zwischen 20 und 35°C liegt, zeichnet Thermophilie das Wachstum von Organismen gerade bei erhöhten Temperaturen aus. So können Thermophile als thermotolerante Organismen (45-50°C), fakultativ Thermophile (50-65°C) und obligat thermophile Organismen, mit den höchsten Wachstumsraten bei 65-70°C, existieren (Farrell und Campbell, 1969). Extrem Thermophile zeigen bevorzugtes Wachstum bei Temperaturen von 70°C und höher.

Thermophile Arten finden sich in fast allen Bakterienarten. Sie können aerob, anaerob oder fakultativ aerob sein, und sie verwenden ähnliche Kohlen- und Stickstoffquellen wie ihre mesophilen Äquivalente. Ihre Lebensräume sind hauptsächlich heiße Quellen oder aber Vulkane. Neben diesen Habitaten finden sie sich auf Kohlenhalden,

Kompostplätzen (Zeikus, 1979) oder auch in Heißwasseraufbereitern (Brock, 1967) und in verschmutzten Flüssen (Degryse, 1978).

Innerhalb der Thermophilen lassen sich weitere Gruppen extremer Ökosysteme unterscheiden. Als Bewohner von sauren heißen Quellen vulkanischen Ursprungs sind aerobe und anaerobe Arten anzutreffen, welche Schwefelverbindungen zu oxidieren vermögen. Die Produkte von sulfatproduzierenden Organismen werden, wiederum mit Hilfe weiterer anaerober thermophiler sulfatreduzierenden Arten, unter Bildung von Schwefelwasserstoff verwertet.

Auch innerhalb der Gruppe der Methanbildner sind neben mesophilen Arten Thermophile anzutreffen. Sie sind strikt anaerob und leben infolge dieser Eigenschaften in Sümpfen, Tümpeln und ähnlichen Habitaten.

Halophilie kennzeichnet die Anpassung von Mikroorganismen an hochkonzentrierte Salzlösungen, wie sie beispielsweise in Salzseen oder Salzgärten anzutreffen sind. Barophile Organismen hingegen leben unter Konditionen hohen hydrostatischen Druckes in marinen Lebensräumen.

Die heutigen Untersuchungen zur Aufzeigung evolutionärer Verwandtschaften der Organismen bedienen sich bevorzugt molekulargenetischer Methoden, da die Sequenzen bestimmter Moleküle genügend konserviert sind, um molekulare phylogenetische Verwandtschaften aus ihnen ableiten zu können. Ribosomale RNA schien infolge hoher funktioneller und genetischer Konstanz als universeller Marker besonders geeignet. Die Katalogisierung der Nucleotidsequenzen der 16S rRNA und 18S rRNA und die daraus ermittelten Ähnlichkeitskoeffizienten führten schließlich zur Erstellung eines universellen phylogenetischen Stammbaums. Abbildung 1 zeigt den auf rRNA basierenden universellen Stammbaum. Er vermittelt einen Überblick über die Evolution der Zelle, welche stetig einem horizontalen Genflow unterworfen war. So lebten Bakterien nach heutigem Wissen vor über 3 Milliarden Jahren im

präbiotischen chemischen Stadium und entwickelten sich über ein Vorläuferstadium hin zu den Vorläufern der Domänen der Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten.

Ein großer Anteil der untersuchten Vertreter der Extremophilen wird taxonomisch den Archaeobakterien zugeordnet, deren Name auf die Annahme hinweist, daß jene extremen Umweltbedingungen die Zustände widerspiegeln, welche vor 3-4 Milliarden Jahren, in archaischen Zeiten, vorherrschten. Phänotypisch umfaßt die Gruppe der Archae vier metabolische Typen, die Methanogenen, die extrem Halophilen, die Sulfothermophilen sowie thermophile sulfatreduzierende Arten.

Zusätzlich finden sich Extremophile im Reich der Eubakterien, deren Phänotyp gleichfalls über den genannten Zeitraum von wenigstens 3 Milliarden Jahre stabil und invariant war (Woese, 2000; Woese, 1996; Woese und Fox, 1977).

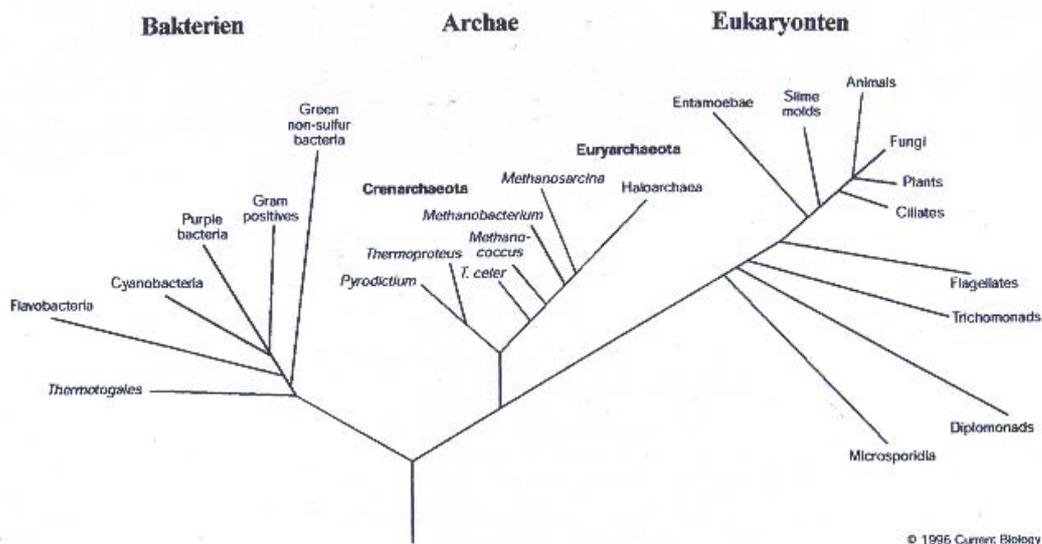


Abb.1: Universeller phylogenetischer Stammbaum, basierend auf ribosomaler RNA (Woese, 1996).

1.2 Einordnung der untersuchten Bakterienarten

Im Zusammenhang mit dem zuvor aufgezeigten phylogenetischen Stammbaum sollen vorweg die im Laufe der Zeit vorgenommenen Klassifizierungen der in dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämme erläutert werden. Die Einordnung des Bakterienstamms *Thermus thermophilus HB8* erfolgte in früheren Studien gemäß der künstlichen Klassifizierung, welche Verwandtschaften aufgrund ihrer Ähnlichkeiten nach morphologischen, cytologischen und physiologischen Kriterien identifizierte. Das System bezieht sich auf die Benutzung eines Bestimmungsschlüssels, der in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology dokumentiert ist (Breed et al., 1957; Murray et al., 1984).

So wurde das Bakterium vorläufig der Gattung *Flavobacterium* zugeordnet. *T. thermophilus HB8* zeigte zwar entsprechende Merkmale, welche für einige Stämme von *Flavobacterium* beschrieben wurden, unterschied sich jedoch ganz wesentlich durch die Wachstumstemperatur (Breed et al., 1957). Später erfolgte, aufgrund verschiedener gemeinsamer Merkmale, die Zuordnung des Stamms zur Gattung *Thermus*. Da jedoch wiederum Merkmalsunterschiede zu *Thermus aquaticus YT-1* vorhanden waren, z.B. was den morphologischen Aufbau der Zellen angeht, wurde er als separate Art als *T. thermophilus HB8* bezeichnet.

Die Einordnung von *T. thermophilus HB8* wurde in Anlehnung an Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Volume 1, 1984, in Sektion 4 vorgenommen, welche die Gruppe der Gram-negativen aeroben Stäbchen und Kokken repräsentiert (Murray et al., 1984). Innerhalb der Gattung *Thermus* liegt der Stamm *T. thermophilus HB8* als unbewegliches Gram-negatives aerobes Stäbchen mit etwa 0,5-3,0 µm Länge vor. Die Zellen wachsen einzeln und in Ketten. Sie bilden gelbe bis orangefarbene Kolonien. Die Pigmente sind Carotinoide, welche mit der Zellwand assoziiert sind. Im eingesetzten Kulturmedium sind die Carotinoide unlöslich. *Thermus*-Stämme sind generell unfähig, Endosporen zu bilden. Das Temperaturoptimum des Eubakteriums liegt bei 65-72°C, das Temperaturmaximum bei 85°C und das

Minimum bei 47°C. Der Guanin- und Cytosingehalt der DNA liegt bei 69 mol % des DNA-Hydrolysats, und der Adenin- und Thymingehalt stellt 31 mol %, da keine andere Base im Hydrolysat entdeckt wurde. Die Schmelztemperatur wurde auf 97,5°C festgestellt und die Dichte im Cäsiumchlorid-Gradienten als 1,727 g/cm³ bestimmt. *T. thermophilus HB8* ist sensitiv gegenüber zahlreichen Antibiotika. Gelatinehydrolyse wurde nachgewiesen. Das pH-Optimum zeichnet sich im neutralen bis alkalischen Bereich ab, d.h. bei Raumtemperatur liegt das pH-Optimum bei 7,5 und bei 75°C bei pH 7,0. Die optimale Konzentration an NaCl für das Wachstum in Pepton-Hefeextrakt beträgt 0,2-0,3 %. Die Generationszeit beträgt unter kräftigem Schütteln im zuvor genannten Medium 18-20 Minuten. In der stationären Phase beträgt die Zelldichte $8 \cdot 10^8$ Zellen/ml (Oshima und Imahori, 1974).

Phylogenetische Analysen, basierend auf 16S rRNA-Sequenzen, bestätigten, daß eine Verwandtschaft der Gattung *Thermus* mit eubakteriellen Thermophilen wie z.B. *Thermotoga maritima* und *Thermomicrobium roseum* besteht (Weisburg et al., 1989). Die Einordnung der Gattung *Thermus* könnte somit in diesem Bereich innerhalb des phylogenetischen Stammbaums erfolgen, welche evolutionär die ältesten eubakteriellen Stammbaumlinien darstellen. Ferner konnte gezeigt werden, daß die ursprünglichen Eubakterien alle thermophil waren, und von einem gemeinsamen thermophilen Vorfahren abstammten (Achenbach-Richter et al., 1987). In Abbildung 2 ist der eubakterielle Stammbaum mit den genannten Gattungen im Ursprung zu sehen.

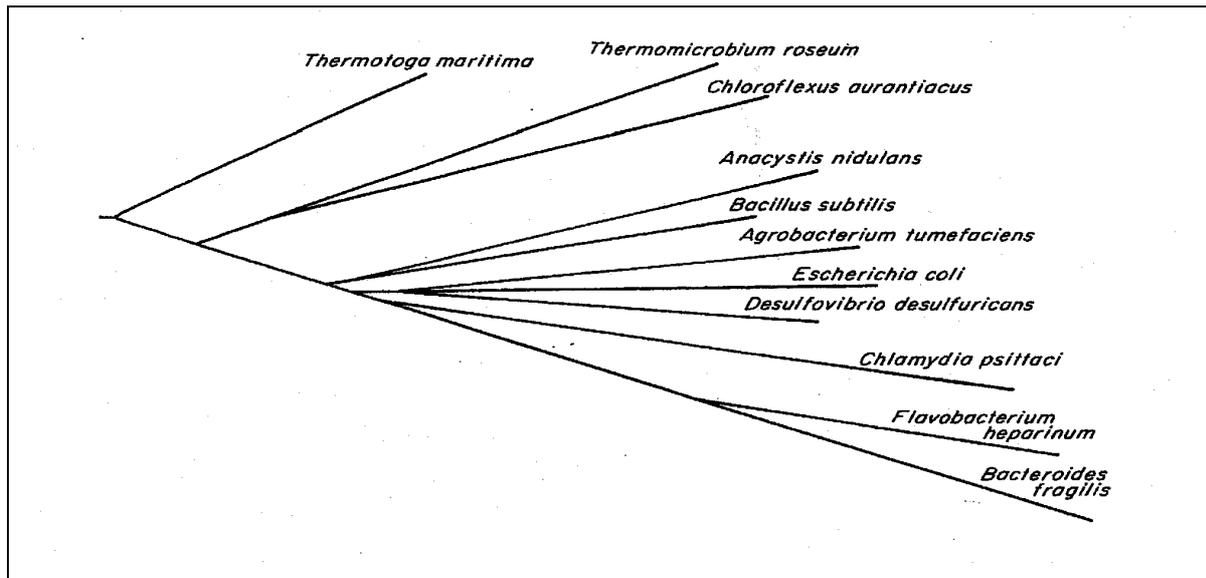


Abb.2: Phylogenetischer Stammbaum der Eubakterien, basierend auf 16S rRNA-Sequenzvergleichen (Achenbach-Richter et al., 1987).

Es sollte jedoch berücksichtigt werden, daß thermophile rRNA generell einen sehr hohen G+C-Gehalt aufweist. Die Übereinstimmungen der rRNA-Sequenzen könnten somit thermophile Konvergenz und nicht zwingend evolutionäre Verwandtschaften zeigen. Durch weitere Vergleiche von rRNA-Sequenzen der ursprünglich der Gattung *Thermus* zugeordneten Spezies mit jenen verschiedener Eubakteriengruppen wurde eine spezifische Verwandtschaft bestimmter Arten der Gattung *Deinococcus*, wie z.B. *Deinococcus radiodurans*, mit der Gattung *Thermus* nachgewiesen (Weisburg et al., 1989). *D. radiodurans*, ein Gram-positives, rot pigmentiertes, nicht bewegliches und äußerst strahlungsresistentes sowie leicht thermophiles Eubakterium, findet sich in der Gruppe der Gram-positiven Bakterien.

Zur näheren Bestimmung des Verwandtschaftsgrads wurden verfügbare Proteine von *T. thermophilus* HB8 und *D. radiodurans* verglichen, wobei die Mehrheit der Proteine (143 von 175) miteinander übereinstimmten. Es konnte gezeigt werden, daß die übereinstimmenden Proteine von Genen codiert werden, welche auf einem der beiden Chromosomen von *D. radiodurans* liegen. Möglicherweise besaß der gemeinsame Vorläufer der beiden Gattungen dieses Chromosom, und alle weiteren genetischen

Elemente (ein Chromosom und zwei Plasmide) wurden von *D. radiodurans* separat erworben. Ferner sollte nicht außer acht gelassen werden, daß einige Arten von *Deinococcus* eine leichte Thermophilie zeigen, was auch auf einen gemeinsamen thermophilen Vorläufer hinweisen könnte (White et al., 1999). Der somit eher nicht typische Vertreter der Gram-positiven Gruppe stünde phylogenetisch der *Thermus*-Gruppierung näher. Abbildung 3 zeigt die Domäne der Eubakterien, basierend auf 16S rRNA-Daten unter Berücksichtigung der Stämme *T. thermophilus* HB8 und *D. radiodurans* (Siefert und Fox, 1998).

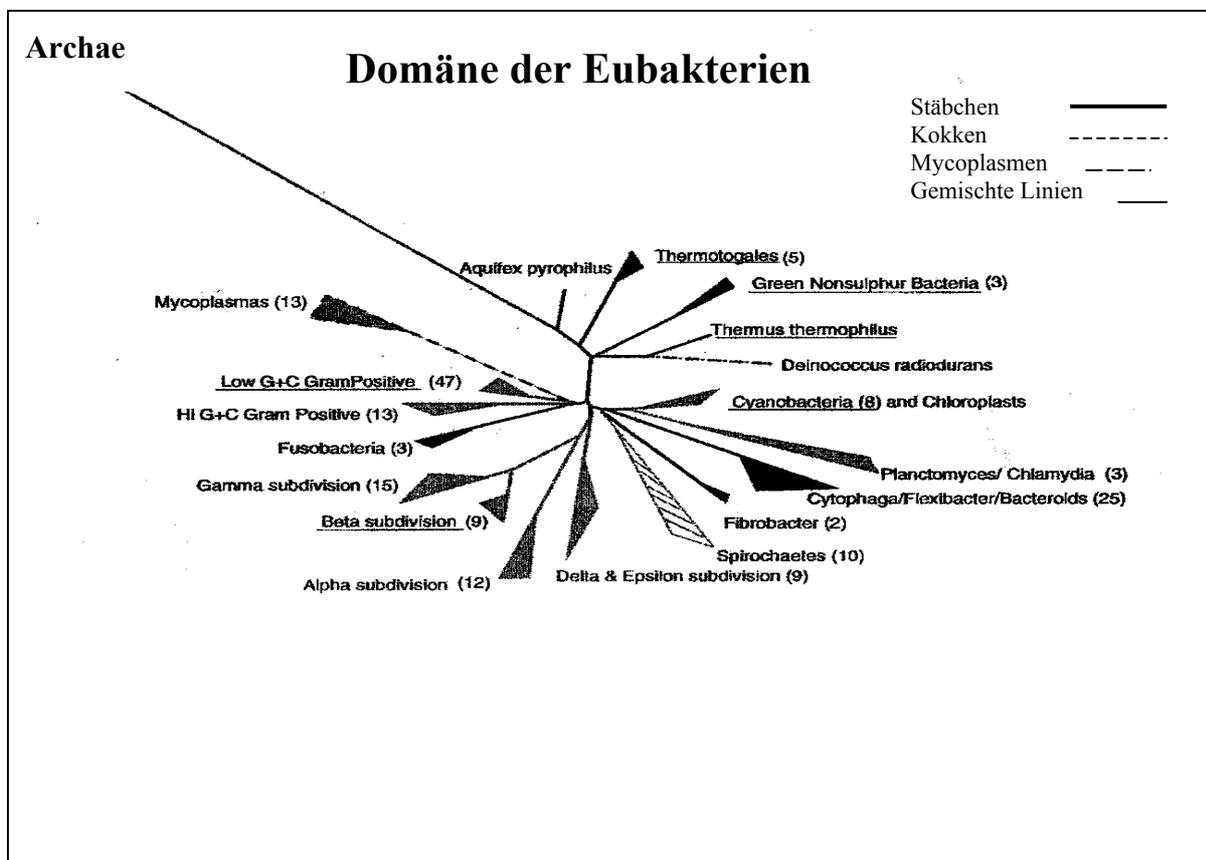


Abb.3: Phylogenetischer Stammbaum der Eubakterien, basierend auf 16S rRNA-Daten (Siefert und Fox, 1998).

Der thermophile Bakterienstamm *Bacillus caldolyticus* wurde 1972 von Heinen und Heinen (1972) gemäß der künstlichen Klassifikation beschrieben. Basierend auf der Fettsäurezusammensetzung wurde der sporenbildende Stamm der Gattung *Bacillus* zugeordnet. Zuvor wurde der Stamm bereits als *Thermus proteolyticus* beschrieben (Lauwers et al., 1970).

Die Zellen verhalten sich Gram-variabel, wobei junge Zellen eine Gram-negative Reaktion zeigen, während ältere Zellen stets variieren. Der Zelldurchmesser beträgt 0,7 µm, die Zellen sind von einer 26 nm dicken doppelschichtigen Zellwand umgeben, gefolgt von einer Cytoplasmamembran. *B. caldolyticus* produziert eine Vielzahl extrazellulärer Enzyme, namentlich Amylasen und Proteasen. Das Temperaturoptimum liegt bei 72°C und das Maximum bei 82°C. Der Stamm wächst in einem weiten pH-Bereich von 6-8, jedoch mit starker Minderung auf beiden Seiten. Ein typisches Merkmal des Bakteriums ist das Vorhandensein einer Vielzahl verzweigtkettiger Fettsäuren im Lipidextrakt des Organismus. Lysozymbehandlung bei 37°C führt zur Bildung von Sphäroplasten. *B. caldolyticus* ist äußerst sensitiv gegenüber Penicillin.

Phylogenetisch wird *B. caldolyticus* in die Gruppe der Gram-positiven Eubakterien mit geringem G+C-Gehalt eingegliedert. Innerhalb derer findet sich der Stamm in der Klasse *Bacilli*, der Ordnung *Bacillales*, der Familie *Bacillaceae* sowie der Gattung *Bacillus*. Aus Abbildung 4 ist die Ordnung der *Bacillales* entsprechend der phylogenetischen Klassifizierung zu entnehmen (Siefert und Fox, 1998). Die Familie der *Bacillaceae* steht im phylogenetischen Stammbaum zwischen den Familien der *Alicyclobacillaceae* und *Sporolactobacillaceae*. In Abbildung 4 ist *B. caldolyticus* zwischen den Arten *Alicyclobacillus spp.* sowie *Sporolactobacillus spp.* einzuordnen.

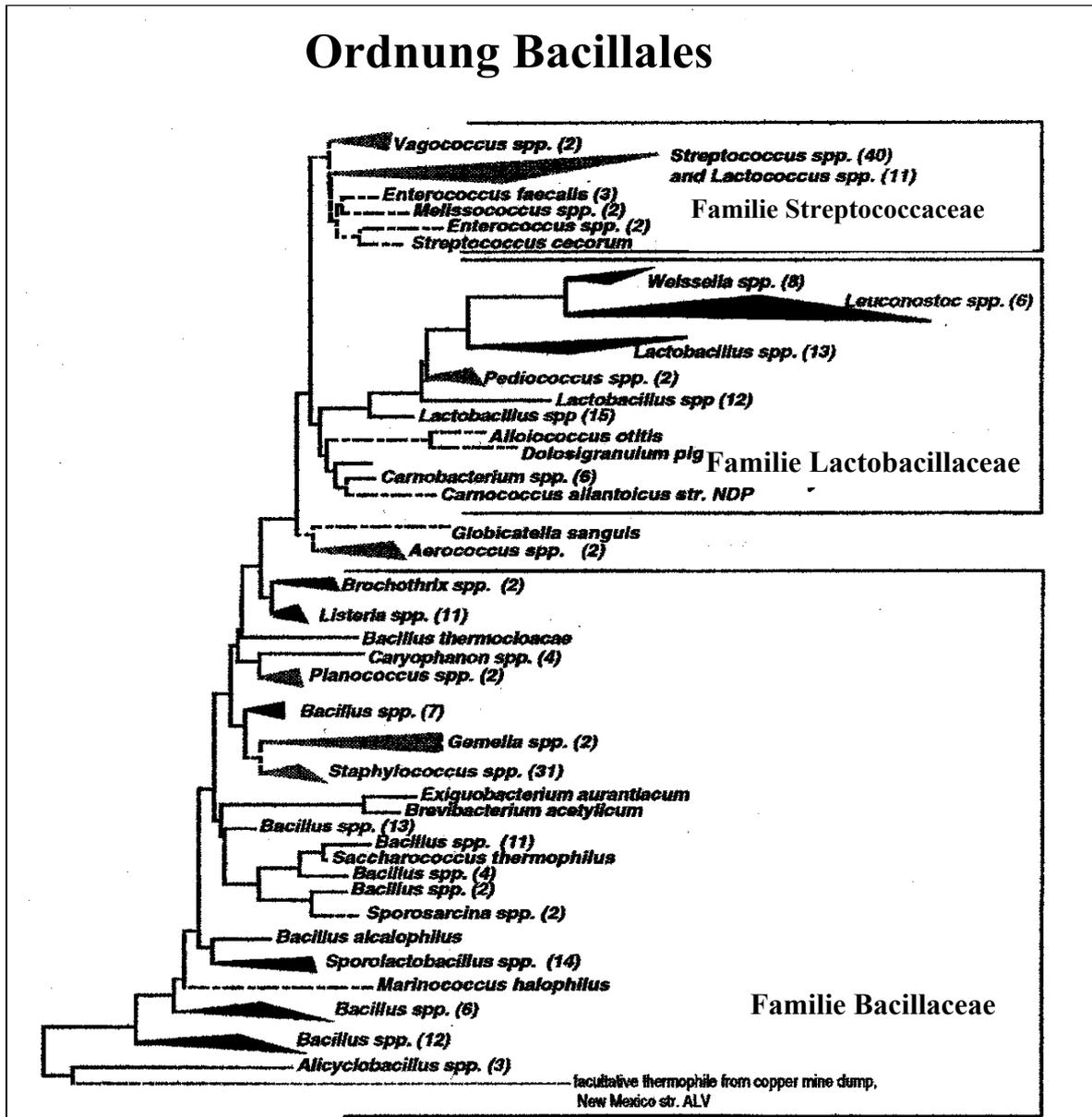


Abb.4: Phylogenetischer Stammbaum der Ordnung der Bacillales. Die in Klammern angegebenen Ziffern bestimmen die Anzahl der eingegliederten Arten (Siefert und Fox, 1998).

1.3 Stabilität thermophiler Enzyme

Extreme Temperaturen führen normalerweise zur Denaturierung von Makromolekülen und auch zum Zerfall niedermolekularer Verbindungen. Die Fähigkeit thermophiler Organismen selbst bei extremsten Temperaturen existieren und wachsen zu können, legt die Schlußfolgerung nahe, daß Thermophile über spezielle Mechanismen verfügen, welche das Überleben in extremer Umgebung garantieren. Thermostabilität erregte somit stets das Interesse nach Klärung des Phänomens auf molekularer Basis.

Folglich wurden alle in Frage kommenden Komponenten, wie Proteine, Nucleinsäuren u.a. Zellbestandteile in vergleichenden Studien mit homologen Komponenten mesophiler Stämme untersucht, und diskutiert. Als mögliche Erklärung für thermische Stabilität können die im Laufe der Zeit erhaltenen und nachfolgend dargestellten Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

Thermophilie steht in einem direkten Zusammenhang mit außerordentlich stabilen Zellmembranen. Der direkte Vergleich der Fettsäurezusammensetzung bei mesophilen und thermophilen Stämmen zeigte, daß thermophile sporenbildende Arten der Gattung *Bacillus* beispielsweise einen höheren Anteil an verzweigt-kettigen und gesättigten iso-Fettsäuren mit generell höheren Schmelzpunkten besitzen. Am Beispiel von *T. aquaticus* wurde die Vorherrschaft von verzweigt-kettigen gesättigten Fettsäuren, allerdings auffallenderweise kürzerer Kettenlängen, bestätigt. Bei diesem Organismus wurden zusätzlich temperaturabhängige Veränderungen (50-75°C) der Fettsäurezusammensetzung zu thermal stabileren Formen beobachtet. Bei höheren Temperaturen war eine deutliche Zunahme der iso-C₁₆- (62,4°C) sowie der normal-C₁₆-Form (63,1°C) mit höheren Schmelzpunkten, und eine Abnahme der anteiso-C₁₇- (38°C) und iso-C₁₇-Form (60,5°C), welche geringere Schmelztemperaturen aufweisen, nachgewiesen worden (Ray et al., 1971).

Ein großes Interesse galt insbesondere dem Auffinden individueller Lipidkomponenten in Zellmembranen thermophiler Organismen. So konnte ein unbekanntes Glycolipid als Hauptlipidkomponente bei *T. thermophilus HB8* bestätigt werden. Die Analyse dieses Glycolipids ergab, daß seine molare Zusammensetzung aus Galactose, Glucose, Glucosamin, Glycerin, Fettsäureestern und Fettsäureamiden im Verhältnis 2:1:1:1:2:1 bestand. Nach Hydrolyse der esterartig bzw. amidartig gebundenen Fettsäuren wurde wiederum die iso-Form (iso-C₁₅ und iso-C₁₇) hauptanteilig nachgewiesen (Oshima und Yamakawa, 1972).

Als weiteres Charakteristikum für Thermophile sind generell hohe G+C-Gehalte in der DNA erwähnenswert. Hohe G+C-Gehalte bedingen erhöhte Schmelztemperaturen der DNA, infolge der größeren Anzahl an vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen. Der G+C-Gehalt der DNA aus *T. thermophilus HB8* wurde im Säurehydrolysat zu 69 mol % bestimmt, während er bei *E. coli* nur 51 mol % beträgt. Da der Gehalt an individuellen Aminosäuren des Gesamtproteins von *T. thermophilus HB8* mit den Werten von *E. coli* im wesentlichen korrespondierte, ist es wahrscheinlich, daß bevorzugt G+C-reiche Codons für die Generierung der Aminosäuren verwendet werden. Ferner zeigten Circular dichroismus-Spektren der DNA, daß thermophile DNA, gemessen in neutraler Lösung und bei RT, nicht in der gewöhnlichen B-Form vorliegt. Die bevorzugte Einnahme einer davon abweichenden Konformation ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die GC-Basenpaare zurückzuführen (Oshima und Imahori, 1974).

Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität von Ribosomen und tRNA ergaben, daß die Schmelztemperatur der Ribosomen aus *T. thermophilus HB8* um 15°C höher lagen (86°C) als bei *E. coli* (71°C). Ähnliche Ergebnisse ließen sich mit entsprechenden Experimenten der tRNA erzielen. Auch hier unterschied sich die Schmelztemperatur der thermophilen tRNA (87,5°C) von der der mesophilen tRNA aus *E. coli* (78,5°C). Auch diese Ergebnisse weisen auf eine positive Korrelation zwischen maximalen Wachstumstemperaturen und Schmelztemperaturen hin, welche wiederum auf hohe

G+C-Gehalte in den entsprechenden Nucleinsäuren zurückzuführen sind (Oshima und Imahori, 1971).

Hinsichtlich der Proteine schienen die Unterschiede bei thermophilen und mesophilen Vertretern auf den ersten Blick eher unwesentlich. Schließlich zeigte sich jedoch, daß diesen geringen Veränderungen sehr große Bedeutung zukommt. Vergleiche der Aminosäurezusammensetzungen bei *T. thermophilus* HB8 und *E. coli* ergaben geringe Zunahmen der Aminosäuren Alanin und Prolin, sowie geringfügige Verminderungen von Asparaginsäure und Isoleucin in thermophilem Gesamtprotein (Oshima und Imahori, 1974). Spätere Untersuchungen deuteten darauf hin, daß höhere Gehalte an Alanin und Prolin eine dichtere Packung der Proteinstruktur im hydrophoben Inneren ermöglicht. Zusätzlich könnten sie zur Stabilisierung von Loops beitragen. Hingegen bewirken am C β -Atom verzweigte Aminosäuren wie z.B. Isoleucin, Valin und Threonin starke konformationelle Einschränkungen, so daß sie in thermophilen Proteinen weniger häufig anzutreffen sind (Bruins et al., 2001).

Somit führen Substitutionen einzelner Aminosäuren in der Regel nicht zu einer Änderung der Struktur, sondern zur Änderung hydrophober Interaktionen oder Wasserstoffbrückenbildung, was der Stabilisierung bzw. Destabilisierung der Proteine dient. Durch einen Vergleich von Wildtyp-Lysozym mit jenem einer thermosensitiven Mutante des T4-Phagen berichteten Grütter et al. (1979), daß Arginin 96 im Wildtyp-Lysozym durch Histidin in der Mutante ersetzt war. Die 3D-Struktur der thermosensitiven Mutante unterschied sich bis auf diesen Austausch nicht. Somit lag die Annahme nahe, daß die Substitution des Arginins durch ein Imidazol an dieser Position den hydrophoben Kern destabilisiert, was zur Thermosensitivierung auf molekularer Basis beitrug (Grütter et al., 1979). Ähnliches wurde bei Mutanten von *E. coli* beobachtet, welche Aminosäuresubstitutionen in einer Position der α -Untereinheit der Tryptophansynthetase, gegenüber dem Wildtyp, aufwiesen. Auch hier bestand ein Zusammenhang zwischen Stabilität des Proteins und hydrophoben Bereichen in bestimmten Positionen (Yutani et al., 1977).

So machen nachweislich hydrophobe Wechselwirkungen den Hauptanteil der stabilisierenden Kräfte bei Proteinen aus, was allerdings nicht ausschließt, daß noch andere Kräfte die Stabilität erhöhen können. Am Beispiel der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* wurde nachgewiesen, daß die größere Hitzestabilität des thermophilen Enzyms die Folge von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den vier Untereinheiten ist, welche im mesophilen Enzym fehlen. Dies bedeutet, daß die Energie ein paar weniger Ionenbindungen ausreichen, um ein thermostabiles Enzym vor Denaturierung und Hitze zu schützen (Perutz, 1978).

Zusätzlich begünstigen hitzestabile Chaperone die produktive Zurückfaltung eines großen Proteinspektrums, da die spontane Rückfaltung bei erhöhten Temperaturen fehlt. Das aus *T. thermophilus* HB8 isolierte Chaperon besteht aus zwei Arten von Proteinen, einer 58 kDa- und einer 10 kDa-Komponente. Diese beiden Komponenten entsprechen der cpn60- und cpn10-Komponente des *E. coli*-Chaperons. Es wird angenommen, daß eine große Anzahl von Kopien dieser beiden Komponenten in Chaperonen der Thermophilen vorliegen. Die beiden Chaperonkomponenten binden miteinander und formieren einen binären Komplex in Anwesenheit von ATP. Vermutlich ist auch die Stabilität dieses binären Komplexes bei *T. thermophilus* HB8 fester als bei Chaperonen anderer Herkunft. Entsprechend dieser Beobachtungen unterscheidet sich die molekulare Gestalt des Chaperons von *Thermus* von der cpn60-Familie. Dies wurde zusätzlich durch elektronenmikroskopische Bilder bestätigt. Ferner zeigt das Chaperon von *Thermus* keine Aktivität bei Temperaturen unter 50°C (Taguchi et al., 1991).

Als abschließendes Argument für Thermostabilität sollte erwähnt werden, daß bei thermophilen Organismen die Resynthese denaturierbarer Proteine und Nucleinsäuren insgesamt, im Vergleich zu mesophilen Organismen, höher ist (Brock, 1967).

1.4 Anwendungen thermophiler Enzyme

Thermophile Enzyme sind eine Quelle neuer Katalysatoren, welche von großem industriellen Interesse sind. Die Gründe dafür liegen in ihrer außerordentlichen Stabilität gegenüber extremen Bedingungen wie erhöhten Temperaturen, pH, Druck und organischen Lösungsmitteln. Die Vorzüge resistenter thermophiler Proteasen gegenüber alkalischen Substanzen wurden schon 1963 in Europa erkannt, und so wurden sie als Additive für Haushaltswaschmittel kommerziell eingesetzt. Mischungen aus Proteasen und Amylasen fanden als Mundwäsche gegen Zahnbeläge schon Ende der 60er Jahre Anwendung (Herbert und Codd, 1986). Die Produktion bei erhöhten Temperaturen versprach kostengünstiger zu sein, da Viskositäten reduziert, Produktionsraten, infolge besserer Löslichkeiten von Substraten erhöht, Kontaminationen unterdrückt, und auf Kühlungsvorgänge gänzlich verzichtet werden konnte (Bruins, 2001). So finden eine Vielzahl thermophiler Enzyme sowohl innerhalb eines breiten Spektrums von Industrieanwendungen, als auch auf medizinischen und analytischen Gebieten alltägliche Anwendung. Im folgenden sollen die Einsatzmöglichkeiten der gängigsten Enzymgruppen etwas detaillierter beschrieben werden.

In Anbetracht der immer mehr zur Neige gehenden fossilen Energieresourcen trat die alternative Gewinnung von Heiz- und Brennstoffmaterialien aus Biomasse, wie z.B. polymere Verbindungen, im Laufe des 20. Jahrhunderts immer stärker in den Vordergrund. Die Hydrolyse von Cellulose liefert monomere Zuckereinheiten, die D-Glucose. In einem gesonderten Fermentierungsprozeß kann die Gewinnung von Ethanol durch Zusatz von *Saccharomyces cerevisiae* nach Destillation im technischen Maßstab erfolgen. Mit Hilfe einer speziellen enzymatischen Behandlung der Cellulose bei erhöhten Temperaturen erübrigt sich ein Zusatz größerer Mengen konzentrierter Schwefelsäure, welche zur Totalhydrolyse des Polymers nötig wären. Die in Frage kommenden Stämme für die Produktion cellulolytischer Enzyme gehören hauptsächlich der Gattung *Clostridium* an. Die Verwendung dieser Stämme begünstigt

zusätzlich einen direkt anschließenden Fermentierungsprozeß bei erhöhten Temperaturen, so daß sich der Zusatz von *S. cerevisiae* erübrigt. Cellulose wird somit kontinuierlich zu Ethanol umgesetzt.

Mit demselben Ziel erfolgt die Verwertung von Stärke, welche aus zwei Komponenten, der Amylose und dem Amylopektin, besteht. Baustein beider polymerer Verbindungen ist auch D-Glucose. Amylose besteht aus Glucoseeinheiten, welche 1,4-glycosidisch verknüpft sind. Amylopektin ist gleichfalls aus Hauptketten von 1,4 verknüpften Glucoseeinheiten aufgebaut. Zusätzlich sind Seitenketten 1,6-glycosidisch mit der Hauptkette verbunden. Infolge der hohen Spezifität der Katalysatoren sind zahlreiche Enzyme an der Stärkeumwandlung beteiligt, wie beispielsweise α -Amylase, Glucoamylase (α -Glycosidase), Pullulanase, Cyclodextrin-Glycosyltransferase, Xyloseisomerase u.a.. Als erstem Schritt wird unlösliches Stärkegranulat bei erhöhten Temperaturen vorgequollen. Der Einsatz thermophiler Enzyme begünstigt somit auch bei diesem Produktionsprozeß einen kontinuierlichen Verlauf, ohne Kühlungsaufwand. α -Amylase hydrolysiert α -1,4 glycosidische Bindungen in Amylose und Amylopektin. Abbauprodukte sind Maltose, Isomaltose und Glucose. Zur Gewinnung thermophiler Amylasen eignen sich bevorzugt Stämme der Gattung *Bacillus*, Actinomyceten und Pilze. Die Hydrolyse der 1,6-glycosidischen Bindungen erfolgt mit Hilfe der Pullulanase und in schwächerem Maße mit der Glucoamylase. Die thermophilen Enzyme werden aus *B. stearothermophilus* und *Thermoactinomyces* gewonnen (Bruins, 2001).

Als weiterer wichtiger Heiz- und Brennstoff wäre das Methan zu nennen, dessen Forschung aus diesem Grunde vorangetrieben wird. So ergaben vergleichende Studien mesophiler und thermophiler Methanproduzenten, daß thermophile Prozesse die im Anschluß angeführten Vorteile zeigten. Die Umsatzrate von organischen Abfällen zu Methan wurde gesteigert, Viskositäten gesenkt sowie bakterielle und virale Akkumulationen von Pathogenen gehemmt.

Analytische und molekularbiologische Anwendungen, wie z.B. automatisierte und thermisch-abhängige Reaktionszyklen der PCR-Reaktion, machten thermostabile Enzyme unentbehrlich. So wurde die bis heute verwendete thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* gewonnen. Für reverse Transkription, und damit zur Synthese für c-DNA, konnte eine weitere DNA-Polymerase aus *T. thermophilus HB8* isoliert werden. Ferner wurden thermophile Ligasen aus *T. thermophilus HB8* gewonnen.

Neben den schon eingangs erwähnten industriellen Anwendungen von thermophilen Proteasen in Waschmitteln sind gerade Proteasen auf zahlreichen anderen Gebieten, sowohl bei Industrie als auch in der Analytik, von Bedeutung. So werden Proteasen als Alternative zu chemischen Substanzen bei der Lederindustrie erfolgreich zur Oberflächenbehandlung von Häuten eingebracht. Entscheidend für das Quellen der Häute und Felle sind Alkalibehandlungen, was alkalophile Proteasen unabdingbar macht. Ferner finden Proteasen bei der milchverarbeitenden Industrie hauptsächlich zur Käseherstellung Anwendung. Hierbei wird lösliches Casein infolge proteolytischer Spaltung mit Hilfe des Chymosins unlöslich, was zur Gerinnung der Milch führt. Als weitere Beispiele für Proteaseanwendungen bei der Nahrungsmittelindustrie wären die Proteolyse von Gluten des Weizenmehls, zur Modifikation des Teiges, sowie die proteolytische Hydrolyse von Sojabohnenproteinen zu nennen (Rao et al., 1998).

1.5 Proteolytische Enzyme

Proteasen repräsentieren eine der größten Gruppen industrieller Enzyme. Wie aus Abbildung 5 zu ersehen ist, machen sie, neben Amylasen, Lipasen und anderen Enzymen, rund 60 % der weltweit verkauften Enzyme aus. Infolge ihrer hochspezifischen Katalyse, der Hydrolyse gezielter Peptidbindungen finden sie zahlreiche Anwendungen (1.4) bei der Industrie. Darüber hinaus zeigen sie unter geeigneten Bedingungen synthetische Fähigkeiten. Mehr als 50 % der industriell

wichtigen Enzyme werden heute mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen produziert.

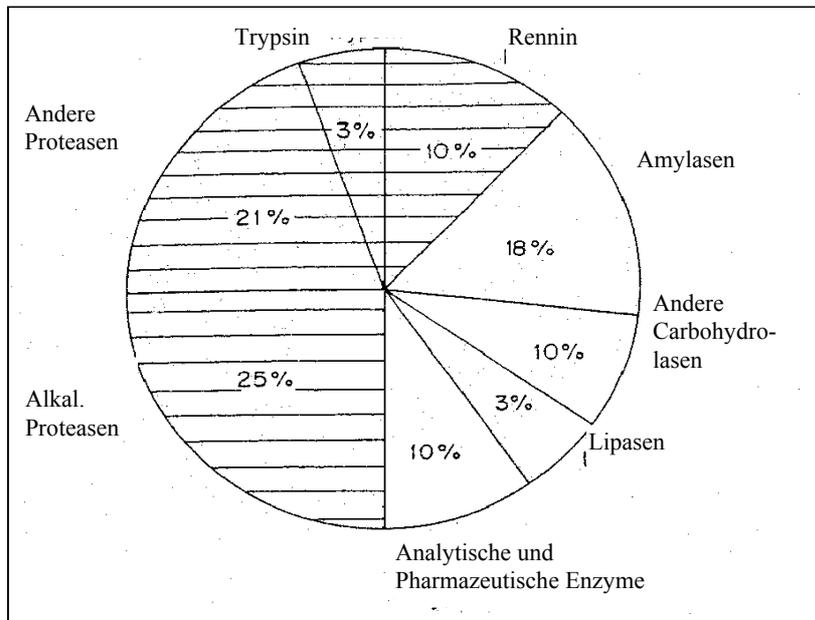


Abb.5: Übersicht, der weltweit verkauften Enzyme. Die schraffierte Fläche entspricht dem prozentuellen Proteaseanteil der weltweit verkauften Enzyme (Rao et al., 1998).

Jedoch sind die vielfältigen Funktionen der Proteasen in der Zelle und allen Formen lebender Organismen nicht gering zu schätzen. So katalysieren z.B. extrazelluläre Proteasen von Mikroorganismen und Verdauungsenzyme bei Säugern generell die Hydrolyse größerer Proteine in kleinere Proteine bzw. Peptide außerhalb der Zelle. Dies garantiert die erfolgreiche Aufnahme dieser Grundbausteine in die Zelle einerseits, bzw. die gezielt kontrollierte extrazelluläre Aktivierung des Zymogens andererseits. Ferner existieren Proteasen extrazellulär im Blutplasma als Bestandteile des Blutgerinnungssystems. Die Aktivierung dieser Gerinnungsfaktoren führt in einer kaskadenförmigen Reaktionsfolge zur Fibrinbildung. Intrazelluläre Proteasen üben hingegen regulatorische und metabolische Funktionen in der Zelle aus. So ist der gesamte intrazelluläre Protein-„Turnover“ auf die Zusammenwirkung verschiedener

proteolytischer Enzyme zurückzuführen, welche Proteine gemeinsam vollständig hydrolysieren und Vorstufen für anabole Prozesse zur Verfügung stellen. (Rao et al., 1998). Membrangebundene Signalpeptidasen hingegen sind wesentlich am Export von Proteinvorstufen aus dem Cytoplasma beteiligt. Ihre Aufgabe besteht darin, exportierte Proteine auf der extracytoplasmatischen Seite, unter Abtrennung der hydrophoben Region des Signalpeptids, von der Membran zu lösen (Dalbey et al., 1997).

Entsprechend der Nomenklatur des Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology werden Proteasen der 3. Hauptklasse der Enzyme, den Hydrolasen, zugeordnet. Nach weiterer Differenzierung der Hydrolasen erfolgt ihre Zuteilung zur 4. Unterklasse, den proteolytischen Enzymen. Innerhalb der Proteasen werden 2 Hauptgruppen, Exo- und Endopeptidasen, nach Kriterien der Lokalisation ihres Angriffes an der Peptidkette, unterschieden. Während Exopeptidasen ausschließlich am endständigen Amino- oder Carboxyterminus angreifen, hydrolysieren Endopeptidasen bevorzugt im Inneren des Proteinmoleküls. Zusätzlich sind Endopeptidasen befähigt, niedermolekulare Peptide, synthetische Aminosäureester und Amide endständig zu spalten. Gemäß ihrer funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum differenziert die internationale Enzymnomenklatur innerhalb der beiden Hauptgruppen 4 Untergruppen als Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen. Basierend auf ihren Aminosäuresequenzen und evolutionären Verwandtschaften werden die Untergruppen erneut in Familien, und diese ihrerseits entsprechend ihrer Aktivität in Gruppen klassifiziert (Rao et al., 1998).

1.6 Aufgabenstellung

Mikroorganismen eignen sich aufgrund ihrer hohen Teilungsraten und einfachen Kultivierung, sowie ihrer Zugänglichkeit für genetische Manipulation besonders für die Gewinnung von Enzymen. Die Nutzung der großen Verschiedenheit thermophiler Proteasen und ihrer damit verbundenen Spezifitäten verspricht charakteristische Einsatzmöglichkeiten, sowohl für zahlreiche industrielle Anwendungen, als auch im Bereich der Grundlagenforschung. Auch auf diesem Sektor wird ihre Selektivität bzgl. der Hydrolyse von Peptidbindungen bei erhöhten Temperaturen gezielt für Anwendungen wie z.B. der Sequenzierung, zur Erfassung von Primärstrukturen etc. herangezogen. Darüber hinaus ist über ihre detaillierten regulatorischen und metabolisierenden Aufgaben im Ausgangsorganismus selbst noch relativ wenig bekannt. All dies spräche prinzipiell dafür, möglichst viele Enzyme und damit zusammenhängende Informationen zu sammeln.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, thermophile stabile Proteasen aus thermophilen Bakterienstämmen zu isolieren und zu charakterisieren. Die Reindarstellung der Enzyme sollte mit den gängigen, und zur Verfügung stehenden chromatographischen Methoden erfolgen. Im besonderen waren hierfür zwei Bakterienstämme vorgesehen, *T. thermophilus HB8* und *B. caldolyticus*.

Unter Berücksichtigung früherer Studien bzgl. der außerordentlich aktiven Segregation thermophiler Enzyme durch *B. caldolyticus* war das Augenmerk der Untersuchungen dieses Stamms bevorzugt auf die Isolierung neuer extrazellulärer Proteasen gerichtet. Ganz im Gegensatz dazu stand die Entdeckung neuer intrazellulärer Proteasen aus *T. thermophilus HB8* im Vordergrund, da sehr wenige proteolytisch aktive Enzyme aus diesem Organismus überhaupt beschrieben sind.

So wurde in dieser Arbeit unter 3.1 die Kultivierung des Bakterienstamms *T. thermophilus HB8* dargestellt. Die Entwicklung eines Reinigungsverfahrens für

intrazelluläre thermophile Proteasen ist in 3.2 beschrieben und dokumentiert. Im Anschluß daran erfolgte zur näheren Charakterisierung die Festlegung der Substratspezifität einer gereinigten intrazellulären Protease aus diesem Stamm unter Verwendung zahlreicher synthetischer Substrate (3.3). Eine vorläufige Abschätzung der molaren Masse dieses Enzyms wurde mit verschiedenen Methoden vorgenommen, und in 3.4 dargestellt. Es folgten Untersuchungen zur Primärstruktur der isolierten Protease (3.5) sowie die Isolierung der genomischen DNA aus *T. thermophilus* HB8 (3.6) im Hinblick auf eine spätere Synthese von Oligonucleotiden zur Auffindung des Gens, welches für die Protease codiert. Ferner werden in 3.7 kinetische Untersuchungen der intrazellulären Protease dazu herangezogen, um maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeiten im gegebenen Testsystem erzielen zu können. Entsprechend wurde die Zellkultivierung des Bakterienstamms *B. caldolyticus* separat in 3.8 dargestellt, gefolgt von der Darstellung geeigneter Reinigungsverfahren für extrazelluläre Proteasen (3.9). In den letzten Teilen dieser Arbeit wurden ein Immunisierungsverfahren mit Antigen aus *B. caldolyticus* (3.10), die anschließend vorgenommene Antikörperreinigung (3.11) und die Immunoreinigung mit Hilfe der Immunoaffinitätschromatographie vorgestellt (3.12).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche Gelmaterialien wie CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Sephadex G-25, Sepharose CL-6B, Phenylsepharose CL-4B als auch die Fertigsäule Superdex 200 HiLoad 16/60 wurden von Amersham Biotech AB (Uppsala, Schweden) bezogen.

Die synthetischen Peptide Alanyl-alanyl-phenylalanin-7-amino-4-methyl-cumarin sowie Glutaryl-phenylalanin-7-amino-4-methyl-cumarin waren bei Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg, Deutschland) verfügbar.

Der NEO-10 kDa Proteinstandard, bestehend aus 12 Banden, war von der Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland).

ICN-Biomedicals GmbH (Eschwege, Deutschland) lieferte die Bestandteile der Medien wie Hefeextrakt und Nutrient broth als auch Dimethylsuberimidat-dihydrochlorid und Hämoglobin.

Das Pentapeptid Glutamyl-glycyl-tyrosyl-alanyl-lysin wurde freundlicherweise von Dr. Kalbacher (Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Die 10 kDa Protein-Leiter, bestehend aus 13 Banden, stammte von Life-Technologies GmbH (Eggenstein, Deutschland).

Acetonitril, Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumsulfat, Diethylether, di-Kaliumhydrogenphosphat, Eisessig, Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Formaldehyd, Kaliumnatriumtartrat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kochsalz, Natriumacetat-Trihydrat,

Natriumbisulfit, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxidplätzchen, Natriumthiosulfat-Pentahydrat, Perjodsäure, ortho-Phosphorsäure, RNase aus Rinderpankreas, Salzsäure, Schiffs Reagenz, Silbernitrat, Trichloressigsäure, Trifluoressigsäure, L-Tyrosin, Wasserstoffperoxid wurden von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) waren die Enzyme wie Chymotrypsin A₄ aus Rinderpankreas, Fumarase aus Schweineherz, Katalase aus Rinderleber und Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz, ferner Dithiothreitol, Natriumpyruvat und Nicotinamid-adenin-dinucleotid.

Acrylamid, Agarose, 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluoridhydrochlorid, Roti-Phenol/Chloroform, Ethylendiamintetraessigsäure, Glycin, Harnstoff, Methanol, N,N'-Methylenbisacrylamid, Saccharose und Trypton waren von der Firma Roth GmbH + Co (Karlsruhe, Deutschland).

Von Serva Feinbiochemica GmbH + Co (Heidelberg, Deutschland) wurden N α -Benzoyl-arginin-ethylesterhydrochlorid, N α -Benzoyl-L-tyrosin-ethylester, Bromphenolblau, Coomassie Brilliantblau G 250, Coomassie Brilliantblau R 250, Lysozym, β -Mercaptoethanol, Natriumlaurylsulfat, Ovalbumin und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin bezogen.

Bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) waren nachfolgend genannte Chemikalien und Materialien erhältlich. N-[3-(2-Furyl)-acryloyl]-glycyl-L-leucinamid, N α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid, α -Amylase, Chininsulfat-Dihydrat, DEAE Sephadex A-25, Dextranblau aus *Leuconostoc ssp.*, 3,5-Dinitrosalicylsäure, Ethanol, Freundesches Adjuvans, Hydroxylaminhydrochlorid, Methylaminhydrochlorid, Poly-(vinylidendifluorid)-Membranen, Proteinase K aus *Tritirachium*, Streptomycin-sulfat, N-Succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanin-p-nitroanilid, N-Succinyl-phenyl-alanin-p-nitroanilid, Triethanolamin, Tris(hydroxymethyl)aminomethan und Triton X-100.

Die HPLC-Fertigsäule TSK G 3000 SW war bei der Toyo Soda Manufacturing Co. (Tokio, Japan) erhältlich.

DE52-Cellulose wurde von Whatman (Maidstone, England) bezogen.

2.1.2 Bakterienstämme

Der Bakterienstamm *Thermus thermophilus* HB8, ursprünglich am 23. September 1968 aus einer heißen Quelle in Mine, in der Shizuoka Präfektur in Japan isoliert, (Oshima and Imahori, 1974; Degryse et al., 1978) wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) unter der Bezeichnung DSM 579 bezogen.

Bacillus caldolyticus, früher als *Thermus proteolyticus* (Lauwers et al., 1970) bezeichnet, stammte gleichfalls von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Der Bakterienstamm wurde als *Bacillus* sp. unter der Bezeichnung DSM 405 bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung und Stammhaltung der Bakterienstämme

Als Kulturmedium für *T. thermophilus* HB8 wurde ein komplexes Flüssigmedium, bestehend aus 0,4 % Trypton, 0,4 % Hefeextrakt und 0,2 % Kochsalz eingesetzt. Zur Kultivierung der beimpften Medien wurden Schikanekolben in einem thermostatisierbaren Wasserbad–Rundschüttler Typ Aquatron der Firma Infors AG, (Bottmingen, Schweiz) kontinuierlich bei 150 U/min und 70°C inkubiert. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte in einer Zentrifuge des Typs J 21C der Firma

Beckman (München, Deutschland) unter Verwendung des Rotors JA-14 mit 6000 U/min bei 4°C und über einen Zeitraum von 25 Minuten.

Das Kulturmedium für *B. caldolyticus* bestand aus 0,8 % Nutrient broth pH 7,0. Die Kulturen wurden mit 90 U/min im Wasserbad-Rundschüttler inkubiert. Die Zellen von *B. caldolyticus* wurden vom Medium durch Zentrifugation über einen Zeitraum von 25 Minuten unter Verwendung des Rotors JA-14 mit 6000 U/min, bei 4°C abgetrennt. Das Abzentrifugieren der Zellen von *T. thermophilus HB8* sowie *B. caldolyticus*, welche für Stammkulturen vorgesehen waren, erfolgte in einer Tischzentrifuge Universal der Firma Hettich (Tuttlingen, Deutschland) unter sterilen Bedingungen (3.1.2).

2.2.2 Zellaufschluß

Der Aufschluß von 20 g Bakterienzellen des Stammes *T. thermophilus HB8* wurde mit Hilfe des Ultraschallgerätes der Branson Sonic Power Company Modell Sonifier B-12 (Carouge-Genève, Schweiz) vorgenommen. Die Zellaufschlußlösung war mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 3 % Triton X-100 (w/v) im Verhältnis 1:2 versetzt (3.2.1). Die Zentrifugation des Rohextrakts erfolgte für 25 Minuten bei 4°C mit der Zentrifuge Sorvall RC-5 von Du Pont Instruments (Bad Nauheim, Deutschland).

2.2.3 Fällung mit Streptomycinsulfat

Der Zusatz des polykationischen Antibiotikums Streptomycinsulfat führt in Konzentrationen von 2–10 mmol/l zur Präzipitation von Nucleinsäuren. Hierzu wurde eine Streptomycinsulfatlösung so vorbereitet, daß nach tropfenweiser Zugabe zum Enzymrohextrakt eine Konzentration von 3,4 mmol/l gegeben war. 250 mg Streptomycinsulfat wurden in 13 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gelöst, mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, und langsam zu 37 ml Rohextrakt tropfenweise, unter Rühren, bei RT zugegeben. Die Abtrennung des Präzipitats

erfolgte mit Hilfe der Zentrifugation bei 4°C und 5000 U/min mit dem Rotor SS-34 für 30 Minuten. Das Präzipitat wurde verworfen und mit dem Überstand weitergearbeitet. Der Überstand von 47 ml wurde an einer PM 30-Membran (2.2.6.1) auf 17 ml eingeeengt.

2.2.4 Chromatographische Methoden

2.2.4.1 Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose

Im Anschluß an die Streptomycinsulfatfällung erfolgte eine Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose. Es wurde eine Kunststoffsäule der Maße 25*2,1 cm verwendet. Das Gelmaterial wurde mit mehreren Gelbettvolumina an 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,5 % Triton X-100 (w/v) äquilibriumiert. Der Überstand der Streptomycinsulfatfällung (2.2.3) wurde auf das Säulenmaterial aufgetragen und ohne zu Spülen die Elution mit 192 ml eines 0–0,5 M NaCl-Gradienten (jeweils 100 g Einwaage der jeweiligen Lösung) in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,5 % Triton X-100, mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min und bei 4°C, vorgenommen. Zur Einstellung einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min wurde eine Schlauchpumpe Gilson, Minipuls 2 von Abimed (Düsseldorf, Deutschland) eingesetzt. Die vollständige Elution erfolgte durch Nachspülen mit 0,5 M NaCl in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,5 % Triton X-100. Gesammelt wurden Fraktionen zu 4 ml bei 4°C mit einem Fraktionssammler LKB 2211 SuperRac von LKB (Bromma, Schweden). Die spektroskopische UV-Absorptionsmessung bei 280 nm wurde an einem UV-VIS-Spektralphotometer, DU 7400 der Firma Beckman (München, Deutschland) vorgenommen. Proteolytische Enzymaktivitäten ließen sich nach der in 2.2.9.1 beschriebenen Anson-Hämoglobin-Methode gleichfalls spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmen. Die Konzentrierung von 23,5 ml der vereinigten Enzymfraktion 1 auf ein Volumen von 1,7 ml erfolgte an PM 30 (2.2.6.1).

2.2.4.2 Gelchromatographie an Sepharose CL-6B

Für die Gelchromatographie an Sepharose CL-6B wurde eine Kunststoffsäule der Maße 62*2,1 cm verwendet. Die Äquilibrierung des Säulenmaterials erfolgte mit mehreren Gelbettvolumina an 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,1 % Triton X-100. Es wurden 1,7 ml der konzentrierten Enzymfraktion 1 mit einem Gesamtproteingehalt von 70,7 mg auf das Säulenmaterial aufgetragen (2.2.4.1). Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 1 ml/min bei 4°C eingestellt. Als mobile Phase wurde 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,1 % Triton X-100 gewählt. Nach Sammlung von 80 Fraktionen zu 2,5 ml wurde die Absorption bei 280 nm spektroskopisch bestimmt. Die proteolytische Enzymaktivität wurde nach der in 2.2.9.1 beschriebenen Anson-Hämoglobin-Methode ermittelt.

2.2.4.3 Gelchromatographie an TSK G 3000 SW

Das für das HPLC-System vorgesehene Säulenmaterial TSK G 3000 SW (Henschen et al., 1985) wurde mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gespült. Nach der Äquilibrierung wurden 500 µl der zuvor im Verhältnis 1:200 verdünnten Enzymfraktion der Gelchromatographie an Sepharose CL-6B injiziert. Nach Injektion der Probe wurde mit einer Flußrate von 1 ml pro Minute eluiert und Banden entsprechend der Absorptionzunahme bei 280 nm separat gesammelt. Proteolytische Aktivitäten wurden gemäß 2.2.9.1 nach der Anson-Hämoglobin-Methode bestimmt. Über einen geräteinternen UV-Detektor erfolgte die Aufzeichnung der Absorption bei 280 nm.

2.2.4.4 Gelchromatographie an Sephadex G-25

Für einen Denaturierungsansatz wurden 500 µl, der mit Hilfe der Ultrafiltration eingengten Enzymfraktion nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B, eines Proteingehalts von 3,2 mg, mit 1,4 ml 8 M Harnstoff, 50 µl β-Mercaptoethanol und

2 Tropfen 5 % Methylaminhydrochlorid gemischt. Der Versuchsansatz verblieb für 4–5 Stunden bei Raumtemperatur und wurde im Anschluß daran mit Eisessig auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt. Die Abtrennung von Harnstoff und β -Mercaptoethanol, sowie die weitere Abtrennung von Fremdprotein erfolgten an einer mit Sephadex G-25 gefüllten Kunststoffsäule der Maße 59*2,1 cm, welche zuvor mit 2–3 Gelbettvolumina 0,1 M Essigsäure pH 3,5 gewaschen wurde. Als mobile Phase wurde gleichfalls 0,1 M Essigsäure pH 3,5 eingesetzt. Nach Sammeln von Fraktionen zu 1,5 ml bei 4°C und einer Flußrate zu 1 ml/min wurde der pH-Wert mit Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Die Reagenzgläser wurden in geöffnetem Zustand, unter Zutritt von Luftsauerstoff bei Raumtemperatur für mindestens 20 Stunden stehen gelassen. Die Absorption bei 280 nm sowie die proteolytische Enzymaktivität (2.2.9.1) wurden spektroskopisch bestimmt.

2.2.4.5 Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25

Die Abtrennung der Zellen von *B. caldolyticus* aus 5 Litern Kulturmedium erfolgte durch Zentrifugation, unter Verwendung des Rotors JA-14 bei 6000 U/min und 4°C. Im Anschluß daran wurden 1470 ml des enzymhaltigen Mediums auf eine Anionenaustauschchromatographie-Säule des Typs DEAE Sephadex A-25 gegeben, welche zuvor mit mehreren Gelbettvolumina an 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 äquilibriert wurde. Die Elution der Proteine erfolgte mit 198 ml (Einwaage) eines 0–0,5 M Natriumchlorid-Gradienten in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, wobei nach Beendigung des Gradienten mit 0,5 M NaCl in 10 mM Kaliumphosphat nachgespült wurde. Die Säulenmaße betragen 60*2,1 cm. Gesammelt wurden 94 Fraktionen zu 3 ml. Die Absorption bei 280 nm wurde spektroskopisch gemessen, und proteolytische Aktivitäten nach Anson (2.2.9.1) bei 750 nm bestimmt.

2.2.4.6 Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60

1 ml des Konzentrats der angereicherten Enzymfraktion 3, isoliert nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 mit einem Proteingehalt von 1,3 mg, wurden mit einer HiLoad 16/60 Superdex prep grade-Säule an einer Äkta-Anlage von Amersham Biotech AB (Uppsala, Schweden) weiter aufgetrennt. Als mobile Phase wurde 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 verwendet. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Über einen mit dem Äkta-Gerät verbundenen Fraktionssammler wurden 100 Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Die Absorption bei 280 nm wurde mit einem UV-VIS-Spektralphotometer gemessen, und die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach der Anson-Hämoglobin-Methode (2.2.9.1).

2.2.5 Ultrazentrifugation

2.2.5.1 Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Für die präparative Ultrazentrifugation wurde ein 5-20%iger Saccharose-Dichtegradient vorbereitet. Hierfür wurden 2,4 ml einer 5%igen Saccharoselösung und 2,4 ml einer 20%igen Saccharoselösung beide in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, in einem Gradientenmischer, welcher über eine Schlauchpumpe mit einem Zentrifugenröhrchen verbunden war, so geschichtet, daß die Konzentration vom Zentrifugenröhrchenboden zum Zentrifugenröhrchenrand linear abnahm. Es folgte die Auftragung von 130 µl der enzymhaltigen Probe, erhalten nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B, mit einem Proteingehalt von 190 µg, auf den Gradienten. Im Anschluß daran wurde über einen Zeitraum von 195 Minuten bei 50000 U/min und 4°C zentrifugiert. Zur Stabilisierung des Saccharose-Dichtegradienten kam der Ausschwingrotor SW-65 von Beckman (München, Deutschland) zum Einsatz. Die Ultrazentrifuge Typ L5-65 stammte gleichfalls von Beckman. Die Fraktionierung des Gradienten gelang, indem das Zentrifugenröhrchen mit einer Kappe verschlossen, und eine Kapillare bis zum Boden des Röhrchens geführt wurde. Somit konnte der

Gradient mit abnehmender Dichte über eine Schlauchpumpe aus dem Röhrchen entnommen werden. Gesammelt wurden 30 Fraktionen zu jeweils 130 µl.

2.2.6 Proteinkonzentrierung

2.2.6.1 Proteinkonzentrierung mit Ultrafiltration

Die Konzentrierung der proteolytisch aktiven Fraktionen der jeweiligen Chromatographieschritte während der Proteaseanreicherung aus *T. thermophilus HB8* konnte mit Membranen der Firma Millipore GmbH (Eschborn, Deutschland), welche eine Polyethersulfonbeschichtung (PM) und eine Porengröße von 30 kDa aufwiesen, in Ultrafiltrations-Druckkammern des Types 8050 bzw. 8003 der Firma Amicon (Witten, Deutschland) vorgenommen werden. Entsprechende Membranen wurden zur Konzentrierung der extrazellulären Proteasen aus *B. caldolyticus* eingesetzt, jedoch mit dem Unterschied, daß diese eine hydrophile Cellulosebeschichtung trugen (YM) und eine Porengröße von 3 kDa aufwiesen. Neben der Konzentrierung ließen sich mit dieser Methode Salze sowie niedermolekulare Verbindungen zusätzlich abtrennen.

2.2.7 Proteinbestimmung

2.2.7.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts der enzymhaltigen Proben im Verlauf des Reinigungsprozesses erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Um Proteinmengen hinreichend genau bestimmen zu können, wurde eine Kalibrierungsgerade mit Rinderserumalbumin für den Bereich 0–10 µg Rinderserumalbumin pro ml aufgenommen. Die Probenansätze wurden jeweils auf 50 µl mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 ergänzt und mit jeweils 950 µl des Bradford-Reagenzes auf 1 ml aufgefüllt. Nach einer fünfminütigen Inkubationsdauer wurde das Absorptionsmaximum bei 595 nm spektroskopisch bestimmt. Die

Komponenten des Bradford–Reagenzes waren 100 mg Coomassie Brillantblau G 250, gelöst in 50 ml 95 % Ethanol p.a., 100 ml 85 % ortho–Phosphorsäure und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ergänzt auf das Volumen von 1 Liter.

2.2.8 Elektrophoretische Methoden

2.2.8.1 Diskontinuierliche SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese

Das in dieser Arbeit verwendete Elektrophoresesystem von Hames (1988) basiert auf dem PAGE–System nach Laemmli (1970). Es wurde mit einem dissoziierenden und diskontinuierlichen pH–Puffersystem gearbeitet. Die Sammlung der Proteine erfolgte im sauren Bereich bei pH 6,8 in einem 2,5%igen Sammelgel und die Trennung im alkalischen Milieu bei pH 8,8 in einem 10%igen Trenngel. Zur Herstellung von Trenngelen einer 10%igen Acrylamidkonzentration wurden 10 ml einer Acrylamid/ $\text{N,N}'$ –Methylenbisacrylamidlösung des Verhältnisses 30:0,8, 3,75 ml Tris–HCl pH 8,8, 0,3 ml 10 % SDS (w/v), 1,5 ml 1,5 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v), 14,45 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ und 0,015 ml TEMED zusammengegeben. Die Polymerisation erfolgte in einer Gel–Caster–Apparatur SE 250 von Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (Uppsala, Schweden). Für das 2,5 % ige Sammelgel wurden 2,5 ml Acrylamid/ $\text{N,N}'$ –Methylenbisacrylamidlösung (30:0,8), 5 ml Tris–HCl pH 6,8, 0,2 ml 10 % SDS, 1,0 ml 1,5 % Ammoniumperoxodisulfatlösung, 11,3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ und 0,015 ml TEMED verwendet. Die angegebenen Volumina sind für 5 Minigele der Größe 10*8 cm vorgesehen.

Als Reservoirpufferlösung wurde Tris–Glycin pH 8,3 bestehend aus 3 g Tris, 14,4 g Glycin und 0,1 % SDS (w/v) pro Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ eingesetzt. Die Probenvorbereitung war derart, daß SDS–Probenpufferlösung und Enzymprobe in demselben Volumen sowie 1/10 Volumen Bromphenolblaulösung gemischt wurden. Die SDS–Probenpufferlösung bestand aus 6 ml 10 % SDS (w/v), 3 ml 87 % Glycerin (w/v), 2,4 ml Tris–HCl pH 6,8 und 2,1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$. Die Bestandteile der

Bromphenolblaulösung waren 1 M Dithiothreitol und 0,2 % Bromphenolblau (w/v). Das Gemisch wurde anschließend über einen Zeitraum von 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in einem vertikalen System der Hoefer Pharmacia Inc. (Uppsala, Schweden) Typ Mighty Small Mini-Vertikal Electrophoresis Unit, SE 250. Als Spannungsquelle diente ein Netzgerät der Firma BioRad (München, Deutschland), Power Pac 300. Die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde durch Anlegen einer Stromstärke von 28 mA erreicht.

Die Fixierung und Anfärbung der Proteine nach beendeter Elektrophorese wurde, je nach vorliegender Konzentration der Proteinprobe, wahlweise mit Coomassie Brillantblau R 250 oder mit einer Silbernitratlösung angefärbt. Die Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung war 45 % Methanol (v/v), 8 % Eisessig (v/v) sowie 0,25 % Coomassie Brillantblau R 250 (w/v). Die Entfärbelösung für Coomassiegefärbte Polyacrylamidgele bestand aus 25 % Ethanol (v/v) und 15 % Eisessig (v/v). Für den Färbungs- bzw. Entfärbungsvorgang wurden die Gele für 20 Minuten in der Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Gele, nach wiederholtem Wechsel der Entfärbelösung, entfärbt. Für die wesentlich empfindlichere Silberfärbung wurden die PAGE-Gele zunächst für 10 Minuten in Fixierlösung, bestehend aus 12 % Essigsäure (v/v), 40 % Ethanol (v/v) und 0,05 % 37 % Formaldehyd (v/v), bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Es folgten drei Waschschrte über einen Zeitraum von jeweils 10 Minuten mit 50 % Ethanol. Im Anschluß daran wurde das PAGE-Gel in einer Imprägnierlösung mit 0,2 % 10%iger Natriumthiosulfat-Pentahydrat-Lösung (v/v) für 1 Minute inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten mit H₂O_{bidest.} erfolgte die Inkubation mit einer Silbernitratlösung der Zusammensetzung 0,2 % Silbernitrat (w/v) und 0,075 % 37%iges Formaldehyd (v/v) über einen Zeitraum von mindestens 20 Minuten. Anschließend wurde mit 6 % Natriumcarbonat (w/v), 0,004 % 10%iges Natriumthiosulfat-Pentahydrat (v/v) sowie 0,05 % 37%iges Formaldehyd (v/v) entwickelt. Nach weiteren zwei Waschschrten mit H₂O_{bidest.} sowie einem Stoppbad mit 40 % Ethanol (v/v) und 12 % Essigsäure (v/v) folgte eine 20minütige Inkubation der PAGE-Gele mit 50%igem Ethanol.

2.2.8.2 Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese

Die hier verwendete Methode basiert auf dem System nach Laemmli (1970), modifiziert durch Hames (1988). Mit einem nicht-dissoziierenden diskontinuierlichen Puffersystem erfolgte die Trennung unter nativen Bedingungen im Trenngel bei pH 8,8. Die Sammlung der Proteine geschah im Sammelgel bei einem pH von 6,8. Der Acrylamidgehalt im Trenn- bzw. Sammelgel betrug 7,5 % bzw. 2,5 %. Zur Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde eine Stromstärke von 28 mA gewählt. Die Herstellung der Trenngele einer 7,5 % Acrylamidkonzentration erforderte 7,5 ml der Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Stammlösung (30:0,8), 3,7 ml Tris-HCl pH 8,8, 1,5 ml 1,5 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v), 17,25 ml H₂O_{deion.} und 0,015 ml TEMED. Für die Präparation des Sammelgels mit einem Acrylamidgehalt von 2,5 % wurden 2,5 ml der Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Stammlösung, 5 ml Tris-HCl pH 6,8, 2,5 ml 1,5 % Ammoniumperoxodisulfat und 0,015 ml TEMED vorgelegt. Das angegebene Volumen war für 5 Minigele der Größe 10*8 cm bestimmt. Die Reservoirpufferlösung war aus 3 g Tris, 14,4 g Glycin pro Liter H₂O_{deion.}, pH 8,3 zusammengesetzt. Für die Probenvorbereitung wurden die jeweiligen enzymhaltigen Proben und 0,2 % Bromphenolblau im Verhältnis 11:1 gemischt. Elektrophoreseapparatur sowie Spannungsquelle waren mit jenen in 2.2.8.1 beschriebenen identisch.

2.2.9 Enzymatische Bestimmungsmethoden

2.2.9.1 Proteolytische Aktivitätsbestimmung nach Anson

Die Bestimmung und Quantifizierung proteolytischer Aktivitäten enzymhaltiger Lösungen erfolgte mit Hilfe der Anson-Hämoglobin-Methode (Anson, 1939). Der Test bedient sich des Hämoglobins als natürlichem Substrat welches durch Zusatz von Harnstoff entfaltet wird, und somit unspezifische proteolytische Angriffe des Enzyms begünstigt.

Zur Herstellung des Hämoglobinsubstrats wurden 11,54 g Harnstoff, unter Rühren bei 25°C im Wasserbad in 10–15 ml H₂O_{deion.} gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2,4 g einer 1 N NaOH-Lösung sowie 0,635 g lyophilisiertes Hämoglobin. Nach weiterem Rühren für 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden 3,156 g einer 1 M Kaliumdihydrogenphosphatlösung zugegeben, die Lösung mit H₂O_{deion.} auf 32,6 g aufgefüllt und der pH mit konzentrierter Salzsäure auf 7,5 eingestellt.

Für den Enzymstandardtest wurden 250 µl enzymhaltige Lösung und 250 µl des Hämoglobinsubstrats für 15 Minuten bei 70°C in einem Heizblock inkubiert, durch Zugabe von 1 ml einer 0,3 M Trichloressigsäure die Reaktion gestoppt und das Präzipitat in einer Tischzentrifuge der Firma Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), Typ 5415 D abzentrifugiert. Nach Abnahme von 500 µl des Überstands und Zusatz von 1 ml 0,5 N Natronlauge sowie 250 µl, im Verhältnis 1:3 mit H₂O_{deion.} verdünntem Folin–Ciocalteus Phenolreagenzes wurde die Absorption bei 750 nm spektroskopisch bestimmt (Peterson, 1979). Die Behandlung des Leerwertes erfolgte in gleicher Weise, jedoch mit dem Unterschied, daß eine Inkubation des Enzyms mit Substrat unterblieb und dieses nach erfolgter Inkubation zugesetzt wurde.

Kalkulation

Um die gemessene proteolytische Aktivität kalkulieren zu können, definierte Anson (1939) eine Protease-Einheit, indem er Tyrosin als Standardreferenz heranzog. So entspricht ein Anson–Unit (AU) unter standardisierten Reaktionsbedingungen der Proteasemenge, welche pro Minute die Menge an färbaren Spaltprodukten freisetzt, welche dieselbe Farbintensität aufweisen wie 1 mmol freies Tyrosin.

Für die Standardtyrosinlösung der Konzentration 0,8 mmol/l wurden 14,5 mg L–Tyrosin in 100 ml HCl der Konzentration 0,2 mol/l gelöst. So ließ sich eine Eichgerade mit Stoffkonzentrationen von 0 bis 240 nmol L–Tyrosin aufnehmen, indem die Volumina der Proben auf 500 µl mit 0,2 mol/l HCl ergänzt und nach Zusatz von 1 ml einer 0,5 N NaOH-Lösung sowie 250 µl des mit H₂O_{deion.}

verdünnten Folin–Ciocalteus Phenolreagenzes spektroskopisch bei 750 nm gemessen wurden. Durch Umformung der Geradengleichung der aufgenommenen Eichgerade kann die freigesetzte Stoffmenge über die gemessene Absorption und den ermittelten Steigungsfaktor berechnet werden. Da AU als mmol Tyrosin pro Minute definiert wird, entspricht 1 nmol Tyrosin 1 μ AU. Infolge der Entnahme von 500 μ l aus 1500 μ l der vorliegenden Inkubationslösung nach der Zentrifugation und einer Inkubationszeit von 15 Minuten wird die ermittelte Stoffmenge durch 15 geteilt und mit dem Faktor 3 multipliziert. Es resultieren μ AU pro Testansatz (250 μ l enzymhaltige Lösung). Die Multiplikation von μ AU mit 1000 und Division durch 0,25 ergibt μ AU pro Liter. Nach Einberechnung der Verdünnung und nochmaliger Division durch 1000 erhält man mAU pro Liter. Unter Berücksichtigung des tatsächlich vorliegenden Volumens errechnet sich die Gesamtaktivität.

2.2.9.2 Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Ala–Ala–Phe–AMC

Das Aminopeptidasesubstrat Alanyl-alanyl-phenylalanin–7–amino–4–methyl-cumarin (Ala–Ala–Phe–AMC) wird durch entsprechende Proteaseaktivität hydrolysiert, wobei 7–Amino–4–methyl-cumarin (AMC) freigesetzt wird, welches stark fluoresziert. Die Anregung der Verbindung erfolgte bei 380 nm und die Emission wurde bei 440 nm gemessen. Alle Proben wurden bei 70°C in Abhängigkeit von der Zeit in einem Wasserbad inkubiert. Zur Herstellung der Substratlösung wurde das AMC–Peptid in 500 μ l Methanol gelöst und anschließend mit 12 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,03 % Triton X–100 verdünnt. Für den Enzymtest wurden 2,5 ml Substratlösung eingesetzt. Die Enzymkonzentration wurde, je nach Reinheit der Lösung, im Bereich zwischen 10–375 μ g Protein in 2,5 ml Küvettenvolumen (4–150 μ g/ml Testlösung) gewählt. Alle Lösungen wurden vor der Messung steril filtriert und somit von Partikeln befreit, welche zur Messung von Artefakten führten.

Kalkulation

Unter Verwendung einer Standardlösung von 1,35 μM Chininsulfat-Dihydrat in 0,5 M Schwefelsäure, erfolgte die Kalibrierung des Spektrofluorometers Typ Mark I, Farrand Optical Co. Inc., (New York, Amerika). Die Anregung des Chininsulfats erfolgte bei 347 nm, die Emission wurde bei 448 nm aufgezeichnet (Zimmerman et al., 1977). Die gemessene Fluoreszenz der freigesetzten AMC-Gruppe wurde als relative Fluoreszenz dargestellt.

2.2.9.3 Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Glutaryl–Phe–AMC

Glutaryl–phenylalanin–7–amino–4–methyl-cumarin (Glutaryl–Phe–AMC) wurde als Substrat für kinetische Untersuchungen überprüft. Die hydrolytische Aktivität der Protease wurde durch die Freisetzung der AMC–Gruppe fluorimetrisch bei 440 nm detektiert. Das Substrat konnte gemäß 2.2.9.2 gelöst und eingesetzt werden. Zusätzlich wurde es in Triethanolamin-HCl eingesetzt. Gelöst wurde ein mg Substrat in jeweils 1 ml 0,2 mol/l Triethanolamin-HCl pH 7,5 (Bergmeyer, 1984). Zur Herstellung der Triethanolaminlösung wurden 37,13 g Triethanolamin in 800 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gelöst, und nach Einstellung des pH auf 7,5 mit $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ auf 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ ergänzt. Für den enzymatischen Test wurden 1850 μl der Triethanolaminlösung, 500 μl der Substratlösung und 150 μl der nach Gelchromatographie erhaltenen Enzymlösung mit einem Proteingehalt von 225 μg eingesetzt. Der Leerwert setzte sich aus denselben Lösungen zusammen mit dem Unterschied, daß die Enzymlösung durch 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 ersetzt war. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte gemäß 2.2.9.2.

2.2.9.4 Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Suc–Phe–p-nitroanilid

Der Nachweis proteolytischer Aktivitäten mit N–Succinyl–phenylalanin–p–nitroanilid (Suc–Phe–p-nitroanilid) erfolgte durch Messung des Chromophors p–Nitroanilin

spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 405 nm. Gelöst wurde 1 mg Substrat in jeweils 1 ml Triethanolamin-HCl der Konzentration 0,2 mol/l pH 7,5, gemäß 2.2.9.3. Für den Enzymtest wurden 975 µl 0,2 mol/l Triethanolamin-HCl pH 7,5 sowie 500 µl der Substratlösung zusammengegeben, und die Reaktion wurde durch Zusatz von 25 µl Enzymlösung gestartet. Die Enzymkonzentration wurde analog 2.2.9.2 im Bereich zwischen 4-150 µg Protein pro ml Testlösung gewählt. Die Absorptionzunahme bei 405 nm wurde an einem thermostatisierbaren Spektralphotometer bei 70°C über einen Zeitraum von 10 Minuten verfolgt.

Kalkulation

Enzymaktivität stellt eine Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit dar. Die Kalkulation der Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit erfolgt über die Bestimmung der Änderung der Absorption pro Minute ($\Delta A/\text{min}$). Unter Berücksichtigung des Volumens der Testlösung, des Probenvolumens, des Lichtwegs und des Absorptionskoeffizienten des Substrats errechnet sich die Konzentration (mmol/l) der eingesetzten Probe als $\Delta A \cdot V_{(\text{Küvette})} / \epsilon \cdot d \cdot V_{(\text{Probe})}$. Für das freigesetzte p-Nitroanilid beträgt der Absorptionskoeffizient $\epsilon_{405} = 1,02 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$ (Bergmeyer, 1984). Für die Konzentrationsaktivität pro Zeiteinheit ergibt sich die Volumenaktivität (U/l) als $\Delta A \cdot V_{(\text{Küvette})} \cdot 1000 / \epsilon \cdot d \cdot V_{(\text{Probe})} \cdot \Delta t$.

2.2.9.5 Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid

Analog zu der in 2.2.9.4 beschriebenen Methode wurde der Nachweis proteolytischer Aktivität mit N-Succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-phenylalanin-p-nitroanilid (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid) geführt. Die Parameter zur Lösung des Substrats sowie die Testbedingungen und der Absorptionskoeffizient wurden in 2.2.9.4 beschrieben.

2.2.9.6 Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Benzoyl–Arg–p-nitroanilid

Für Untersuchungen zur Substratspezifität der isolierten Protease wurde N α -Benzoyl–DL–arginin–p–nitroanilid (Benzoyl–Arg–p-nitroanilid) eingesetzt. Für den Enzymtest wurden 4,4 mg des Substrats in 500 μ l DMSO vorgelöst und mit H₂O_{bide}st. ergänzt, was einer 4 mM Lösung entspricht. Die Parameter für den Enzymtest waren 800 μ l der Substratlösung, 100 μ l 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 und 100 μ l Enzymlösung. Der Nachweis und die Kalkulation entsprachen der in 2.2.9.4 angeführten Darstellung.

2.2.9.7 Hydrolytische Aktivitätsbestimmung mit Benzoyl–Tyr–ethylester

Zur Charakterisierung des Enzyms bezüglich seiner Substratspezifität und möglicher Esteraseaktivität wurde N-Benzoyl–L–tyrosin-ethylester (Benzoyl–Tyr–ethylester) überprüft. Hierzu wurde 1 mg des Substrats in 500 μ l Methanol gelöst und mit 12 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,1 % Triton X–100 ergänzt (Rao und Lombardi, 1975). Für den Enzymtest wurden 975 μ l der Substratlösung und 25 μ l Enzymlösung eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen bewegten sich je nach Reinheit im Bereich zwischen 4–150 μ g Testlösung. Die Reaktion sollte bei 256 nm als Absorptionzunahme durch Zunahme von dissoziiertem N-Benzoyl-L-tyrosin, über eine Zeitspanne von 10 Minuten, bei 70°C spektroskopisch meßbar sein. Es gilt die in 2.2.9.4 angeführte Berechnungsformel mit $\epsilon_{256}=0,964 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ (Bergmeyer, 1970).

2.2.9.8 Hydrolytische Aktivitätsbestimmung mit Benzoyl–Arg–ethylester

Die Überprüfung der isolierten Protease auf Esteraseaktivität wurde mit N α -Benzoyl–arginin-ethylester (Benzoyl–Arg–ethylester) vorgenommen. Zur Herstellung der Substratlösung wurden 34,3 mg N α -Benzoyl–arginin-ethylesterhydrochlorid in 10 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gelöst. Die Lösung wies eine Konzentration von 10 mmol/l auf (Walsh und Wilcox, 1979). Die Bedingungen für den Enzymtest sind in

2.2.9.7 dargestellt. Es gilt die in 2.2.9.4 angeführte Berechnungsformel mit $\epsilon_{256}=0,808 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

2.2.9.9 Aktivitätsbestimmung mit Furylacryloyl–Gly–Leu-amid

Ein spezifisches synthetisches Substrat für neutrale Proteasen ist N-[3-(2-Furyl)acryloyl]–glycyl–L–leucinamid (Feder, 1968). Der Nachweis der Hydrolyse erfolgte spektroskopisch durch Messung der Absorptionsabnahme bei 345 nm und 70°C. Für die Präparation der Stammlösung wurden 76,6 mg Substrat in 100 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gelöst. Die eingesetzten Volumina an Substratlösung und Enzymlösung für den Aktivitätstest waren 950 μl bzw. 50 μl . Beim Leerwert wurde statt Enzym 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 eingesetzt. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt gemäß 2.2.9.4 mit einem Absorptionskoeffizienten von $\epsilon_{345}=0,766 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$.

2.2.9.10 Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Glu–Gly–Tyr–Ala–Lys

Das Pentapeptid Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys wurde zur Untersuchung der enzymkatalysierten Hydrolyse spezifischer Peptidbindungen eingesetzt. Für den Verdau des Peptids durch Chymotrypsin A₄ aus Rinderpankreas wurden 1 μg Peptid/ μl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 und 60 μg Chymotrypsin A₄ pro 100 μl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gelöst. 60 μl Peptidlösung wurden als Leerwert über einen Zeitraum von 30 Minuten bei RT inkubiert. Ferner wurden 40 μl Peptidlösung mit 10 μl Chymotrypsinlösung 30 Minuten lang bei RT inkubiert. Davon wurden jeweils 25 μl an der Nucleosil 120 C₁₈ 5 μm -Säule mit einer HPLC-Anlage aufgetrennt. Zusätzlich wurden 60 μl Peptidlösung als Leerwert über einen Zeitraum von 60 Minuten bzw. über Nacht bei 70°C in einem Heizblock inkubiert. 40 μl Peptidlösung wurden mit 30 μl der gereinigten Protease aus *T. thermophilus* HB8 mit einem Proteingehalt von 4,5 μg gemischt und über die gleichen Zeiträume inkubiert.

Die mobile polare Phase, bestehend aus Lösung A mit 550 μl Trifluoressigsäure pro Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ und Lösung B mit 80 % Acetonitril und 0,05 % Trifluoressigsäure, wurde als Gradient im Verhältnis 0-30 % Lösung B gemischt. Die Detektion des Peptids bzw. der Peptidfragmente erfolgte bei 214 nm.

2.2.9.11 Bestimmung der Katalaseaktivität

Katalase aus Rinderleber besitzt eine molare Masse von 240000 Dalton. Die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O kann durch Abnahme der Absorption bei 240 nm spektroskopisch verfolgt werden. Somit stellt die Messung der Absorptionsdifferenz in Abhängigkeit von der Zeit eine Möglichkeit dar, Katalaseaktivität zu bestimmen. Die für den Enzymtest eingesetzten Volumina waren 300 μl 10 mmol/l H_2O_2 in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 600 μl Enzymlösung bzw. für den Leerwert statt dessen 600 μl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 (Bergmeyer, 1983). Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur am UV-VIS-Spektralphotometer, und die Kalkulation kann unter Berücksichtigung des Absorptionskoeffizienten mit $\epsilon_{240}=0,00394 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{mm}^{-1}$ gemäß 2.2.9.4 vorgenommen werden.

2.2.9.12 Bestimmung der Fumaraseaktivität

Fumarase, ein in der Matrix der Mitochondrien lokalisiertes Enzym mit einer molaren Masse von 194000 Dalton katalysiert die reversible Umwandlung von Malat in Fumarat. Die Anhäufung von Fumarat wird als Zunahme der Absorption bei 240 nm in Abhängigkeit von der Zeit spektroskopisch bei Raumtemperatur gemessen. Zur Herstellung der Substratlösung wurden 134 mg DL-Äpfelsäure in 10 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gelöst, anschließend 3,5 ml einer 1 N NaOH-Lösung zugegeben und mit 10 mM Kaliumphosphat auf 20 ml aufgefüllt. Die Volumina für den Enzymtest waren 800 μl der Substratlösung und 200 μl der angereicherten Enzymlösung. Die Reaktion wurde am UV-VIS-Spektralphotometer aufgezeichnet,

und die Kalkulation der Enzymaktivität erfolgte unter Berücksichtigung des Absorptionskoeffizienten $\epsilon_{240}=2,44 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ (Bergmeyer, 1970) gemäß 2.2.9.4.

2.2.9.13 Bestimmung der Lactat–Dehydrogenaseaktivität

Lactat–Dehydrogenase aus Schweineherz besitzt eine molare Masse von 140000 Dalton und katalysiert die reversible Reduktion von Pyruvat. Die direkteste Bestimmungsmethode für Lactat–Dehydrogenaseaktivität ist die spektroskopische Messung der Absorptionsabnahme des Cosubstrats $\text{NADH}+\text{H}^+$ bei 340 nm. Für den Enzymtest wurden 700 μl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 100 μl 1 mmol/l $\text{NADH}+\text{H}^+$, 100 μl 1 mmol/l Natriumpyruvat sowie 100 μl der enzymhaltigen Lösung eingesetzt. Der Leerwert war entsprechend zusammengesetzt, jedoch mit dem Unterschied, daß das Enzym durch das entsprechende Volumen an 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 ersetzt war. Der Absorptionskoeffizient beträgt $\epsilon_{340}=6,2 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ (Bergmeyer, 1970).

2.2.9.14 Bestimmung der α –Amylaseaktivität

α –Amylase aus *Bacillus subtilis* weist eine molare Masse von 96900 Dalton auf. α –Amylase spaltet α -glycosidische 1–4 Bindungen im Inneren des Stärkemoleküls, wodurch Maltose und weitere reduzierende Fragmente entstehen. Reduzierende Kohlenhydrate können mit 3,5–Dinitrosalicylsäure spektroskopisch bei 546 nm nachgewiesen werden (Bergmeyer, 1970). Die Zusammensetzung der Substratlösung war 500 mg lösliche Stärke und 17,5 mg NaCl gelöst in 50 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5. Zur Herstellung des Färbereagenzes wurden 1 g 3,5–Dinitrosalicylsäure in 20 ml einer 2 N NaOH-Lösung und 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst und nach Zugabe von 30 g K–Na–Tartrat auf 100 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgefüllt. Im Verlauf des Aktivitätstests wurden 125 μl der Substratlösung und 125 μl enzymhaltige Lösung für eine Stunde bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert und im Anschluß daran 250 μl des Färbereagenzes zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation der Proben in einem

Wasserbad bei 100°C wurde mit 2,5 ml H₂O_{bidest.} aufgefüllt und die Absorption bei 546 nm am UV-VIS-Spektralphotometer gemessen. Der Leerwert wurde entsprechend behandelt, jedoch mit dem Unterschied, daß statt Enzym 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 eingesetzt wurde.

2.2.10 Nachweis von Glycoproteinen

Der Nachweis von Zuckerresten in Glycoproteinen erfolgte nach Auftrennung des Proteins im SDS–Polyacrylamidgel (Glossmann und Neville, 1971). Um das SDS zu entfernen, wurde das SDS–Gel dreimal für eine Stunde in der Waschlösung aus 30 % Methanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v) in H₂O_{deion.} bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran wurde im Dunkeln bei 4°C über einen Zeitraum von 1 Stunde mit 1 % Perjodsäure (w/v) in 7,5 % Essigsäure (v/v) in H₂O_{deion.} oxidiert, und nach mehrfachem Waschen des Gels mit 7,5 % Essigsäure (v/v) in H₂O_{deion.} wurde mit Schiff's Reagenz bei 4°C und über einen Zeitraum von 1 Stunde gefärbt. Im Anschluß an die Färbung wurde überschüssiges Schiff's Reagenz mit 1 % Natriumbisulfit (w/v) in 0,1 N HCl entfernt. Als Positivkontrolle wurde Ovalbumin, bzw. als Negativkontrolle Rinderserumalbumin verwendet.

2.2.11 Größenbestimmung an Sepharose CL-6B

Für die chromatographische Auftrennung an Sepharose CL-6B wurde eine Kunststoffsäule mit den Maßen 74*2,1 cm verwendet. Die Standards waren 1 mg Dextranblau aus *Leuconostoc ssp.*, 50 µg Katalase aus Rinderleber, 7 µg Lactat–Dehydrogenase aus Schweineherz, 1 mg α-Amylase aus *Bacillus subtilis* und 6 µg Fumarase aus Schweineherz (Andrews, 1965). Von der Protease aus *T. thermophilus HB8* wurden 200 µl der Enzymfraktion nach Sepharose CL-6B, mit einem Proteingehalt von 1 mg eingesetzt. Das Säulenmaterial wurde vor dem Probenauftrag

mit mehreren Gelbettvolumina 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gespült. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer Flußrate von 1 ml/min, unter Verwendung der genannten Pufferlösung. Der Nachweis der Enzyme wurde gemäß Abschnitt 2.2.9.11 mit Hilfe der UV-VIS-Spektroskopie vorgenommen. Die Absorption des Dextranblaus wurde gleichfalls spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen.

2.2.12 Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat

Die Proteinkonzentrationen der Standardproteine Katalase aus Rinderleber und Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz betragen 0,15 mg bzw. 0,014 mg. Für die Protease aus *T. thermophilus* HB8 wurde eine Konzentration von 35 µg gewählt. Pro Versuchsansatz wurde das Protein in 100 µl 0,2 M Triethanolaminhydrochlorid pH 8,5 gelöst und Dimethylsuberimidatdihydrochlorid zugesetzt bis eine Endkonzentration von 20 mM im gegebenen Volumen erreicht war (Hunter und Ludwig, 1970; Hajdu et al., 1976; Davies und Stark, 1970). Die zeitabhängige Entnahme von jeweils 30 µl Probenlösung aus dem Versuchsansatz erfolgte nach 0, 15 und 30 Minuten. Durch Addition der doppelten Menge an Hydroxylaminhydrochlorid, bezogen auf die anfängliche Dimethylsuberimidatkonzentration, konnte die Vernetzungsreaktion gestoppt werden.

2.2.13 Elektrotransfer von Protein (Westernblot)

Der Transfer von Protein aus SDS-PAGE-Gelen basierte auf dem Tank-Blotting-System (Towbin et al., 1979; Gershoni und Palade, 1983). Die Transfer-Elektrophorese-Einheit „Mighty Small“ stammte von Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (Uppsala, Schweden). Die Transfer-Pufferlösung bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS und 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3. Als proteinbindende Oberfläche wurde eine Poly-(vinylidendifluorid)-Membran (PVDF) verwendet (Matsudaira, 1987). Die hydrophoben Membranen wurden vor dem Transfer in

Methanol eingelegt und anschließend in Transferpufferlösung für 2-5 Minuten äquilibriert. Das SDS-PAGE-Gel, die Membran, Blottingpapier sowie eine beidseitige Lage Schaumstoff und zwei Plastikhalterungen bildeten ein sandwichartiges System, welches in die kühlbare Tankvorrichtung, befüllt mit Towbinpuffer, eingesetzt wurde. Als Spannungsquelle diente ein Gerät von LKB, 2197 Power Supply, (Bromma, Schweden). Die angelegte Spannung betrug 85 Volt. Die Zeit für einen kompletten Transfer waren 4-5 Stunden. Proteine auf PVDF-Membranen ließen sich mit Coomassie Brillantblau R 250 anfärben. Hierzu wurde die Membran nach dem Transfer in einer Lösung bestehend aus 0,1 % Coomassie Brillantblau R 250 (w/v) in 40 % Methanol (v/v), 1 % Essigsäure (v/v) in H₂O_{deion.} gefärbt und mit 80 % Methanol (v/v) in H₂O_{deion.} unter mehrfachem Wechsel der Lösung entfärbt. Nach dem Trocknen der Membran ließen sich die gefärbten Proteinbanden auf weißem Hintergrund erkennen.

2.2.14 Bestimmung der N-terminalen Sequenz der Primärstruktur der Protease aus *T. thermophilus* HB8

Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz der Protease wurde mit Hilfe der Methode nach Edman vorgenommen (Edman und Begg, 1967). Hierzu wurde die angereicherte proteasehaltige Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose in unterschiedlichen Konzentrationen in einem 10 % SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.8.1). Das ungefärbte SDS-Gel wurde direkt im Anschluß einem Elektrotransfer unterzogen. Die Bindung des Proteins erfolgte an eine hydrophobe PVDF-Membran, welche nach beendetem Transfer einer Coomassie Brillantblau R 250-Färbung sowie anschließender Entfärbung unterzogen wurde (2.2.13). Die transferierten 67 kDa-Banden wurden aus der Membran herausgeschnitten und einer automatischen Analyse im Sequenator, ausgehend vom N-Terminus, unterworfen und als Phenylthiohydantoinderivate (PTH) nachgewiesen. Hierzu wurden Membranstücke der Größe 3*1 mm aus der Coomassie-gefärbten PVDF-Membran in einen TFA-behandelten Glasfilter zusammen mit 0,75 mg BioBrene Plus von Applied Biosystems

(Weiterstadt, Deutschland) gegeben. Nach Fixierung des Filters im dafür vorgesehenen Reaktionsraum wurde die Sequenzierung im Protein-Sequenator 494A Procise von Applied Biosystems ausgeführt. Die Auftrennung der PTH-Aminosäuren erfolgte mit Hilfe einer HPLC-C₁₈-Säule der Maße 2,1*250 mm. Die Detektion der PTH wurde entsprechend der erhaltenen UV-Absorptionssignale bei 269 nm erreicht. Die Quantifizierung wurde anhand eines 10 pmol PTH-Aminosäurenstandards von Applied Biosystems vorgenommen.

2.2.15 Gelverdau der Protease aus *T. thermophilus* HB8

In Hinsicht auf einen Gelverdau der Protease aus *T. thermophilus* HB8 wurde ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel vorbereitet. Als angereicherte enzymhaltige Probe wurde Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose, mit einem Proteingehalt von 41,6 mg/ml, eingesetzt. Nach der Probenvorbereitung für das SDS-PAGE gemäß 2.2.8.1 wurden 4 Geltaschen mit jeweils 10,4 µg Protein vorgesehen. Weitere 4 Geltaschen verblieben leer und dienten als Gelblank. In einer weiteren Geltasche erfolgte die Auftrennung des Proteinmolekulargewichtsstandards (3.2.9). Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Brilliantblau R 250 gefärbt und schließlich entfärbt (2.2.8.1). Nach zwei folgenden Waschschrritten des Gels mit H₂O_{bidest.} wurde die Präparation der interessierenden Proteinbanden vorgenommen, wobei jeweils 2 identische Gelbanden zusammengefaßt wurden. Die jeweiligen Gelbanden wurden zweimal über einen Zeitraum von 15 Minuten mit je 1 ml H₂O_{bidest.} gewaschen und anschließend in Würfel geschnitten, welche ihrerseits für zweimal 15 Minuten mit 1 ml H₂O_{bidest.} gewaschen wurden. Zur vollständigen Entfärbung der Banden erfolgten zwei Waschvorgänge über jeweils 15 Minuten, mit 100 µl 50 % Acetonitril sowie ein Schrumpfvorgang durch Zugabe von 100 µl Acetonitril. Nach Entfernung des Acetonitrils wurden die Gelwürfel mit 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat rehydratisiert, nochmals mit 100 µl Acetonitril für 15 Minuten auf dem Schüttler geschrumpft und nach Abnahme der Lösung in einer Vakuumzentrifuge bei RT getrocknet.

Die Reduktion wurde unter Schutzgas mit 10 mM Dithiothreitol in 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,2-8,4 vollzogen und für eine Stunde bei 56°C auf dem Schüttler, unter Lichtabschluß, belassen. Es folgte die Alkylierung mit 2 % 4-Vinylpyridin in 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 8,2-8,4, gleichfalls unter Schutzgas für 30 Minuten und Lichtabschluß auf dem Schüttler. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, zweimal 15 Minuten mit 200 µl 50 % Acetonitril gewaschen, mit 100 µl Acetonitril geschrumpft, mit 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat rehydratisiert und die Gelwürfel in der Vakuumzentrifuge bei RT getrocknet. Durch Zugabe von 50 µl Verdaupuffer, bestehend aus 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 10 % Acetonitril und 1 mM CaCl₂, wurden die Gelstücke rehydratisiert.

Für die Hydrolyse wurden jeweils zwei 67 kDa-Proteasebanden zusammengefaßt und mit Trypsin behandelt. Zusätzlich wurde ein Verdau der ~55 kDa-Bande mit Trypsin vorgenommen. Die Konzentration des Trypsins wurde so berechnet, daß es im Verhältnis 1:50 des eingesetzten Proteins vorlag. Es wurden 20 µl einer Trypsinlösung (100 µg/100 µl 1 mM HCl; Verd. 1:50) zugegeben, so daß 400 ng Trypsin pro Ansatz vorlagen. Nach Zugabe von 60 µl Verdaupuffer ohne CaCl₂-Zusatz wurde 12 Stunden lang bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat, 50 µl Acetonitril für 15 Minuten zugegeben und die Überstände jeweils abgenommen und gesammelt. Es folgten zwei Elutionen über einen Zeitraum von jeweils 15 Minuten mit 100 µl 5 % Ameisensäure, 50 % Acetonitril sowie eine Elution mit 100 µl 5 % Ameisensäure, 50 % Acetonitril für 15 Minuten im Ultraschallbad, wobei jeweils die Überstände abgenommen und gesammelt wurden. Nach einer abschließenden Elution mit 50 µl Acetonitril über den Zeitraum von 15 Minuten sollten alle Peptide in der vereinigten Eluatlösung vorliegen, welche auf ca. 10 µl mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge bei RT eingeengt wurde (Beck, 2002).

2.2.16 Bestimmung von Teilsequenzen der Primärstruktur der Protease aus *T. thermophilus* HB8 mit Massenspektrometrie

Für die Bestimmung von Teilsequenzen der 67 kDa-Protease und der ~55 kDa-Bande aus *T. thermophilus* HB8 wurden die Peptide an einer RP-Kapillarsäule der Firma Grom (Herrenberg, Deutschland) TSK-Gel Super-ODS 120 mm*300 µm mit einer Flußrate von 5 µl/min an einem HPLC-System von Agilent (Waldbronn, Deutschland) mit angeschlossenen UV-Detektor aufgetrennt. Das getrocknete Peptidgemisch der ~55 kDa-Bande wurde in 10 µl 0,025 % TFA in HPLC-Wasser gelöst, und davon wurden 2,5 µl auf die Säule gegeben. Als Elutionsmittel wurden Lösung A mit 0,025 % TFA in HPLC-Wasser und Lösung B mit 0,023 % TFA, 80 % Acetonitril in HPLC-Wasser eingesetzt. Der Gradient setzte sich über den Zeitraum 0-10 Minuten aus 5 % B, von 10-15 Minuten aus 10 % B, von 15-100 Minuten aus 75 % B und von 100-120 Minuten aus 95 % B zusammen. Entsprechend wurde das erhaltene Peptidgemisch des tryptischen Verdaus der 67 kDa-Protease behandelt und aufgetrennt. Der UV-Detektor zeichnete die erhaltenen Signale bei einer Wellenlänge von 214 nm auf.

Die Peptididentifizierung erfolgte mit Hilfe eines LC-MS/MS-Experiments. Das verwendete Ionenfallen-Massenspektrometer esquire 3000^{plus} der Firma Bruker Daltronik (Bremen, Deutschland) war direkt mit der RP-Trennsäule gekoppelt. Ionisierung erfolgte mit Elektrospray. Zusätzlich konnten mit Hilfe einer Kollisionsaktivierung (CID) von den Peptiden während des LC-MS/MS-Experiments Fragmentationenspektren erhalten werden, wodurch Proteine in Datenbanken, falls vorhanden, identifiziert werden können.

2.2.17 Isolierung der genomischen DNA aus *T. thermophilus HB8*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *T. thermophilus HB8* wurden 50 ml Kulturmedium (2.2.1) mit *T. thermophilus HB8* beimpft und am darauffolgenden Tag in ein Kulturgefäß mit 200 ml Nährmedium überimpft. Am Folgetag wurden die Zellen gemäß 2.2.1 durch Zentrifugation geerntet, der Zelleniederschlag in 100 ml TES-Saccharoselösung, bestehend aus 25 g Saccharose in 30 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8, suspendiert und bei 6000 U/min und 4°C zentrifugiert. Im Anschluß daran erfolgte eine nochmalige Resuspendierung des Zelleniederschlags in 6 ml TES-Saccharoselösung. Es folgten die Zugabe von 1 ml 0,25 M EDTA und 0,4 ml 1 % Lysozym (w/v) (Süßmuth et al., 1987). Die Lösung wurde bei 37°C unter Schütteln für 20 Minuten und nach nochmaligem Zusatz von 1 ml 0,25 M EDTA für weitere 40 Minuten inkubiert. Die vollständige Lyse ließ sich durch den Zusatz von 1 ml 10 % SDS (w/v) nach Inkubation für 30 Minuten erreichen. Es folgte ein Verdau der Zellproteine durch Zusatz von 0,9 ml 0,3 % Proteinase K aus *Tritirachium* (w/v) in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8 bei 30°C. Der Zusatz von 8 ml Roti-Phenol/Chloroform pH 7,5-8 begünstigte die Denaturierung und Sammlung der Proteine. Die Trennung von organischer und wässriger Phase geschah durch Zentrifugation bei 12000 U/min über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 10°C. Phenolreste ließen sich durch den Zusatz von Diethylether entfernen. Es folgte der Zusatz von 1 % RNase aus Rinderpankreas (w/v) in 30 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8, welche zuvor für 10 Minuten bei 100°C gekocht wurde. Der Versuchsansatz wurde bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluß daran wurde die genomische DNA mit einer Lösung, bestehend aus 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,6 und 2,5 Volumen kaltem Ethanol bei 70°C über einen Zeitraum von 20 Minuten gefällt und mit 7000 U/min bei 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert. Der DNA-Niederschlag wurde für 15 Minuten in einem Exsikator getrocknet und in 1,5 ml 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8 über Nacht bei 37°C im Heizblock gelöst.

2.2.18 Kinetik

2.2.18.1 pH-Optimum

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde das Peptid Ala-Ala-Phe-AMC als 400 μM Lösung in Universalpuffer nach Teorell und Stenhagen gelöst (Bisswanger, 2000). Das Peptid wurde gemäß 2.2.9.2 in Methanol p.a. vorgelöst. Zur Herstellung der Universalpufferlösung wurden 100 ml 0,22 M Citronensäure, 100 ml 0,33 M Phosphorsäure, 3,54 g Borsäure und 343 ml einer 1 N NaOH-Lösung zusammengegeben und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf einen Liter aufgefüllt. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte in Stufen über einen Bereich von 3-12 mit konzentrierter HCl. Für den Enzymtest wurden 225 μg Enzym in Universalpuffer bei der jeweils entsprechenden pH-Stufe bei 70°C für 30 Minuten inkubiert. Der aktuelle pH-Wert wurde am Ende der Aktivitätsbestimmung mit einer pH-Elektrode überprüft.

2.2.19 Immunisierung

2.2.19.1 Immunisierung eines Kaninchens mit Antigen aus *B. caldolyticus*

Für die gezielte Antikörperbildung in einem Versuchstier wurden 50 μg der gereinigten 69-kDa-Protease aus *B. caldolyticus* in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, unter Zusatz desselben Volumens des kompletten Freundschens Adjuvans einem Kaninchen von Charles River (Kissleg, Deutschland) bei der primären Applikation injiziert (Harlow, 1988). Dabei wurde das in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 gelöste Antigen mit dem mineralöhlhaltigen Adjuvans durch wiederholtes Aufziehen in einer Spritze so gemischt, daß eine Emulsion entstand. Die Emulsion wurde dem Kaninchen subkutan in die Rückenhaut an verschiedenen Stellen appliziert. Im Abstand von sechs Wochen folgte die sekundäre Applikation mit 16 μg Antigen. Nach einer weiteren Woche wurden 4 ml Blut aus der Ohrvene des Kaninchens entnommen. Das Blut verblieb für eine Stunde im Trockenschrank bei 37°C bis zur vollständigen Gerinnung.

Das Serum im Überstand wurde für die weitere Überprüfung auf vorhandene Immunglobuline vom Koagulat abgenommen. Der verbliebene Blutkuchen wurde über Nacht im Kühlraum aufbewahrt und am folgenden Tag bei 4000 U/min und 4°C für 10 Minuten im Rotor des Typs SS-34 abzentrifugiert, und der Überstand abgenommen. Im Falle einer positiven Reaktion auf Immunglobuline wurde das Gesamtblut des Kaninchens nach einer weiteren Woche entnommen und entsprechend behandelt. Die Serumfraktion kann bei -70°C über mehrere Jahre konserviert werden.

2.2.19.2 Immunodiffusion nach Ouchterlony

Für die Immunodiffusionsmethode (Harlow, 1988) wurden Agaroseplatten mit 1,4 % Agarose (w/v) in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) pH 7,4 in einem Wasserbad erhitzt, anschließend auf 45°C abgekühlt und in Platten mit einem Durchmesser von 3,5 cm gegossen. Die Bestandteile von PBS waren 8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 und 1,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ pro Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$. Nach Erstarren der Agarose erfolgte das Austanzen peripherer Löcher (\varnothing 0,4 cm) sowie eines Zentrallochs (\varnothing 0,6 cm) mit einer Lochstanze. Vom Serum des Kaninchens wurden 220 μl mit einem Proteingehalt von 7,1 mg in das Zentralloch gegeben, und periphere Löcher wurden mit der angereicherten Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25, eines Proteingehalts von 0,58 mg bzw. 1,29 mg in jeweils 70 μl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, befüllt. Die Agaroseplatten verblieben über einen Zeitraum von mehreren Tagen bei Raumtemperatur.

Schwächere Präzipitationslinien konnten zur besseren Sichtbarmachung nach der Immunodiffusion, mit Coomassie Brilliantblau G 250 gefärbt werden. Hierzu wurde die verfestigte Agarose aus der Petrischale genommen und 3*3 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung pH 7,4 gebadet, beidseitig mit Filterpapier abgedeckt und an der Luft getrocknet. Nach 5-10minütiger Inkubation in 0,05 % Coomassie Brilliantblau G 250 (w/v) wurde das getrocknete Agarosegel in Essigsäure/Ethanol/Wasser im Verhältnis 1:5:4 (v/v/v) entfärbt.

2.2.19.3 Antigen-Antikörperkomplexe in Lösung

Für die Antigen-Antikörper-Präzipitin-Reaktion wurden Antigen- als auch Antikörperfraktionen über einen Zeitraum von 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert und die Enzymaktivität mit Hilfe des Ansonstests (2.2.9.1) bestimmt. Die angereicherte Enzymprobe (konzentrierte Enzymfraktion 3 nach DEAE Sephadex A-25) wies einen Proteingehalt von 1,3 mg/ml auf und wurde so verdünnt, daß 100 µg Protein jeweils in der Probe vorlagen. Der Proteingehalt der angereicherten Antikörperfraktion nach Gelfiltration an Superdex wurde zu 11,59 mg/ml bestimmt. Die eingesetzten Antikörpermengen erstreckten sich über den Bereich von 50-200 µg Protein.

2.2.20 Antikörperreinigung

2.2.20.1 Ammoniumsulfat-Fraktionierung

12 ml des Kaninchenserums wurden bei 4°C und 15000 U/min über einen Zeitraum von 10 Minuten im Rotor des Typs SS-34 zentrifugiert. Nach Vereinigung der Überstände und Zugabe von 1/10 des Volumenüberstands (1,2 ml) einer 1 M Tris/HCl-Lösung pH 8,0 resultierten 13,2 ml. Im Anschluß daran erfolgte die tropfenweise Zugabe desselben Volumens (13,2 ml) einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung, so daß eine 50 % ige Lösung resultierte. Die Lösung wurde noch für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und bei 4°C wiederum für 10 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert. Nach Aufnahme des Niederschlags in 2 ml H₂O_{deion.} wurde nochmals 40 % des vorliegenden Volumens (1,2 ml) der gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugegeben und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde der Niederschlag bei 4°C für 10 Minuten bei 15000 U/min abzentrifugiert, nochmals in 3 ml H₂O_{deion.} aufgenommen und für 2*2 Stunden bei Raumtemperatur gegen physiologische Kochsalzlösung (PBS) dialysiert. Das

Probenvolumen nach der Dialyse betrug 3,9 ml. Alle Proteinbestimmungen im Verlauf der Antikörperreinigung wurden nach Bradford bestimmt (2.2.7.1).

2.2.20.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose

Für diese Anwendung wurde eine Kunststoffsäule der Maße 12*1 cm eingesetzt. Die Äquilibrierung des hydrophoben Gelmaterials Phenylsepharose CL-4B erfolgte mit 1 M Ammoniumsulfat in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5. Die im Anschluß an die Ammoniumsulfatpräzipitation erhaltene, dialysierte Probe (2.2.20.1) mit einem Volumen von 3,9 ml wurde mit der entsprechenden Ammoniumsulfatsalzkonzentration (1 M) versetzt und im Anschluß auf das Säulenmaterial aufgetragen. Die Elution der Proteine wurde mit einem absteigenden Gradienten von 1–0 M Ammoniumsulfat (50 ml + 52 ml) in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 ausgeführt. Im Anschluß an den Gradienten wurde mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 nachgespült. Es wurden 120 Fraktionen zu jeweils 1,5 ml mit einer Flußrate von 1ml/min gesammelt, die Immunglobulinbande spektroskopisch über die Absorption bei 280 nm detektiert und Fraktionen mit der höchsten Absorption vereinigt. Die Konzentrierung der Immunglobulinfraktion erfolgte mit Ultrafiltration unter Zuhilfenahme einer YM 3-Membran (2.2.6.1).

2.2.20.3 Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60

14,3 mg der nach hydrophober Interaktionschromatographie an Phenylsepharose CL-4B gewonnenen Immunglobulinfraktion wurden an Superdex 200 HiLoad 16/60 mit Hilfe des Äkta-Systems aufgetrennt. Als mobile Phase diente 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5. Gesammelt wurden 80 Fraktionen zu 2 ml mit einer Flußrate von 0,5 ml/min. Die Lokalisation der Proteinbanden erfolgte über die Aufzeichnung der Absorption bei 280 nm.

2.2.21 Immunoreinigung

2.2.21.1 Immobilisierung von Antikörpern an CNBr-aktivierter Sepharose

Für die Immobilisierung von Antikörpern an CNBr-aktivierter Sepharose 4B wurden 2 ml der erhaltenen Immunglobulin-Fraktion nach hydrophober Interaktionschromatographie an Phenylsepharose CL-4B mit einem Proteingehalt von 27,6 mg gegen 0,5 M Natriumchlorid in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat pH 8,3 über Nacht dialysiert. Währenddessen wurde die präaktivierte Sepharose 4B vorbereitet, indem 2 g pulverförmiges Gelmaterial in 20 ml 1 mM HCl aufgeschlämmt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen wurde. Es resultierten ca. 4 ml gequollenes Gelmaterial mit einer Proteinaufnahmekapazität für polyklonale Antikörper von 10-20 mg/ml. Es folgten zwei Waschvorgänge mit 400 ml der 1 mM HCl (200 ml/g Gel) und 200 ml 0,5 M Natriumchlorid in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat pH 8,3. Nach erfolgter Dialyse wurde die Antikörperkonzentration gleichfalls mit der genannten Pufferlösung auf 5-10 mg Protein/ml angepaßt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (2.2.7.1). Für die Kopplungsreaktion wurden 1 Volumenanteil der aktivierten Matrix mit fünf Volumenanteilen der Antikörperlösung gemischt und während einer 16-25stündigen Schüttelinkubation bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Antikörpermatrix mit 1 M Glycin pH 8 für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert. Es folgten drei weitere Waschvorgänge mit 0,5 M NaCl in 0,1 M Natriumacetat pH 4, 0,5 M NaCl in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat pH 8,3 und 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 (Harris and Angal, 1989).

2.2.21.2 Affinitätschromatographie

Zur Bindung der extrazellulären Protease aus *B. caldolyticus* im zellfreien Medium wurden 6 ml des Affinitätsträgers in 30 ml Medium über einen Zeitraum von 20 Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß daran

wurde das Gelmaterial in eine Kunststoffsäule der Maße 1*6 cm gefüllt und mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 mehrere Stunden gewaschen. Die Elution des Antigens erfolgte mit 0,5 M Natriumchlorid in 0,1 M Natriumacetat pH 3,5. Es wurden 50 Fraktionen zu 1 ml mit einer Flußrate von 1 ml/min gesammelt und sofort mit einer 1 M NaOH-Lösung auf pH 7,5 eingestellt.

Zur Bindung des Antigens aus einer vorgereinigten Enzymprobe wurden 730 µl der angereicherten Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25, mit einem Proteingehalt von 1 mg, auf die Säule gegeben. Um möglichst viel Antigen zu binden, wurde die Enzymprobe in einem geschlossenen System mit Hilfe einer Pumpe über einen Zeitraum von vier Stunden über die Säule geschickt. Alle übrigen Bedingungen wie z.B. Elution etc. waren mit den zuvor beschriebenen identisch.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultivierung von *T. thermophilus* HB8

3.1.1 Zellkultivierung

Für die Isolierung thermophiler Proteasen wurde der thermophile Bakterienstamm *T. thermophilus* HB8 (Oshima und Imahori, 1974), welcher den Eubakterien zugehörig ist, auf intrazelluläre Proteasen hin untersucht.

Das Wachstum der Zellen von *T. thermophilus* HB8 vollzog sich in 5 Litern flüssigem, komplexen Nährmedium gemäß 2.2.1. Als besonders selektive Anreicherungsbedingung wurde eine Bebrütungstemperatur von 70°C gewählt, welche gerade dem thermophilen Stamm optimales Wachstum gewährt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen, durch tägliche Überimpfung aus Vorkulturen zur Vorbeugung des Wachstums von Begleitorganismen, inkubiert. Zum Animpfzeitpunkt $t=0$ erfolgte die Beimpfung von 50 ml Kulturmedium mit einer bei -70°C konservierten Stammkultur (3.1.2). Nach 24 Stunden Inkubation wurden 400 ml Kulturmedium mit dieser ersten Vorkultur beimpft, und nach weiteren 24 Stunden konnten 450 ml Zellsuspension ihrerseits in 800 ml des Flüssigmediums überführt werden.

Als auffallendes Merkmal des Stammes soll die charakteristische Verfärbung der Zellen infolge der Produktion von Pigmenten, welche mit der Zellwand assoziiert sind, erwähnt werden. Beobachtet wurde ein Wechsel der Farbe von gelb über orange nach rot, welcher mit der Kultivierungsdauer korreliert. Die Zellmasse von 5 Litern Medium der *T. thermophilus* HB8-Kultur betrug 18-25 g Feuchtwicht nach erfolgter Zentrifugation und in Abhängigkeit von der Zelldichte der angelegten Stammkulturen. Für die nachfolgend beschriebene Reinigung der intrazellulären Protease wurde eine Zellmasse von 20 g Feuchtwicht eingesetzt.

3.1.2 Stammhaltung

Zur Gewinnung der Stammkulturen wurde ein nach 3.1.1 beschriebener Kultivierungsansatz von *T. thermophilus HB8* nach 3 Tagen Wachstum in sterilen Gefäßen abzentrifugiert und der Niederschlag mit geringen Mengen an sterilem Nährmedium (2.2.1) suspendiert. Im Anschluß daran wurden jeweils 250 µl der Zellsuspension auf 200 µl steriles und wasserfreies Glycerin in Reaktionsgefäßen geschichtet. Der Zusatz von Glycerin sollte die Kulturen infolge der Bindung von Wasser stabilisieren. Mit Hilfe des Tiefkühlverfahrens wurden die Stammkulturen durch schnelles Abkühlen auf -70°C konserviert.

Für die Gewinnung der Stammkulturen von *B. caldolyticus* wurde, analog dem für *T. thermophilus HB8* beschriebenen Verfahren (3.1.2), ein Kultivierungsansatz von *B. caldolyticus* (2.2.1) abzentrifugiert, der Niederschlag mit geringen Mengen Nutrient broth pH 7,0 suspendiert und jeweils 250 µl der so erhaltenen Zellsuspension auf 200 µl Glycerin in Reaktionsgefäßen geschichtet. Die Konservierung der Stammkulturen erfolgte bei -70°C .

3.2 Entwicklung eines Reinigungsverfahren für thermophile Proteasen aus *T. thermophilus* HB8

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, Proteasen aus thermophilen Organismen, im besonderen aus *T. thermophilus* HB8 und *B. caldolyticus*, zu isolieren. Somit galt es für jeden Bakterienstamm ein optimales Verfahren zur Reindarstellung intrazellulärer bzw. extrazellulärer Proteasen zu entwickeln. Die geeigneten Schritte zur Anreicherung einer intrazellulären Protease aus *T. thermophilus* HB8 bestanden zunächst in einer Streptomycinsulfatfällung, einer im Anschluß daran folgenden Anionenaustauschchromatographie sowie einer Gelchromatographie. Die völlige Reinheit wurde nativ mit Hilfe der Ultrazentrifugation, bzw. unter denaturierenden Bedingungen, infolge der Abtrennung von denaturierenden Reagenzien, mit Hilfe der Gelchromatographie erlangt. Auch für die Gewinnung und Reinigung einer extrazellulären Protease aus *B. caldolyticus* mußten die Parameter zur schnellen und unkomplizierten Gewinnung des gesuchten Enzyms separat ermittelt werden. Die geeigneten chromatographischen Schritte bestanden hier im wesentlichen aus Anionenaustauschchromatographie und Gelchromatographie. Im Folgenden sollen die Verfahren für jeden Organismus getrennt dargestellt werden.

3.2.1 Zellaufschluß

Zur Gewinnung des Rohextrakts von *T. thermophilus* HB8 wurden 20 g Bakterienzellen nach Zugabe von 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 im Verhältnis 1:2 resuspendiert. Um die Löslichkeit von Membranproteinen zu erhöhen, und somit hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu verringern, erfolgte ein Zusatz von 3 % des nichtionischen Detergenzes Triton X-100 zur Aufschlußlösung (Helenius et al., 1979). Die Zellsuspension wurde über einen Zeitraum von 15 Minuten für jeweils 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und auf Eis für 30 Sekunden abgekühlt. Nach anschließender Zentrifugation konnte der Rohextrakt gewonnen werden. Um die maximale Enzymausbeute zu erlangen, wurde der

Niederschlag nach dem Dekantieren des Rohextrakts mit einem geringen Volumen der eingangs schon erwähnten Aufschlußlösung resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Es resultierten insgesamt 37 ml Rohextrakt mit einem Gesamtproteingehalt von 1369 mg. Mit der Anson-Hämoglobin-Methode (2.2.9.1) konnte eine proteolytische Aktivität von 11,5 mAU nachgewiesen werden (Tabelle 2).

3.2.2 Fällung mit Streptomycinsulfat

Die Komplexierung und Präzipitation von Polyanionen, wie sie z.B. durch Nucleinsäuren repräsentiert werden, ließ sich unter Beteiligung des polykationischen Antibiotikums Streptomycinsulfat erreichen. Da die zu isolierende Protease nicht mit Diethylamino-ethyl-Cellulose als Anion in Wechselwirkung trat, (3.2.3) wurde angenommen, daß das gewünschte Protein nicht wie viele anionische Proteine durch Streptomycinsulfat abgetrennt wurde. Die Ausfällung wurde bereits am Rohextrakt von *T. thermophilus HB8* vorgenommen, da somit einerseits größere Mengen an Proteinen und Nucleinsäuren vorweg abgetrennt werden konnten, andererseits störende Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nucleinsäuren im weiteren Verlauf unterbunden wurden. Die Proteinbestimmung nach Bradford (2.2.7.1) ergab, daß der Gesamtproteingehalt vor der Ultrafiltration an einer PM 30-Membran (2.2.6.1) infolge der Streptomycinsulfatfällung von 100 % im Rohextrakt auf 61,8 % (846 mg) bzw. nach Konzentrierung mit Ultrafiltration auf 60,5 % (828 mg) verringert wurde (3.2.8). Dies bedeutet, daß neben Nucleinsäuren ein erheblicher Teil an anionischen Proteinen mit ausgefällt bzw. auch kationische Proteine aufgrund der vorliegenden hohen Proteinkonzentration im Rohextrakt mitgerissen wurden. Infolge des Konzentrierungsschrittes entstand somit ein Verlust von 1,3 % des Gesamtproteins (Tabelle 2). Die Aktivitätsbestimmung nach Anson ergab 9,1 mAU vor dem Konzentrierungsschritt an der PM 30-Membran bzw. 7,3 mAU nach dem Konzentrierungsschritt. Im Hinblick auf Aktivität ergab sich damit ein Verlust von

20,9 % an Aktivität infolge der Streptomycinsulfatfällung und ein weiterer Verlust von 15,6 % als Folge des Konzentrierungsschrittes (Tabelle 2).

3.2.3 Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose

Nach Einengung des Überstands der Streptomycinsulfatfällung mit Hilfe der Ultrafiltration an einer PM 30-Membran gemäß 2.2.6.1 resultierten 17 ml einer angereicherten Proteaselösung aus *T. thermophilus HB8* (Tabelle 2), welche an DE52-Cellulose weiter aufgetrennt wurde. Bei dem genannten Gelmaterial handelte es sich um eine mit positiv geladenen Diethylamino-ethyl-Gruppen beladene Cellulosematrix, an welche Anionen über elektrostatische Wechselwirkungen reversibel gebunden werden können.

In nachfolgend dargestellter Abbildung 6 ist das Elutionsprofil in Abhängigkeit von der proteolytischen Enzymaktivität pro Testansatz, der Absorption bei 280 nm und des aufsteigenden 0–0,5 M NaCl-Gradienten dargestellt. Auffällig ist, daß mindestens zwei deutlich unterschiedliche Banden mit proteolytischer Aktivität detektiert wurden. Die gleich zu Beginn auftretende Bande mit Proteaseaktivität wurde ganz offensichtlich nicht an das Anionenaustauschermaterial gebunden. Im Gegensatz hierzu war die zweite Bande, welche nahezu mit der höchsten Salzkonzentration eluiert wurde, fest an das kationische Trägermaterial gebunden.

Nach Vereinigung der jeweils aktivsten Fraktionen resultierten die zwei enzymhaltigen Fraktionen 1 und 2, bestehend aus den Fraktionen 16–22 mit 23,5 ml und 134 mg Protein (Tabelle 2), sowie der Fraktionen 36–52 mit 57 ml und 359,1 mg Protein, welche separat durch Ultrafiltration an einer PM 30-Membran konzentriert wurden. Enzymfraktion 1 bzw. 2 enthielten vor der Konzentrierung zusammen noch insgesamt 36 % (9,8 % und 26,2 %) des Gesamtproteins. Infolge des Konzentrierungsschrittes verblieben von 9,8 % des Gesamtproteins der Enzymfraktion 1 noch 5,2 % (70,7 mg) (Tabelle 2). Die ermittelten Aktivitäten wurden als 1,5 mAU

für Enzymfraktion 1 bzw. 5,6 mAU für Enzymfraktion 2 festgelegt, was noch 13 % bzw. 48,7 % der Gesamtaktivität vor dem Konzentrierungsschritt entspricht. Nach dem Konzentrierungsschritt verringerte sich die Aktivität bei Enzymfraktion 1 von 1,5 mAU (13 %) auf 0,5 mAU (4,4 %) und somit um weitere 8,6 %. Insgesamt wurde bei dieser Methode ein Verlust von 2,3 % der Gesamtaktivität vor dem Konzentrierungsschritt verzeichnet (Tabelle 2).

Da Enzymfraktion 1 nach einer Überprüfung im SDS-PAGE (3.2.9), im Unterschied zu Enzymfraktion 2, in stark angereicherter Form und als diskrete Bande erkennbar vorlag wurde im weiteren Verlauf der Reinigung mit Enzymfraktion 1 weitergearbeitet.

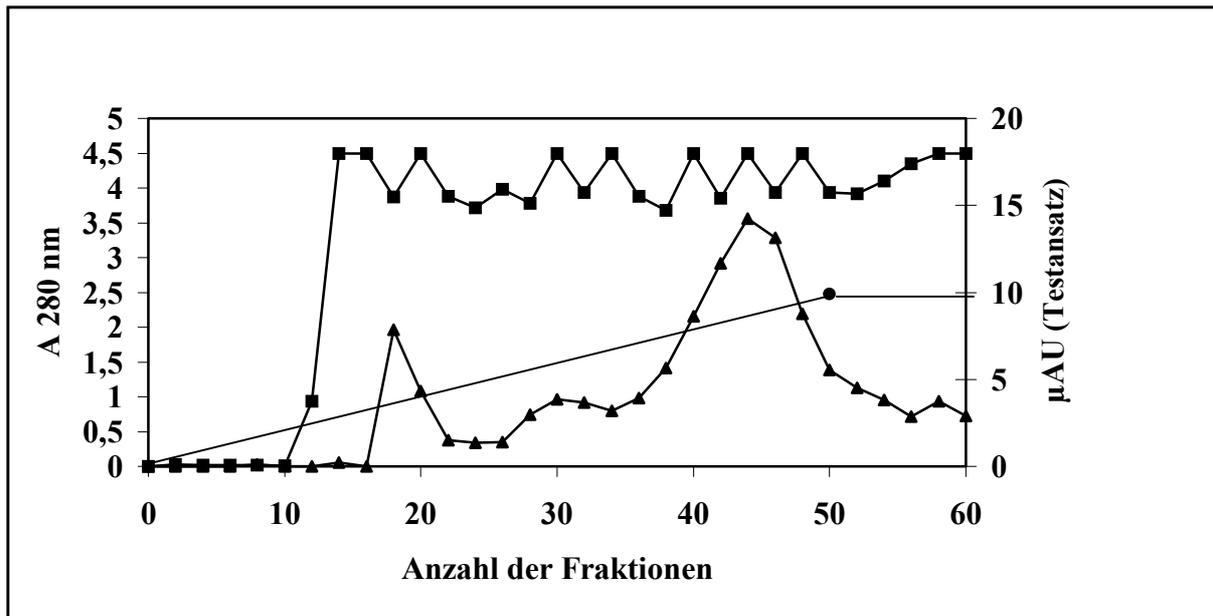


Abb.6: Anionenaustauschchromatographie des Überstands nach der Streptomycinsulfatfällung aus Zellen von *T. thermophilus* HB8 an DE52-Cellulose. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm (■), die Enzymaktivität in μAU pro Testansatz (▲) und der 0-0,5 M NaCl-Gradient in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,5 % Triton X-100 (●) in Abhängigkeit von der Anzahl der gesammelten Fraktionen. Es wurden 17 ml des eingeeengten Überstands der Streptomycinsulfatfällung mit einem Proteingehalt von 828 mg auf die Säule aufgetragen und ohne zu Spülen mit 192 ml eines 0-0,5 M NaCl-Gradienten in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,5 % Triton X-100 eluiert. Im Anschluß an den Gradienten wurde mit 0,5 M NaCl in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,5 % Triton X-100 nachgespült. Die Fließgeschwindigkeit der Säule betrug 1 ml/min. Es wurden 60 Fraktionen mit einem Volumen zu jeweils 4 ml gesammelt.

3.2.4 Gelchromatographie an Sepharose CL-6B

Die aktiven, eingeengten Proteasefraktionen der resultierenden nichtbindenden Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose wurden nach Kriterien der Molekülgröße und Molekülform an Sepharose CL-6B als stationärer Phase, mit einem Fraktionierbereich von $10 \cdot 10^3$ - 10^4 , im Anschluß an die Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt.

Abbildung 7 zeigt sowohl die Absorption bei 280 nm als auch die nach Anson kalkulierte enzymatische Aktivität der proteasehaltigen Fraktionen. Deutlich erkennbar konzentriert sich proteolytische Aktivität nun auf eine Bande mit einem Aktivitätsmaximum bei Fraktion 60, welche von weiterem Fremdprotein deutlich unterschieden werden kann. Nach Vereinigung der aktivsten Fraktionen 52–62 konnten 23 ml Enzymlösung mit einem Proteingehalt von 55,2 mg, was einem Gesamtproteingehalt von 4 % entspricht, gewonnen werden. Mit Hilfe der Ultrafiltration an einer PM 30-Membran (2.2.6.1) resultierten 1,8 ml mit 11,5 mg Protein (0,8 % Gesamtprotein) (Tabelle 2).

Für die proteolytische Aktivität wurden nach Anson 0,5 mAU vor der Konzentrierung bzw. 0,2 mAU nach erfolgter Einengung ermittelt (Tabelle 2). Somit verblieben nach dieser Methode ohne Verluste 4,4 % der Gesamtaktivität. Lediglich nach Konzentrierung der Enzymlösung war wiederum eine erhebliche Verringerung der Aktivität zu verzeichnen.

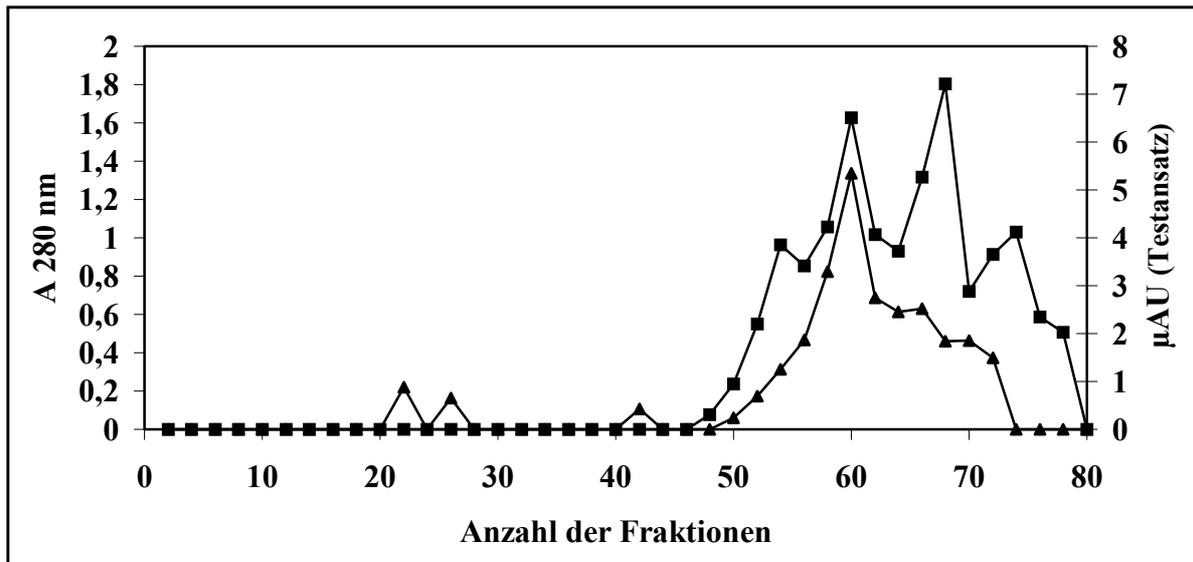


Abb.7: Gelchromatographie an Sepharose CL-6B. Auftrennung der nichtbindenden Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose aus Zellen von *T. thermophilus* HB8. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm (■) und die Enzymaktivität in μ AU pro Testansatz (▲) in Abhängigkeit von der Anzahl der gesammelten Fraktionen. Aufgetragen wurde ein Probenvolumen von 1,7 ml mit einem Gesamtproteingehalt von 70,7 mg. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, bestehend aus 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,1 % Triton X-100, betrug 1 ml/min. Es wurden 80 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 2,5 ml gesammelt.

3.2.5 Gelchromatographie an TSK G 3000 SW

Die Untersuchung der vereinigten enzymhaltigen Fraktionen nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B konnten an einem für das HPLC-System vorgesehenen Gelchromatographiematerial TSK G 3000 SW fortgesetzt werden. TSK-Gele des Typs SW sind Silikagele, welche hydrophile Oberflächen infolge zahlreicher Hydroxylgruppen besitzen. TSK G 3000 SW weist einen Fraktionierbereich von 10^3 – $300 \cdot 10^3$ auf. Abbildung 8 zeigt die bestimmte Absorption bei 280 nm von drei gesammelten Proteinbanden, welche nach abnehmender Molmasse angeordnet sind. Ferner wurde die proteolytische Aktivität für jede dargestellte Bande in Tabelle 1 dargestellt. Die Aktivitätsbestimmung nach Anson

ergab, daß die erste Bande den Hauptanteil an proteolytischer Aktivität in sich vereinigt. Ein weitaus geringerer Anteil fand sich in der zweiten und dritten Proteinbande. Ein deutlicher Nachteil der HPLC–TSK SW–Säulen bestand darin, daß nur sehr geringe Probenmengen aufgetragen werden konnten und somit die Untersuchungen lediglich in analytischem Maßstab möglich waren.

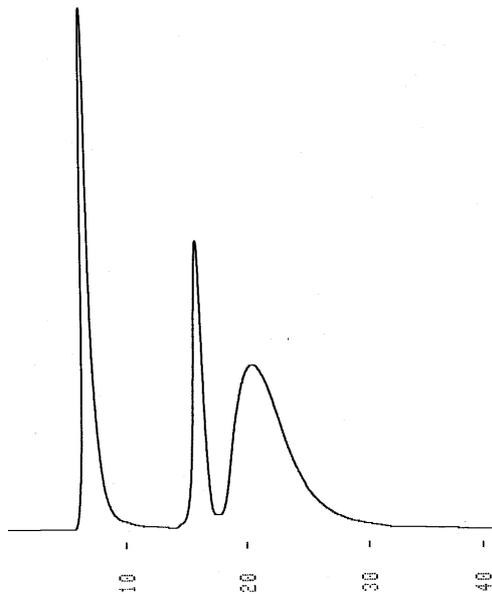


Abb.8: Gelchromatographie an TSK G 3000 SW. Aufgezeichnet wurde die Absorption bei 280 nm, nachdem 500 µl der zuvor im Verhältnis 1:200 verdünnten Enzymprobe aus Zellen von T. thermophilus HB8 nach Gelfiltration an Sepharose CL-6B injiziert wurden. Die Elution erfolgte mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 als mobiler Phase. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Es wurden drei Banden gesammelt.

Tab.1: Gelchromatographie an TSK G 3000 SW. Darstellung der ermittelten Enzymaktivitäten der drei gesammelten Banden (Abb.8) nach Anson.

	Volumen [ml]	µAU(Testansatz)	Aktivität in µAU
Bande 1	0,9	0,88	3,2
Bande 2	0,9	0,26	0,9
Bande 3	4,3	0,04	0,7

3.2.6 Gelchromatographie an Sephadex G-25

Die Behandlung von Protein mit 8 M Harnstoff und β -Mercaptoethanol bewirkt in allen Fällen die Denaturierung des Proteins, welche in einigen wenigen Fällen nach geeigneter Abtrennung der Reagenzien wieder rückgängig gemacht werden kann. Im einzelnen bewirkt die Behandlung der angereicherten Enzymprobe mit 8 M Harnstoff eine partielle Entknäuelung der Polypeptidketten. Diese nehmen infolge willkürlich zustandekommender Wechselwirkungen oder Verknüpfungen eine vom Zufall bestimmte Konfiguration ein. Der Zusatz des Reagenzes β -Mercaptoethanol begünstigt die Reduktion von Disulfidbrücken zwischen Cysteinketten, was zur Lösung von Tertiär- und/oder Quartärstruktur beiträgt. Diese strukturelle Veränderung führt zum Verlust der biologischen Funktion und somit im gegebenen Fall zum Verlust der enzymatischen Hydrolyse.

Am Beispiel der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 konnte gezeigt werden, daß nach Abtrennung von β -Mercaptoethanol und Harnstoff mit Hilfe einer Gelchromatographie an Sephadex G-25 mit einem Fraktionierbereich von 10^3 – $5 \cdot 10^3$ die enzymatische Aktivität nach anschließender Reoxidation der Sulfhydrylgruppen in Anwesenheit von Luftsauerstoff wieder gegeben war.

In Abbildung 9 ist sowohl die gemessene Absorption bei 280 nm als auch die nach Anson bestimmte Enzymaktivität nach Rückfaltung des Enzyms dargestellt. Enzymhaltige Fraktionen konnten sehr deutlich von später auftretenden Harnstoff- und β -Mercaptoethanolfraktionen (ab Fraktion 43) getrennt werden. Die aktiven Fraktionen 24–30 sowie 34–41 wurden zu einer Enzymfraktion vereint und an einer YM 3-Membran mit Hilfe der Ultrafiltration (2.2.6.1) eingeeengt. Von 500 μ l der eingeeengten Enzymfraktion nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B mit einem Proteingehalt von 3,2 mg konnten 36 μ g an aktivem Enzym zurückgewonnen werden. Somit wurden durch Addition mehrerer solcher Durchläufe von 11,5 mg an eingesetztem Protein insgesamt 130 μ g (1,1 %) der aktiven und spontan rückgefalteten

Protease ohne Zuhilfenahme von Hilfsproteinen zurückgewonnen. Mit der Anson-Methode wurden 0,01 mAU bestimmt, was einem Prozentsatz an proteolytischer Aktivität von 5 entspricht (Tabelle 3).

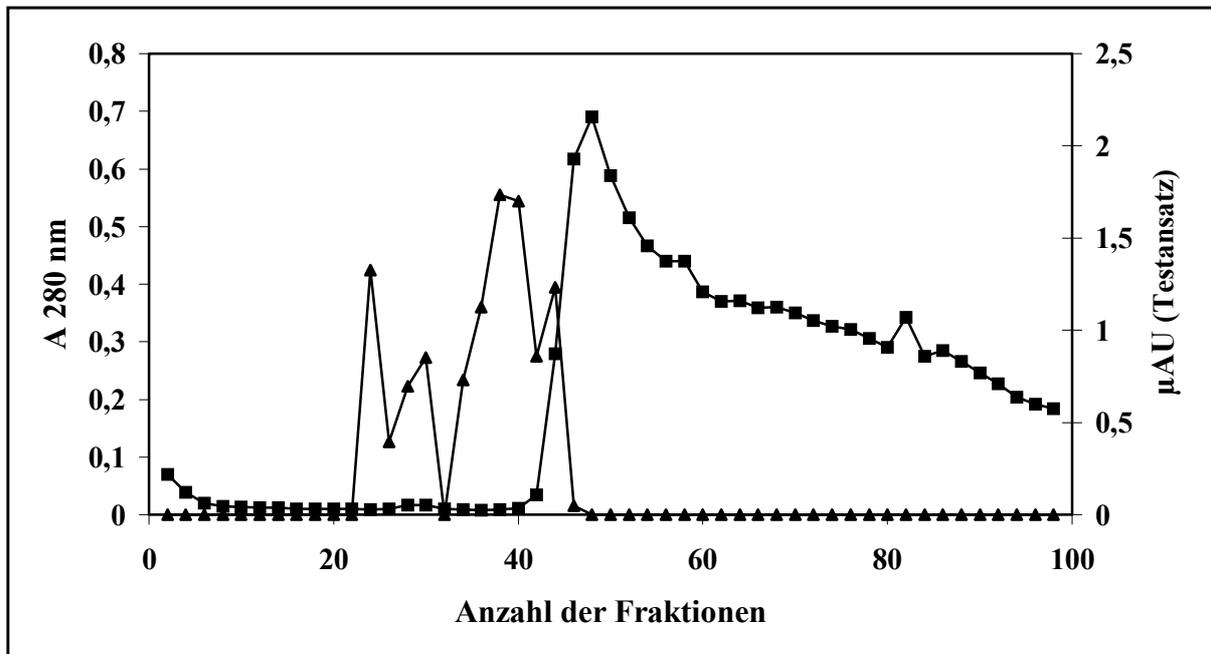


Abb.9: Gelchromatographie einer mit 8 M Harnstoff und β -Mercaptoethanol denaturierten Enzymprobe aus *T. thermophilus* HB8 an Sephadex G-25 zur Abtrennung der denaturierend wirkenden Reagenzien. Für den Denaturierungsansatz wurden 500 μ l der nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B gewonnenen Enzymprobe, eines Proteingehalts von 3,2 mg, mit 1,4 ml 8 M Harnstoff, 50 μ l β -Mercaptoethanol sowie einiger Tropfen 5 % Methylaminhydrochlorid gemischt. Der Versuchsansatz verblieb für 4-5 Stunden bei Raumtemperatur. Als mobile Phase wurde 0,1 M Essigsäure pH 3,5 und eine Flußrate von 1ml/min gewählt. Das Volumen der gesammelten Fraktionen belief sich nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 mit 0,5 M NaOH auf 1,9 ml pro Fraktion. Die gesammelten Fraktionen verblieben über einen Zeitraum von mindestens 20 Stunden in geöffnetem Zustand bei Raumtemperatur. Nach so erfolgtem Luftsauerstoffzutritt wurde die Absorption bei 280 nm (■) als auch die Enzymaktivität (▲) bestimmt.

3.2.7 Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

Eine Alternative zur Abtrennung von Fremdprotein unter denaturierenden Bedingungen gemäß 2.2.4.4 nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B wurde in der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation gesehen. Unter Verwendung eines 5-20 % Saccharose-Dichtegradienten basierte die Trennung der Makromoleküle auf ihren molaren Massen und dem Reibungswiderstand. Die Absorptionen bei 280 nm, die proteolytischen Aktivitäten pro Testansatz in Abhängigkeit der Fraktionen und der 5-20%ige Saccharose-Gradient sind aus Abbildung 10 zu entnehmen.

Es sind mehrere Proteinbanden mit proteolytischer Aktivität zu erkennen. Sie wurden durch Vereinigung der Fraktionen (1-5), (8-10), (14-17 und 21-30) als Enzymfraktionen 1, 2 und 3 eingeteilt. Die Proteinbestimmung nach Bradford (2.2.7.1) ergab, daß von eingesetzten 190 µg Protein 27 µg, 23 µg und 115 µg auf die Enzymfraktionen 1-3 in genannter Reihenfolge verteilt wurden. Durch Addition mehrerer solcher Läufe erhält man bei 11,5 mg Ausgangsprotein (Tabelle 2) rechnerisch die in Tabelle 3 dargestellten Werte. Der Grund für diese Auftrennung, der schon mit Hilfe zweier Säulenschritte angereicherten Proteasefraktion in 3 Fraktionen unterschiedlicher Größe ist hier zunächst nicht klar erkennbar. Infolge der geringen Volumina, 130 µl pro Fraktion, war eine Bestimmung der proteolytischen Aktivität der vereinigten Enzymfraktionen 1-3 nach Messung der einzelnen Fraktionen mit der darüber hinaus noch sehr unspezifischen Anson-Hämoglobin-Methode nicht mehr möglich.

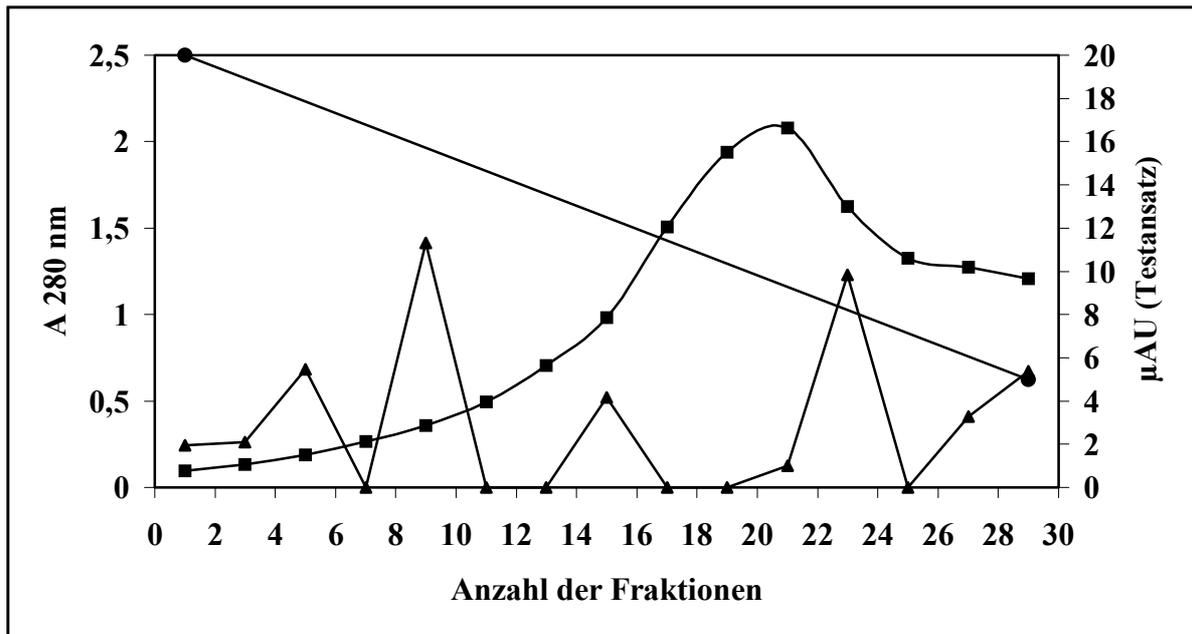


Abb.10: Auftrennung der angereicherten Enzymprobe aus Zellen von *T. thermophilus* HB8 mit Hilfe der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation unter Verwendung eines 5-20 % Saccharose-Dichtegradienten. Dargestellt sind die Absorptionen bei 280 nm (■), die proteolytischen Aktivitäten pro Testansatz in μAU (▲) und der in umgekehrter Reihenfolge aufgetragene (20-5 %) Saccharose-Dichtegradient (●). Es wurden $130 \mu\text{l}$ der nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B erhaltenen Enzymfraktion mit einem Proteingehalt von $190 \mu\text{g}$ auf einen 5-20 % Saccharose-Dichtegradienten (5 ml) aufgetragen. Die Zentrifugationsdauer betrug 195 Minuten bei 50000 U/min. Die Fraktionierung des Saccharose-Dichtegradienten erfolgte in absteigender Weise, d.h. von hohen zu niedrigen Konzentrationen. Gesammelt wurden 30 Fraktionen zu $130 \mu\text{l}$.

3.2.8 Reinigungstabellen

Das angewandte Reinigungsverfahren zur Anreicherung von Proteaseaktivitäten ist in nachfolgender Tabelle 2 dargestellt. Ausgehend vom Enzymrohextrakt mit 1369 mg Gesamtprotein und proteolytischer Aktivitäten von 11,5 mAU wurden 38 % des Gesamtproteins infolge der Streptomycinsulfatfällung abgetrennt. Gleichzeitig war damit eine Verringerung der vorliegenden Aktivitäten um 20,9 % verbunden. Durch die Konzentrierung des resultierenden Fällungsüberstands an PM 30-Membranen wurden weitere 1,5 % Gesamtprotein und somit insgesamt 39,5 % abgetrennt. Zusätzlich trat ein Verlust an Aktivität von 15,6 % auf, insgesamt 36,5 %. Infolge der, mit dieser Methode verbundenen Aktivitätsverluste war nur eine geringe Zunahme der spezifischen Aktivität erkennbar. Mit der Ionenaustauschchromatographie wurden die Aktivitäten in zwei proteolytisch aktive Enzymfraktionen mit 9,8 % (Enzymfraktion 1) und 26,2 % (Enzymfraktion 2) Gesamtprotein aufgeteilt. Da die Ausgangsaktivität (7,3 mAU) nahezu verlustlos auf Enzymfraktion 1 (1,5 mAU) und Enzymfraktion 2 (5,6 mAU) aufgeteilt wurde, bei gleichzeitiger Abtrennung von 24,5 % Gesamtprotein, war ein Anstieg der spezifischen Aktivität, 11,2 und 15,6, erkennbar.

Alle nachfolgend aufgeführten Methoden in Tabelle 2 und Tabelle 3 wurden auf die resultierende Enzymfraktion 1 nach Ionenaustauschchromatographie angewandt. Die Konzentrierung von Enzymfraktion 1 war wieder mit Verlusten sowohl an Protein als auch an Aktivität verbunden. Es verblieben von 134 mg Gesamtprotein 52,8 % (70,7 mg) mit einer Aktivität von 33,3 % (0,5 mAU). Mit Hilfe der Gelchromatographie blieb die Aktivität bei Abtrennung von 22 % des vorliegenden Proteins vollständig erhalten. Der daran anschließende Konzentrierungsschritt brachte wieder Verluste an Protein und Aktivität.

Die vollständige Reindarstellung dieser proteolytisch aktiven Fraktion gelang sowohl mit dem Denaturierungs- und Renaturierungsschritt als auch mit Ultrazentrifugation (Tabelle 3). So verblieben von eingesetzten 11,5 mg Gesamtprotein 130 µg (1,1 %) mit einer Aktivität von 0,01 mAU (5 %) nach Denaturierung. Hingegen resultierten

nach Ultrazentrifugation von 11,5 mg zwei reine Fraktionen (Enzymfraktion 1 und Enzymfraktion 2) mit 13,9 % (1,6 mg) und 12,2 % (1,4 mg) Gesamtprotein (Tabelle 3).

Tab.2: Übersicht der Anreicherung einer intrazellulären Protease aus *T. thermophilus* HB8.

Reinigungs- Methode	Vol [ml]	Protein [mg/ml]	Protein [mg]	Aktivität [mAU]	Spez. Aktivität [mAU/g]	Reinigungs- grad	Ausbeute [%]
Rohextrakt	37	37	1369	11,5	8,4	1	100
Streptomycin- sulfatfällung	47	18	846	9,1	10,8	1,3	79,1
Ultrafiltration Streptomycin- sulfatfällung	17	48,7	828	7,3	8,8	1,1	63,5
Ionenaustauscher Enzymfraktion 1	23,5	5,7	134	1,5	11,2	1,3	13
Ultrafiltration Ionenaustauscher Enzymfraktion 1	1,7	41,6	70,7	0,5	7,1	0,9	4,4
Ionenaustauscher Enzymfraktion 2	57	6,3	359,1	5,6	15,6	1,9	48,7
Gelchromato- graphie	23	2,4	55,2	0,5	9,1	1	4,4
Ultrafiltration Gelchromato- graphie	1,8	6,4	11,5	0,2	17,4	2,1	1,7

Tab.3: Übersicht der Reinigung einer intrazellulären Protease aus *T. thermophilus* HB8.

Reinigungs- methode	Vol [ml]	Protein [mg/ml]	Protein [mg]	Aktivität [mAU]	Spez. Aktivität [mAU/g]	Reinigungs- grad	Ausbeute [%]
Denaturierung / Renaturierung	5,4	0,02	0,13	0,01	77	9,2	0,1
Ultrazentri- fugation Enzymfraktion 1	1	1,6	1,6	n. m.	n. m.	n.m.	n. m.
Enzymfraktion 2	1	1,4	1,4	n. m.	n. m.	n.m.	n. m.
Enzymfraktion 3	1	7	7	n. m.	n. m.	n.m.	n. m.

3.2.9 Diskontinuierliche SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Überprüfung der angewandten Methoden im Verlauf der Reindarstellung der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 nach Kriterien der Reinheit erfolgte anhand der diskontinuierlichen SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese.

So wurden die denaturierten Proben der einzelnen Reinigungsschritte im Vergleich mit einem Proteinstandardgemisch in einem Trenngel mit 10 % Acrylamid getrennt. Abbildung 11 zeigt das Elektropherogramm mit den erhaltenen Auftrennungen nach Silberfärbung. Der in Abbildung 11(A) gewählte Proteinstandard war aus einem Gemisch 12 rekombinanter Proteine der molaren Massen 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150 und 200 kDa zusammengesetzt. Abbildung 11(B) zeigt die von der Firma vorgegebene Auftrennung der Standardbanden mit zugeordneter Molmasse. Die Proben in Abbildung 11(A) sind in folgender Reihenfolge dargestellt. Von links nach rechts wurden das Proteinstandardgemisch (1), die Probe nach dem Renaturierungsschritt (2), die resultierende Probe nach der Gelchromatographie an Sepharose CL-6B nach Ultrafiltration (3) und in nicht konzentrierter Form (4),

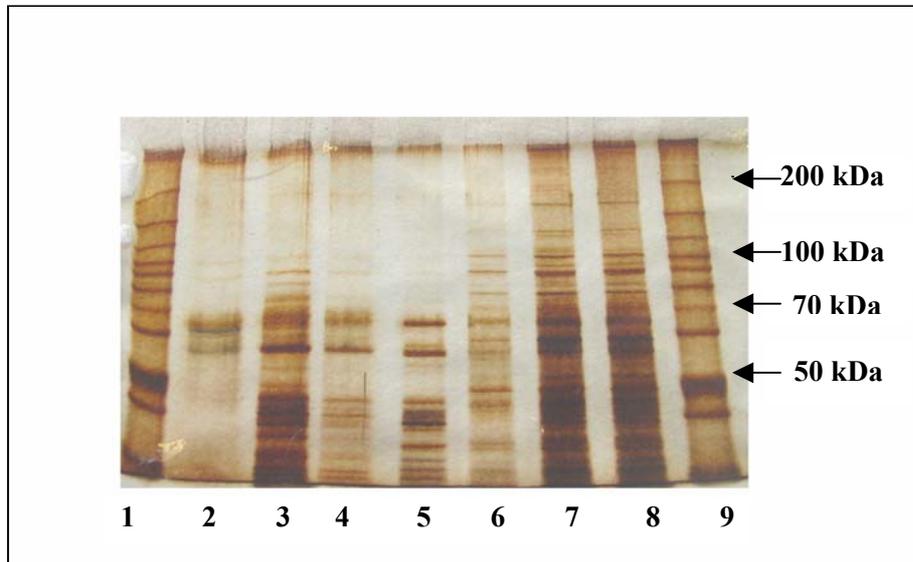
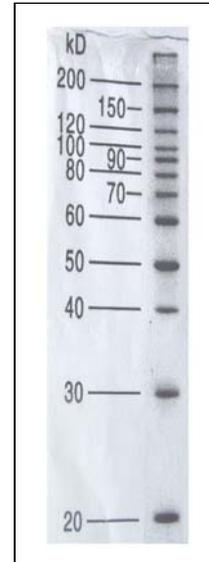
Enzymfraktion 1 (5) und Enzymfraktion 2 (6) nach Anionenaustauschchromatographie, der Überstand der Streptomycinsulfatfällung (7), der Rohextrakt (8) und nochmals der Proteinstandard (9) aufgetragen.

Ziel der Reinigung war es eine reine Proteasebande zu erhalten. Der Reinigungseffekt ist deutlich zu erkennen. Die Auftrennung des Rohextrakts verglichen mit der des Überstands der Streptomycinsulfatfällung zeigte hinsichtlich des Proteins keine wesentlichen Unterschiede. Hingegen differierten Enzymfraktion 1 und Enzymfraktion 2 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose, worauf schon aufgrund des unterschiedlichen Bindungsverhaltens hingewiesen wurde. Die erste Enzymfraktion wies, im Gegensatz zur zweiten, im oberen Bereich von 70–200 kDa keine Fremdproteinbanden auf. Die Auftrennung von Enzymfraktion 1 nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B zeigte eine Verringerung von Fremdproteinbanden im unteren Bereich bis 50 kDa. Mit dieser Chromatographie konnte ein Großteil der gelben Fraktion abgetrennt werden (Carotinoide), welche zuvor stets mit der enzymhaltigen Fraktion auftrat.

Die für zahlreiche Anwendungen geforderte absolute Reinheit der Protease konnte prinzipiell durch Denaturierung mit Harnstoff und β -Mercaptoethanol und anschließender Renaturierung, infolge Abtrennung dieser Reagenzien erreicht werden. Abbildung 12(A) zeigt im Vergleich mit einem zweiten Proteinstandard eine diskrete Hauptbande im Bereich von 60-70 kDa, welche der Protease zuzuordnen ist. Der Proteinstandard, bestehend aus 13 Proteinen mit den Molmassen 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 und 200 kDa ist in Abbildung 12(B) nach Firmenangabe dargestellt.

Ferner gelang dies unter nativen Bedingungen mit Hilfe der Saccharose-Gradientenzentrifugation (Abb.13). Enzymfraktion 1 und 2, welche die höchsten Saccharosekonzentrationen innerhalb des Gradienten aufwiesen, zeigten die Hauptbande bei 60-70 kDa. Die Enzymfraktion mit der niedrigsten Saccharosekonzentration zeigte neben der Hauptbande zusätzliche Proteinbanden

darunter. Die Auftrennung der drei Fraktionen wurde im Vergleich mit dem in 11(B) erläuterten Standard dargestellt.

A**B**

*Abb.11: Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Überprüfung der angewandten Methoden im Verlauf der Reindarstellung der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8. Die Proben wurden mit demselben Volumen an SDS-Probenpufferlösung sowie 1/10 Volumen Bromphenolblaulösung gemischt und für 10 Minuten gekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 10 % Trenngel und durch Anlegen einer Stromstärke von 28 mA. In Abbildung 11(A) ist rechts und links ein Proteinstandardgemisch aufgetragen (1), (9). Die von der Firma vorgeschlagene Auftrennung der Banden und die entsprechenden zugehörigen Molmassen sind in 11(B) dargestellt. So erfolgt von 20-100 kDa eine Auftrennung im Abstand von 10 kDa. Von den denaturierten Proteinproben der einzelnen Reinigungsschritte wurden 1,2 µg der Probe nach dem Renaturierungsschritt (2), 3,2 µg der konzentrierten Probe nach Gelchromatographie (3), 1,2 µg der nicht konzentrierten Probe nach Gelchromatographie (4), 0,7 µg der Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose (5), 0,2 µg der Enzymfraktion 2 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose (6), 1,5 µg des Überstands der Streptomycinsulfatfällung (7), 1,1 µg Rohextrakt (8) aufgetragen. Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.*

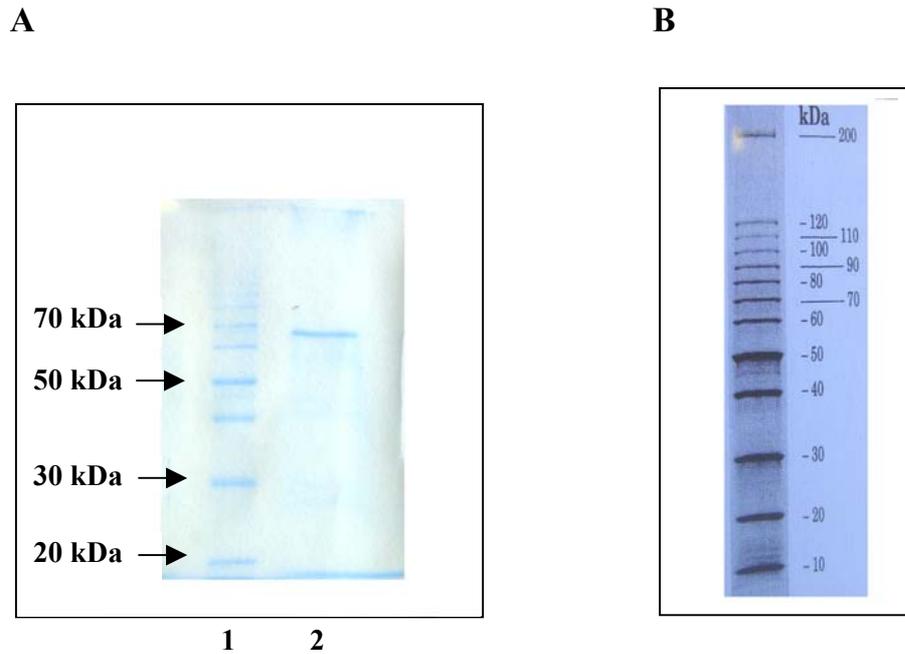


Abb.12: Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Sephadex G-25. Es wurden $2,5 \mu\text{g}$ des reinen Enzyms (2) im Vergleich mit einem Proteinstandard (1) nach Färbung mit Coomassie Brilliantblau R 250 dargestellt (A). (B) zeigt separat den in (2) aufgetragenen Standard zur Verdeutlichung der Größenverhältnisse nach Firmenangabe.

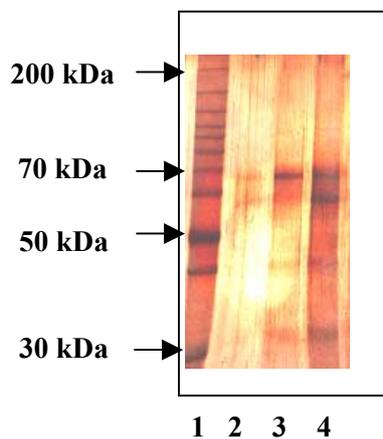


Abb.13: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Ultrazentrifugation. Links ist der in 11(B) erläuterte Proteinstandard (1), gefolgt von $0,7 \mu\text{g}$ der Enzymfraktion 1 (2), $1 \mu\text{g}$ der Enzymfraktion 2 (3), und $1,2 \mu\text{g}$ von Enzymfraktion 3 (4) nach Ultrazentrifugation aufgetragen. Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.2.10 Nicht-dissoziierende und diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine zusätzliche Überprüfung der angewandten Methoden zur Reinheitsbestimmung erfolgte mit einem nicht-dissoziierenden und diskontinuierlichen Puffersystem, bei welchem sowohl nach Größe als auch nach Ladung getrennt wurde. Die Auftrennung der Proteinproben wurde in einem 7,5%igen Trenngel pH 8,8 vorgenommen. In Abbildung 14 ist von links nach rechts die Auftragung von 0,4 μg der Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose und 1,2 μg der angereicherten Enzymprobe der Gelchromatographie an Sepharose CL-6B aufgetragen. Auffällig war, daß bei keiner der angereicherten Proben eine klare Trennung zustande kam. Ein großer Anteil des Proteins verblieb komplett zwischen Sammelgel und Trenngel, der Rest bildete einen Film zwischen tatsächlich trennbaren Proteinbanden. Dieses System erwies sich somit wohl aufgrund ungewöhnlicher Ladungseffekte als völlig unzureichend, so daß keine Aussagen bezüglich des Reinheitsgrades möglich waren.

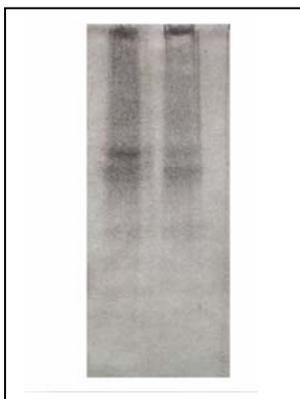


Abb.14: Nicht-dissoziierende und diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese des angereicherten proteolytischen Enzyms aus T. thermophilus HB8. Die Trennung wurde in einem 7,5 % Acrylamidgel pH 8,8 vorgenommen. Von links nach rechts sind 0,4 μg der enzymhaltigen Bande nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose und 1,2 μg nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B aufgetragen. Die Proteine wurden mit der Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.3 Entwicklung eines Aktivitätstests für die isolierte Protease aus *T. thermophilus* HB8

3.3.1 Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit synthetischen Substraten

Da natürliche Substrate wie Hämoglobin und Casein zahlreiche zugängliche Peptidbindungen besitzen, eignen sie sich in erster Linie zur unspezifischen Erfassung jeglicher Proteaseaktivitäten, gerade im Verlauf des Reinigungsprozesses. Zur Untersuchung und Charakterisierung der Spezifität in vergleichenden und kinetischen Studien hingegen sollte ein Substrat mit klar definierter Peptidbindung eingesetzt werden. Für diese Untersuchungen kommen synthetische Substrate in Frage, welche aus einzelnen Aminosäuren oder Peptiden bestehen und über ihre α -Carboxylgruppe mit primären, chromophoren oder fluorophoren Aminen oder mit Alkoholen verbunden sind. Entsprechend ihrer Schutzgruppe werden sie in drei Kategorien als Endopeptidase-, Aminopeptidase- und Carboxypeptidasesubstrate eingeteilt.

Die zeitabhängigen Enzymtests basieren darauf, daß infolge proteolytischer Aktivität die Freisetzung des Chromophors oder Fluorophors durch Hydrolyse des Esters bzw. des Säureamids erfolgt, welche proportional der gemessenen Absorption oder Emission ist. Im Hinblick auf die Entwicklung eines geeigneten Aktivitätstests für die gereinigte Protease aus *T. thermophilus* HB8 wurde eine Vielzahl von Substraten, welche sich bezüglich ihrer Art und Anzahl der Aminosäurereste sowie der Schutzgruppen unterschieden, hinsichtlich ihrer enzymatischen Hydrolysierbarkeit geprüft.

Tabelle 4 zeigt eine Auflistung und Bewertung der überprüften Substrate. Für die Festlegung der Substratspezifität der isolierten Protease wurden zunächst Verbindungen mit dem aromatischen Aminosäurerest Phenylalanin als Substrat für chymotrypsinähnliche Proteasen, innerhalb der Klasse der Serinproteasen, sowohl als Endopeptidase- als auch als Aminopeptidasesubstrat verbunden mit chromophorem oder fluorophorem Amin eingesetzt. Als weiteres Substrat unter Beteiligung des aromatischen Aminosäurerestes Tyrosin, verbunden mit einer Ethylester-Schutzgruppe, sollte neben der Proteinaseaktivität auch Esteraseaktivität anzeigbar sein. Ferner wurden Substrate überprüft, welche innerhalb der Serinproteasen durch trypsinähnliche Enzyme bevorzugt unter Beteiligung des basischen Aminorestes Arginin hydrolysiert werden. Zusätzlich konnte ein spezifisches Substrat für neutrale Proteasen, unter Beteiligung eines Leucinrestes und einer Amid-Schutzgruppe, untersucht werden.

Als hydrolysierbare Substrate erwiesen sich das Aminopeptidasesubstrat Ala-Ala-Phe-AMC und das Endopeptidasesubstrat Glutaryl-Phe-AMC. Die eingesetzten Konzentrationen waren 10-550 μM für das Substrat Ala-Ala-Phe-AMC und 0,15 mM-1,15 mM für Glutaryl-Phe-AMC (Tabelle 4). Bei beiden Verbindungen wird durch die entsprechende proteolytische Aktivität 7-Amino-4-methyl-cumarin freigesetzt, welches stark fluoresziert. Die Anregung dieser Verbindungen erfolgte bei 380 nm und die Emission wurde bei 440 nm gemessen. Enzymhaltige Proben und die entsprechenden Leerwerte wurden in Abhängigkeit von der Zeit bei 70°C inkubiert (2.2.9.2f).

Nicht hydrolysiert wurden die zwei Endopeptidasesubstrate Succinyl-Phe-p-nitroanilid (1,3 mM) und Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid (0,8 mM), gleichfalls unter Beteiligung von Phenylalanin, welche jedoch eine p-Nitroanilin-Schutzgruppe trugen (Tabelle 4). Der Nachweis proteolytischer Aktivität mit diesen Substraten erfolgte spektroskopisch durch Messung des Chromophors p-Nitroanilin infolge einer Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm und 70°C.

Auch Esteraseaktivität, unter Zuhilfenahme eines Endopeptidasesubstrats mit Tyrosinrest und Ethylester-Schutzgruppe, N-Benzoyl-Tyr-ethylester (0,25 mM), konnte nicht nachgewiesen werden (Tabelle 4). Die Reaktion sollte sich infolge einer Zunahme der Absorption bei 256 nm und 70°C abzeichnen.

Trypsinähnliche Spezifitäten konnten unter Verwendung zweier Substrate mit basischen Argininresten verbunden mit p-Nitroanilin- bzw. Ethylester-Schutzgruppe, N-Benzoyl-DL-Arg-p-nitroanilid (4 mM) und N-Benzoyl-DL-Arg-ethylester (10 mM), nicht bewiesen werden (Tabelle 4).

Das spezifische Substrat für neutrale Proteasen, Furylacryloyl-Gly-Leu-amid (2,5 mM) wurde gleichfalls nicht umgesetzt (Tabelle 4). Der Nachweis der Hydrolyse wurde spektroskopisch durch Messung der Absorptionsabnahme bei 345 nm und 70°C geführt.

Tab.4: Auflistung und Bewertung synthetischer Substrate unterschiedlicher Aminosäure-zusammensetzung und unterschiedlicher Schutzgruppen in Abhängigkeit ihrer Hydrolysierbarkeit durch die Protease aus *T. thermophilus* HB8. Meßbare proteolytische Aktivitäten wurden mit (+) gekennzeichnet, nicht umgesetzte Substrate wurden mit (-) bewertet.

Name des Substrats	Konzentration	Bewertung
Ala-Ala-Phe-AMC	10-550 µM 5-255 µg/ml	+
Glutaryl-Phe-AMC	0,15-1,15 mM 65-500 µg/ml	+
Succinyl-Phe-p-nitroanilid	1,3 mM 0,5 mg/ml	-
Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilid	0,8 mM 0,5 mg/ml	-
N-Benzoyl-DL-Arg-p-nitroanilid	4 mM 1,7 mg/ml	-
N-Benzoyl-DL-Arg-ethylester	10 mM 3,4 mg/ml	-
N-Benzoyl-Tyr-ethylester	0,25 mM 80 µg/ml	-
Furylacryloyl-Gly-Leu-amid	2,5 mM 0,7 mg/ml	-

3.3.2 Vergleich der Substrate Glutaryl-Phe-AMC und Ala-Ala-Phe-AMC

Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, wurden lediglich die beiden Peptide, welche mit 7-Amino-4-methyl-cumarin verbunden waren, durch die isolierte Protease aus

T. thermophilus HB8 hydrolysiert. Dieser Sachverhalt wurde zunächst in Abhängigkeit unterschiedlicher Puffersysteme untersucht. Ein quantitativer Vergleich der Substrate bzgl. ihrer Umsetzbarkeit erfolgte schließlich in gleichen und somit vergleichbaren Puffersystemen. Das Substrat Glutaryl-Phe-AMC konnte gemäß 2.2.9.3 in 0,2 mol/l Triethanolamin-HCl pH 7,5 gelöst werden. In Abbildung 15 ist die erzielte Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 70°C dargestellt. Hieraus ist zu ersehen, daß die relative Fluoreszenz kontinuierlich mit der Inkubationszeit zunimmt. Ein linearer Zusammenhang zwischen relativer Fluoreszenz und der Inkubation bei 70°C war über einen Zeitraum von mehr als zwei Stunden gegeben.

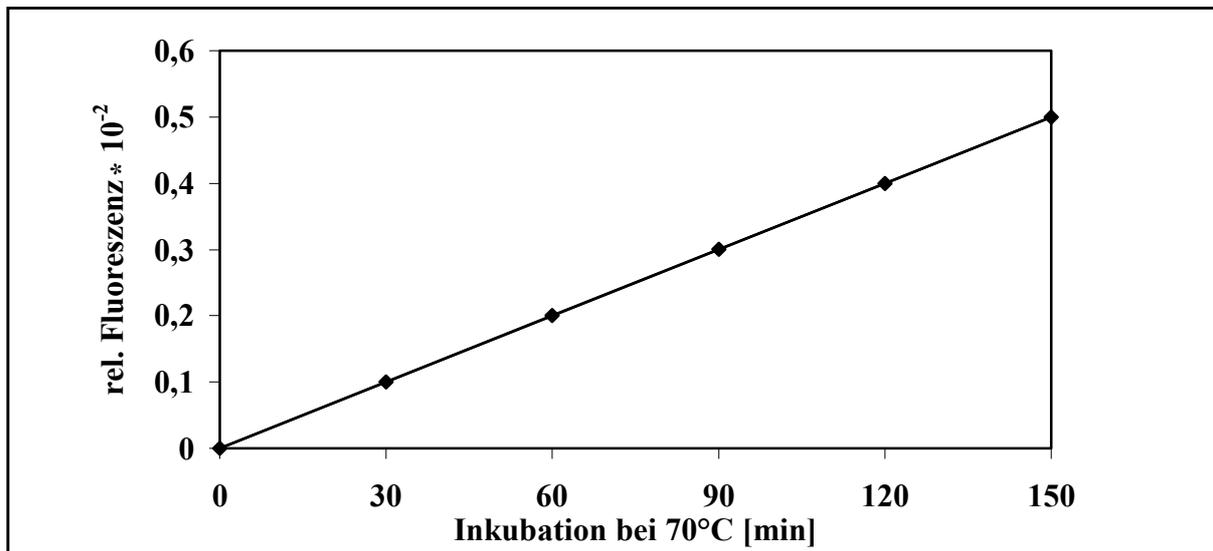


Abb.15: Relative Fluoreszenz infolge enzymatischer Hydrolyse von Glutaryl-Phe-AMC durch die isolierte Protease aus *T. thermophilus* HB8 und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 70°C. Die eingesetzten Volumina des Testsystems waren 1850 µl 0,2 mol/l Triethanolamin-HCl pH 7,5, 500 µl des in 0,2 mol/l Triethanolamin-HCl pH 7,5 gelösten Substrats (1mg/ml) und 150 µl des nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B erhaltenen Enzyms mit einem Proteingehalt von 225 µg. Die Anregung der Verbindung erfolgte bei 380 nm, die Emission wurde als relative Fluoreszenz bei 440 nm bestimmt.

Im Gegensatz hierzu blieb Ala-Ala-Phe-AMC in dem beschriebenen Triethanolamin-HCl-Puffersystem nach 2.2.9.3 bei 70°C nicht in Lösung, sondern fiel schon nach geringsten Inkubationszeiten bei 70°C aus. Die Lösung des Substrats erfolgte somit in einem Methanol-Kaliumphosphatsystem, welches zusätzlich 0,03 % des nichtionischen Detergenzes Triton X-100 enthielt und den erforderlichen Temperaturen und Inkubationszeiten entsprach (2.2.9.2). Abbildung 16 zeigt analog die erzielte relative Fluoreszenz mit Ala-Ala-Phe-AMC in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 70°C.

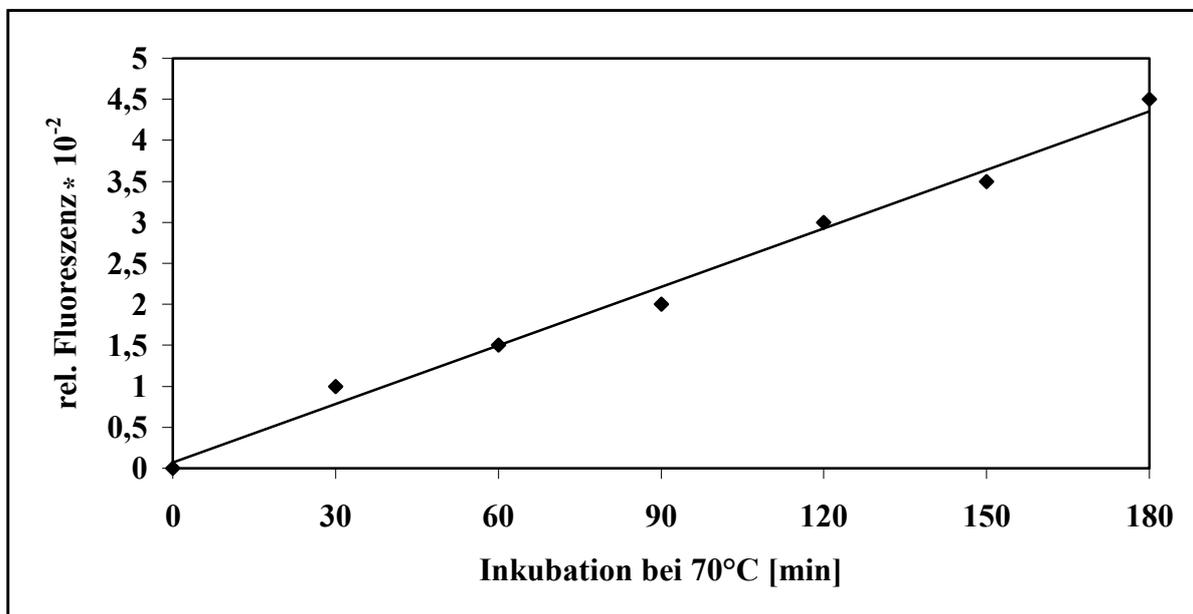


Abb.16: Relative Fluoreszenz infolge enzymatischer Hydrolyse von Ala-Ala-Phe-AMC mit Hilfe der isolierten Protease aus T. thermophilus HB8 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 70°C. Die Volumina des Testsystems waren 2450 µl Ala-Ala-Phe-AMC-Lösung und 50 µl Enzymlösung mit einem Proteingehalt von 225 µg. Die Substratlösung bestand aus 1 mg des Peptids, das in 500 µl Methanol und 12 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,03 % Triton X-100 gelöst wurde. Die Anregung der 7-Amino-4-methyl-cumarin-Verbindung erfolgte bei 380 nm, die Emission wurde bei 440 nm als relative Fluoreszenz bestimmt.

Da ein direkter Vergleich der Substrate miteinander nur in gleichen Puffersystemen möglich ist wurde als weiterer Schritt die Lösbarkeit von Glutaryl-Phe-AMC in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,03 % Triton X-100 überprüft. Der Vorversuch zeigte, daß das Substrat über den erforderlichen Inkubationszeitraum bei 70°C in Lösung gehalten werden konnte. In Abbildung 17 und 18 ist die erzielte relative Fluoreszenz der beiden Substrate vergleichsweise unter identischen Versuchsparametern dargestellt.

Aus Abbildung 17 ist zu ersehen, daß die relative Fluoreszenz durch enzymatische Hydrolyse von Glutaryl-Phe-AMC bis zu einer Inkubationszeit von 30 Minuten anstieg. Ab diesem Zeitpunkt war jedoch keine Zunahme der relativen Fluoreszenz in diesem System mehr zu beobachten, was auf eine Fluoreszenzlöschung hinweist. Die gemessene AMC-Fluoreszenz blieb somit im wesentlichen konstant.

Abbildung 18 hingegen zeigt eine konstante Zunahme der relativen Fluoreszenz unter Einsatz von Ala-Ala-Phe-AMC. Ein deutlich linearer Kurvenverlauf kennzeichnet das Ergebnis während eines Inkubationszeitraums von 120 Minuten. Ferner liegen die bestimmten Werte zum Zeitpunkt 30 Minuten im Anfangsbereich höher als bei vergleichender Messung mit Glutaryl-Phe-AMC.

Aus angeführten Gründen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit, im Besonderen für kinetische Messungen, das sensitivere Substrat Ala-Ala-Phe-AMC verwendet.

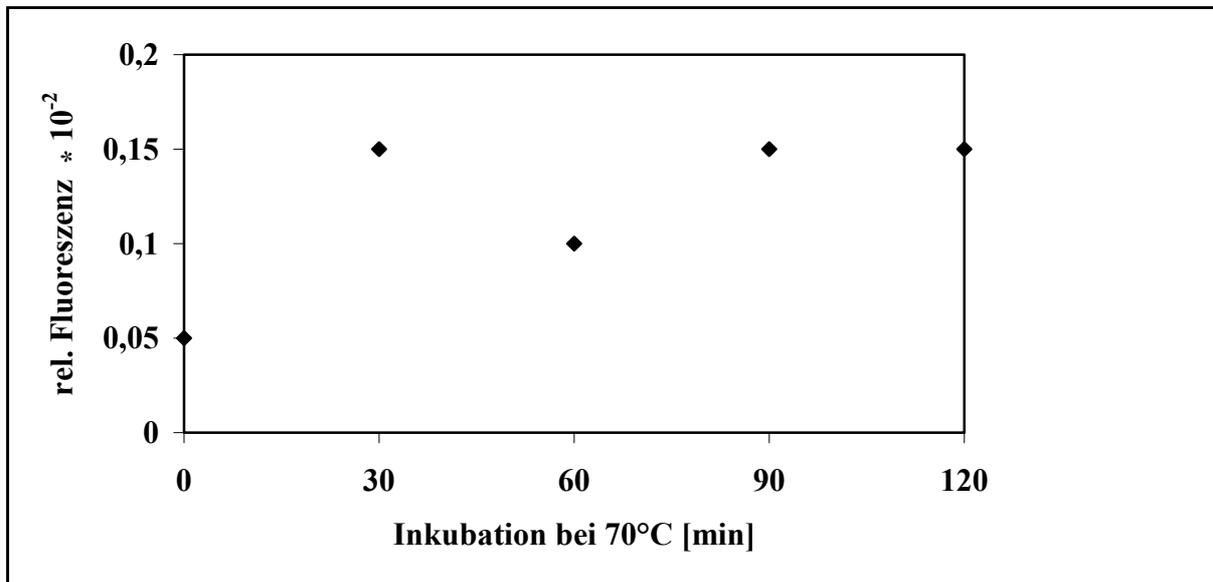
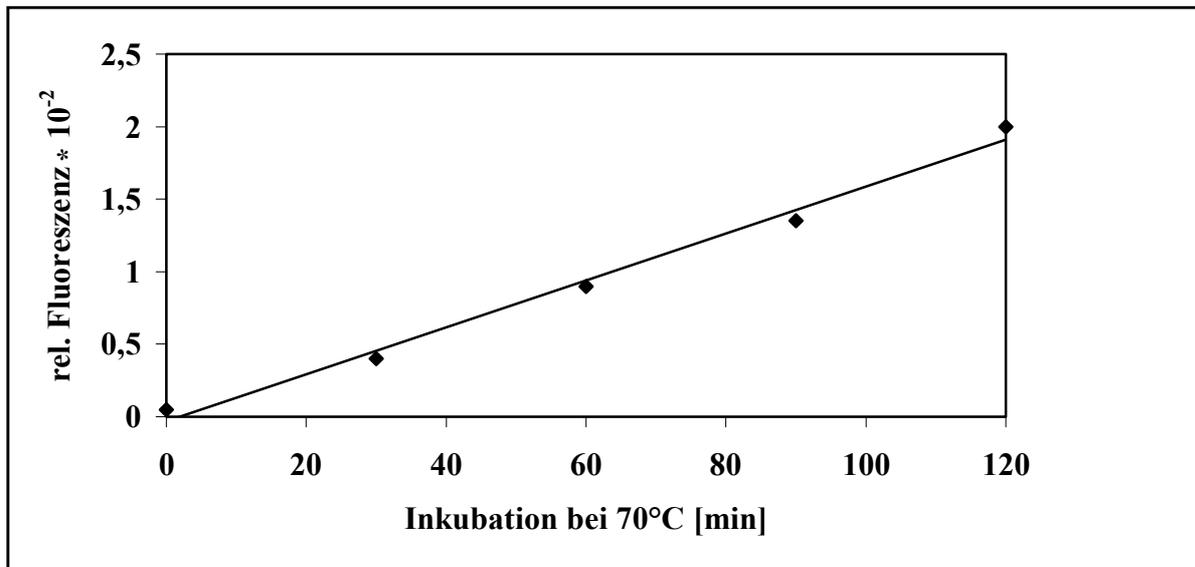


Abb.17: Relative Fluoreszenz infolge der enzymatischen Hydrolyse von Glutaryl-Phe-AMC durch die isolierte Protease aus *T. thermophilus* HB8 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 70°C. Für den Test wurden 2500 μl einer 150 μM Glutaryl-Phe-AMC-Lösung verwendet, wobei das Peptid in 500 μl Methanol gelöst und 12 ml Kaliumphosphat pH 7,5, 0,03 % Triton X-100 zugesetzt wurden. Als Enzymlösung wurden 4 μl der Enzymfraktion nach Gelfiltration an Sepharose CL-6B mit einem Proteingehalt von 225 μg verwendet. Die Anregung der AMC-Verbindung erfolgte bei 380 nm, die Emission wurde bei 440 nm gemessen.



*Abb.18: Vergleich der relativen Fluoreszenz aufgrund enzymatischer Hydrolyse von Ala-Ala-Phe-AMC durch die isolierte Protease aus *T. thermophilus* HB8 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 70°C. Der Enzymtest umfasste 2500 μ l einer 150 μ M Ala-Ala-Phe-AMC-Lösung und 4 μ l Enzym mit einem Proteingehalt von 225 μ g (Abb.17). Die Substratlösung wurde entsprechend der Glutaryl-Phe-AMC-Lösung hergestellt unter Berücksichtigung der Molmasse dieses Peptids. Die Anregung erfolgte bei 380 nm, die Emission wurde bei 440 nm aufgezeichnet.*

3.3.3 Proteolytische Aktivitätsbestimmung mit Glu–Gly–Tyr–Ala–Lys

Das in 3.3.1 beschriebene Ergebnis zur Substratspezifität der gereinigten Protease aus *T. thermophilus HB8* sollte durch weitere Experimente bekräftigt werden können. Der Hinweis einer bevorzugten Katalyse von Reaktionen unter Beteiligung aromatischer hydrophober Aminosäuren wie z.B. Phenylalanin legt die Schlußfolgerung nahe, daß weitere aromatische Aminosäurereste wie beispielsweise Tyrosin umsetzbar sind und somit ein chymotrypsinähnliches Verhalten nachweisbar sein müsste. Da die Nichtumsetzung von N-Benzoyl-Tyr-ethylester durch die Schutzgruppen zustande kommen könnte, wurde ein neues Substrat eingesetzt. Folglich wurde ein eigens für diese Untersuchung synthetisiertes Pentapeptid der Sequenz Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys ohne Schutzgruppen verwendet, bei welchem die Hydrolyse der spezifischen Peptidbindung sowohl durch die Serinprotease Chymotrypsin A₄ aus Rinderpankreas als auch mit Hilfe der gereinigten Protease aus *T. thermophilus HB8* darstellbar sein müsste. Da Chymotrypsin Peptidbindungen hydrolysiert, an welchen aromatische Aminosäurereste beteiligt sind, wurde erwartet, daß ein Tripeptid Glu-Gly-Tyr und ein Dipeptid Ala-Lys entsteht.

Abbildung 19(A) zeigt die Auftrennung des Ausgangspeptids Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys nach einer Inkubation über einen Zeitraum von 30 Minuten bei Raumtemperatur an einer unpolaren RP-Trennsäule des Typs Nucleosil 120 C₁₈, 5µm. Das Peptid erscheint mit einer Retentionszeit von 11,43 als alleinige Bande.

Wie Abbildung 19(B) zeigt entstanden nach Verdau mit Chymotrypsin A₄ aus Rinderpankreas über einen Zeitraum von 30 Minuten und bei Raumtemperatur zwei Banden. Die Bande mit der Retentionszeit 11,94 stimmt mit dem Ausgangspeptid überein, und eine zusätzliche Bande mit einer Retentionszeit von 13,39 ist einem der Hydrolyseprodukte zuzuordnen. Ferner ist deutlich eine Abnahme der Bande des

Ausgangspeptids gegenüber der unbehandelten Bande und eine Zunahme des Hydrolyseprodukts zu erkennen.

In Abbildung 19(C) ist nochmals das Ausgangspeptid dargestellt, jedoch nach Inkubation über einen Zeitraum von 60 Minuten und bei 70°C. Das Ausgangspeptid besitzt eine Retentionszeit von 11,47 und zeigt somit Thermostabilität.

Zur eingehenderen Überprüfung des Pentapeptides auf Thermostabilität wurde eine Inkubation bei 70°C über Nacht vorgenommen (Abbildung 19(D)). Zu erkennen ist das unveränderte Ausgangspeptid mit einer Retentionszeit von 11,64 Minuten.

Wie aus Abbildung 19(E) zu ersehen ist, resultieren nach Inkubation mit der isolierten Protease aus *T. thermophilus HB8*, vorgenommen über einen Zeitraum 24 Stunden und bei 70°C, nach Auftrennung an Nucleosil 120 C₁₈ die schon bekannte Bande des Ausgangspeptids mit einer Retentionszeit von 11,67 und die Bande bei 13,44, welches wiederum einem der Hydrolyseprodukte zuzuordnen ist.

Die Auftrennungen der Hydrolyseprodukte nach Behandlung des Pentapeptids vergleichsweise mit Chymotrypsin einerseits und mit der isolierten Protease andererseits an Nucleosil 120 C₁₈ bestätigten die schon eingangs beschriebene Vermutung, daß die isolierte Protease aus *T. thermophilus HB8* eine chymotrypsinähnliche Spezifikation aufweist, da exakt dieselben Hydrolyseprodukte nachgewiesen wurden.

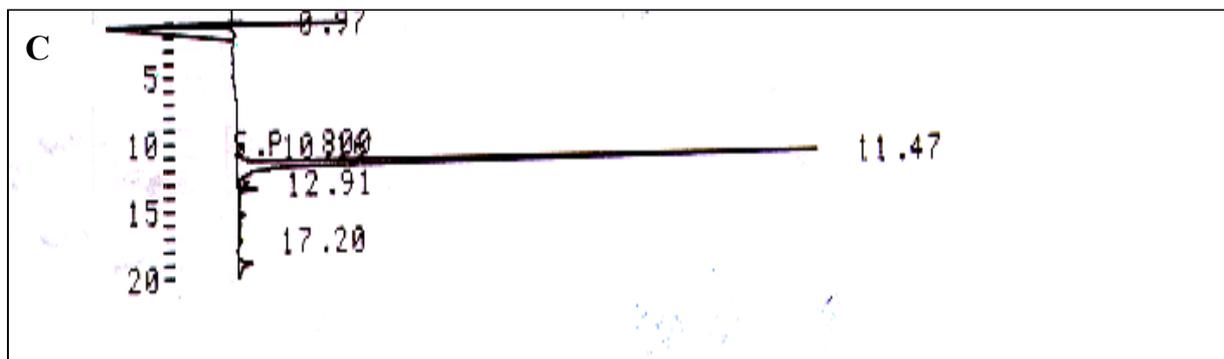
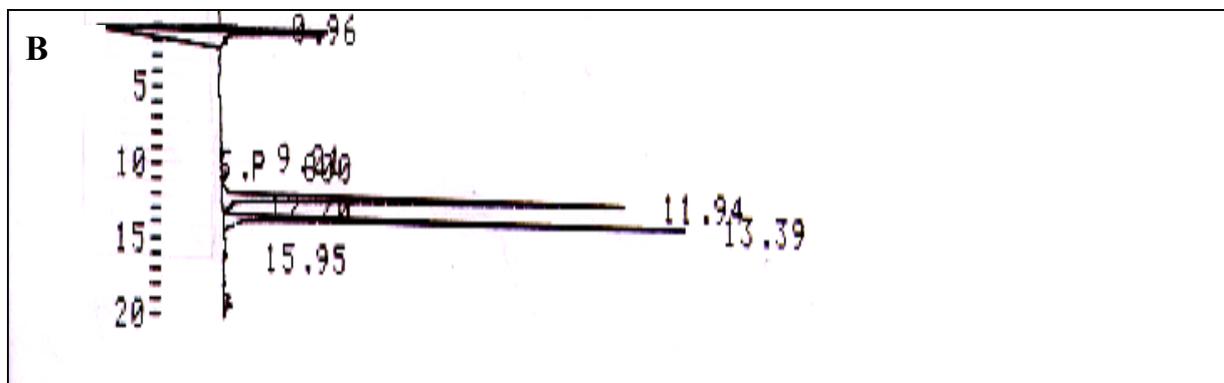
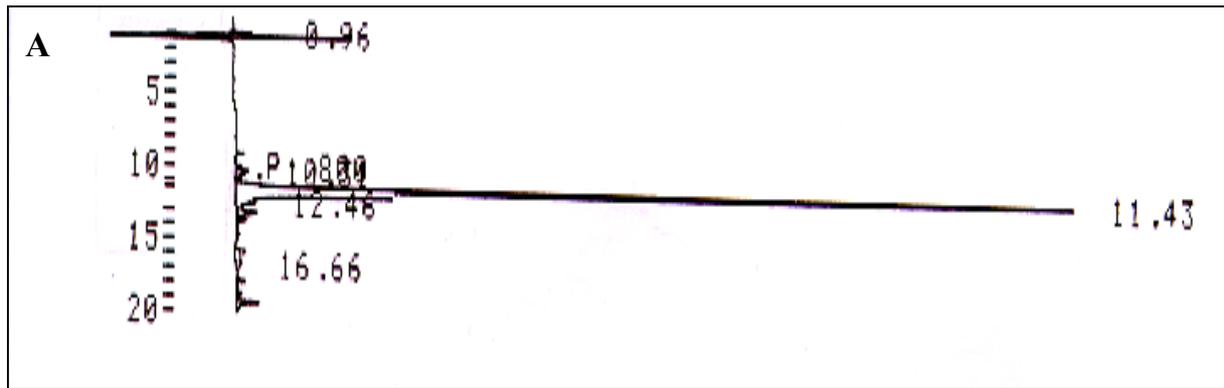
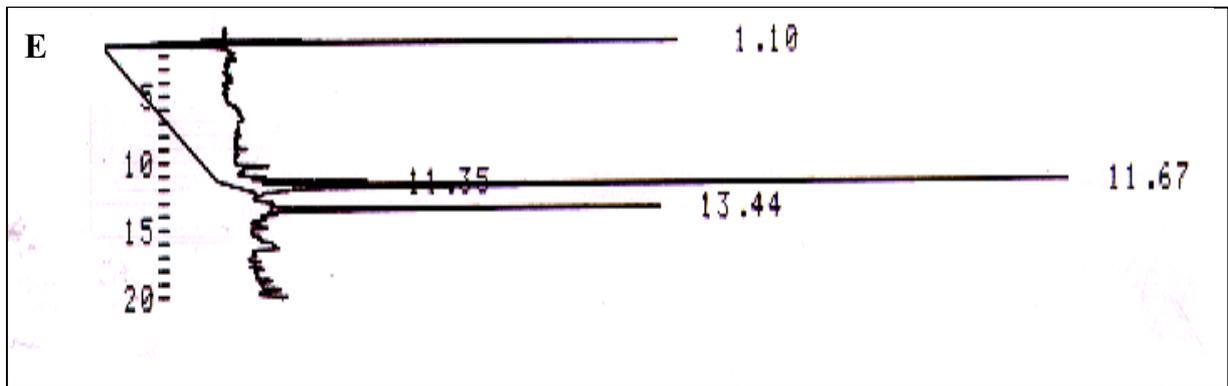
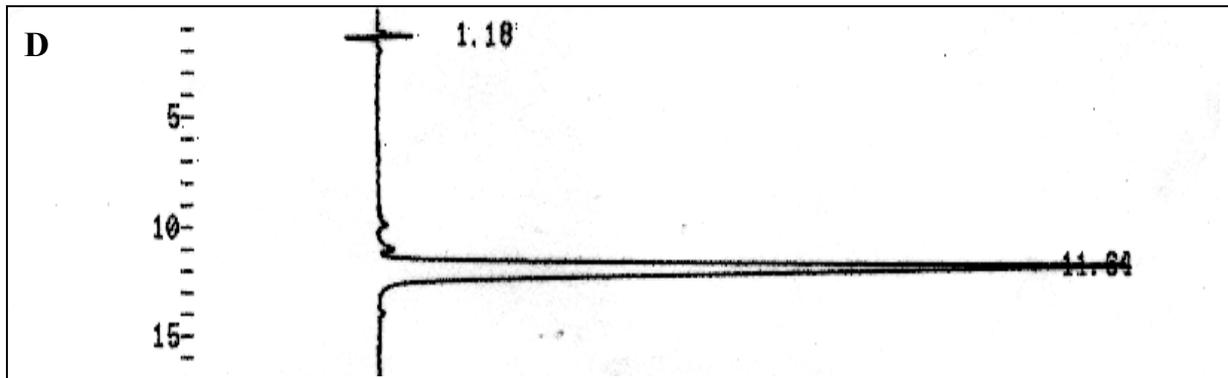


Abb.19: Auftrennung des Pentapeptides Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys nach Verdau mit Chymotrypsin A_4 aus Rinderpankreas einerseits und der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 andererseits an Nucleosil 120 C_{18} , 5 μm . Als mobile Phase wurde Lösung A mit 550 μl TFA pro Liter $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ und Lösung B mit 80 % Acetonitril, 0,05 % TFA als Gradient im Verhältnis 0–30 % Lösung B gemischt. Dargestellt in (A) ist das Ausgangspeptid mit einer Retentionszeit von 11,43, inkubiert bei Raumtemperatur über



einen Zeitraum von 30 Minuten. (B) zeigt das Ausgangsprodukt mit einer Retentionszeit von 11,94 und das Hydrolyseprodukt mit 13,39 infolge der Hydrolyse durch Chymotrypsin bei Raumtemperatur und nach 30minütiger Inkubation. In (C) ist das Ausgangspeptid (11,47) nach Inkubation bei 70°C für 60 Minuten dargestellt. (D) Ausgangspeptid nach 24stündiger Inkubation bei 70°C. (E) Ausgangspeptid (11,67) und Hydrolyseprodukt (13,44) infolge proteolytischer Tätigkeit der Protease aus *T. thermophilus* HB8 für 24 Stunden bei 70°C.

3.4 Größenbestimmung der thermophilen Protease aus *T. thermophilus* HB8

3.4.1 Diskontinuierliche SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Beschreibung der molaren Masse der gereinigten Protease aus *T. thermophilus* HB8 wurde das Wanderungsverhalten des Enzyms im Polyacrylamidgel untersucht. Mit dieser Methode wird infolge der Bindung von stöchiometrischen Mengen SDS an das Protein bzw. an Proteinuntereinheiten eine negative Überschlußladung erzeugt, wodurch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur Molmasse ist.

Abbildung 20(B) zeigt das Elektropherogramm mit den zurückgelegten Wanderungstrecken der gereinigten Protease und eines Proteinmolekulargewichtstandards. Der Standard ist aus einem Gemisch 12 rekombinanter Proteine zusammensetzt (3.2.9). Aus Abbildung 20(A) ist die Auftrennung des Proteingemisches nach Firmenangabe zu ersehen. Der direkte Vergleich der aufgetrennten Proteaseprobe mit dem Proteinmolekulargewichtstandard zeigt im SDS-Polyacrylamidgel eine Bande zwischen den Standards bei 60 und 70 kDa.

Da für die Proteasebande eine Wanderungstrecke von 1,7 cm im SDS-Polyacrylamidgel ermittelt wurde, kann mit Hilfe der logarithmischen Darstellung der molaren Masse in Abhängigkeit von der Wanderungstrecke (Abb.21) eine Molmasse von 67 kDa für die Probenbande angenommen werden.

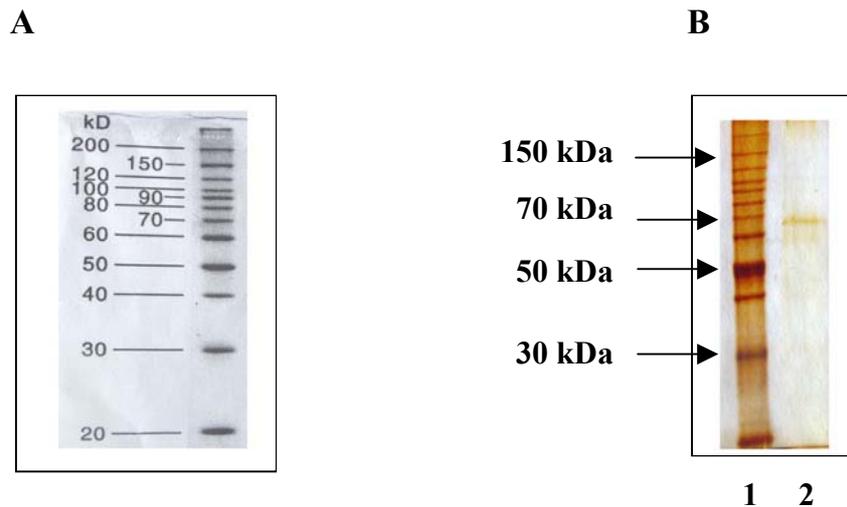


Abb.20: Bestimmung der molaren Masse der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 durch direkten Vergleich mit rekombinanten Proteinen bekannter Größe (20-200 kDa) eines Proteinstandardgemisches nach SDS-PAGE. (A) zeigt separat die Größenverhältnisse des Proteinstandardgemisches und (B) die Auftrennung von 3 μ l des Proteinstandardgemisches (1) und 4 μ g der gereinigten Protease nach Ultrazentrifugation (2) im 10 % igen Trenngel. Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

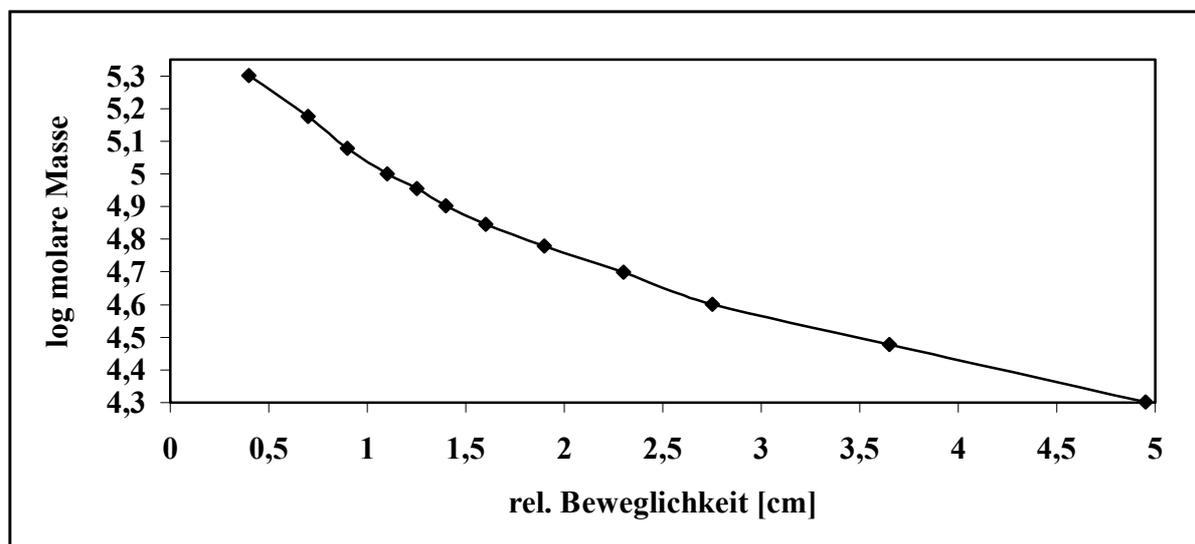


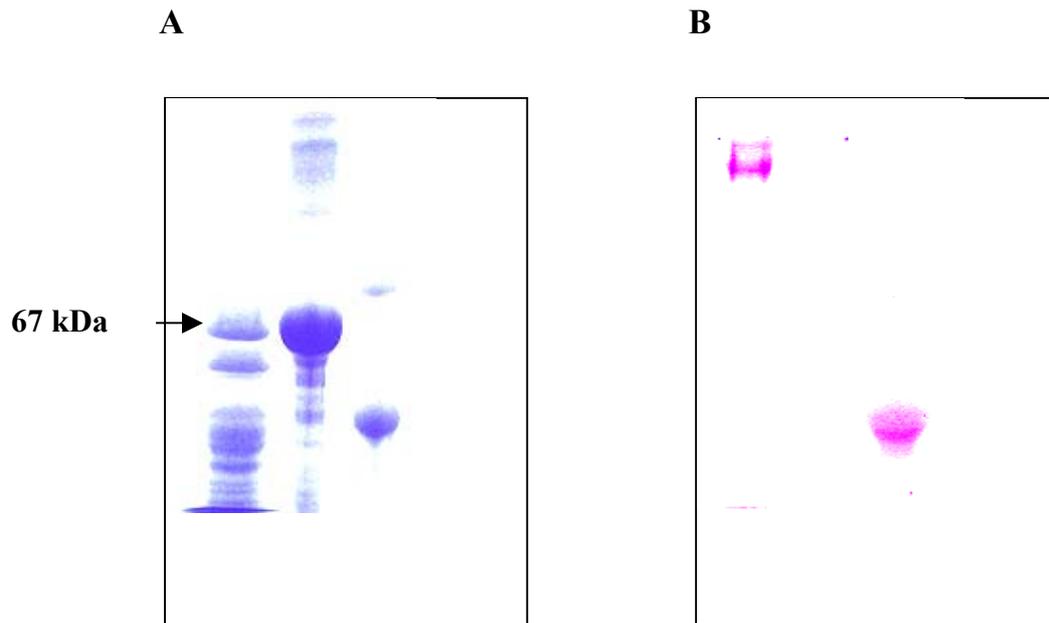
Abb.21: Auftragung des dekadischen Logarithmus der molaren Masse von 12 rekombinanten Proteinen des Standardgemisches zwischen 20-200 kDa in Abhängigkeit von der rel. Beweglichkeit der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel. Zuordnung des Logarithmus der Molmasse der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 über die ermittelte Wanderungsstrecke von 1,7 cm.

3.4.2 Nachweis von Glycoproteinen

Da ein beträchtlicher Anteil der Proteine sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten in glycosylierter Form vorliegen kann, erschien es sinnvoll, die Proteasebande aus *T. thermophilus HB8* nach erfolgter SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese daraufhin zu untersuchen. Ein geeigneter Nachweis von Zuckerresten in Proteinen ist die Perjodat-Schiff-Färbung (PAS). Dabei werden Verbindungen mit vicinalen Hydroxylgruppen in Anwesenheit von Perjodat oxidiert. Die entstehenden Aldehydgruppen lassen sich mit Schiffs Reagenz und somit Fuchsinschwefliger Säure durch Rotviolett-färbung schon in Spuren nachweisen. Zur Beurteilung der Färbung wurde als Positivkontrolle Ovalbumin und als Negativkontrolle Rinderserumalbumin im SDS-Polyacrylamidgel mitgeführt.

In Abbildung 22(A) ist die Auftrennung der aus *T. thermophilus HB8* erhaltenen Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose und der Proben Ovalbumin und Rinderserumalbumin nach SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung dargestellt.

Abbildung 22(B) zeigt die entsprechende Probenanordnung nach SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese im Vergleich mit der im Anschluß folgenden PAS-Färbung. So sind von links nach rechts die nicht angefärbte Proteaseprobe, eine ungefärbte Negativkontrolle des Rinderserumalbumins und eine gefärbte Positivkontrolle des Ovalbumins dargestellt. Im oberen Bereich der Auftrennung der angereicherten Enzymfraktion aus *T. thermophilus HB8* wurde offensichtlich eine Zuckerverbindung angefärbt, welche aufgrund ihrer Distanz zur Proteasebande in keinem Zusammenhang mit dieser steht.



*Abb.22: Nachweis von Glycoproteinen mit der Perjodat–Schiff–Färbung. In (A) ist von links nach rechts die Auftrennung von 52 μg der Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose aus Zellen von *T. thermophilus* HB8, 11 μg Rinderserumalbumin und 12,5 μg Ovalbumin nach SDS–PAGE und anschließender Coomassieanfärbung dargestellt. (B) zeigt die entsprechende Auftrennung der genannten Proben mit anschließender PAS–Färbung.*

3.4.3 Größenbestimmung an Sepharose CL-6B

Da mit Hilfe der Gelchromatographie Makromoleküle entsprechend ihrer Größe getrennt werden, können Molmassen unbekannter Proteine unter Verwendung von Standards bekannter molarer Massen abgeschätzt werden. Hierbei ergibt die Auftragung des Elutionsvolumens der Standardproteine gegen den dekadischen Logarithmus ihrer molaren Masse eine Standardkurve, welche innerhalb eines relativ weiten Bereiches Linearität zeigt. Ein abweichendes gelchromatographisches Verhalten können jedoch Moleküle zeigen, welche nicht in der typisch globulären Form, wie z.B. Glycoproteine, vorliegen.

Um den Grad der Retardierung, welcher sich als Quotient aus Elutionsvolumen (V_e) und Ausschlußvolumen (V_o) ergibt, bestimmen zu können, wurde neben den Standardenzymen Dextranblau aus *Leuconostoc ssp.*, das eine durchschnittliche Molmasse von 2000 kDa besitzt, aufgetragen. Das Ausschlußvolumen des Säulenmaterials ergibt sich somit als das Volumen, bei welchem der Absorptionswert des Dextranblaus sein Maximum erreicht. Das Elutionsvolumen stellt diejenige Menge an Eluat dar, welche zwischen dem Auftragen der Proben und ihrem Austritt aus der Säule gemessen wurde. Die Bestimmung erfolgt anhand der halben Maximalhöhen der Substanzbanden. Die Standardproteine waren Katalase aus Rinderleber mit einer molaren Masse von 240 kDa, Fumarase aus Schweineherz mit 194 kDa, Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz mit 140 kDa und α -Amylase aus *Bacillus subtilis* mit 96,9 kDa.

Wie aus Abbildung 23(A-D) zu ersehen ist, ergab sich für das beschriebene Gelmaterial Sepharose CL-6B über die Bestimmung des Absorptionsmaximums des Dextranblaus bei 580 nm ein Ausschlußvolumen (V_o) von 110 ml.

Aus Abbildung 23(A-D) ist ferner die Volumenaktivität des jeweiligen Standardenzymes oder die Absorption der infolge enzymatischer Tätigkeit entstehenden

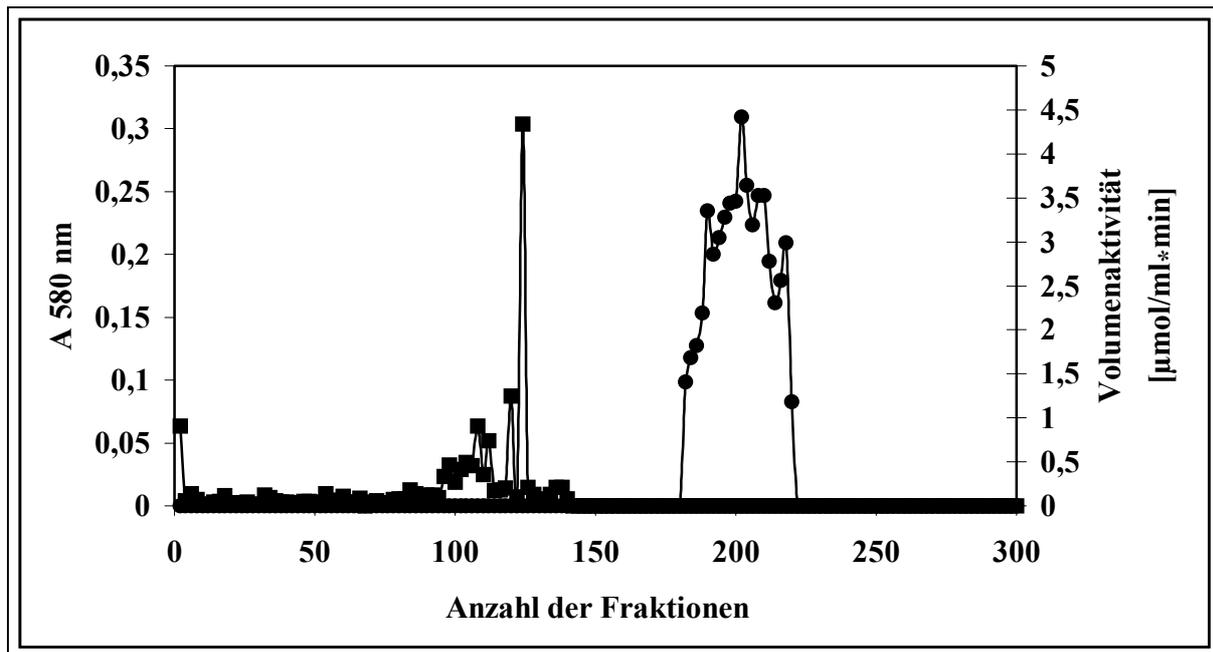
Produkte in Abhängigkeit der gesammelten Fraktionen zu entnehmen (2.2.9.11f). Die ermittelten Elutionsvolumina sind somit 210 ml für Katalase, 230 ml für Fumarase, 248 ml für Lactat-Dehydrogenase und 268 ml für α -Amylase.

Abbildung 24 zeigt die mit Hilfe der Anson-Methode ermittelten proteolytisch aktiven Fraktionen über den jeweiligen Elutionsvolumina. Für die Protease aus *T. thermophilus HB8* ergab sich somit ein Elutionsvolumen von 230 ml, welches mit jenem der Fumarase genau übereinstimmt.

In Abbildung 25 ist die Auftragung der Elutionsvolumina der Standardenzyme gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen Molmassen sowie der Grad der Retardierung mit V_e/V_o zu sehen.

Durch Vergleich mit den eingesetzten Standards konnte mit Hilfe der Methode der Gelchromatographie an Sepharose CL-6B für die isolierte Protease aus *T. thermophilus HB8* eine molare Masse von ~194 kDa ermittelt werden.

A



B

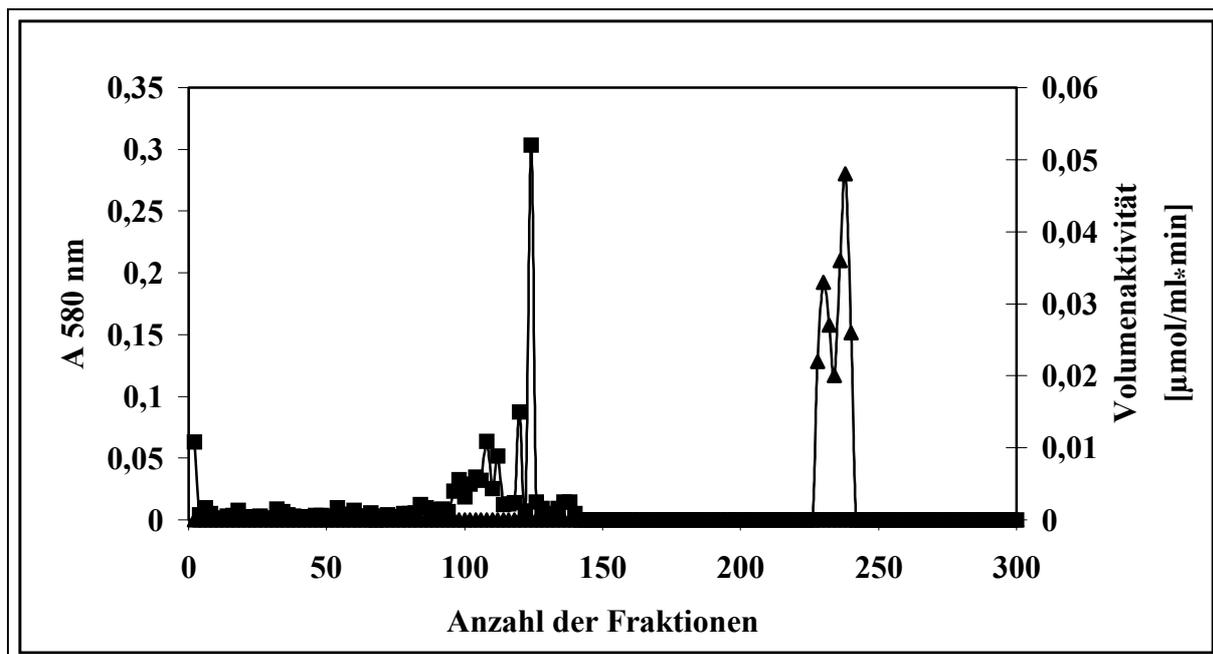
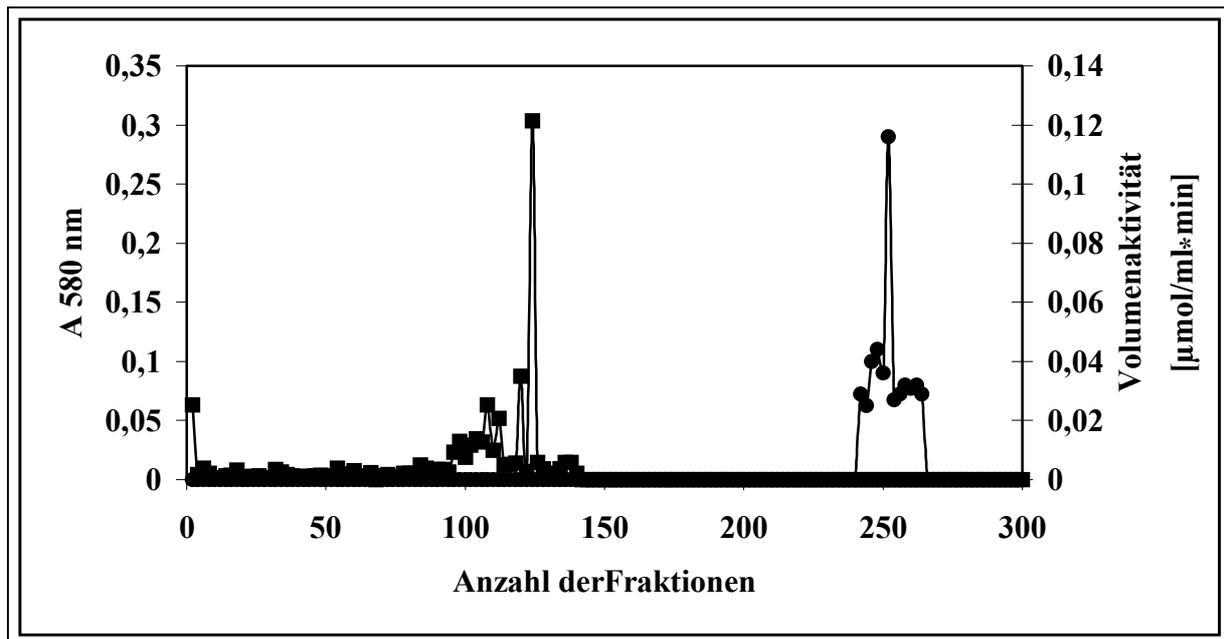
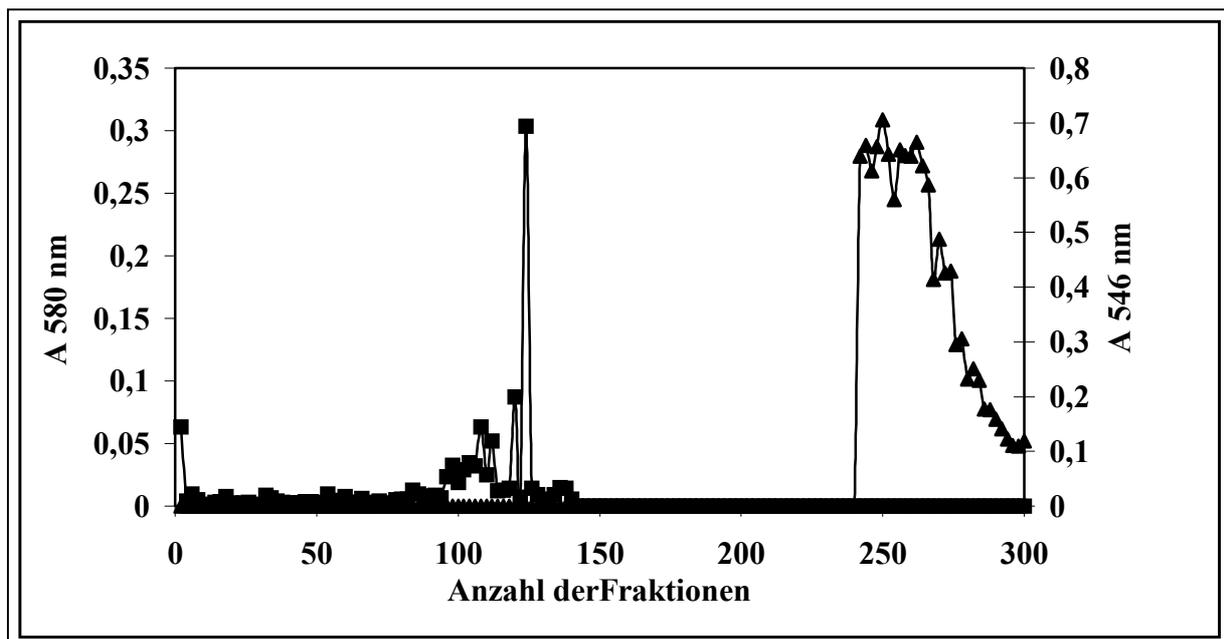


Abb.23: Größenbestimmung der Protease aus *T. thermophilus* HB8 an Sepharose CL-6B mit Standardproteinen bekannter Molmassen. Als Standards wurden 1 mg Dextranblau aus *Leuconostoc* ssp., 0,05 mg Katalase aus Rinderleber, 0,007 mg Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz, 1 mg α -Amylase aus *Bacillus subtilis* und 0,006 mg Fumarase aus Schweineherz eingesetzt. Die Elution der Proteine erfolgte mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 und einer Flußrate von 1ml/min. Es wurden 300 Fraktionen zu jeweils 1 ml gesammelt.

C



D



Auf der primären Y-Achse wurde jeweils die Absorption des Dextranblaus (■) dargestellt (A-D). Die sekundäre Y-Achse zeigt in (A) die Volumenaktivität des Standardenzym Katalase (●) mit einer Molmasse von 240 kDa. In (B) wurde die Volumenaktivität der Fumarase mit 194 kDa (▲) und in (C) der Lactat-Dehydrogenase mit einer Molmasse von 140 kDa (●) dargestellt. Die Absorption bei 546 nm kennzeichnet die aktiven Fraktionen der α -Amylase mit 96,9 kDa, was aus (D) zu entnehmen ist (▲).

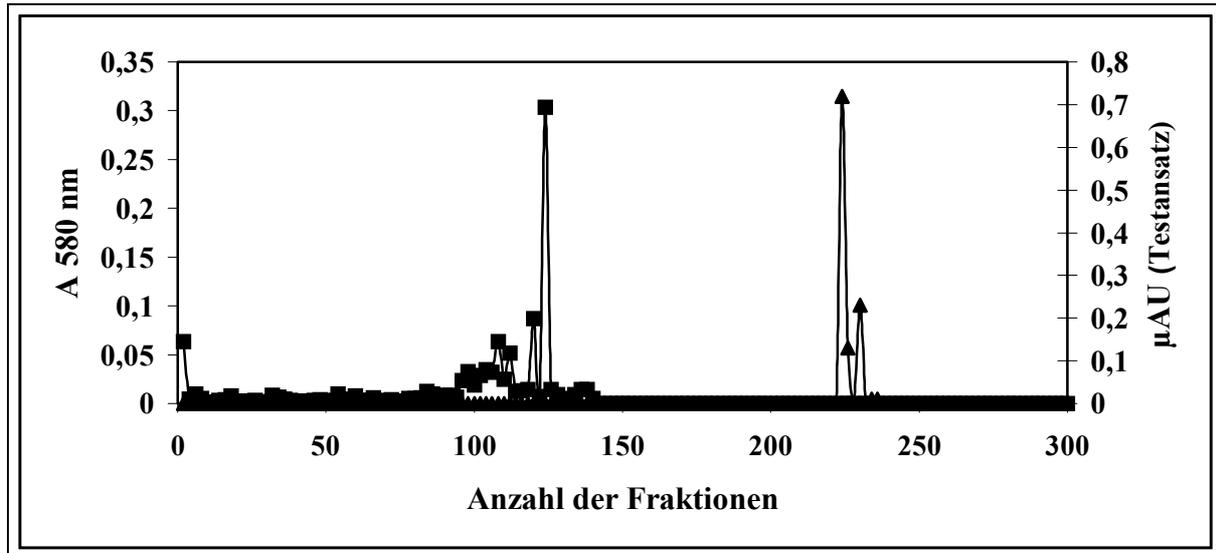


Abb.24: Größensbestimmung der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 an Sepharose CL-6B. Es wurden 200 µl der erhaltenen Enzymfraktion nach Gelchromatographie an Sepharose CL-6B mit einem Proteingehalt von 1 mg eingesetzt. Die Elution wurde mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 und einer Flußrate von 1ml/min vorgenommen. Gesammelt wurden 300 Fraktionen zu jeweils 1 ml. Die primäre Y-Achse zeigt die Absorption des Dextranblaus bei 580 nm (■). Die Skalierung der sekundären Y-Achse stellt die nach Anson bestimmte proteolytische Aktivität des Enzyms (▲) in Abhängigkeit von den gesammelten Fraktionen dar.

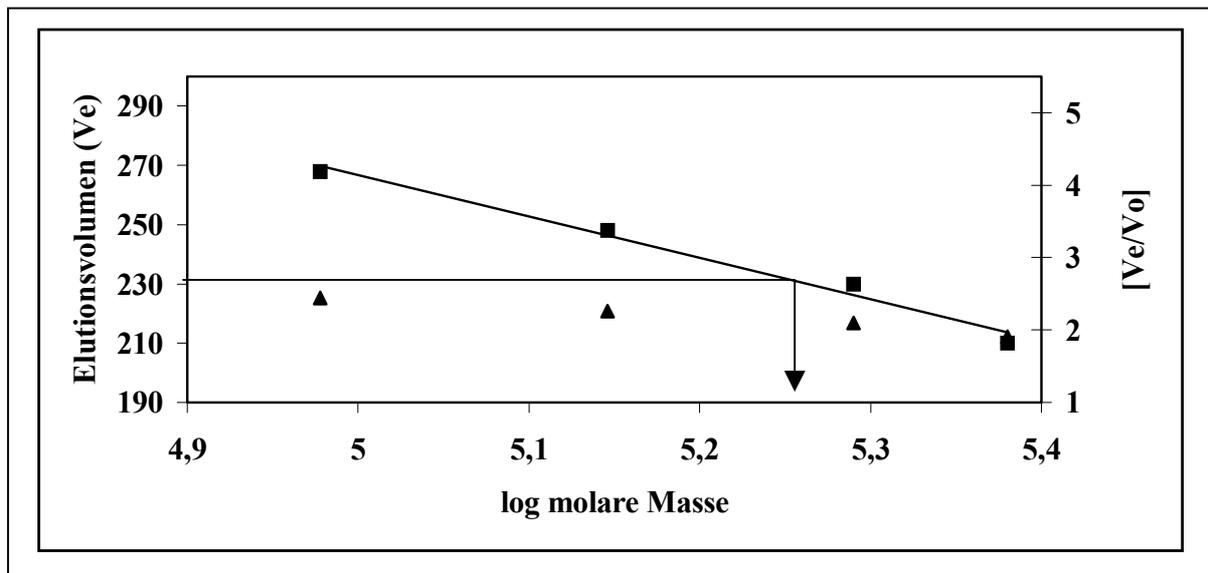


Abb.25: Darstellung der Elutionsvolumina der Standardproteine Katalase, Fumarase, Lactat-Dehydrogenase und α-Amylase in Abhängigkeit vom Logarithmus ihrer molaren Masse (■). Auftragung von V_e/V_o über dem Logarithmus der molaren Masse (▲).

3.4.4 Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat

Die Bestimmung der Anzahl und Anordnung von Proteinuntereinheiten in oligomeren Proteinen kann durch kovalente Vernetzung identischer Untereinheiten und in Kombination mit SDS-PAGE erfolgen. Bifunktionale Reagenzien ermöglichen in definierter Konzentration ausschließlich eine intramolekulare Quervernetzung. Der Diimidoester Dimethylsuberimidatdihydrochlorid (Octandiimidsäure-dimethylester-dihydrochlorid) begünstigt die kovalente Vernetzung der ϵ -Aminogruppen von Lysin sowie N-terminaler α -Aminogruppen aller anderen Aminosäuren. Voraussetzung dafür ist jedoch, daß die relevanten Gruppen in ausreichender Anzahl vorhanden sind, das Reagenz lange genug ist um die erforderliche Distanz zu überspannen und das Protein eine nicht zu flexible Struktur besitzt.

Zur Vermeidung von intermolekularen Vernetzungen wurde die Proteinkonzentration innerhalb des Bereiches 0,1-5 mg/ml gewählt. Der Konzentrationsbereich des Diimidoesters war 0,5-100 mM. Ferner wurden die Reaktionsbedingungen so gewählt, daß der Diimidoester in 0,2 M Triethanolaminhydrochlorid pH 8,5 gelöst wurde und somit die Amidinierung gegenüber der Hydrolyse begünstigt war. Durch Entnahme von Aliquots aus dem Versuchsansatz in Abhängigkeit von der Zeit und nachfolgender Auftrennung im SDS-PAGE wurde bei intramolekularer Vernetzung eines aus identischen Untereinheiten bestehenden Proteinmoleküls das zeitabhängige Auftreten von Banden mit der doppelten oder mehrfachen Molmasse der Untereinheit erwartet.

Zur Überprüfung der Versuchsbedingungen wurden als Standards zwei Enzyme bekannter molarer Masse herangezogen. Katalase aus Rinderleber, ein aus vier identischen Untereinheiten zu je 60 kDa bestehendes tetrameres Häminenzym, weist eine molare Masse von 240 kDa auf und Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz, ein Tetramer der molaren Masse von 140 kDa mit jeweils 35 kDa pro Untereinheit.

In Abbildung 26 ist die Quervernetzung der identischen Untereinheiten der Katalase mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid nach $t=0$, 15 und 30 Minuten und ein Proteinstandardgemisch (3.2.9) nach Auftrennung in einem SDS-Trenngel der Acrylamidkonzentration von 10 % dargestellt. Der Abbildung ist zu entnehmen, daß zum Zeitpunkt $t=0$ Minuten mehrere Banden vorhanden sind. Durch den direkten Vergleich mit dem Proteinstandardgemisch kann jedoch die am stärksten ausgeprägte Bande der 60 kDa-Untereinheit der Katalase zugeordnet werden. Nach $t=15$ und 30 Minuten ist sowohl eine Zunahme im Bereich von 120 kDa, 180 kDa und im Bereich größer als 200 kDa als auch eine Abnahme der 60 kDa Bande erkennbar. Allerdings wurde infolge einer Zunahme von Banden an anderen Stellen deutlich, daß gleichfalls eine Vernetzung von Nebenbanden stattfand. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß eine intramolekulare Vernetzung der identischen Katalase-Untereinheiten mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid unter gegebenen Bedingungen möglich ist.

Abbildung 27 zeigt die Quervernetzung der identischen Proteinuntereinheiten der Lactat-Dehydrogenase mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid in Abhängigkeit von der Zeit und nach Auftrennung in einem 10 % SDS-Trenngel. Durch Vergleich mit einem mitgeführten Proteinstandardgemisch (3.2.9) ist das Monomer der Lactat-Dehydrogenase mit der molaren Masse von 35 kDa als deutlich hervortretende Bande zu erkennen. Dimer und Tetramer sind zum Zeitpunkt $t=15$ Minuten bei 70 bzw. 140 kDa im Elektropherogramm zu sehen. Die Bildung des Trimers, welches bei 105 kDa erwartet wurde unterblieb. Mit diesem Versuch konnte bestätigt werden, daß der eingesetzte Diimidoester eine Quervernetzung der Untereinheiten der Lactat-Dehydrogenase verursachte. Allerdings konnte bei diesem Versuch keine vollständige Vernetzung der identischen Untereinheiten mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid infolge des Fehlens des Trimers erzielt werden.

Das Ergebnis des Versuches einer Quervernetzung von identischen Untereinheiten der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 ist in Abbildung 28 dargestellt. Das Elektropherogramm zeigt die Auftrennung der in den Zeiteinheiten 0, 15 und

30 Minuten entnommenen Proben in der SDS-PAGE. Nach erfolgreicher Quervernetzung von Untereinheiten zu jeweils 67 kDa würde man Banden eines Vielfachen davon erwarten. Wie aus Abbildung 28 zu entnehmen ist sind zum Zeitpunkt $t=0$ mehrere Banden zu sehen, wobei die 67 kDa-Bande die höchste Molmasse im Gel besitzt. Ferner ist zu sehen, daß weder nach 15 Minuten noch nach 30 Minuten Banden hinzukamen, so daß keine Vernetzung stattfand.

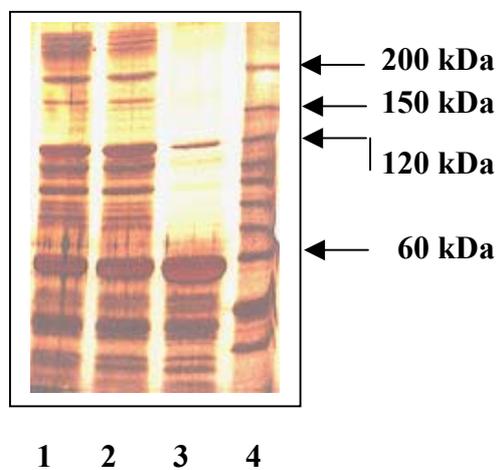


Abb.26: Quervernetzung der identischen Proteinuntereinheiten einer molaren Masse von 60 kDa von Katalase aus Rinderleber mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid in Abhängigkeit von der Zeit und anschließende SDS-PAGE. Der Versuchsansatz bestand aus 0,15 mg Katalase aus Rinderleber in 100 μ l Triethanolaminhydrochlorid pH 8,5. Dimethylsuberimidatdihydrochlorid wurde so eingesetzt, daß eine Konzentration von 20 mM vorlag. Nach der Entnahme von Aliquots zum Zeitpunkt $t=0$, 15 und 30 Minuten wurde die Reaktion mit 12 % Hydroxylaminhydrochlorid in Triethanolaminhydrochlorid pH 8,5 gestoppt und im Anschluß daran in einem 10 % igen Trenngel im SDS-PAGE-System aufgetrennt. Es wurden jeweils 11,3 μ g Katalase zum Zeitpunkt $t=0$ Minuten (3), $t=15$ Minuten (2) und $t=30$ Minuten (1) und 3 μ l des Proteinstandardgemisches (3.2.9) (4) aufgetrennt.

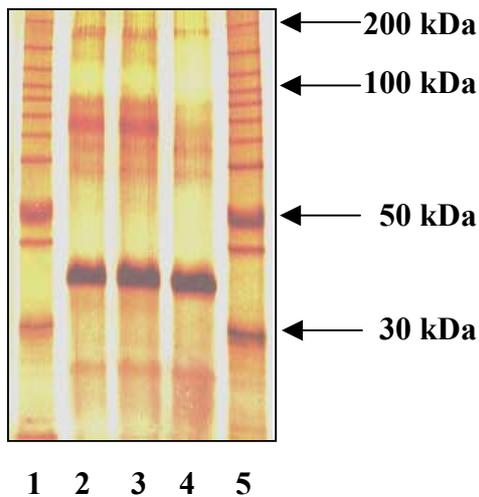


Abb.27: Quervernetzung der identischen Untereinheiten einer molaren Masse von 35 kDa der Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid und anschließender SDS-PAGE. Der Versuchsansatz bestand aus 0,014 mg Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz in 100 μ l Triethanolaminhydrochlorid pH 8,5 und 20 mM Dimethylsuberimidatdihydrochlorid. Die Entnahme der Proben erfolgte nach 0, 15 und 30 Minuten. Von links nach rechts wurden das Proteinstandardgemisch (3.2.9) (1) und jeweils 1,1 μ g LDH nach 0 (4), 15 (3) und 30 Minuten (2) und nochmals das Proteinstandardgemisch (5) aufgetragen. Die Proteine wurden mit der Silberfärbung sichtbar gemacht.

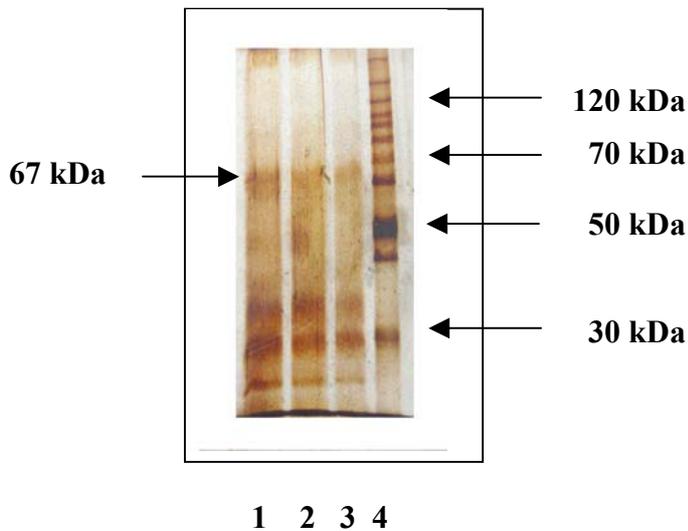


Abb.28: Versuch der Quervernetzung identischer Untereinheiten der Molmasse 67 kDa der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 mit Dimethylsuberimidatdihydrochlorid und anschließender SDS-PAGE. Es wurden 35 μg Protease in 100 μl Triethanolaminhydrochlorid pH 8,5 eingesetzt. Die Konzentration des Dimethylsuberimidats wurde so gewählt, daß eine Konzentration von 20 mM vorlag. Nach den Zeiteinheiten 0, 15 und 30 Minuten wurden Proben entnommen, mit 12 % Hydroxylaminhydrochlorid in Triethanolaminhydrochlorid pH 8,5 gestoppt und in einem 10 % igen Trenngel mit SDS-PAGE aufgetrennt. Pro Geltasche wurden 4,4 μg Protein eingebracht. Von links nach rechts wurden die Proben nach 0 (3), 15 (2), 0 (1) Minuten im Vergleich mit dem Proteinstandard (3.2.9) (4) aufgetragen. Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.5 Untersuchungen zur Primärstruktur der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8

3.5.1 Bestimmung der N-terminalen Sequenz

Mit Hilfe der automatisierten Bestimmung der Aminosäureabfolge nach Edman, ausgehend vom N-Terminus der isolierten Protease, wurde nachfolgend aufgeführte Sequenz gefunden. Die einzelnen N-terminal abgespaltenen Aminosäuren wurden als Phenylthiohydantoinderivate nachgewiesen. Insgesamt wurden 20 Aminosäurepositionen bestimmt, wobei Fehlstellen in Position 1 und Position 16 vorhanden waren. Die eindeutige Zuordnung von Position 1 war im ersten Zyklus aufgrund vorliegender Verunreinigungen nicht möglich. Für Position 16 konnte gleichfalls keine Zuordnung getroffen werden, da kein deutliches Signal vorlag.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
X	P	Q	D	N	S	L	V	I	G	A	S	Q	E	P	X	V	L	A	G
	Pro	Gln	Asp	Asn	Ser	Leu	Val	Ile	Gly	Ala	Ser	Gln	Glu	Pro		Val	Leu	Ala	Gly

*Abb.29: Automatisierte Bestimmung der N-terminalen Sequenz der isolierten Protease aus T. thermophilus HB8 nach Edman. Von der proteasehaltigen Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose wurden unterschiedliche Proteinmengen (Bereich 10-1 µg) mit SDS-PAGE aufgetrennt. Die so aufgetrennten Proteine wurden einem Elektrotransfer nach Towbin unterzogen und an eine PVDF-Membran gebunden. Die mit Coomassie Brilliantblau R 250-gefärbten Proteasebanden der Größe 3*1 mm wurden aus der proteinbindenden Membran herausgeschnitten und der automatischen Aminosäureanalyse im Sequenator unterzogen (2.2.14). Die Auftrennung der PTH-Aminosäuren erfolgte mit einer HPLC-C₁₈-Säule der Maße 2,1*250 mm. Die Detektion der PTH wurde entsprechend der erhaltenen UV-Absorptionssignale bei 269 nm erreicht.*

3.5.2 Bestimmung von Teilsequenzen der Primärstruktur

Zur Erzeugung von Fragmenten für Teilsequenzen der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 wurde eine proteasehaltige Proteinprobe in einem SDS-Polyacrylamidgel zunächst aufgetrennt, gefärbt und fixiert. Im Anschluß daran wurden die Proteasebanden der Größe 67 kDa und die darunterliegenden Banden der Größe ~55 kDa aus dem Gel präpariert und einem tryptischen Verdau im Gel (2.2.15) unterzogen. Abbildung 30 zeigt die erhaltene Auftrennung von Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose im 10 % SDS-Polyacrylamidgel.

Die so erhaltenen Peptide wurden mit einer RP-Kapillarsäule an einer HPLC-Anlage aufgetrennt und als UV-Signale detektiert. In Abbildung 31 ist das UV-Chromatogramm der Peptidtrennung, der im Gel verdauten Bande der Größe ~55 kDa, welches bei einer Wellenlänge von 214 nm ermittelt wurde, dargestellt

Da die RP-Trennsäule direkt mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer verbunden war, erfolgte die Peptididentifizierung mit Hilfe eines LC-Tandem-Massenspektrometer-Experiments (LC-MS/MS-Experiment). Hierbei erfolgte die Erzeugung von Molekülionen mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation (ESI). Zusätzlich wurde ein Teil der fokussierten Vorläufer-Ionen separat durch Kollision einer weiteren Ionisation (CID) unterworfen. Die so entstehenden Fragmente können in einem angeschlossenen zweiten Massenspektrometer (MS/MS-Analyse) untersucht werden. Somit wurden nicht nur die Peptidmassen massenspektrometrisch ermittelt, sondern auch die Sequenz des jeweiligen Ausgangs-peptids anhand seines charakteristischen Fragmentmusters bestimmt. Über diese fragmentionenspezifischen Daten konnten die Proteine, falls in der Datenbank vorhanden, identifiziert werden. Aus Abbildung 32 ist das bei dem LC-MS/MS-Experiment aufgenommene Base-Peak-Chromatogramm (BPC) des Ionenstroms der Peptidauftrennung zu entnehmen. Ferner ist das aufsummierte Massenspektrum des Ionenfallenspektrometers der während des

Zeitraums von 41,2-42,4 Minuten eluierten Peptide, welche während des LC-MS/MS-Experiments aufgezeichnet wurden, in Abbildung 33 dargestellt. Abbildung 34 stellt sowohl das Massenspektrum als auch das CID-Spektrum des Peptids VLTGDVVG YDR, welches bei 41,5 Minuten eluierte und dem Signal bei 597,2 (Abbildung 33) entspricht, dar.

Die Identifizierung der ~55 kDa-Proteinbande mit Hilfe einer Datenbankabfrage ist in Abbildung 35 dargestellt. Die getroffenen und identifizierten Peptide sind graphisch wiedergegeben. Für die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) der taxonomischen Einordnung *Thermus thermophilus* wurde eine Sequenz-übereinstimmung von 73 % erzielt.

Zusätzlich sind die Trefferzahlen aus dem Balkendiagramm (Abbildung 36) zu entnehmen. Es wurden insgesamt zwei Proteine identifiziert, wobei die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.42) eine signifikante Trefferzahl von 540 (Scores) neben Trypsin erreichte.

Entsprechend der Untersuchungen der ~55 kDa-Bande wurde die Proteinbande, welche bei 67 kDa migrierte, mit Hilfe der LC-MS/MS-Analyse untersucht. In Abbildung 37 ist das UV-Chromatogramm abgebildet, und Abbildung 38 zeigt das entsprechende Base-Peak-Chromatogramm des Ionenstroms. Die Auswertung der ermittelten MS/MS-Spektren erbrachte jedoch keinen Treffer. Bei dem untersuchten Protein handelt es sich somit um ein noch nicht identifiziertes Protein dieser Gattung.

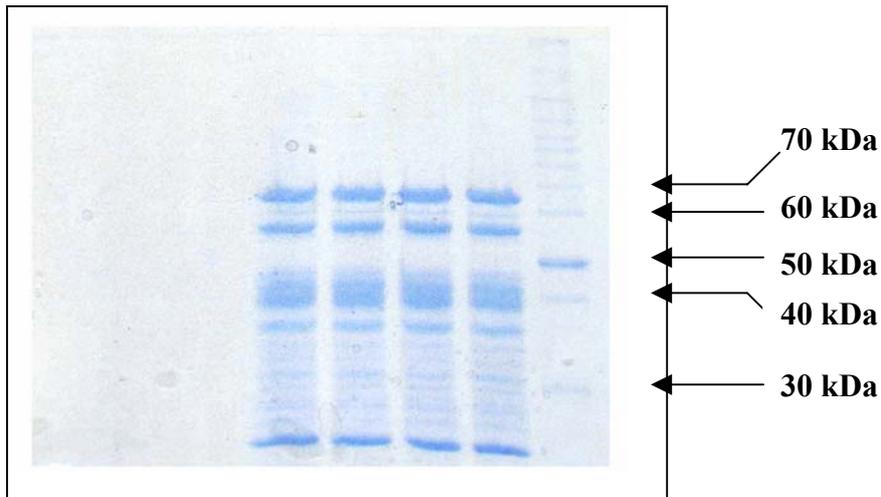
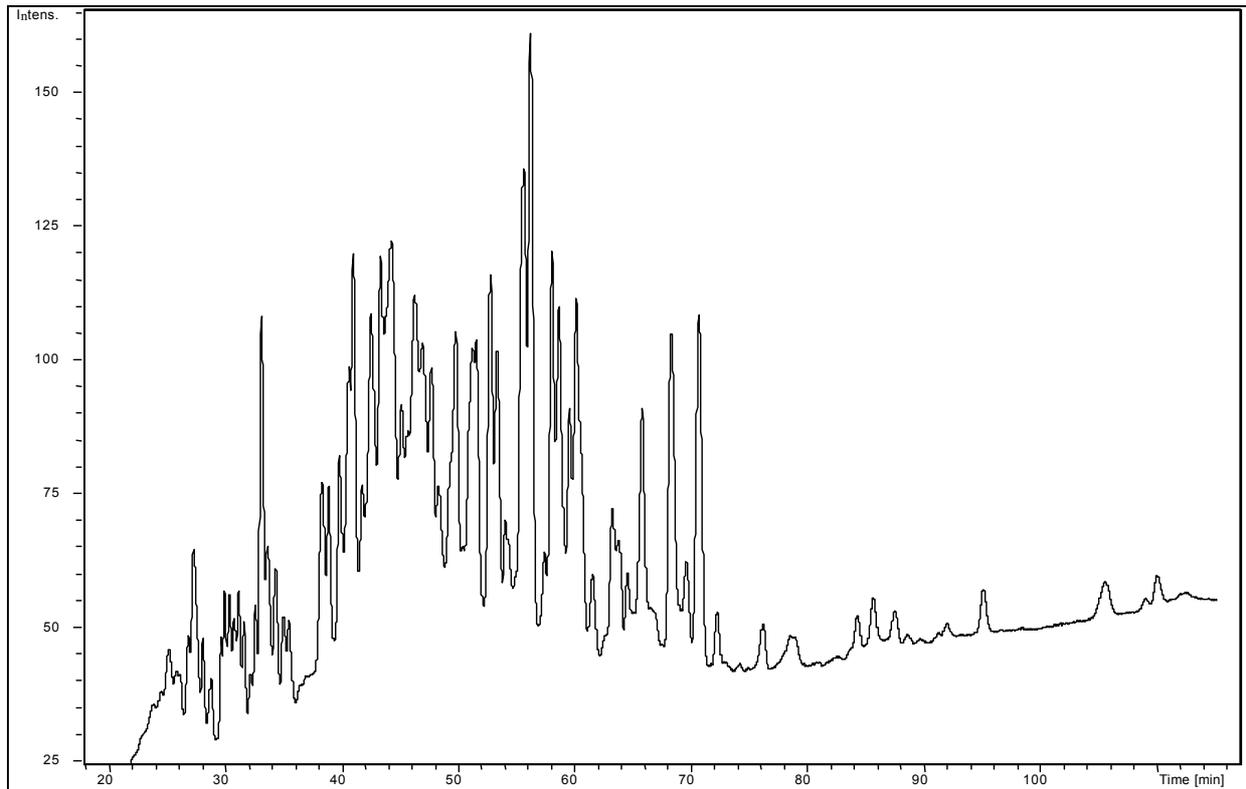


Abb.30: Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Auftrennung von Enzymfraktion 1 nach DE52-Cellulose mit einem Proteingehalt von 41,64 mg/ml. Von links nach rechts wurden $4 \cdot 10,41 \mu\text{g}$ der Enzymprobe und der Proteinmolekulargewichtsstandard (3.2.9) aufgetragen. Die restlichen Gelflächen dienten als Leerwert.



*Abb.31: Peptidauftrennung an einer RP-Kapillarsäule mit TSK-Gel Super-ODS 120 mm*300 μm . Das Peptidgemisch der tryptisch verdauten ~ 55 kDa-Bande wurde in 0,025 % TFA in H_2O gelöst. Es wurden 2,5 ml injiziert und mit einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ eluiert. Als Elutionsmittel wurden Pufferlösung A mit 0,025 % TFA in H_2O und Lösung B mit 0,023 % TFA, 80 % Acetonitril in H_2O eingesetzt. Der Gradient setzte sich über den Zeitraum 0-10 Minuten aus 5 % B, 10-15 Minuten 10 % B, 15-100 Minuten 75 % B und 100-120 Minuten 95 % B zusammen. Das UV-Chromatogramm wurde bei einer Wellenlänge von 214 nm ermittelt.*

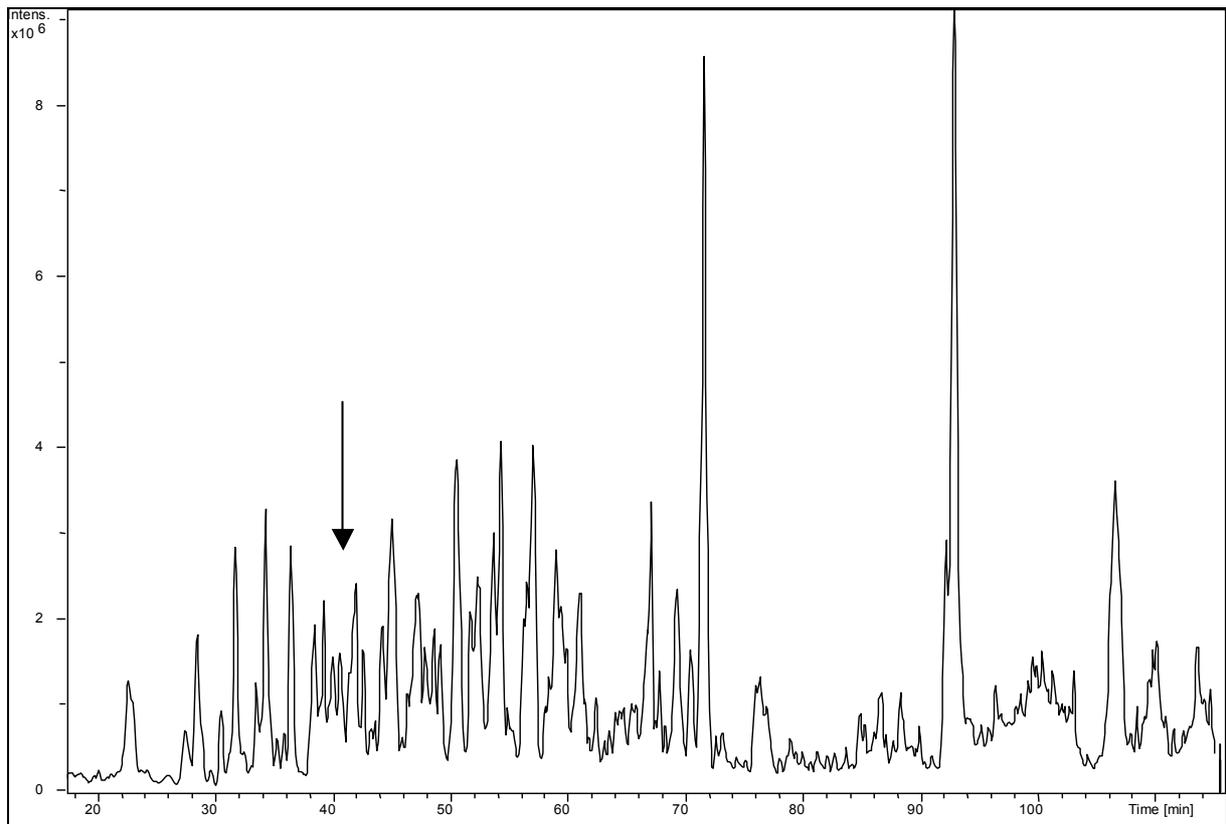


Abb.32: Base-Peak-Chromatogramm des Ionenstroms, welches beim LC-MS/MS-Experiment aufgenommen wurde. Der Pfeil (\downarrow) kennzeichnet die Peptide, welche während des Zeitraums von 41,2-42,4 Minuten eluiert wurden. Die Einstellungen des Massenspektrometers waren: positiver Ionenmodus; Elektrospray Ionisations-Spannung: -4100 V; Trockengas-Temperatur: 295 °C; Nebulizer: 22 psi; Scanbereich: 300-1700 m/z. Die Beladung der Falle wurde über die Software automatisch kontrolliert. MS/MS-Parameter: 1 Precursor Ion (isoliert mit 6 m/z); 9 MS/MS-Spektren; Active Exclusion ein (2 min); MS/MS Fragmentierungs-Amplitude: 1 V.

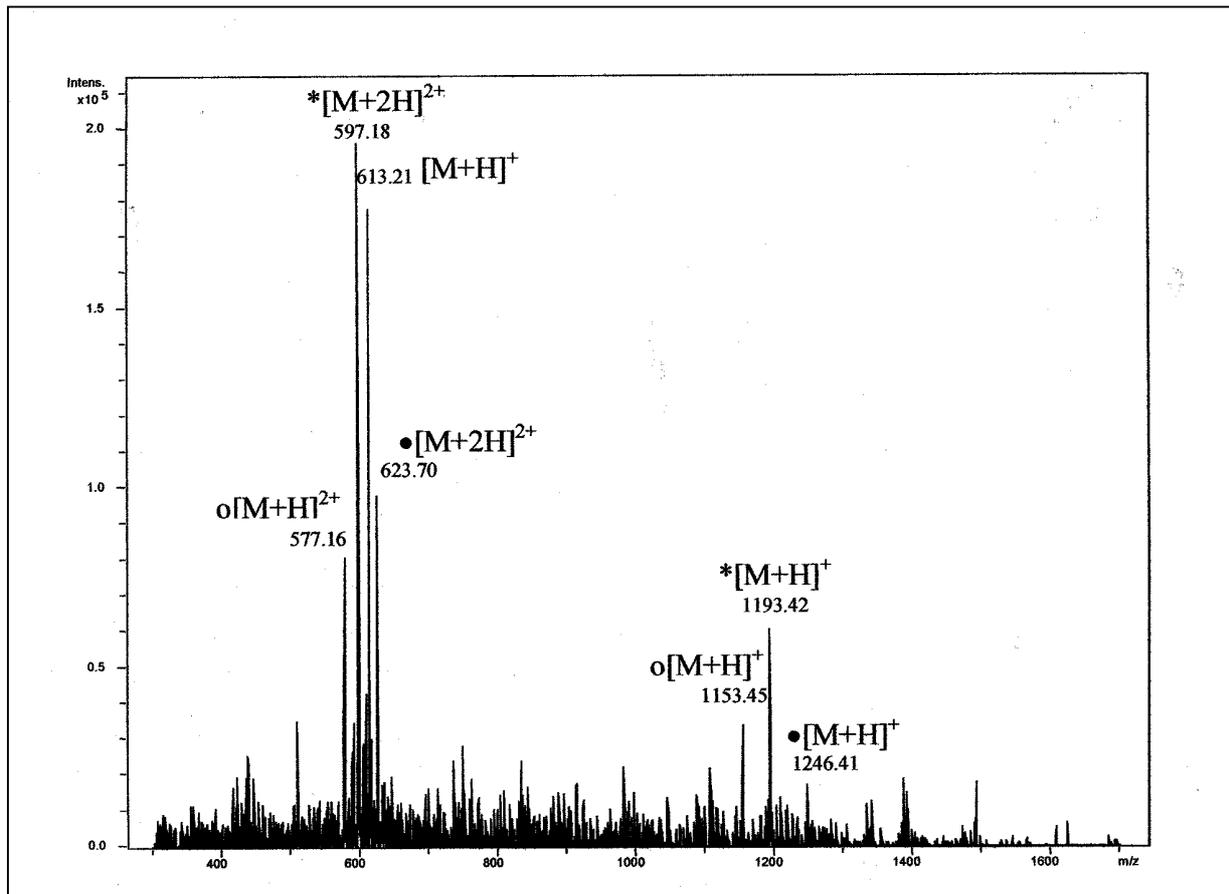


Abb.33: Aufsummiertes Massenspektrum der eluierten Peptide, welches über den Zeitraum von 41,2-42,4 Minuten während des LC-MS/MS-Experiments aufgezeichnet wurde. Die eluierten Peptide wurden entsprechend ihren Ladungszuständen gekennzeichnet. Siehe Position Pfeil (↓) Abbildung 32.

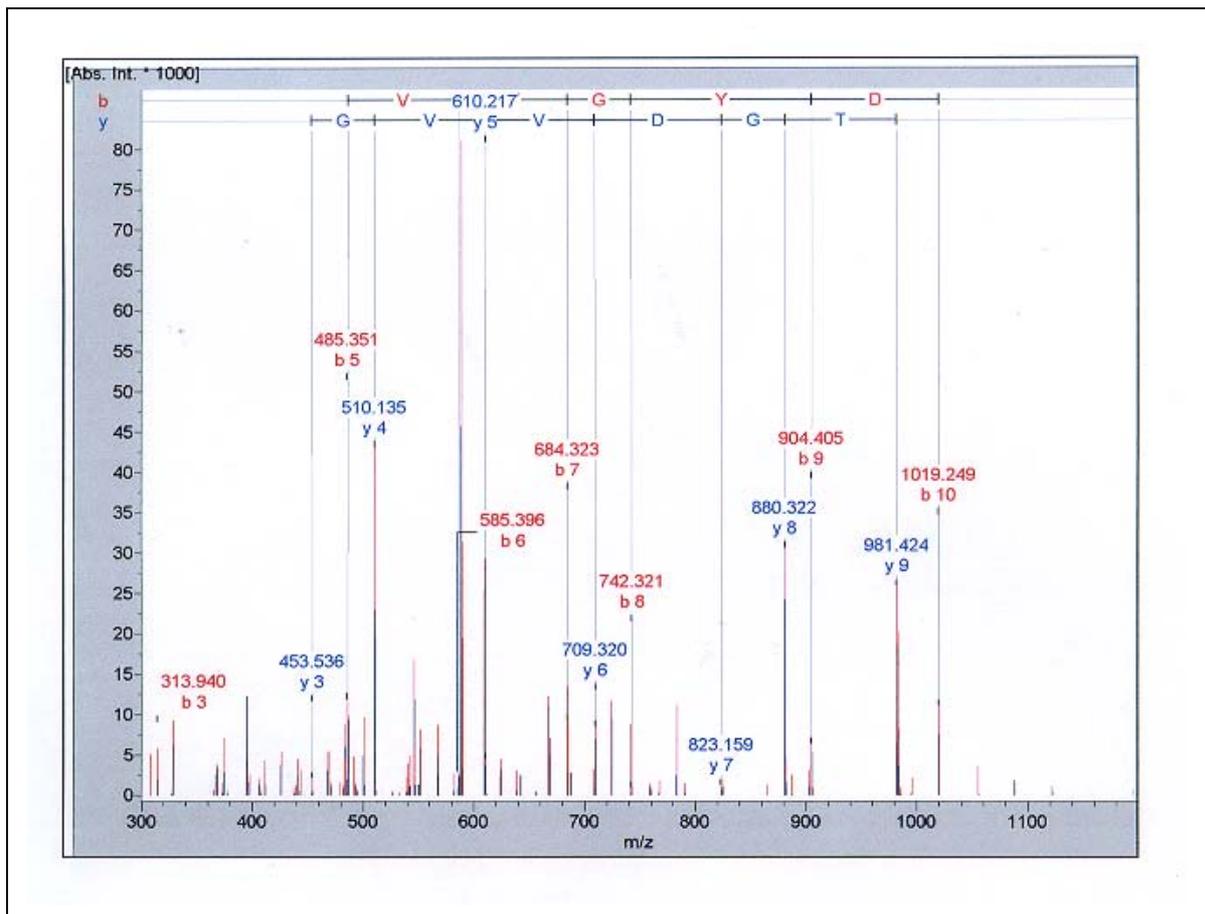


Abb.34: MS/MS-Spektrum des Peptids VLTGDVVG YDR, das bei 41,5 Minuten eluierte und dem Signal bei 597,2, mit m/z als 2-fach positiv geladenem Molekülion, entspricht. Die y- und b-Typ Fragmentenserien wurden gleichzeitig erhalten. Das CID-Spektrum wurde automatisch während der LC-MS/MS-Analyse erhalten.

```

Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42) (Oxalosuccinate decarboxylase) (IDH)
Found in search of DATA.TXT

Nominal mass (Mr): 54603; Calculated pI value: 6.33
NCBI BLAST search of P33197 against nr
Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: Thermus thermophilus

Fixed modifications: S-pyridylethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 73%

Matched peptides shown in Bold Red

  1  MPLITTETGK  KMHVLEDGRK  LITVIPGDGI  GPECVEATLK  VLEAAKAPLA
 51  YEVRAGASV  FRRGIASGVP  QETIESIRKT  RVVLKGPLET  PVGYGEKSAN
101  VTLRKLFEY  ANVRPVREFF  NVPTPYAGRG  IDLVVVRENV  EDLYAGIEHM
151  QTPSVAQTLK  LISWKGSEKI  VRFAPFELARA  EGRKKVHCAT  KSNIMKLAEG
201  PKRAPEQVAQ  EYPDIEAVHI  IVDNAAHQLV  KRPEQFEVIV  TTNMNGDILS
251  DLTSGLIGGL  GFAPSANIGN  EVAIFEAVHG  SAPKYAGKNV  INPTAVLLSA
301  VMMLRYLEEF  ATADLIENAL  LYTLEEGRVL  TGDVVGYDRG  AKTTEYTEAI
351  IQNLGKTPRK  TQVRGYKPFK  LPQVDGAIAP  IVPRSRVVVG  VDVVFVETNLL
401  PEALGKALED  LAAGTFFRLK  MISNRGTQVY  PPTGGLTDLV  DHYRCRFLYT
451  GEGEAKDPEI  LDLVSRVASR  FRWMHLEKIQ  EFDGEPGFTK  AQGED

```

Abb.35: Mascot-Identifizierung der tryptisch im Gel verdauten ~55 kDa-Bande. Als Bedingungen wurden nachfolgend genannte Parameter bei der Datenbankabfrage eingegeben. Trypsin als Enzym; Cysteinreste S-pyridylethyliert; Massen monoisotopisch; Proteinmasse 55 kDa; Peptidmassentoleranz: $\pm 0,5$ Da; maximal zwei verpasste Schnittstellen; Datenbank: SwissProt 41.1 (183303 Proteinsequenzen); Taxonomy: Eubakterien (54681 Proteinsequenzen).

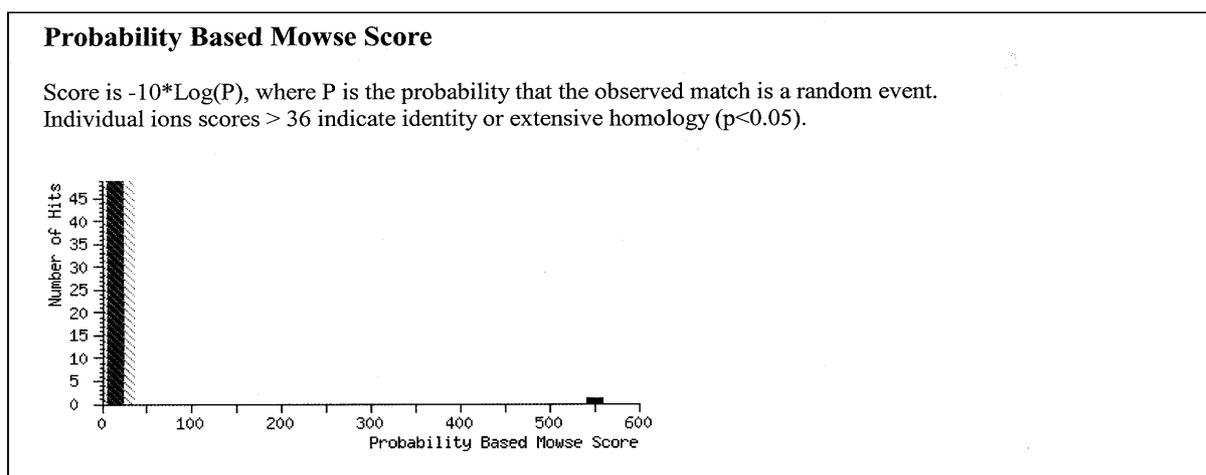
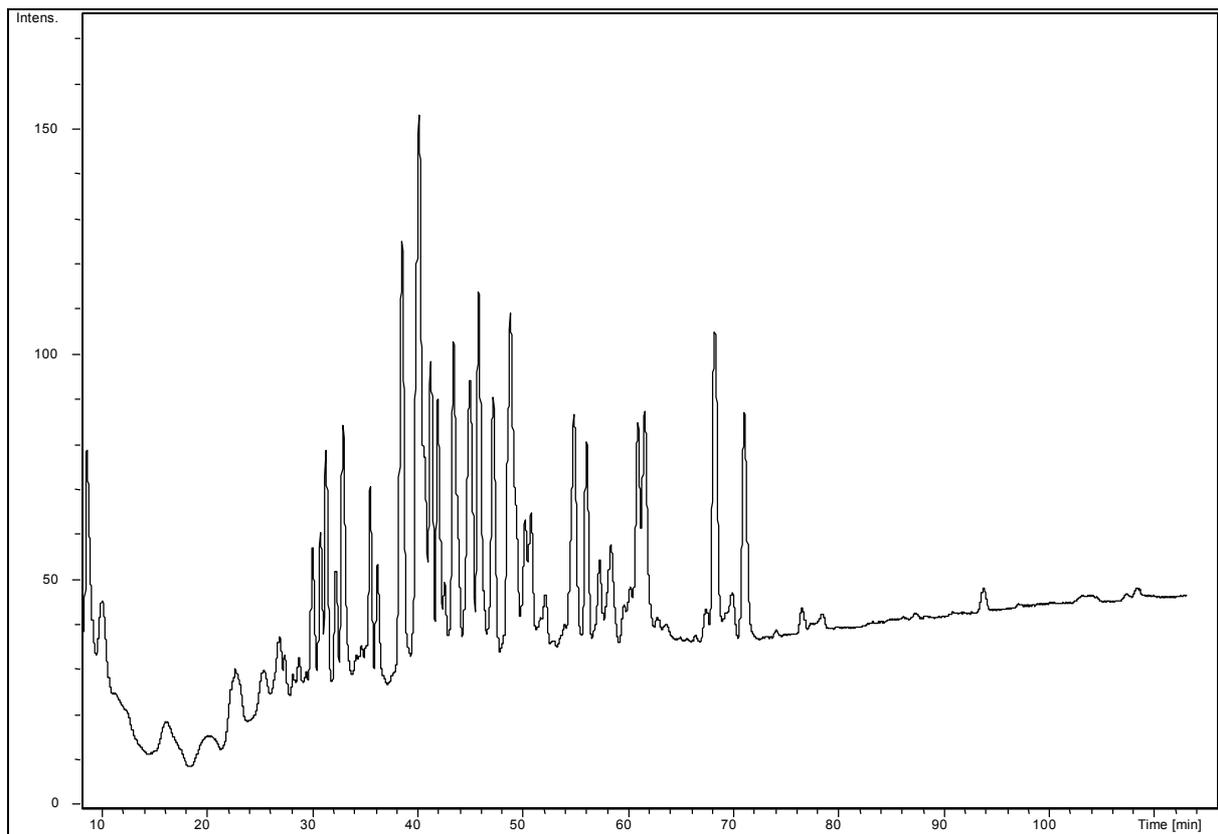


Abb.36: Mascot-Identifizierung. Balkendiagramm mit den erzielten Treffern (Scores) für die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase aus *T. thermophilus* HB8.



*Abb.37: UV-Chromatogramm der nach tryptischem Gelverdau erhaltenen Peptide der 67 kDa-Proteasebande. Die Peptidauftrennung erfolgte an einer RP-Kapillarsäule mit TSK-Gel Super-ODS 120 mm*300 µm. Das Peptidgemisch der verdauten 67 kDa-Bande wurde in 0,025 % TFA in H₂O gelöst. Es wurden 2,5 ml injiziert, und mit einer Flußrate von 5 µl/min eluiert. Als Elutionsmittel wurden Pufferlösung A mit 0,025 % TFA in H₂O und Lösung B mit 0,023 % TFA, 80 % Acetonitril in H₂O eingesetzt. Der Gradient setzte sich über den Zeitraum 0-10 Minuten aus 5 % B, 10-15 Minuten 10 % B, 15-100 Minuten 75 % B, 100-120 Minuten 95 % B zusammen. Das UV-Chromatogramm wurde bei einer Wellenlänge von 214 nm ermittelt.*

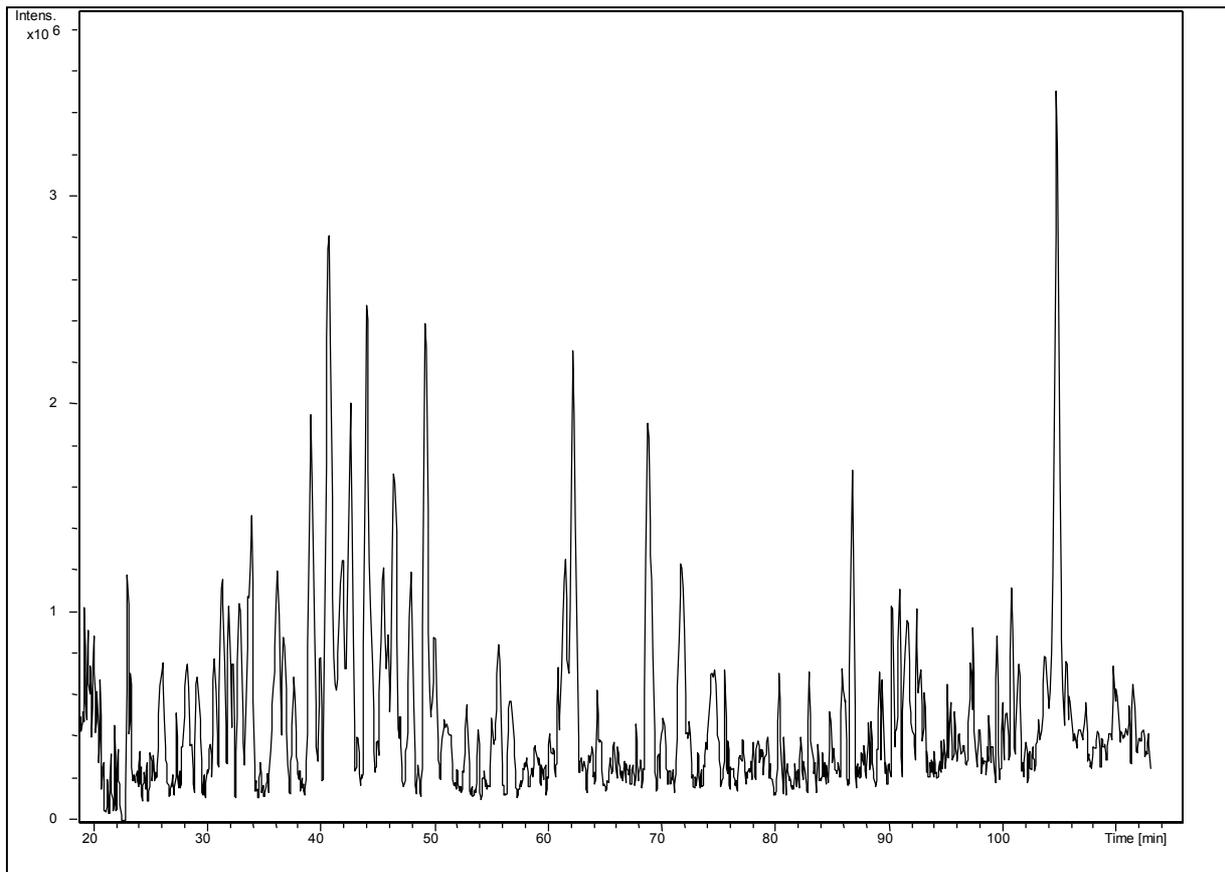


Abb.38: Base-Peak-Chromatogramm des Ionenstroms, welches beim LC-MS/MS-Experiment aufgenommen wurde. Die Einstellungen des Massenspektrometers waren: positiver Ionenmodus; Elektrospray Ionisations-Spannung: -4100 V ; Trockengas-Temperatur: $295\text{ }^{\circ}\text{C}$; Nebulizer: 22 psi ; Scanbereich: $300\text{-}1700\text{ m/z}$. Die Beladung der Falle wurde über die Software automatisch kontrolliert. MS/MS-Parameter: 1 Precursor Ion (isoliert mit 6 m/z), 9 MS/MS-Spektren, Active Exclusion ein (2 min), MS/MS Fragmentierungs-Amplitude: 1 V .

3.6 Isolierung der genomischen DNA aus *T. thermophilus* HB8

3.6.1 Extraktion der genomischen DNA

Bei der in 2.2.17 beschriebenen Methode zur DNA-Extraktion wurden 1,1 g Zellen des Bakterienstamms *T. thermophilus* HB8 schonend mit Hilfe von Lysozym und SDS lysiert, um die zu isolierenden Nucleinsäuren vor Scherkräften zu schützen. Zellproteine wurden mit Proteinase K aus *Tritirachium* verdaut. Roti-Phenol/Chloroform bewirkte die Denaturierung der Proteine im Lysat und die Sammlung der Proteine in der Interphase. Der Zusatz von Isoamylalkohol sollte die Ausbildung einer intensiven Interphase verhindern. Bei einem pH über 7 fanden sich alle Nucleinsäuren in der wässrigen Phase, welche mit Hilfe der Zentrifugation von der organischen Phase abtrennbar war. Durch den Zusatz von RNase wurden Ribonucleinsäuren spezifisch entfernt. Die genomische DNA wurde mit Ethanol schließlich ausgefällt, getrocknet und wieder in Lösung gebracht.

Die Konzentration der isolierten genomischen Desoxyribonucleinsäure aus *T. thermophilus* HB8 wurde über den Quotienten OD/0,02, mit 50,48 OD zu 2524 µg Desoxyribonucleinsäure pro Milliliter Lösung bestimmt (1OD=50 µg DNA pro ml). Bei einem Volumen von 1,5 ml wurden somit 3,79 mg DNA isoliert. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm betrug 1,87, was auf einen hohen Reinheitsgrad der isolierten Probe schließen läßt, gemessen am Standardwert von 1,85.

3.7 Kinetik der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8

Im Rahmen einer Charakterisierung der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 wurde die katalytische Aktivität des Enzyms mit Hilfe von Geschwindigkeitsbestimmungen des Substrat-Umsatzes einer spezifischen Reaktion gemessen. Das in Frage kommende Testsystem wurde bereits in 3.3.2 beschrieben und als solches zugrundegelegt. Das hierbei verwendete Substrat Ala-Ala-Phe-AMC wurde in einem Kaliumphosphatsystem mit Hilfe der isolierten Protease hydrolysiert, das infolge der enzymatischen Reaktion freigesetzte 7-Amino-4-methyl-cumarin als Produktzunahme fluorimetrisch bestimmt und die Reaktionsgeschwindigkeiten des Substrat-Umsatzes als relative Fluoreszenzen pro Zeiteinheit angegeben.

Ziel der nachfolgend beschriebenen Versuche war die Erarbeitung optimaler Bedingungen um maximal mögliche Reaktionsgeschwindigkeiten messen zu können. Als zu standardisierende Parameter wären Inkubationszeit, Substratkonzentration, Enzymkonzentration, pH-Wert, Pufferart sowie Temperatureinflüsse zu nennen.

3.7.1 Inkubationszeit

Da bei dem eingangs erwähnten Enzymtest (3.3.2) keine Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion, sondern die Produktzunahmen innerhalb definierter Inkubationszeiträume und -temperatur gemessen wurden, war es zunächst von Interesse, wie lange stetige Reaktionsgeschwindigkeiten infolge der katalytischen Aktivität der Protease bei definierten Substratkonzentrationen gegeben waren.

So sind in Abbildung 39 die erzielten relativen Fluoreszenzen in Abhängigkeit von der jeweiligen Substratkonzentration bei konstanter Enzymmenge und unterschiedlichen

Inkubationszeiten bei 70°C dargestellt. Das Resultat war eine stetige Zunahme der relativen Fluoreszenz aufgrund des hydrolysierten AMC bei allen verwendeten Substratkonzentrationen. Selbst bei den geringsten Substratkonzentrationen, bei welchen ein rascher Substratverbrauch limitierend sein könnte, war über einen Inkubationszeitraum von 2 Stunden Linearität gegeben.

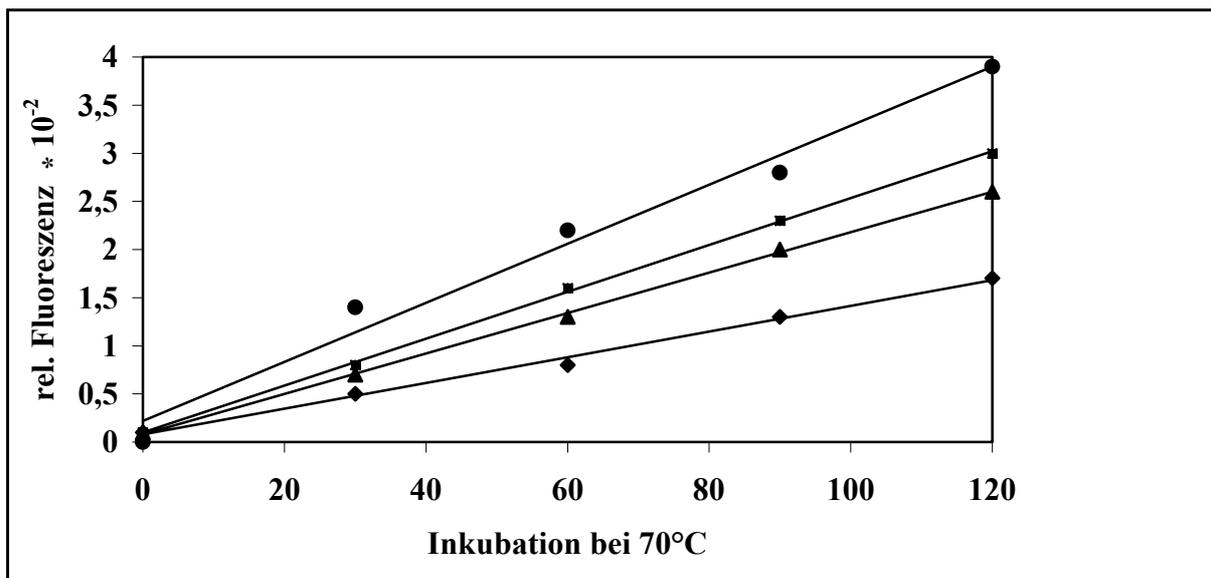


Abb.39: Relative Fluoreszenzen von AMC in Abhängigkeit von verschiedenen Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten bei 70°C und konstanter Proteasemenge. Die Reaktion der AMC-Zunahme wurde in Gegenwart von 25 μM (◇), 50 μM (▲), 100 μM (■) und 200 μM (●) Ala-Ala-Phe-AMC untersucht. Das Peptid wurde in 500 μl Methanol gelöst und in 12 ml 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 0,03 % Triton X-100 verdünnt. Für den Enzymtest wurden 2500 μl dieser Substratpufferlösung und 225 μg Enzym in 4 μl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 eingesetzt.

3.7.2 Substratkonzentration

Im weiteren Verlauf der kinetischen Untersuchungen wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Enzymmenge besteht. Da bei der enzymatischen Freisetzung des fluoreszierenden 7-Amino-4-methyl-cumarins eine exergone Einsubstrat-Reaktion vorliegt, deren Gleichgewicht auf seiten der Hydrolyse liegt, sollte die Theorie nach Michaelis und Menten anwendbar sein. Mit steigenden Substratkonzentrationen müßten somit höhere Geschwindigkeiten erzielbar sein, welche sich schließlich asymptotisch dem Grenzwert der Maximalgeschwindigkeit nähern.

In Abbildung 40 sind die Umsatzgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentrationen nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten bei 70°C aufgetragen. Aus der Graphik ist zu entnehmen, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten bei Substratkonzentrationen um 200 μM nicht mehr zunehmen. Läge in diesem Bereich Substratsättigung vor, so wäre die Maximalgeschwindigkeit erreicht. Die Bestimmung der Michaelis-Konstanten über die Hyperbelfunktion ermittelte jedoch eine Substratkonzentration von 199,8 μM für K_m . Somit wäre Substratsättigung im Bereich um 200 μM nicht gegeben, so daß die gemessenen Daten auf eine Fluoreszenzlöschung hindeuteten.

Nach Wiederholung desselben Versuches mit einer kürzer gewählten Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die nach Abbildung 41 vorgegebene Substratkonzentration der Michaelis-Konstanten mit 196,6 μM bestätigt. Die nicht eingetretene Fluoreszenzlöschung ist auf geringere Produktkonzentrationen infolge der geringeren Inkubationsdauer zurückzuführen. Die so erhaltenen Umsatzgeschwindigkeiten sind in Abbildung 41 dargestellt.

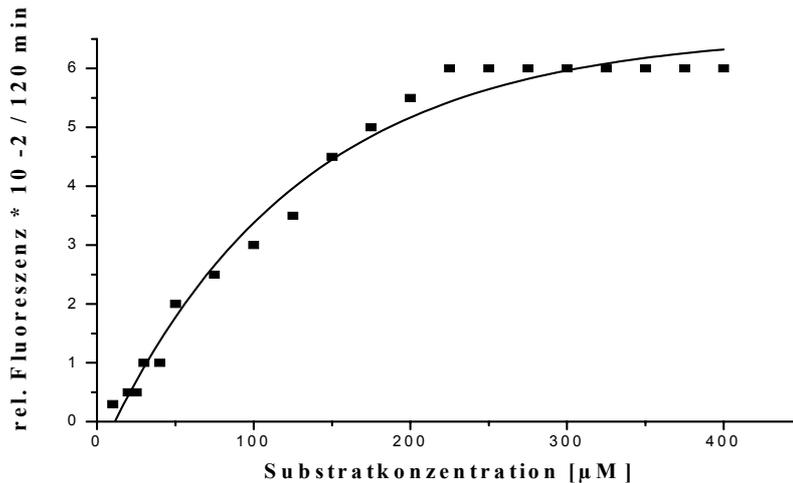


Abb.40: Bestimmung der Michaelis-Konstanten über die Hyperbelfunktion in der direkten Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen und nach zweistündiger Inkubation bei 70°C. Die Reaktion der Hydrolyse von Ala-Ala-Phe-AMC wurde über den Bereich von 10-400 µM im Kaliumphosphatsystem pH 7,5 untersucht. Es wurden 2500 µl der jeweiligen Substratlösung sowie eine konstante Enzymmenge von jeweils 225 µg Protein in 4 µl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 eingesetzt.

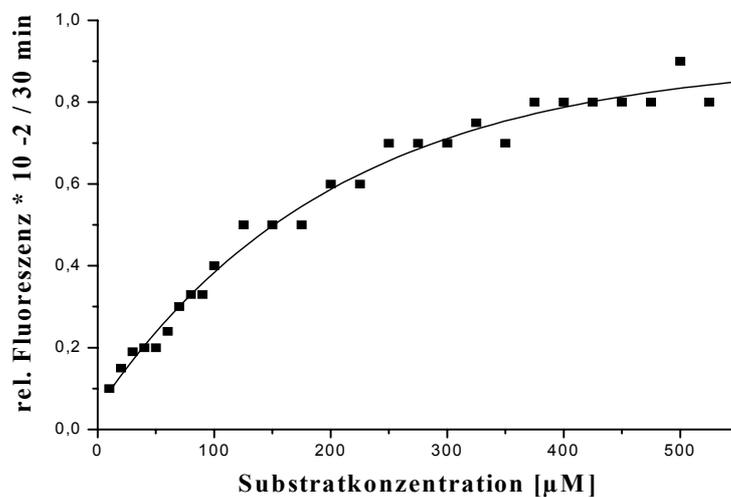


Abb.41: Bestimmung der Michaelis-Konstanten über die Hyperbelfunktion in der direkten Auftragung der relativen Fluoreszenzen von AMC bei verschiedenen Substratkonzentrationen und nach 30minütiger Inkubation bei 70°C. Die Reaktion der Hydrolyse von Ala-Ala-Phe-AMC wurde über den Bereich von 10-550 µM im Kaliumphosphatsystem pH 7,5 untersucht. Es wurden 2500 µl der jeweiligen Substratlösung sowie eine konstante Enzymmenge von jeweils 225 µg Protein in 4 µl 10 mM Kaliumphosphat eingesetzt.

3.7.3 Enzymaktivität

Unter der Voraussetzung, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der aktiven Enzymmoleküle proportional ist, müßten mit zunehmender Enzymmenge höhere Geschwindigkeiten erzielbar sein.

Die Variation der Enzymmenge bei konstanter Substratkonzentration ist in Abbildung 42 dargestellt. Das Resultat waren steigende Fluoreszenzen pro Zeiteinheit und somit höhere Stoffumsätze als Folge höherer Enzymaktivitäten.

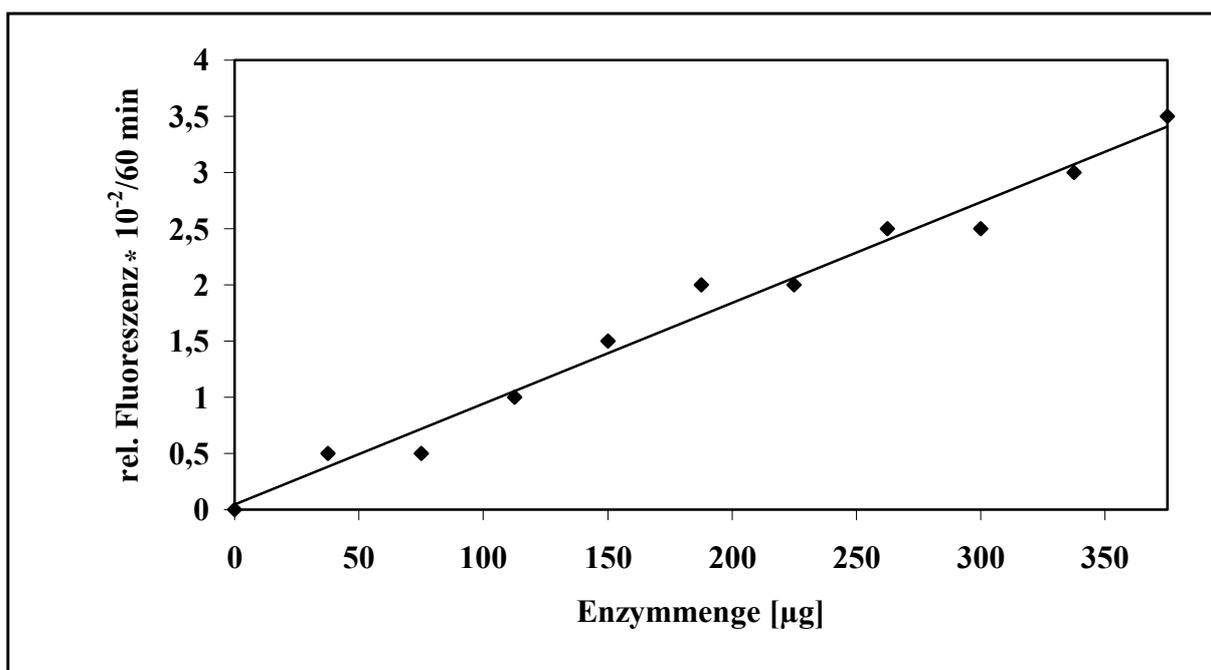


Abb.42: Darstellung des Substratumsatzes als relative Fluoreszenz von AMC in Abhängigkeit von der Enzymaktivität nach einstündiger Inkubation bei 70°C. Die Reaktion wurde für Enzymmengen von 37,5-375 µg im Kaliumphosphatsystem pH 7,5 und in Gegenwart von 200 µM Ala-Ala-Phe-AMC untersucht.

3.7.4 Temperaturmaximum

Temperaturstabilität als kennzeichnendes Charakteristikum von thermophilen Organismen bedeutet in vielen Fällen, daß ihre Enzyme gleichermaßen Thermophilie zeigen. So wurden bei der enzymkatalysierten Hydrolyse durch die Protease aus *T. thermophilus HB8* höhere Geschwindigkeiten bei höheren Temperaturen erwartet.

In Abbildung 43 wurde der untersuchte Sachverhalt wiedergegeben. Eine kontinuierliche Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit als Maß für Substratumsatz bei steigenden Temperaturen wurde beobachtet. Ein Temperaturmaximum zeichnete sich, im gegebenen Testsystem, bei $\sim 90^\circ\text{C}$ ab, sowie eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit jenseits des Maximums. Der pH-Wert im gegebenen Puffersystem blieb über den gesamten Temperaturbereich konstant.

Abbildung 44 zeigt den Temperatureinfluß auf die Enzymaktivität in der Darstellung nach Arrhenius. Im rechten Teil der Abbildung ist die stetige Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit als Gerade erkennbar, welche im linken Teil der Abbildung oberhalb von Temperaturen um 90°C durch Inaktivierung des Enzyms abfällt. Nach Arrhenius ist die Aktivierungsenergie proportional dem Steigungswinkel und wurde zu $E_a = 51,6 \text{ KJ/mol}$ berechnet.

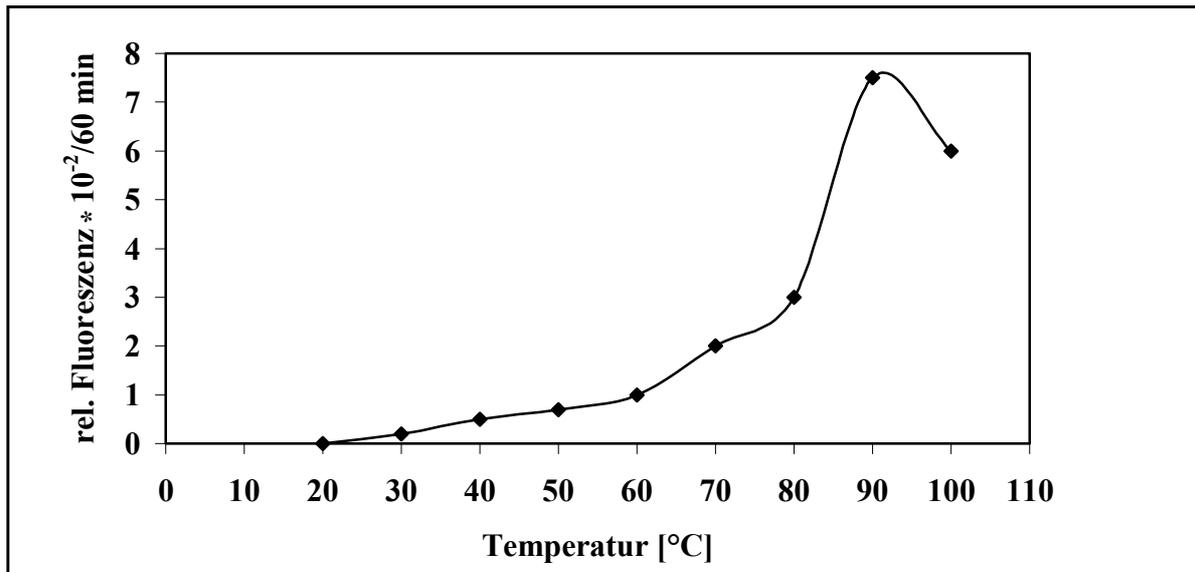


Abb.43: Umsatzgeschwindigkeit als relative Fluoreszenz von AMC in Abhängigkeit von der Temperatur und nach einstündiger Inkubation bei den angegebenen Temperaturen im 10 mM Kaliumphosphatsystem pH 7,5, 0,03 % Triton in Anwesenheit von 200 μ M Ala-Ala-Phe-AMC bei konstanter Enzymmenge von 225 μ g.

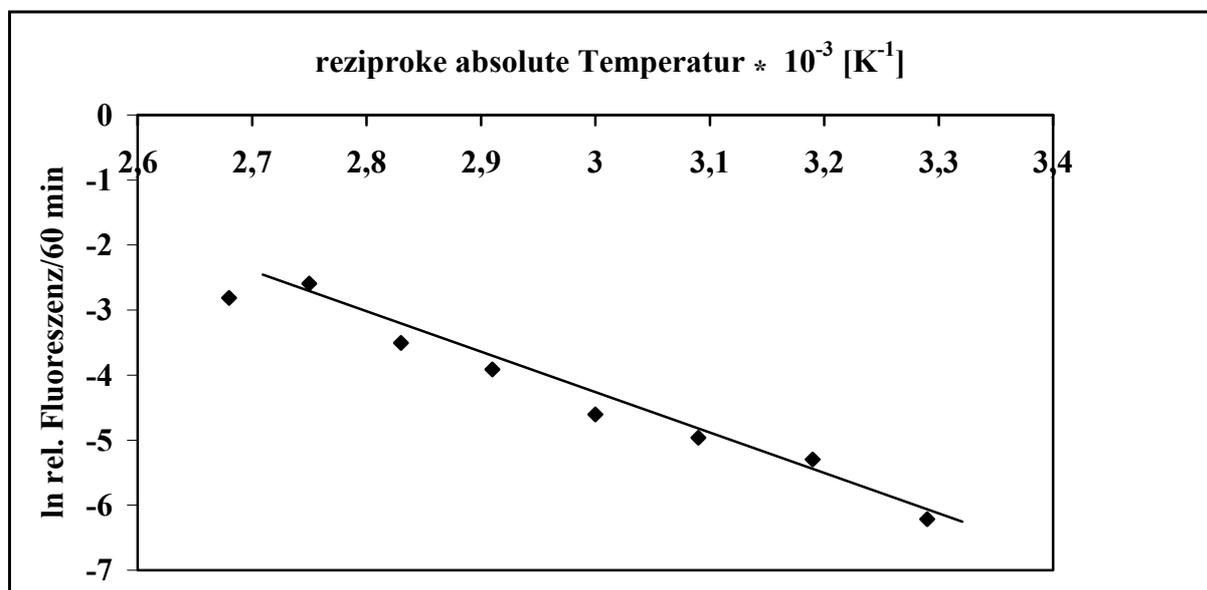


Abb.44: Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur nach Arrhenius. Darstellung der erzielten relativen Fluoreszenz nach einstündiger Inkubation bei den jeweiligen Temperaturen im 10 mM Kaliumphosphatsystem pH 7,5, 0,03 % Triton in Anwesenheit von 200 μ M Ala-Ala-Phe-AMC bei konstanter Enzymmenge von 225 μ g.

3.7.5 pH-Optimum

Als weiteres unterstützendes Merkmal zur Erzielung optimaler Reaktionsgeschwindigkeiten wurde die katalytische Aktivität bei verschiedenen pH-Werten untersucht, da Aktivierung bzw. Deaktivierung des Enzyms mit der Protonierung bzw. Deprotonierung bestimmter, im katalytischen Prozeß beteiligten Aminosäureresten im Zusammenhang steht.

Die erzielten Enzymaktivitäten nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei der jeweiligen pH-Stufe sind in Abbildung 45 wiedergegeben. Das Ergebnis läßt sich durch eine Gauß'sche Normalverteilung charakterisieren mit Werten um den Mittelwert pH 8, welcher dem pH-Optimum gleichzusetzen ist. Ferner wurden relative Fluoreszenzen in benachbarten Bereichen bei pH 7 und pH 9 gemessen. Jenseits pH 6 bzw. pH 10 waren keine Enzymaktivitäten erkennbar.

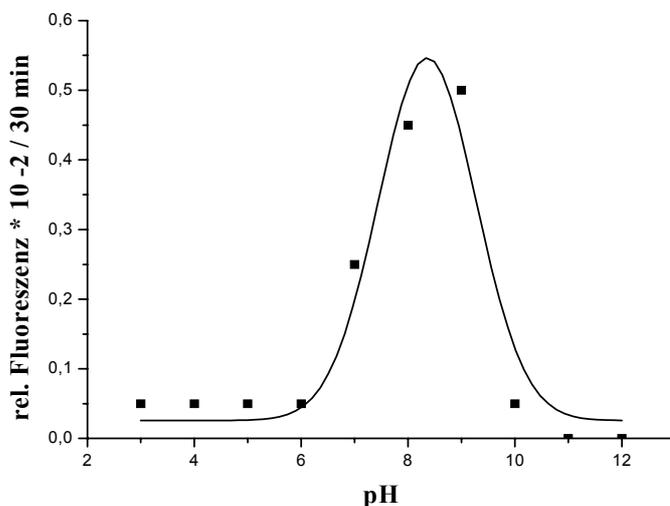


Abb.45: Bestimmung des pH-Optimums. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden als relative Fluoreszenzen in der Zeiteinheit von 30 Minuten bei 70°C in Abhängigkeit von den pH-Werten über einen Bereich von 3-12 bestimmt. Das Peptid Ala-Ala-Phe-AMC wurde als 400 µM Lösung in Universalpuffer nach Teorell und Stenhagen angesetzt. Für den Enzymtest wurden 2500 µl des Substratpuffers und 4 µl Enzymlösung bei der jeweiligen pH-Stufe inkubiert. Der aktuelle pH wurde am Ende der Aktivitätsbestimmung mit einer pH-Elektrode überprüft.

3.7.6 Enzymhemmung

Die Untersuchungen zur Spezifikation der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 wiesen insgesamt darauf hin, daß chymotrypsinähnliche Aktivitäten vorlagen (3.3.1; 3.3.3). Diese Resultate sollten durch Verwendung eines geeigneten Hemmstoffes unterstützt werden. Es war daher eine Hemmung des Enzyms durch den spezifischen Serinproteaseninhibitor 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfouridhydrochlorid (AEBSF), erhältlich unter dem Handelsnamen Pefabloc SC, zu erwarten. Der Inhibitor bindet irreversibel an das Protein, so daß keine Reaktivierung des Enzyms zu erwarten ist. Als Bindungsarten können entsprechend der gewählten Versuchsbedingungen sowohl nicht-kovalente Bindungen als auch kovalente Bindungen zustande kommen. Werden sehr hohe Inhibitorkonzentrationen, ausgedehnte Inkubationszeiten oder aber alkalische Bedingungen gewählt, so bindet die Sulfonylgruppe kovalent an Tyrosin- und Lysinreste des Proteins und an den freien Aminotерminus. Die Vorteile gegenüber den herkömmlich eingesetzten Hemmstoffen für Serinproteasen, wie z.B. PMSF und DFP, wurden darin gesehen, daß eine gute Löslichkeit in wässrigen Lösungen, Stabilität in Lösungen und eine stark verminderte Toxizität gegeben war.

Die erzielten Umsatzgeschwindigkeiten von Ala-Ala-Phe-AMC in Abhängigkeit von steigenden Inhibitorkonzentrationen sind in Abbildung 46 dargestellt. Die Versuchsparameter wurden so gewählt, daß die Substratkonzentration der Michaelis-Konstanten entsprach. Ferner wurde das Enzym mit dem Inhibitor bei Raumtemperatur vorinkubiert und dann bei 70°C weiter inkubiert. So ließen sich mit zunehmenden Inhibitorkonzentrationen deutlich schrittweise Hemmungen erzielen bis zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms bei einer Inhibitorkonzentration von 4 mM.

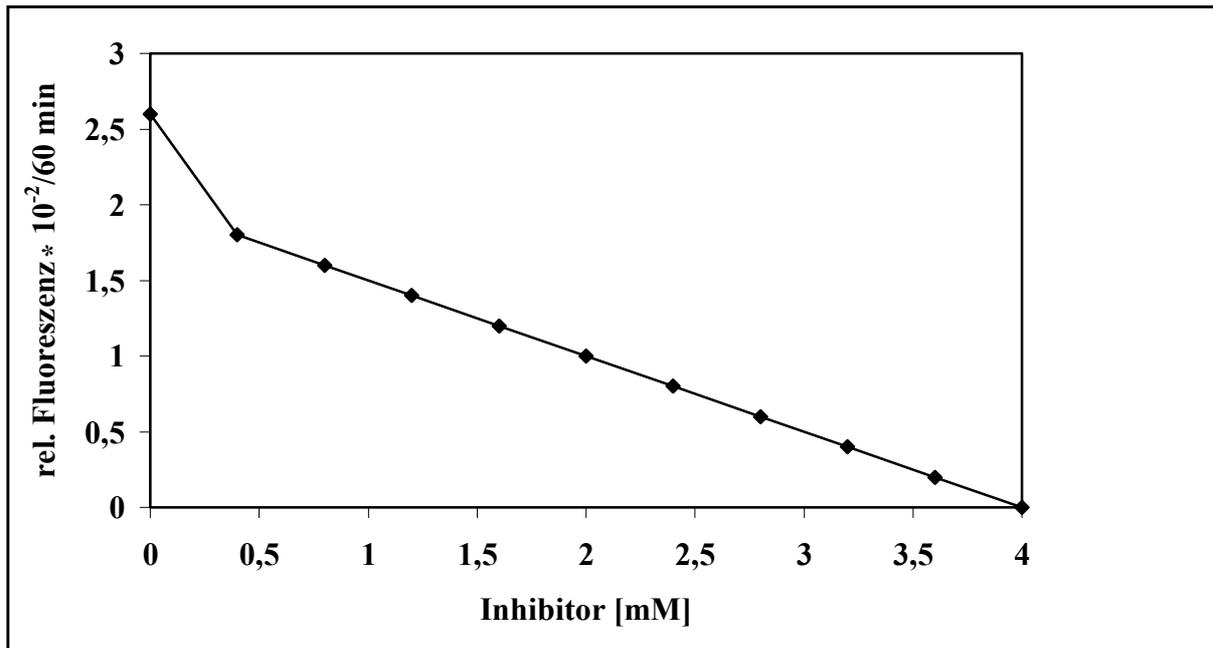


Abb.46: Irreversible Hemmung von Serinproteasen mit 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluoridhydrochlorid. Für den Enzymtest wurde das Substrat Ala-Ala-Phe-AMC als 200 μM Lösung eingesetzt ($\sim K_m$). Von der isolierten Protease aus *T. thermophilus* HB8 wurden 225 μg in 4 μl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 zugegeben. Der Inhibitorzusatz erfolgte in steigenden Konzentrationen (0,4-4 mM). Das Enzym und der Inhibitor wurden eine Stunde bei RT vorinkubiert und bei 70°C für weitere 60 Minuten weiter inkubiert.

3.8 Zellkultivierung und Stammhaltung von *B. caldolyticus*

3.8.1 Zellkultivierung und Stammhaltung

In Vorversuchen zeigte es sich, daß der thermophile Stamm *B. caldolyticus* beträchtliche proteolytische Aktivitäten offenbar als extrazelluläre Proteasen an das Kulturmedium abgibt. Zur Isolierung dieser Enzymaktivität wurden die Zellen von *B. caldolyticus* in 5 Litern eines komplexen Flüssigmediums (2.2.1) bei 70°C und mit 90 U/min kultiviert. Hierfür wurden 4 Vorkulturen zu 50 ml mit jeweils einer Stammkultur (2.2.1) beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erfolgte die Überführung dieser Vorkulturen in jeweils 400 ml Kulturmedium, welche ihrerseits nach weiteren 24 Stunden in 800 ml Nährmedium überimpft wurden. Infolge eines eher langsamen Wachstums des Stamms wurden die Zellen nach wenigstens 24 weiteren Stunden abzentrifugiert.

Somit ließen sich bei der Kultivierung von *B. caldolyticus* unter den beschriebenen Bedingungen aus 5 Litern Nährmedium Zellmassen von 4-8 g Feuchtgewicht und 5 Liter zellfreies Medium erzielen, in welchem proteolytische Aktivitäten erwartet wurden, obwohl diese im Medium nach Anson (2.2.9.1) nicht messbar waren. Aus diesem Grund mußte die Beschreibung des Anreicherungs-faktors und der Ausbeute in Tabelle 5 unterbleiben. In 1,47 Litern zellfreiem Medium wurden 44,1 mg Protein nach Bradford (2.2.7.1) bestimmt (Tabelle 5).

Für die Gewinnung der Stammkulturen von *B. caldolyticus* wurde, analog dem für *T. thermophilus* HB8 beschriebenen Verfahren (3.1.2), ein Kultivierungsansatz von *B. caldolyticus* (3.8.1) abzentrifugiert, der Zellniederschlag mit geringen Mengen Nutrient broth pH 7 (2.2.1) suspendiert und jeweils 250 µl der so erhaltenen Zellsuspension auf 200 µl Glycerin in Reaktionsgefäße geschichtet. Die Konservierung der Stammkulturen erfolgte bei -70°C.

3.9 Entwicklung eines Reinigungsverfahrens für extrazelluläre Proteasen aus *B. caldolyticus*

Unter Berücksichtigung früherer Berichte über die Segregation thermophiler Enzyme durch *B. caldolyticus* sollte der Stamm hinsichtlich extrazellulärer Proteasen untersucht werden (Heinen und Heinen, 1972; Grootegoed et al., 1973). Da extrazelluläre Enzyme direkt ins Medium abgegeben werden, erübrigte sich ein Zellaufschluß. Somit galt es als erstem Schritt im Medium vorliegendes proteolytisch aktives Enzym zu konzentrieren und im Anschluß daran rein darzustellen. Eine unkomplizierte Methode, welche beide Zielsetzungen in sich vereint, wurde in der Anionenaustauschchromatographie gesehen.

3.9.1 Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex

A-25

Die Konzentrierung und Anreicherung proteolytisch aktiver Enzyme im zellfreien Medium wurde an DEAE Sephadex A-25 vorgenommen. Bei der Gelmatrix handelt es sich um eine mit Epichlorhydrin vernetzte Dextranmatrix, an welche Diethylaminoethylgruppen kovalent gebunden sind.

Abb.47 zeigt sowohl die Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm als auch die ermittelten proteolytischen Aktivitäten nach Anson (2.2.9.1) in Abhängigkeit von der Anzahl der Fraktionen und einem aufsteigenden NaCl-Gradienten. Aus der Darstellung geht hervor, daß proteolytische Aktivitäten über einen weiten Bereich, von Anfang bis Ende des NaCl-Gradienten, bestimmt wurden. Auch erkennbar ist, daß die Enzymaktivitäten nach der Anionenaustauschchromatographie als erstem Reinigungsschritt insgesamt im Vergleich zu der Protease aus *T. thermophilus* HB8 geringer sind. Prinzipiell ist es jedoch gelungen die im Medium vorliegenden proteolytischen Enzymaktivitäten mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie zu konzentrieren

und anzureichern. Die aktiven Fraktionen 2-20, 28-40 und 41-56, 63-84 wurden so zusammengefasst, daß drei Enzymfraktionen mit den zugehörigen Volumina von 56 ml, 40 ml und 100 ml resultierten (Tabelle 5). Nach Konzentrierung mit Hilfe der Ultrafiltration (2.2.6.1) an einer YM 3-Membran ließen sich die Volumina auf 2 ml, 1 ml bzw. 2,8 ml einengen. Das Protein der genannten Enzymfraktionen wurde nach Bradford (2.2.7.1) zu 0,6 mg, 1,6 mg und 5 mg vor der Konzentrierung und zu 0,2 mg, 0,2 mg bzw. 3,6 mg nach der Konzentrierung bestimmt. Für die enzymatische Aktivität wurden 0,2 mAU, 0,1 mAU und 0,3 mAU vor dem Konzentrierungsvorgang und 0,1 mAU, 0,04 mAU bzw. 0,3 mAU nach der Ultrafiltration für die Enzymfraktionen ermittelt (Tabelle 5).

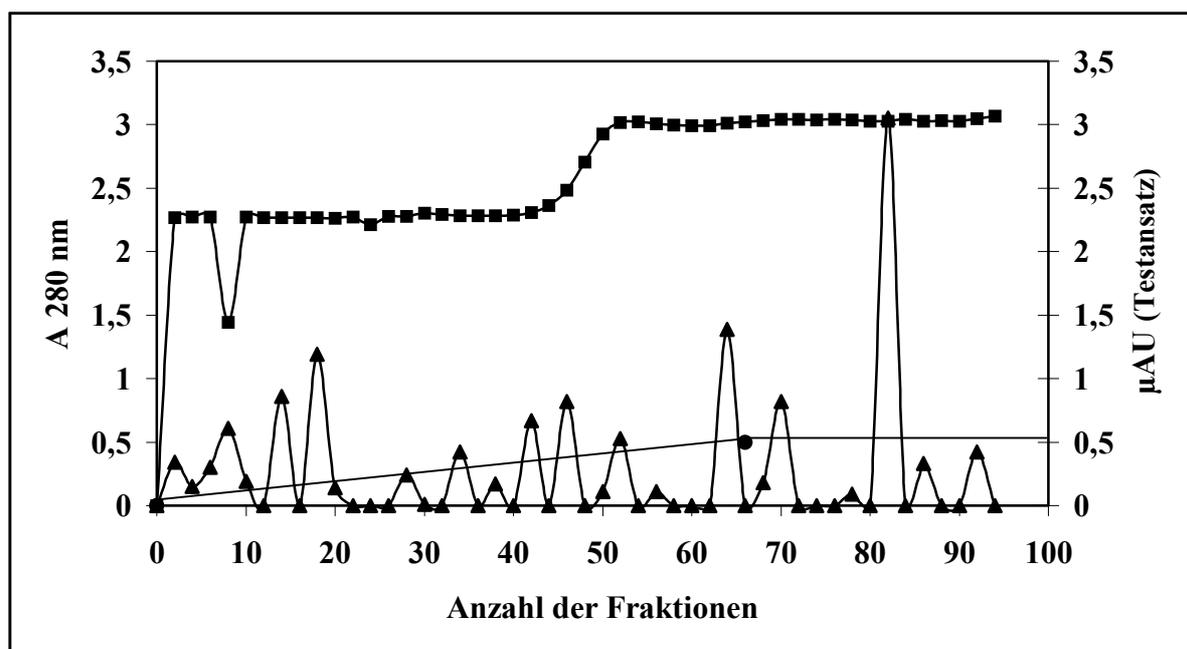


Abb.47: Anreicherung der proteolytisch aktiven Enzymfraktionen aus dem zellfreien Kulturmedium von *B. caldolyticus* an DEAE Sephadex A-25. Es wurden 1,47 l zellfreies Medium mit einem Proteingehalt von 44,1 mg auf das Gelmaterial gegeben. Die Elution erfolgte mit einem 0-0,5 M NaCl-Gradienten in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 (●). Nach Beendigung des Gradienten wurde mit einer 0,5 M NaCl-Lösung in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 nachgespült. Gesammelt wurden 94 Fraktionen zu jeweils 3 ml und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1ml/min; (■) kennzeichnet die Absorption bei 280 nm. Proteolytische Aktivitäten wurden als (▲) dargestellt.

3.9.2 Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60

Die Auftrennung von Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 an Superdex 200 mit einem Proteingehalt von 1,3 mg/ml, ist aus Abbildung 48 zu entnehmen. Somit wurde die angereicherte Enzymfraktion 3, welche nach der Anionenaustauschchromatographie mehrere unterschiedliche Aktivitätsbanden in sich vereinigte, nach Kriterien der Molekülgröße untersucht.

Die Proteaseaktivitäten fanden sich nun als Banden mit abnehmender Molekülgröße über den Säulenlauf verteilt. Im Vergleich mit der bestimmten Absorption bei 280 nm waren die Proteasebanden direkt vor, nach und unter dem Absorptionsmaximum bei 280 nm lokalisiert. Die aktiven Fraktionen 40-52 und 57-64/72-98 wurden daher als zwei separate Enzymfraktionen zusammengefaßt. Zur besseren Unterscheidung dieser Enzymfraktionen von jenen der Anionenaustauschchromatographie werden sie als Proteasefraktion 1 und 2 im weiteren bezeichnet. Eine Proteinbestimmung nach Bradford (2.2.7.1) war im nicht eingeeengten Zustand nicht möglich. Die Volumina für Proteasefraktion 1 bzw. 2 betragen 20 und 55 ml. Die entsprechenden Aktivitäten nach Anson (2.2.9.1) waren 0,08 mAU und 0,08 mAU (Tabelle 5). Nach Konzentrierung der zwei Enzymfraktionen mit dem Ultrafiltrationssystem, unter Verwendung einer YM 3-Membran (2.2.6.1), betragen die Volumina 1,7 ml und 1 ml (Tabelle 5) mit einem Proteingehalt von 0,18 mg und 0,02 mg. Die Aktivitäten wurden für beide Enzymfraktionen zu 0,03 mAU bestimmt.

Bei einer Gesamtproteinmenge von 3,6 mg der Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie können 0,5 mg bzw. 0,06 mg Protein in Proteasefraktion 1 bzw. 2 nach Gelfiltration an Superdex mit einer proteolytischen Aktivität von 0,1 mAU erwartet werden. Tabelle 5 zeigt die ermittelten Werte im Einzelnen, welche beim letzten Schritt der Gelfiltration rechnerisch auf die vorliegende Gesamtmenge ergänzt wurden (Faktor 2,8).

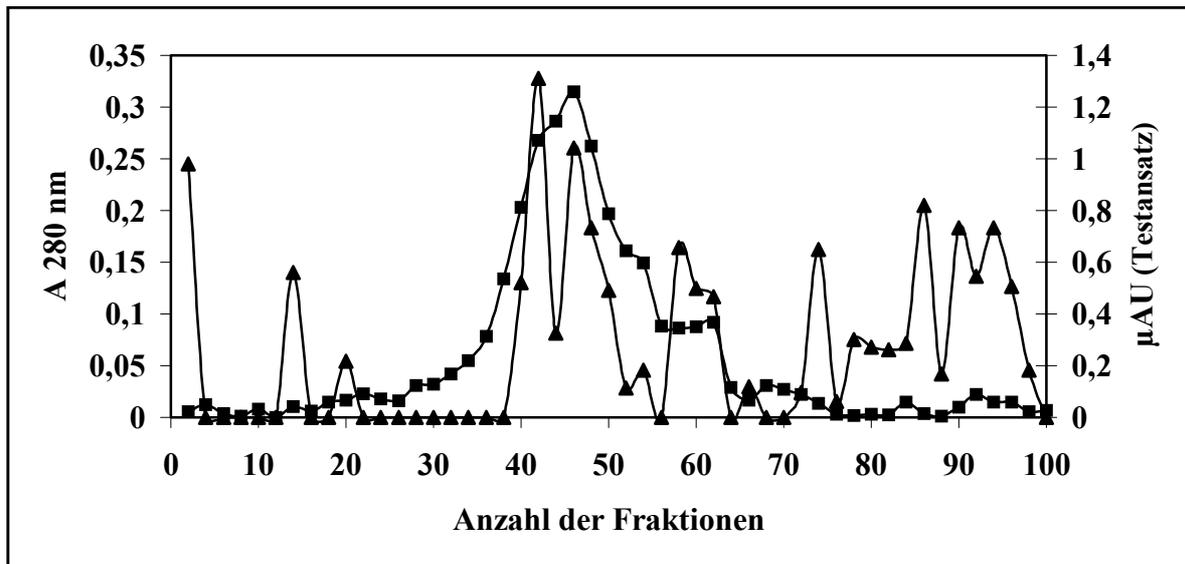


Abb.48: Gelchromatographie der nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 resultierenden Enzymfraktion 3 an Superdex 200 HiLoad 16/60. Das Säulenmaterial wurde mit mehreren Gelbettvolumina 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 äquilibriert. Es wurden 1,3 mg Protein in 1 ml von der angereicherten Enzymlösung auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte gleichfalls mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Es wurden 100 Fraktionen zu 2 ml gesammelt. Die Absorption bei 280 nm wurde mit (■) gekennzeichnet. (▲) zeigt die proteolytische Aktivität bei 750 nm.

3.9.3 Reinigungstabelle

Aus nachfolgender Tabelle sind die erzielten Ergebnisse der verschiedenen Reinigungsverfahren zur Gewinnung extrazellulärer Proteasen aus *B. caldolyticus* zusammenfassend dargestellt. Ausgehend von 1,47 Litern zellfreiem Medium, in welchem keine proteolytischen Aktivitäten messbar waren, konnten proteolytische Aktivitäten mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 konzentriert werden. Es resultierten drei Enzymfraktionen mit Gesamtproteingehalten von 0,6 mg, 1,6 mg und 5 mg vor der Konzentrierung, welche sich infolge des Konzentrierungsschritts mit Ultrafiltration verringerten. Da Enzymfraktion 1 und Enzymfraktion 2 identisch waren und bereits rein vorlagen wurde mit Enzymfraktion 3 weitergearbeitet. Mit Hilfe der Gelchromatographie an Superdex 200 konnten zwei proteolytisch aktive Proteasefraktionen 1 und Proteasefraktion 2 gewonnen werden. Durch Größenbestimmungen der vorliegenden Untereinheiten mit SDS-PAGE zeigte sich, daß Proteasefraktion 1 und Proteasefraktion 2 sich hinsichtlich ihrer Größe von Enzymfraktion 1 und 2 nach Anionenaustauschchromatographie unterschieden und Proteasefraktion 2 in Reinform isoliert wurde (0,06 mg).

Die Beschreibung des Reinheitsgrads und der Ausbeute wurden in der Tabelle nicht dargestellt, da die Ausgangsgrößen (alle vorliegenden Aktivitäten im Medium) nicht bekannt waren. Zusätzlich wurde eine eindeutige Festlegung dieser Größen durch das Vorhandensein verschiedener Proteasen erschwert, so daß eine differenziertere Darstellung hätte erfolgen müssen.

Tab.5: Übersicht der Reinigung extrazellulärer Proteasen aus *B. caldolyticus*.

Reinigungs- Methode	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamt- protein [mg]	Aktivität [mAU]	Spezifische Aktivität [mAU/g]
Medium	1470	0,03	44,1	nicht meßbar	-
Filtrat nach DEAE Sephadex A-25	1470	0,01	14,7	nicht meßbar	-
Enzymfraktion 1 nach DEAE Sephadex A-25	56	0,01	0,6	0,2	333,3
Enzymfraktion 2 nach DEAE Sephadex A-25	40	0,04	1,6	0,1	62,5
Enzymfraktion 3 nach DEAE Sephadex A-25	100	0,05	5	0,3	60
Enzymfraktion 1 nach Ultrafiltration	2	0,1	0,2	0,1	500
Enzymfraktion 2 nach Ultrafiltration	1	0,2	0,2	0,04	200
Enzymfraktion 3 nach Ultrafiltration	2,8	1,3	3,6	0,3	83,3
Proteasefraktion 1 nach Superdex 200	2,8*20	nicht meßbar	nicht meßbar	0,2	-
Proteasefraktion 2 nach Superdex	2,8*55	nicht meßbar	nicht meßbar	0,2	-
Proteasefraktion 1 nach Ultrafiltration	2,8*1,7	0,3	0,5	0,1	200
Proteasefraktion 2 nach Ultrafiltration	2,8*1	0,06	0,06	0,1	1667

2,8=Umrechnungsfaktor (3.9.2)

3.9.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Reinheitsüberprüfung der erhaltenen extrazellulären Proteasefraktionen im Verlauf der Isolierung aus *B. caldolyticus* erfolgte analog der isolierten Protease aus *T. thermophilus HB8* mit der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.2.8.1). Die drei angereicherten Enzymfraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 wurden in einem Trenngel einer 10 % Acrylamidkonzentration separat entsprechend ihrer Molmassen aufgetrennt.

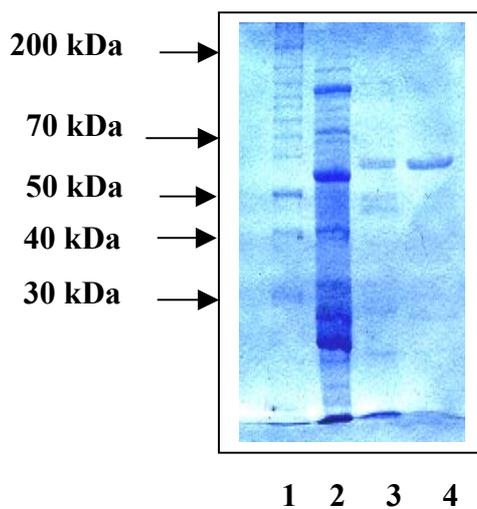
In Abbildung 49 ist das Elektropherogramm zu sehen, welches von links nach rechts einen Proteinmolekulargewichtsstandard, bestehend aus 12 rekombinanten Proteinen (3.2.9), und die Enzymfraktionen 3, 2 und 1 darstellt. In die Taschen des Sammelgels wurden 16,6 µg, 9,3 µg und 9,8 µg Protein von Enzymfraktion 3, 2 und 1 eingebracht. Aus dem Elektropherogramm ist zu entnehmen, daß Enzymfraktion 1 (4) eine Bande bei ~60 kDa zeigt. Enzymfraktion 2 (3) zeigt gleichfalls diese ~60 kDa-Bande und geringfügige Spuren von Fremdprotein, so daß beide Enzymfraktionen weitgehend identisch sind. Enzymfraktion 3 (2) unterscheidet sich hingegen wesentlich von den zuvor genannten. So charakterisieren eine Vielzahl zusätzlicher Proteinbanden das Trennungsbild.

Somit resultierten nach dem Schritt der Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 aus 1470 ml enzymhaltigen Mediums von *B. caldolyticus* 0,2 mg einer Protease in Reinform, deren molare Masse unter denaturierenden Bedingungen im Vergleich mit dem Proteinstandard auf ~60 kDa geschätzt wurde. Ferner konnten weitere 0,2 mg derselben Protease isoliert werden, jedoch mit schwachen Verunreinigungen (Tabelle 5).

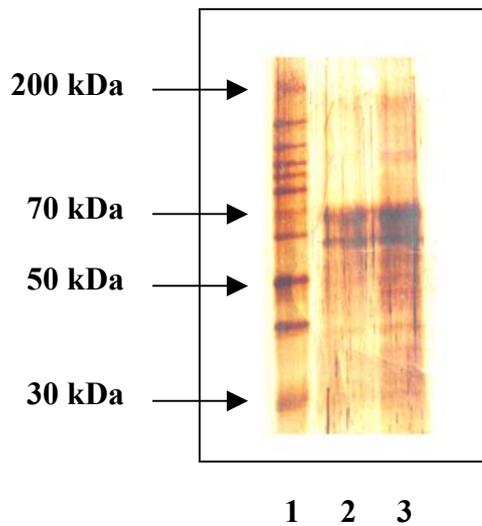
Abbildung 50 zeigt das Elektropherogramm der Auftrennung von Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60. Von links nach rechts sind die Proben der angereicherten Proteasenfraktionen 2 (2) und 1 (3) mit 0,14 µg und 0,94 µg Protein im Vergleich mit dem Proteinstandard (3.2.9) dargestellt.

Proteasefraktion 2 zeigte eine Bande mit einer Molmasse von ~ 70 kDa und eine schwächere Bande, welche mit der 60 kDa-Bande identisch sein könnte, während Proteasefraktion 1 neben dem beschriebenen Bandenmuster noch andere Banden enthielt.

So kann zusammenfassend gesagt werden, daß mit Hilfe der Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60 0,06 mg einer weiteren extrazellulären Protease, deren molare Masse unter denaturierenden Bedingungen auf ~ 70 kDa geschätzt wurde, gereinigt und weitere 0,5 mg desselben Enzyms angereichert werden konnten (Tabelle 5).



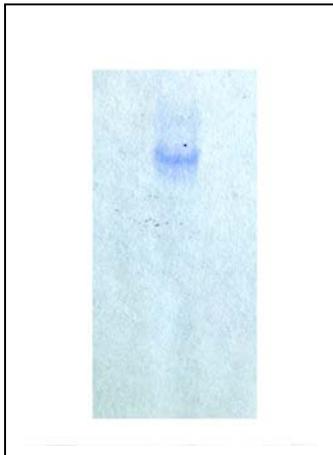
*Abb.49: Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Enzymfraktionen nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25. Die isolierten extrazellulären Proben aus *B. caldolyticus* wurden mit demselben Volumen an SDS-Pufferlösung sowie 1/10 Volumen Bromphenolblaulösung gemischt und für 10 Minuten gekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch Anlegen einer Stromstärke von 28 mA in einem 10 % Trenngel. Von links nach rechts wurden der Proteinstandard (3.2.9) (1), 16,6 μg (2), 9,3 μg (3) und 9,8 μg (4) Protein der Enzymfraktionen 3, 2 und 1 in das 2,5 % Sammelgel aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliantblau R 250 sichtbar gemacht.*



*Abb.50: Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Proteasefraktionen nach Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60. Die isolierten extrazellulären Proben aus *B. caldolyticus* wurden mit demselben Volumen an SDS-Pufferlösung sowie 1/10 Volumen Bromphenolblaulösung gemischt und für 10 Minuten gekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch Anlegen einer Stromstärke von 28 mA in einem 10 % Trenngel. Von den Proteasefraktionen 1 (3) und 2 (2) wurden 0,94 µg bzw. 0,14 µg Protein in das 2,5 % Sammelgel eingebracht. Von links nach rechts sind die Proteasefraktionen in beschriebener Reihenfolge und im Vergleich mit dem Proteinstandard (1) zu sehen. Die Proteine wurden mit der Silberfärbung sichtbar gemacht.*

3.9.5 Nicht-dissoziierende diskontinuierliche Polyacrylamid-gelelektrophorese

Im nicht-dissoziierenden diskontinuierlichen Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 7,5 % und einem pH von 8,8 ergab die Reinheitsüberprüfung nach Auftrennung der Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 eine diskrete Enzymbande. Die Auftrennung ist dem Elektropherogramm in Abbildung 51 zu entnehmen. Hierbei wurden 29,4 µg Protein eingesetzt.



*Abb.51: Diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese der angereicherten Enzymfraktion 1 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 aus *B. caldolyticus*. Die Auftrennung wurde in einem 7,5 % Trenngel pH 8,8 vorgenommen nachdem 29,4 µg Protein in 30 µl 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 mit 1/10 Volumen 0,2 % Bromphenolblau gemischt und ins 2,5 % Sammelgel aufgetragen wurden. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliantblau R 250 gefärbt.*

3.9.6 Größenbestimmung der extrazellulären Proteasen mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die genauere Bestimmung der molaren Massen der isolierten extrazellulären Proteasen aus *B. caldolyticus* wurde analog 3.4.1 die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen untersucht.

In Abbildung 52 sind die zurückgelegten Wanderungstrecken von zwei unterschiedlichen Proteinmolekulargewichtsstandards und den isolierten Enzymfraktionen 1 und 2 nach Anionenaustauschchromatographie (B) und Gelchromatographie (D) dargestellt. Die Auftrennung der Standards und die Zuordnung der Molmasse nach Firmenangabe ist aus (A) und (C) zu ersehen. Durch direkten Vergleich der Proteasen mit dem jeweiligen Standard konnten für Enzymfraktion 1 und Enzymfraktion 2 nach Anionenaustauschchromatographie Werte mit ~60 kDa (B) und für Proteasefraktion 2 ein Wert mit ~70 kDa für die molaren Massen abgeschätzt werden (3.9.4).

Die logarithmische Auftragung der molaren Masse der Proteine in Abhängigkeit von deren relativer Beweglichkeit erlaubt genauere Bestimmungen wie aus Abbildung 53 und 54 zu ersehen ist. Für die isolierte Protease nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 wurde eine Wanderungstrecke von 1,95 cm gemessen, welcher somit eine Molmasse von 57 kDa zuzuordnen ist (Abbildung 53). Entsprechend wurde für die ~70 kDa-Bande nach Gelchromatographie an Superdex 200 eine relative Beweglichkeit von 1,65 cm ermittelt, was einem Wert von 69 kDa entspricht (Abbildung 54).

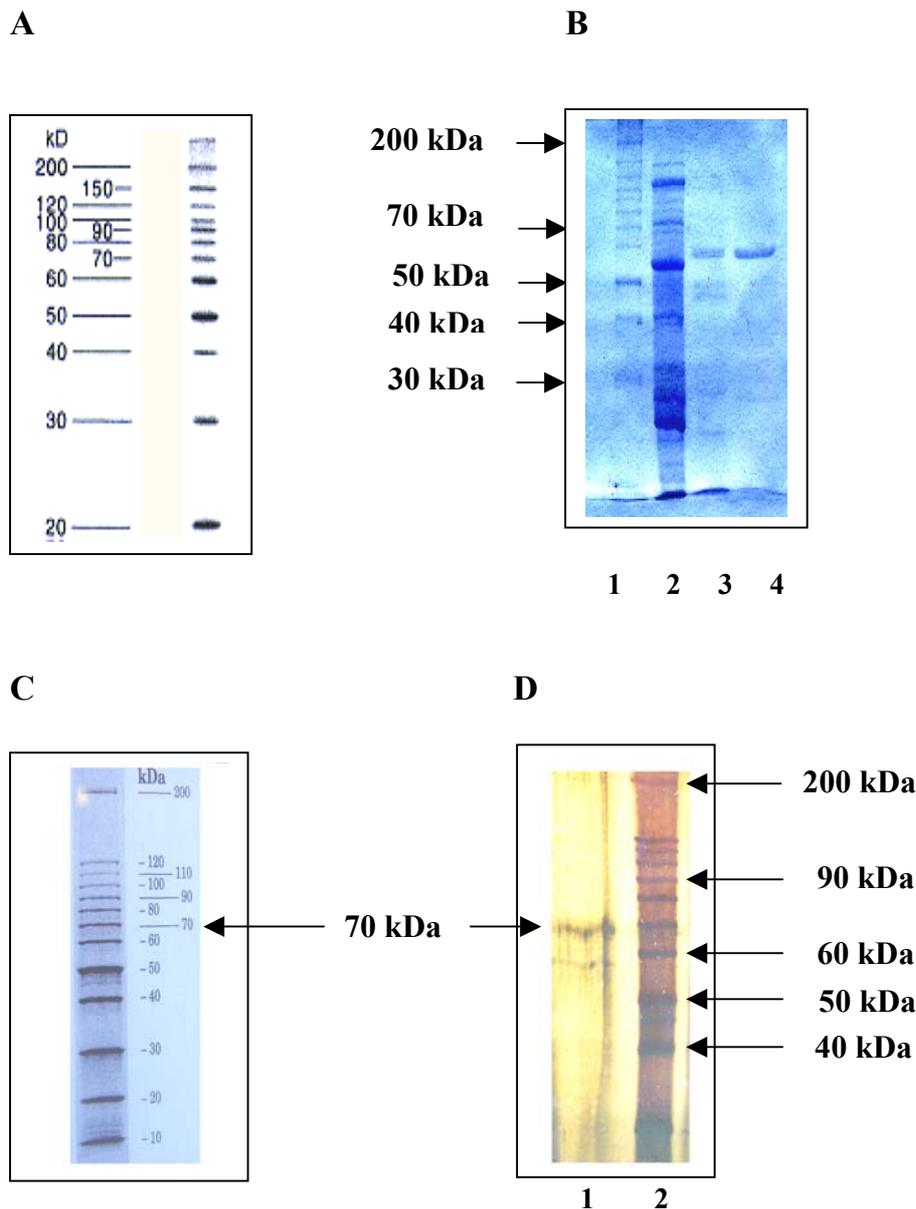


Abb.52: Ermittlung der Wanderungstrecken der Standardproteine und der isolierten Proteasen aus *B. caldolyticus* im SDS-PAGE-Trenngel. Der direkte Vergleich mit dem jeweiligen Standard ermöglicht eine Abschätzung der molaren Masse der Proteasen. (A) zeigt die Auftrennung des in B verwendeten Proteinstandards nach Firmenangabe. (B) stellt die Separierung der Enzymfraktionen 3 (2), 2 (3) und 1 (4) (von links nach rechts) nach Anionenaustauschchromatographie und des in (A) beschriebenen Proteinstandards (1) im 10 % Trenngel unter denaturierenden Bedingungen dar. (C) zeigt die schematische Auftrennung des in D eingesetzten Standards. In (D) ist die resultierende Proteasefraktion 2 (1) nach Gelchromatographie an Superdex, welche unter entsprechenden Bedingungen im Vergleich mit dem Proteinstandard (2) elektrophoretisch aufgetrennt wurde, dargestellt.

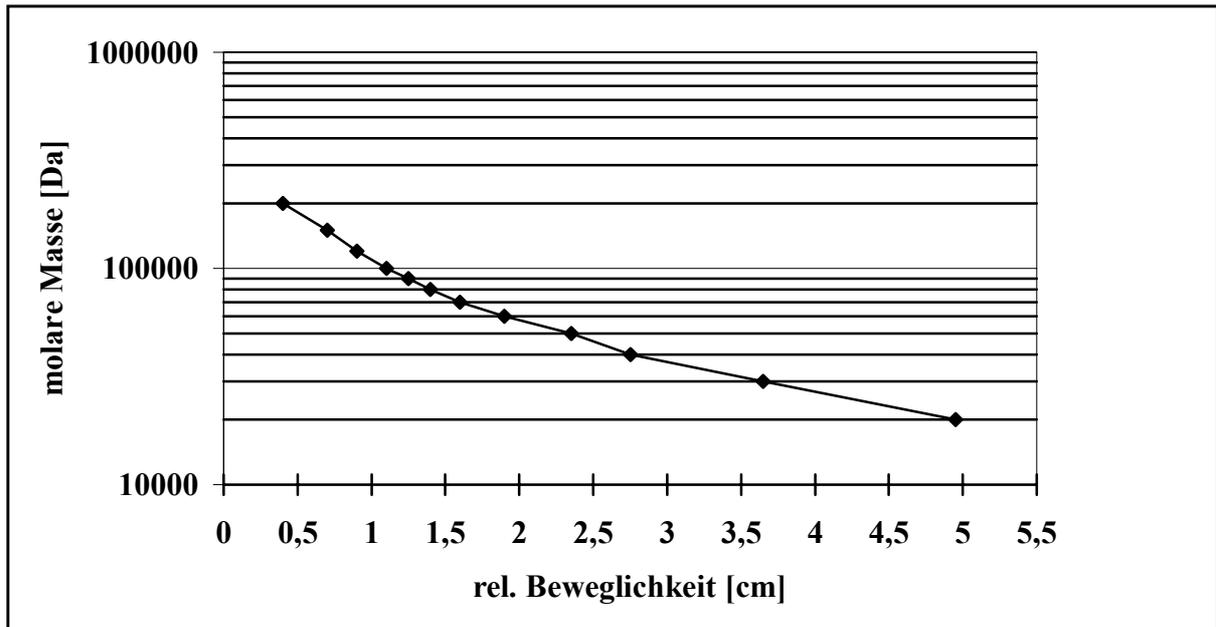


Abb.53: Halblogarithmische Darstellung der molaren Massen der 12 Standardproteine zwischen 20 und 200 kDa in Abhängigkeit ihrer Beweglichkeit im 10 % SDS-Polyacrylamidgel. Über die ermittelte Wanderungstrecke von 1,95 der Enzymfraktionen 1 und 2 nach Anionenaustauschchromatographie konnte die Molmasse zugeordnet werden.

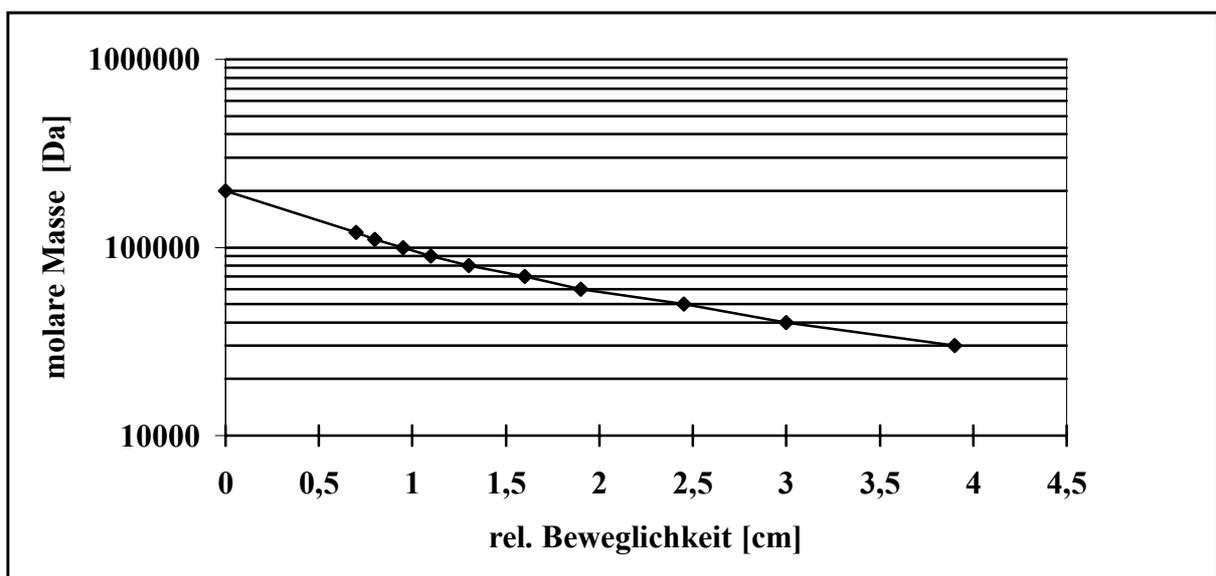


Abb.54: Halblogarithmische Darstellung der molaren Massen von 11 Standardproteinen zwischen 30 und 200 kDa in Abhängigkeit ihrer Beweglichkeit im 10 % SDS-Polyacrylamidgel. Über die Wanderungstrecke von 1,65 cm ließ sich die entsprechende Molmasse für die nach Gelchromatographie an Superdex identifizierte Proteasefraktion 2 bestimmen.

3.10 Immunisierung eines Kaninchens mit Antigen aus *B. caldolyticus*

3.10.1 Immunisierung

Für die Gewinnung polyklonaler Antikörper mit Hilfe des Immunsystems höherer Lebewesen wurde ein Kaninchen gegen die isolierte 69 kDa-Protease aus *B. caldolyticus* immunisiert. Unter Verwendung von Freund's komplettem Adjuvans, das abgetötete Mycobakterien enthält, sollte sich die Immunantwort verstärken lassen. Infolge des Ölzusatzes wird das Antigen im Körper des Versuchstieres nur sehr langsam freigesetzt. Durch intensives Mischen des im wässrigen Puffersystem gelösten Antigens mit dem Adjuvans entstand eine stabile Öl-Wasser-Emulsion, welche nach Applikation im Organismus in Form von Tröpfchen verteilt wurde. Der Zusatz von hitzeinaktivierten Mycobakterien bewirkt eine Stimulierung des Immunsystems und im besonderen die Teilung von T-Lymphocyten sowie die Bildung von B-Lymphocyten-aktivierenden Faktoren.

Bei der primären Applikation wurden 50 µg der gereinigten 69 kDa-Protease und 16 µg bei der sekundären Applikation verabreicht. Die Überprüfung der Sekundärantwort erfolgte eine Woche nach der sekundären Applikation, nachdem 4 ml Blut aus der Ohrvene des Kaninchens entnommen wurden. So konnte vorweg mit Hilfe der Immunodiffusionsmethode nach Ouchterlony (2.2.19.2) die Identität von Antigen und Antikörpern im Serum nachgewiesen werden. Dieser Hinweis auf das Vorhandensein von Antikörpern führte schließlich zur Entnahme des Gesamtblutes aus dem Herzmuskel des Kaninchens nach Betäubung und Einschläferung des Tieres mit Barbituraten. Bei einem Körpergewicht des Kaninchens von 5 kg wurden 150 ml Blut entnommen und nach entsprechender Behandlung (2.2.19.1) durch Abtrennung der roten Blutzellen 98 ml Serum gewonnen.

3.10.2 Immunodiffusion nach Ouchterlony

Der Nachweis der Antikörper im Kaninchenserum erfolgte mit Hilfe der Immunodiffusionsmethode nach Ouchterlony. Hierbei wurde die Präzipitin-Reaktion des Antigen-Antikörper-Komplexes derart nachgewiesen, indem Antigen-Antikörper-Aggregate in der Agarose in ihrer Diffusion retardiert werden und als Präzipitationslinien selbst mit dem Auge wahrnehmbar sind.

In Abbildung 55 ist das Resultat des Immunodiffusionsexperiments dargestellt. Zwei periphere Löcher wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der antigenhaltigen Lösung befüllt. Das Zentralloch enthielt das antikörperhaltige Kaninchenserum. Infolge einer konzentrischen Diffusion wurde erwartet, daß die Präzipitinbande an der Stelle des Agarosegels erscheint, an welcher Antigen und Antikörper aufeinandertreffen. Da das System das Antigen in benachbarten Löchern enthielt, bildete sich eine bogenartige Präzipitinlinie nahe des Zentralloches aus. Aufgrund des Konzentrationsunterschiedes war die Präzipitinlinie der konzentrierteren Probe stärker ausgeprägt. Die Reaktion war nach viertägiger Inkubation bei Raumtemperatur vollständig abgeschlossen und zeigte völlige Identität von Antigen und Antikörper.

Insgesamt waren die Präzipitinlinien eher schwach ausgeprägt, was auf einen niedrigen Antikörpertiter des Kaninchenserums schließen ließ. Die Linien wurden daher mit Coomassie Brilliantblau G 250 (2.2.19.2) zur besseren Sichtbarmachung gefärbt (A). In (B) ist das ungefärbte Agarosegel zu sehen. Die blaue Färbung kam durch Lichteinfall während des Photographierens zustande.

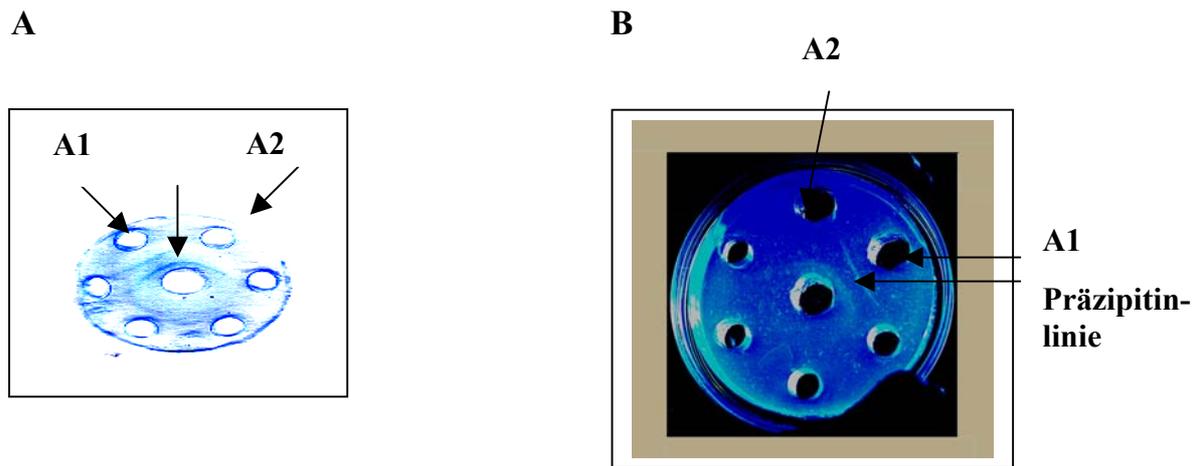
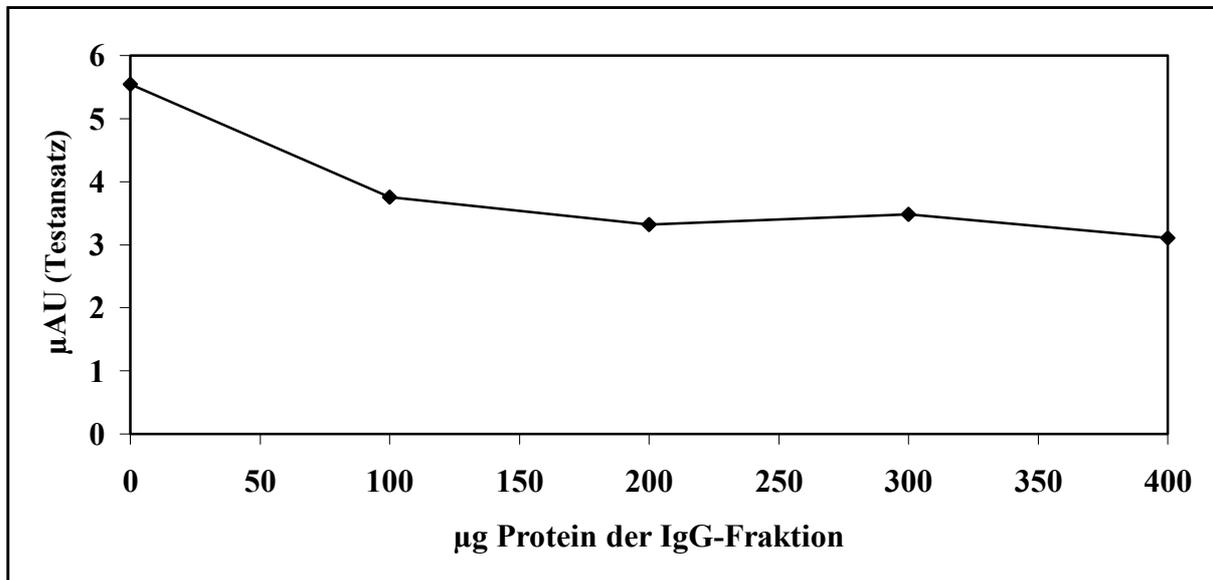


Abb.55: Immunodiffusion nach Ouchterlony. Die Präzipitin-Reaktion erfolgte in 1,4 % Agarose in phosphatgepufferten physiologischer Kochsalzlösung (PBS) pH 7,4. Das Zentralloch wurde mit 220 μ l Kaninchenserum, mit einem Proteingehalt von 7,1 mg, befüllt. Zwei benachbarte periphere Löcher enthielten jeweils 70 μ l der angereicherten Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 mit einem Proteingehalt von 1,29 mg (A1) bzw. 0,58 mg (A2). Die Agaroseplatten wurden über einen Zeitraum von mehreren Tagen bei Raumtemperatur inkubiert, getrocknet und im Anschluß daran mit Coomassie Brilliantblau G 250 gefärbt. (B) zeigt dasselbe Agarosegel ungefärbt in veränderten Kontrast- und Helligkeitsstufen.

3.10.3 Antigen-Antikörperreaktion in Lösung

Die Präzipitin-Reaktion in Lösung führt bei konstanter Enzymmenge und variabler Antikörpermenge zu einer Verminderung der Enzymaktivität. Um sicher zu gehen, daß tatsächlich die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion für den Aktivitätsverlust des Enzyms verantwortlich ist, und nicht etwa Inhibitoren im Serum, wurde das Experiment mit der gereinigten IgG-Fraktion ausgeführt. Auch wurden die angereicherte Enzymfraktion und die IgG-Fraktion für 30 Minuten vorinkubiert. Das Resultat ist in Abbildung 56 dargestellt. Es ist erkennbar, daß eine schrittweise Verminderung der Enzymaktivität eintrat. So verblieben nach 30-minütiger

Vorinkubation und bei der höchsten Antikörperkonzentration noch 56 % der ursprünglichen Enzymaktivität.



*Abb.56: Antigen-Antikörper-Reaktion bei konstanter Antigenmenge aus *B. caldolyticus* und steigenden IgG-Konzentrationen. Für den Enzymtest wurden jeweils 70 µl des angereicherten Enzyms der Fraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 mit einem Proteingehalt von 100 µg und steigende IgG-Mengen (50-400 µg) über einen Zeitraum von 30 Minuten vorinkubiert, und anschließend die Aktivität nach Anson (2.2.9.1) bestimmt.*

3.11 Antikörperreinigung

Das Ziel der Antikörperreinigung bestand darin, Antikörper zu konzentrieren und Fremdproteinkomponenten mit nachfolgend beschriebenen Methoden abzutrennen. Die angewandten Methoden basierten im wesentlichen auf den gängigen Eigenschaften der Proteine, wie z.B. Ladungseffekten, Hydrophobizität und Größe, welche natürlich auch auf Immunglobuline zutreffen. Da die Abtrennung von Antikörpern mit einer spezifischen Determinante vom polyklonalen Antikörpergemisch äußerst schwierig ist sollten alle vorliegenden Antikörper angereichert werden.

3.11.1 Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Die Abtrennung von Serumalbumin und Lipidkomponenten wurde mit Hilfe der Ammoniumsulfatpräzipitation als erstem Schritt vorgenommen. Das Resultat der Ammoniumsulfat-Fraktionierung (2.2.20.1) war somit eine Verringerung des Proteingehalts im Serum um 89,9 %, was größtenteils auf die Abtrennung des Albumins zurückzuführen ist. Somit verblieben von 12 ml des eingesetzten Kaninchenserums mit einem Proteingehalt von 678,4 mg schließlich 68,4 mg. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durch Identifizierung der einzelnen Komponenten im Gel bestätigt.

Abbildung 57 dokumentiert den Sachverhalt. Im Vergleich mit dem Proteinstandard ist hier sowohl die Auftrennung des Serums als auch der erhaltenen Proteinfraction nach erfolgter Ammoniumsulfatpräzipitation dargestellt. Deutlich tritt die Bande des Albumins im Serum bei 69 kDa in den Vordergrund, während diese nach der Fällungsreaktion gänzlich verschwindet. Statt dessen tritt nun die 50 kDa-Bande zum Vorschein, welche mit der reduzierten Form der schweren Kette der IgG-Fraktion identisch ist. Zusätzlich sind die reduzierten leichten Ketten der IgG-Fraktion in schwächerer Form bei 25 kDa zu erkennen.

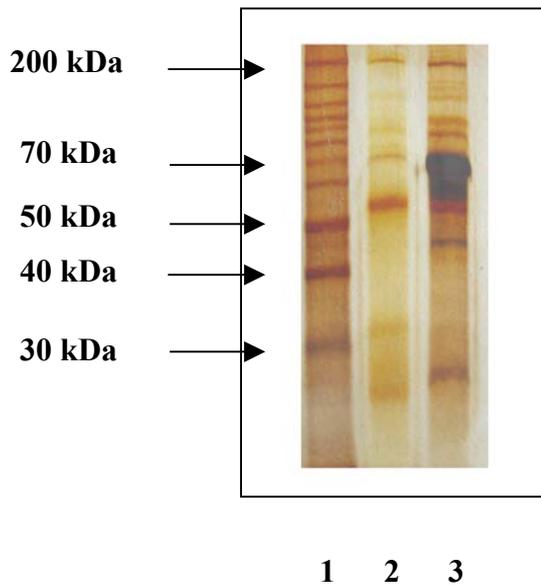


Abb.57: Elektrophoretische Auftrennung des Kaninchenserums und der resultierenden Immunglobulinfraktion nach Ammoniumsulfatpräzipitation. Von links nach rechts wurden der Proteinstandard (3.2.9) (1), 0,8 µg des gelösten Präzipitats (2) und 1,4 µg Protein des Serums (3) entsprechend ihrer Molmassen, aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit Silberfärbung.

3.11.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsapharose CL-4B

Als weitere Methode bot sich, gerade im Anschluß an die Ammoniumsulfat-Fraktionierung, eine hydrophobe Interaktionschromatographie an. Die Gründe dafür waren der vorausgehende Salzschrift einerseits und die Hydrophobizität der Immunglobuline andererseits. Die Elution der Proteine mit Hilfe eines Ammoniumsulfatsalzgradienten ist in Abbildung 58 über der Auftragung der Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit der gesammelten Fraktionen dargestellt. Die Fraktionen mit der höchsten Absorption bei 280 nm wurden vereinigt. Es resultierten die Immunglobulinfraktionen 1 (1-27), 2 (28-60), 3 (61-72) und 4 (73-120) mit den Volumina von 0,4, 3, 2,7 und 2 ml nach Einengung an einer YM 3-Membran (2.2.6.1). Der jeweilige Proteingehalt wurde zu 3,4, 43, 4 bzw. 2,7 mg bestimmt.

Eine eingehendere Überprüfung des Reinheitsgrads der gewonnenen Immunglobulinfraktionen wurde mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.2.8.1) vorgenommen. Das erzielte Resultat ist aus Abbildung 59 zu ersehen. Die Immunglobulinfraktionen 2-4 zeigen im Vergleich mit dem Proteinstandard (3.2.9) eine stark angereicherte reduzierte schwere Kette bei 50 kDa. Etwas unschärfer läßt sich die reduzierte leichte Kette unter der 30 kDa-Marke (25 kDa) erahnen. Insgesamt sind die genannten Fraktionen 2-4 weitgehend identisch, während die erste Immunglobulinfraktion das Protein repräsentiert, das nicht über Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial interagiert. Auffallend sind zusätzliche Banden im Bereich zwischen 70-200 kDa. Aus diesem Grund wurden die weitgehend identischen Immunglobulinfraktionen 2-4 mit einem Proteingehalt von 49,7 mg zusammengefaßt und Immunglobulinfraktion 1 abgetrennt.

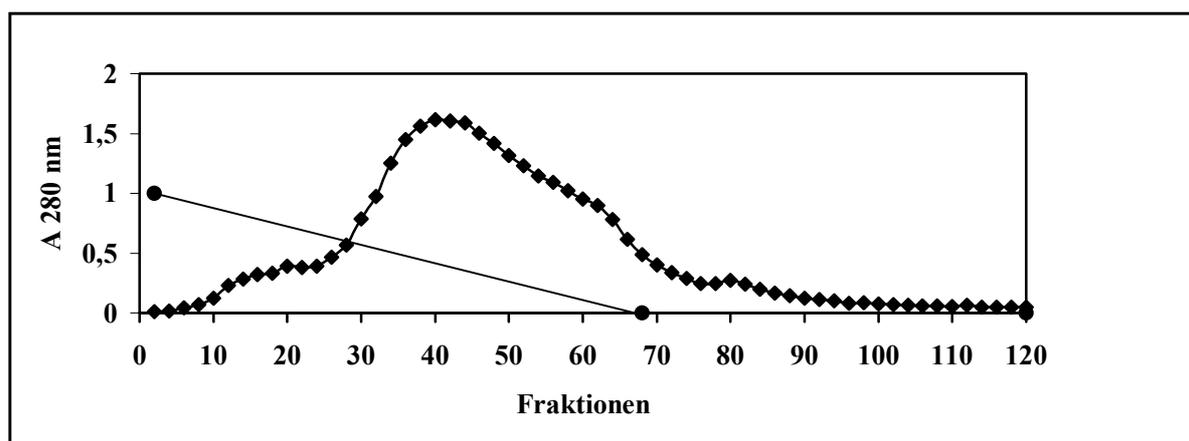


Abb.58: Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose CL-4B zur Unterstützung einer Reinigung der Antikörper gegen die isolierte extrazelluläre 69 kDa-Protease aus *B. caldolyticus*. Die Äquilibration des Gelmaterials wurde mit 1 M Ammoniumsulfat in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 vorgenommen. 3,9 ml der nach Ammoniumsulfatpräzipitation erhaltenen Probe mit einem Proteingehalt von 68,4 mg wurden gleichfalls mit Ammoniumsulfat bis zur Einstellung derselben Konzentration behandelt und aufgetragen. Zur Elution wurde ein 1-0 M Ammoniumsulfatsalzgradient in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 eingesetzt und mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 nach Gradientenende weiterspült. Es wurden 120 Fraktionen zu jeweils 1,5 ml mit einer Flußrate von 1 ml/min gesammelt. Die Immunglobulinbande ließ sich spektroskopisch über die Absorption bei 280 nm bestimmen.

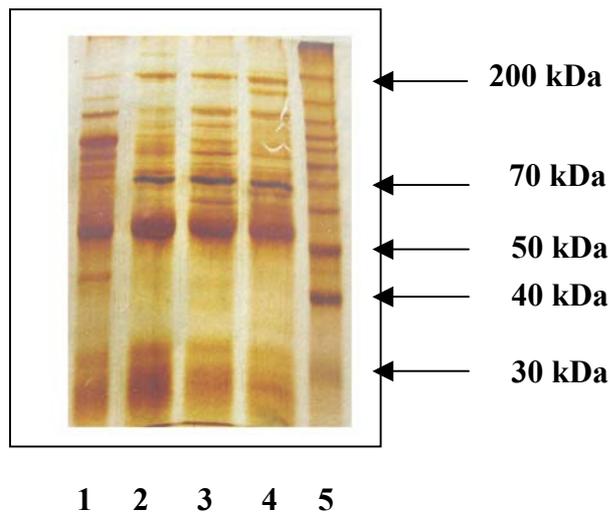


Abb.59: Elektrophoretische Auftrennung der nach hydrophober Interaktionschromatographie erhaltenen Immunglobulinfraktionen im SDS-Polyacrylamidgel. Von links nach rechts wurden die Immunglobulinfraktionen 1-4 mit 1,4 µg (1), 0,7 µg (2), 0,8 µg (3) und 0,8 µg (4) Protein und der Proteinstandard (3.2.9) (5) aufgetragen. Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.11.3 Gelchromatographie an Superdex 200 HiLoad 16/60

Als letztem Schritt im Rahmen der Immunglobulin G-Isolierung wurde schließlich nach Molekülgröße separiert. Abbildung 60 zeigt den chromatographischen Lauf, aufgetragen als Absorption bei 280 nm über den gesammelten Fraktionen. Hieraus ist deutlich ein Absorptionsmaximum bei den Fraktionen 24-31 zu erkennen, ferner eine davor liegende kleinere Bande im Bereich der Fraktionen 16-23, welche separat vereinigt wurden. Nach Konzentrierung an einer YM3-Membran (2.2.6.1) resultierten von insgesamt 49,7 mg (14,3 mg) eingesetztem Protein zwei Fraktionen mit 4,7 mg (1,3 mg) bzw. 23,2 mg (6,7 mg) Protein, wobei pro Lauf nicht mehr als 14,3 mg Protein auf die Säule gegeben wurde.

In Abbildung 61 ist die elektrophoretische Auftrennung dieser beiden Fraktionen im SDS-Polyacrylamidgel dargestellt. Fraktion 2 zeigt in stark angereicherter Form bei

50 kDa die reduzierte schwere Kette von IgG. Zusätzlich ist zwischen 20 und 30 kDa die reduzierte leichte Kette als angereicherte Bande, allerdings unscharf, zu erkennen. Bei 69 kDa sind noch geringe Spuren des Serumalbumins als einziger Fremdproteinbande zu erkennen. Fraktion 1 wies neben geringen Mengen der genannten Komponenten der IgG-Fraktion Verunreinigungen im oberen Bereich (70-200 kDa) auf, welche somit erfolgreich abgetrennt werden konnten.

In Tabelle 6 sind die nach Bradford (2.2.7.1) ermittelten Proteinwerte aller beschriebenen Reinigungsschritte als gesamtheitliche Übersicht dargestellt.

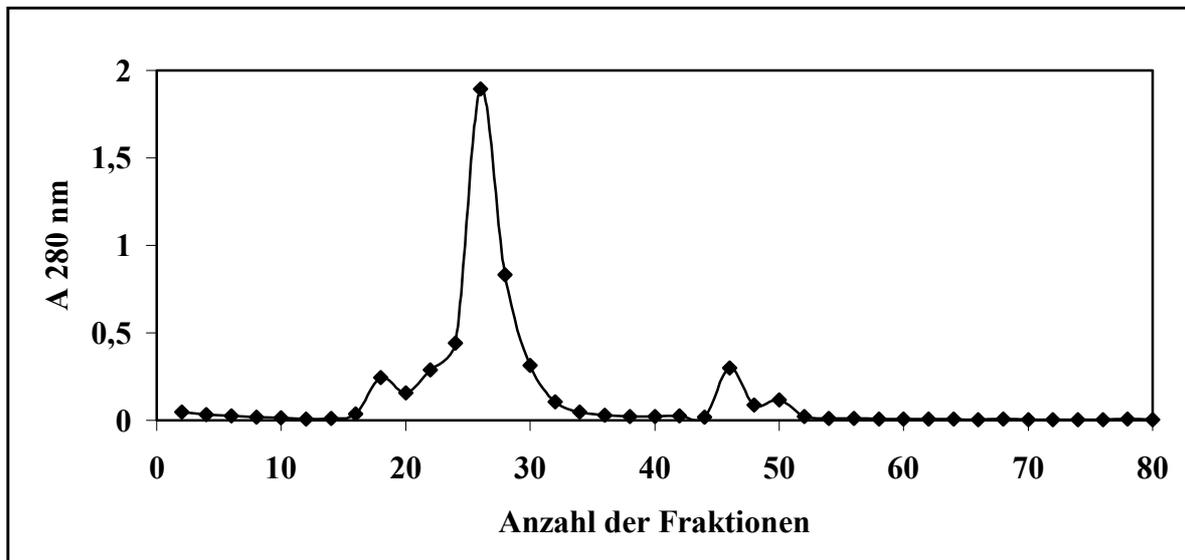


Abb.60: Reinigung der Immunglobulin G-Fraktion an Superdex 200 HiLoad 16/60. Als mobile Phase wurde 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 eingesetzt. Für den Säulenlauf konnten maximal 14,3 mg Protein des vorausgegangenen hydrophoben Chromatographieschrittes aufgetragen werden. Es wurden 80 Fraktionen mit einer Flußrate von 0,5 ml/min gesammelt. Die Detektion der Banden erfolgte über die Absorption bei 280 nm.

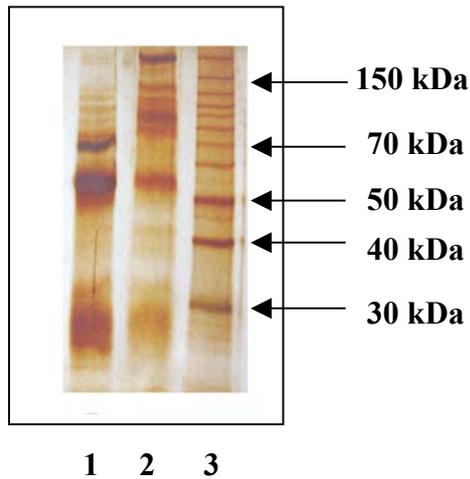


Abb.61: Elektrophoretische Trennung der nach Superdex 200 HiLoad 16/60-Säule erhaltenen Immunglobulin-Fractionen im SDS-Polyacrylamidgel. Von links nach rechts sind die Fractionen 2(1) bzw. 1 (2) mit 0,8 μg bzw. 0,7 μg Protein im Vergleich mit dem Proteinstandard (3.2.9) (3) dargestellt. Die Proteine wurden mit Silberfärbung visualisiert.

Tab.6: Übersicht der Reinigung von Antikörpern der IgG-Klasse aus Kaninchenserum.

Reinigungsmethode	Volumen [ml]	Protein [mg/ml]	Gesamtprotein [mg]
Serum	12,0	56,5	678,4
Ammoniumsulfatpräzipitation	3,9	15,9	68,4
Hydrophobe Interaktions- chromatographie	7,7	6,5	49,7
Gelchromatographie	2,0	11,6	23,2

3.12 Immunoreinigung

Die isolierten polyklonalen Antikörper konnten verwendet werden, die als Antigen eingesetzte extrazelluläre Protease aus *B. caldolyticus* mit Hilfe der Affinitätschromatographie hochspezifisch zu binden und zu reinigen. Nach Immobilisierung der Antikörper an eine präaktivierte Matrix war die Möglichkeit gegeben, die 69 kDa-Protease nach Inkubation im zellfreien Medium und nach einer Vorreinigung zu binden.

3.12.1 Immobilisierung von Antikörpern an CNBr-aktivierter Sepharose 4B

Für die Kopplung der Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurden 2 ml der erhaltenen Immunglobulin-Fraktion nach hydrophober Interaktionschromatographie an Phenylsepharose CL-4B mit einem Proteingehalt von 27,6 mg mit 4 ml gequollenem Gelmaterial für 25 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Überprüfung der Kopplung von Antikörpern an die präaktivierte Matrix mit Hilfe der Methode nach Bradford (2.2.7.1) zeigte, daß nach einer 18stündigen Inkubation 64,5 % des anfänglich vorliegenden Proteins gebunden war. Nach weiteren 7 Stunden Inkubationsdauer der Gel-Antikörpermischung waren 76,7 % Protein immobilisiert, so daß keine weitere Inkubation erfolgte.

3.12.2 Affinitätschromatographie

Die hochspezifische Bindung des Proteins an das Säulenmaterial erfolgte durch Inkubation des Affinitätsträgers in proteasehaltigem zellfreiem Medium über einen Zeitraum von 20 Stunden bei RT. Die Abtrennung des Proteins vom kovalent gebundenen Antikörper wurde in einer Kunststoffsäule ausgeführt. Infolge der relativ

starken Bindungskräfte wurde die Elution des Antigens mit 0,5 M Natriumchlorid in 0,1 M Natriumacetat pH 3,5 vorgenommen.

Aus Abbildung 62 ist das erzielte Resultat der Immunoaffinitätschromatographie nach dem Batchverfahren zu ersehen. Die direkte Inkubation des Affinitätsträgers im zellfreien Medium als alleinigem Arbeitsschritt sollte alle bis dahin benötigten Arbeitsschritte hinfällig machen. Die Auftragung der Absorption bei 280 nm über den gesammelten Fraktionen läßt zwei Banden erkennen, welche deutlich voneinander trennbar sind. Da es prinzipiell nicht auszuschließen ist, daß auch unspezifische Bindungen an das Trägermaterial zustande kommen können, wurde eine zusätzliche Überprüfung der Banden im SDS-Polyacrylamidgel ausgeführt. So wurden die Fraktionen mit der höchsten Absorption bei 280 nm vereinigt und untersucht. Es resultierten zwei Antigenfraktionen: Fraktion 3 und die vereinigten Fraktionen 8-15 mit einem Proteingehalt von 83 µg bzw. 20 µg. Der ermittelte Durchschnitt nach mehreren Säulenläufen betrug 37,7 µg (16-60 µg) für Antigenfraktion 2.

Das Ergebnis der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist in Abbildung 63 dargestellt. So sind nach Auftrennung von Antigenfraktion 1 (3) die 69 kDa-Protease sowie leichte Verunreinigungen im niedermolekularen Bereich erkennbar. Antigenfraktion 2 (2) hingegen repräsentiert, neben Spuren im 60 kDa-Bereich, die gesuchte 69 kDa-Proteasebande.

Das entsprechende Ergebnis der Immunoaffinitätschromatographie mit einer bereits vorgereinigten Probe, der Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 mit einem Proteingehalt von 1 mg ist in Abbildung 64 dargestellt. Ein wesentlicher Unterschied lag jedoch darin, daß die Enzymprobe in einem geschlossenen System, über einen Zeitraum von 4 Stunden, mit Hilfe einer Pumpe über die Säule geschickt wurde und somit eine kürzere Reaktionszeit vorlag, was mit den deutlich erzielten geringeren Proteinmengen übereinstimmte. So wurden die Fraktionen 2-5 bzw. 6-16 als Antigenfraktion 1 (2) bzw. 2 (3) vereinigt. Der

Proteingehalt wurde nach Bradford zu 23 μg bzw. 10 μg bestimmt. In Abbildung 65 ist die entsprechende Auftrennung in der SDS-PAGE dargestellt.

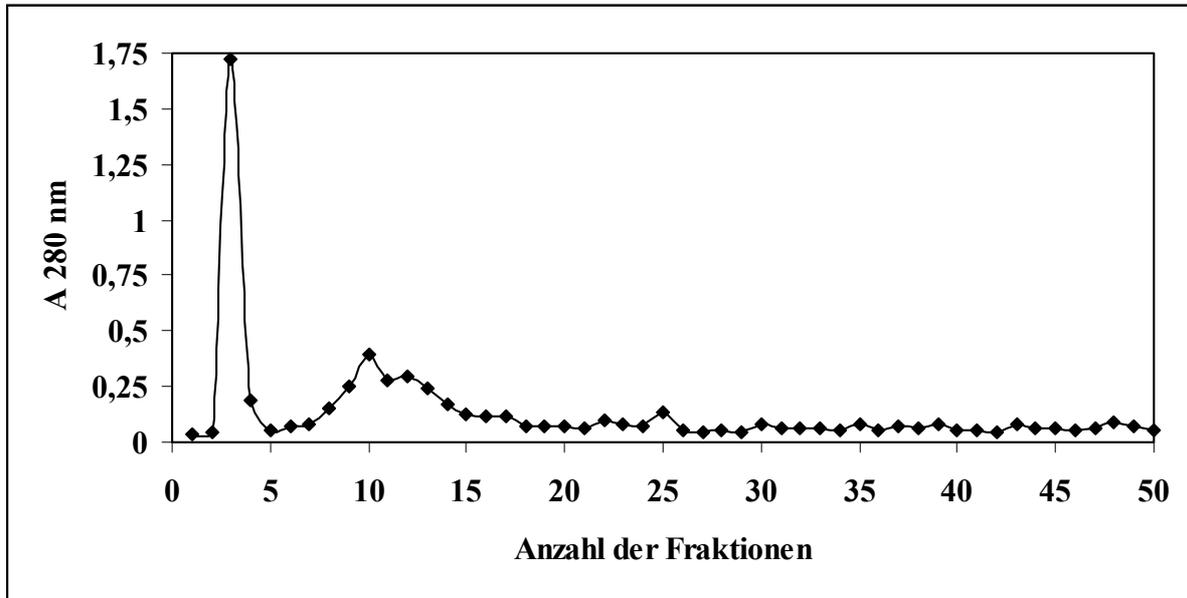


Abb.62: Immunoaffinitätschromatographie an CNBr-aktivierter Sepharose 4B nach dem Batchverfahren. 6 ml der mit JgG besetzten Matrix wurden in 30 ml Medium über einen Zeitraum von 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in eine Kunststoffsäule gegeben. Es folgte ein Waschschrift mit mehreren Gelbettvolumina 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 für mehrere Stunden. Die Elution der 69 kDa-Protease wurde mit 0,5 M Natriumchlorid in 0,1 M Natriumacetat pH 3,5 vorgenommen. Es folgte die Sammlung von 50 Fraktionen zu jeweils 0,8 ml mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Einstellung des pH auf 7,5 wurde mit 1 M NaOH vorgenommen.

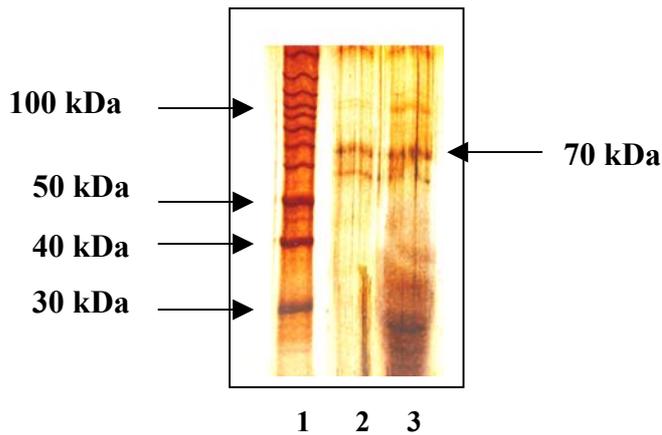


Abb.63: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Immunoaffinitätschromatographie mit dem Batchverfahren. Von links nach rechts wurde die Auftrennung des Proteinstandards (3.2.9) (1), von Antigenfraktion 2 (2) und 1 (3) mit $0,7 \mu\text{g}$ und $1,6 \mu\text{g}$ Protein im SDS-Polyacrylamidgel dargestellt. Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

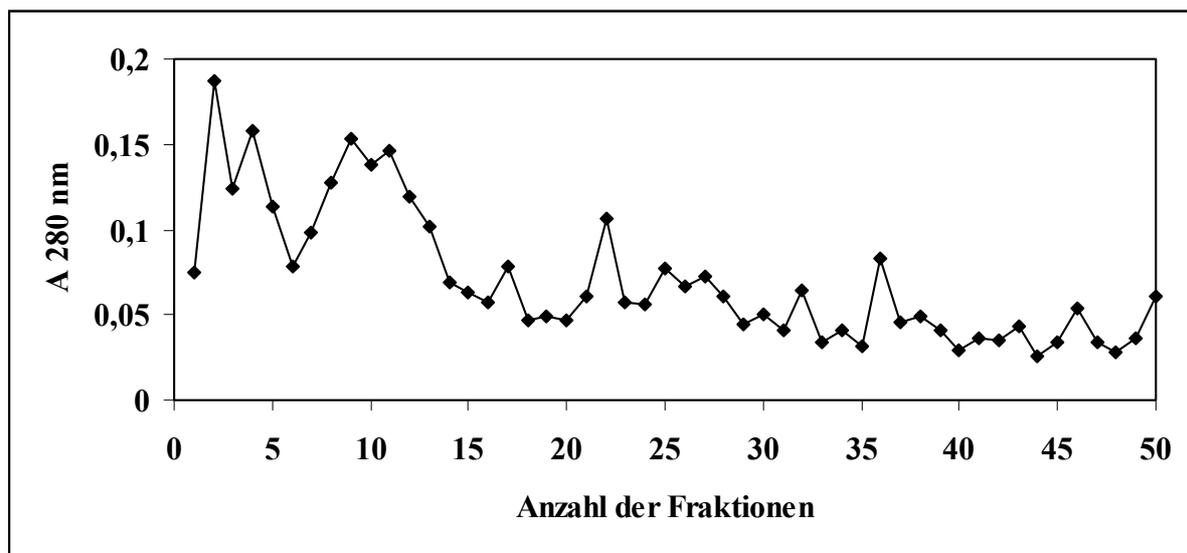


Abb.64: Immunoaffinitätschromatographie an CNBr-aktivierter Sepharose 4B mit vorgereinigter Enzymprobe. Es wurden $730 \mu\text{l}$ der Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 mit einem Proteingehalt von 1 mg auf die Säule gegeben. Zuvor erfolgte die Äquilibrierung des Affinitätsträgers (6 ml) mit 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 in einer Kunststoffsäule. Um eine bestmögliche Bindung des Antigens an den Liganden zu erreichen, wurde die angereicherte Enzymprobe in einem geschlossenen System mit Hilfe einer Pumpe über einen Zeitraum von 4 Stunden über die Säule geschickt. Die Elution wurde mit $0,5 \text{ M}$ Natriumchlorid in $0,1 \text{ M}$ Natriumacetat pH 3,5 vorgenommen und 50 Fraktionen zu jeweils $0,8 \text{ ml}$ mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min gesammelt. Im Anschluß daran wurde der pH mit 1 M NaOH auf 7,5 eingestellt.

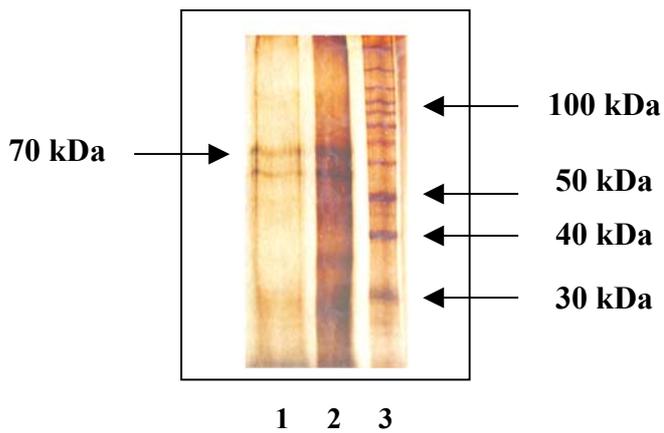


Abb.65: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Immunoaffinitätschromatographie mit einer vorgereinigten Enzymfraktion 3 nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25. Von links nach rechts wurde die Auftrennung der Antigenfraktionen 2 (1) und 1 (2) mit einem Proteingehalt von 0,7 μg bzw. 1,2 μg im SDS-Polyacrylamidgel sowie der Proteinstandard (3.2.9) (3) dargestellt. Die Proteine wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, thermophile stabile intra- und extrazelluläre Proteasen aus den thermophilen Bakterienstämmen *T. thermophilus HB8* und *B. caldolyticus* zu isolieren und zu charakterisieren. Die Reindarstellung der Proteasen sollte mit gängigen und möglichst einfachen Methoden erfolgen.

4.1 Reinigungsverfahren für intrazelluläre Proteasen aus *T. thermophilus HB8*

Insgesamt ist die Reindarstellung einer intrazellulären Protease und die Anreicherung einer weiteren intrazellulären proteolytischen Aktivität aus *T. thermophilus HB8* unter den beschriebenen Bedingungen gelungen. Allerdings mußten im Laufe dieses Reinigungsverfahrens doch beträchtliche Aktivitätsverluste in Abhängigkeit von den angewandten Methoden in Kauf genommen werden, was an dieser Stelle mit methodischen Verbesserungen diskutiert werden soll.

Der Zellaufschluß war offensichtlich erfolgreich, da proteolytische Aktivitäten im Enzymrohextrakt gut nachweisbar waren. Hingegen trat bei der Streptomycin-sulfatfällung ein erster hoher Aktivitätsverlust von 20,9 % der vorliegenden Gesamtaktivität auf. Eine mögliche Erklärung für diesen Verlust ist wohl darin zu sehen, daß die Fällung zur Abtrennung von Nucleinsäuren direkt am sehr konzentrierten Enzymrohextrakt vorgenommen wurde und eine Vielzahl von Proteinen mitgerissen wurden. Als alternative Methode zur hochspezifischen Entfernung von Nucleinsäuren wäre die Behandlung des Enzymrohextrakts mit Desoxyribonuclease zu nennen.

Die zweite Ursache für hohe Aktivitätsverluste war in der Ultrafiltration bzw. in der Porengröße der verwendeten Membranen zu sehen. So gingen unter Verwendung der PM 30-Membran mit einer Ausschlußgrenze von 30 kDa für globuläre Proteine in Abhängigkeit von der Viskosität bzw. dem Proteingehalt der zu konzentrierenden Lösung Verluste von 20-67 % bezogen auf die jeweils vorliegenden Aktivitäten einher. Der Einsatz von Membranen kleinerer Porengrößen wie z.B. 10 kDa oder 3 kDa kann mit Sicherheit Verbesserungen bringen, jedoch auf Kosten der Verweildauer der oft hochviskosen Lösungen in der Ultrafiltrationseinheit. Eine fraktionierende Ultrafiltration unter Verwendung verschiedener Membranen mit zunehmend kleineren Poren im Verlauf der Reinigung wäre zu überlegen.

Mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie an DE52-Cellulose konnten zwei proteolytische Aktivitäten ohne Verlust getrennt werden. Es resultierte eine gleich zu Beginn auftretende Bande, welche nicht vom Anionenaustauschermaterial retardiert wurde, und eine zweite Bande, die mit der höchsten Salzkonzentration eluiert wurde. Von der vorliegenden proteolytischen Gesamtaktivität kamen 1,5 mAU dieser ersten Proteasebande zu, während Bande 2 5,6 mAU in sich vereinigte, was dem 3,7 fachen entspricht. Der Entschluß zur vollständigen Reindarstellung der ersten Proteasebande war zunächst dadurch begründet, daß im Vergleich eine geringere Anzahl an Fremdproteinbanden nach SDS-PAGE vorlagen, was ein schnelleres und unkomplizierteres weiteres Verfahren in Aussicht stellte. Proteasebande 2 war für eine spätere Reinigung vorgesehen.

Die Abtrennung eines Großteils an Fremdprotein mittels Gelchromatographie an Sepharose CL-6B gelang ohne Aktivitätsverluste. In Anlehnung an die weitere chromatographische Analyse der vereinigten aktiven Fraktionen an TSK G 3000 SW fand sich lediglich im hinteren Bereich (Bande 3) Fremdprotein ohne proteolytische Aktivität. Auch war es mit diesem Schritt möglich, einen bedeutenden Anteil der gelben Carotinoidfraktion abzutrennen.

Mit Hilfe des Denaturierungs- und Renaturierungsversuches konnte gezeigt werden, daß unter den beschriebenen nicht-physiologischen Bedingungen und ohne Verwendung jeglicher Hilfssysteme eine Aktivität von 5 %, bezogen auf die Ausgangsaktivität der Probe nach Gelchromatographie zurückgewonnen werden konnte. Ferner lag die renaturierte Proteasefraktion somit in Reinform vor. Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die spontane Rückfaltung in der Regel zu einem hohen Prozentsatz. Somit wäre es durchaus denkbar, daß ein Zusatz von isolierten Chaperonen aus *T. thermophilus HB8* die korrekte Faltung in-vitro begünstigt. Auch könnte ein Zusatz der Protein-Disulfidisomerase, welche Disulfidaustauschreaktionen katalysiert, zu höheren Rückfaltungsraten beitragen.

Die alternative Methode zur Gewinnung einer reinen proteolytisch aktiven Enzymfraktion unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde mit der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation erreicht. Hier fand sich proteolytische Aktivität auf mehrere Fraktionen über den kompletten Fraktionierungsbereich verteilt. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte eine Aggregation der Proteasemoleküle untereinander bzw. mit anderen Molekülen aufgrund ungewöhnlicher Ladungsverhältnisse sein. Nach Zusammenfassung von Enzymfraktion 1 und 2 läge allerdings gegenüber der gewonnenen Proteinmenge nach dem Denaturierungs- und Renaturierungsversuch die 23fache Enzymmenge vor.

Zusätzlich wurde ein ungewöhnliches Laufverhalten der Moleküle bei der diskontinuierlichen Polyacrylamidelektrophorese unter nativen Bedingungen wahrgenommen. So wanderte ein Großteil des aufgetragenen Proteins nicht in das Trenngel, was auf ungewöhnliche Ladungszustände oder aber ungewöhnliche Molmassen der Moleküle schließen läßt. Die Kombination beider Effekte wäre wiederum die Aggregatbildung.

4.2 Optimierung des Aktivitätstests

Die Untersuchung der katalytischen Aktivität der Protease aus *T. thermophilus* HB8 mit Hilfe unterschiedlicher synthetischer Substrate zeigte, daß lediglich die äußerst sensitiven 7-Amino-4-methyl-cumarine in Verbindung mit dem aromatischen Aminosäurerest Phenylalanin umgesetzt wurden. Die Lösung der für das Testsystem in Frage kommenden Substrate Glutaryl-Phe-AMC und Ala-Ala-Phe-AMC war im beschriebenen Kaliumphosphatsystem mit 0,03 % Tritonzusatz erfolgreich.

Unter Einbeziehung der gewonnenen kinetischen Daten, wie z.B. Inkubationsdauer, Temperaturoptimum, pH-Optimum und Michaelis-Konstante, sollten Reaktionsgeschwindigkeiten nun maximiert werden können. So wurden mit dem Substrat Ala-Ala-Phe-AMC Aktivitätsmaxima bei $\sim 90^{\circ}\text{C}$ und einem pH-Wert bei 8 unter sättigenden Bedingungen, d.h. bei einer Substratkonzentration von $400\ \mu\text{M}$ bestimmt.

Ferner sollten die Inkubationszeiträume unter Einsatz höherer Substratkonzentrationen nicht zu lange gewählt werden, da zu hohe Produktkonzentrationen Fluoreszenzlöschungen herbeiführen. Ein Vergleich der beiden Substrate Glutaryl-Phe-AMC und Ala-Ala-Phe-AMC zeigte, daß bei gleich gewählter Substratkonzentration ($150\ \mu\text{M}$) sich die Fluoreszenzlöschung mit Glutaryl-Phe-AMC schon nach 30 minütiger Inkubationsdauer einstellte. Hingegen wurde eine kontinuierliche Zunahme der relativen Fluoreszenz über einen Inkubationszeitraum von 2 Stunden unter Verwendung von Ala-Ala-Phe-AMC beobachtet.

4.3 Untersuchungen zur Spezifikation der isolierten Protease

Der vergleichende Verdau des Pentapeptids Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys durch Chymotrypsin und die isolierte Protease aus *T. thermophilus HB8* und die anschließende Auftrennung der Hydrolyseprodukte an einer RP-Säule waren erfolgreich. Die bevorzugte Hydrolyse der Säureamidbindung unter Beteiligung aromatischer Aminosäurereste zeigte chymotrypsinähnliche Spezifität.

Der spezifische Serinproteaseinhibitor 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluoridhydrochlorid bewirkte eine vollständige Hemmung der Protease bei einer Konzentration von 4 μM , was eindeutig auf eine Serinprotease hinweist.

Der Inhibitor stellt eine sichere, stabile und wasserlösliche Alternative zu Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) und Diisopropylfluorophosphat dar. So ist bei pH 7-7,5 keine Hydrolyse und bei pH 8 nur schwache Hydrolyse dieses Inhibitors im wäßrigen System zu erwarten, was für PMSF nicht zutrifft. 100 μM PMSF zerfällt in wäßriger Lösung bei pH 8 und 25°C schon innerhalb einer Stunde vollständig (James, 1978). Auch wird die Verbindung gegenüber dem neurotoxischen Diisopropylfluorophosphat, welches Serin im aktiven Zentrum der Acetylcholinesterase blockiert, als unproblematisch beschrieben.

4.4 Größenbestimmung

Die Versuche zur Größenbestimmung der isolierten Protease aus *T. thermophilus HB8* mit unterschiedlichen Methoden erbrachten kein einheitliches Ergebnis. Mit SDS-PAGE konnte eine Bande der molaren Masse von 67 kDa identifiziert werden. Für das native Enzym wurde im Vergleich mit den verwendeten Standards Katalase aus

Rinderleber, Fumarase aus Schweineherz, Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz und α -Amylase aus *B. subtilis* mit Hilfe der Gelchromatographie an Sepharose CL-6B hingegen eine Molmasse von ~ 194 kDa ermittelt, was auf ein homotrimeres Molekül schließen ließe. Durch kovalente Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat und anschließendem SDS-PAGE konnte jedoch kein Hinweis auf Aggregation gefunden werden, wo hingegen die fehlende Trennung bei der Ultrazentrifugation wiederum unspezifische Aggregation nahe legte, die möglicherweise in den Quervernetzungsexperimenten nicht zu definierten Banden führt. Als weitere Gründe können Faktoren, wie z.B. die Funktionalität und ausreichende Spacerlänge des Quervernetzers, das Vorhandensein der für die Quervernetzung relevanten funktionellen Gruppen, sowie Faktoren, welche das typische Wanderungsverhalten des Proteins während des Säulenlaufs verfälschen können, in Betracht gezogen werden.

Die Überprüfung des Quervernetzers Dimethylsuberimidat auf Funktionalität erbrachte in Untersuchungen mit zwei Standardenzymen, Katalase aus Rinderleber und Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz, folgende Ergebnisse. Am Beispiel der Katalase aus Rinderleber, bestehend aus vier identischen Untereinheiten mit 60 kDa konnte gezeigt werden, daß das Reagenz prinzipiell funktionsfähig ist. So war die 60 kDa-Bande zum Zeitpunkt 0 als die am stärksten ausgeprägte Bande zu erkennen. Nach maximal 30 Minuten Reaktionszeit mit dem Quervernetzer war eine weniger stark ausgeprägte, aber doch intensive Bande bei 120 kDa, welche der doppelten Molmasse der Untereinheit entspricht, deutlich zu erkennen. Zusätzlich waren in noch schwächerer Form eine Bande bei 180 kDa und nicht exakt zuordenbare Banden mit Molmassen größer als 200 kDa, die dem drei- bzw. vierfachen der Untereinheit entsprechen, zu beobachten. Die Vernetzung der vier identischen Untereinheiten der Lactat-Dehydrogenase mit Dimethylsuberimidat sollte gleichermaßen möglich sein (Hajdu et al., 1976). Im Versuch war nach einer maximalen Reaktionszeit von 30 Minuten deutlich eine Bande bei 70 kDa und Spuren der 140 kDa-Bande erkennbar. Da das Trimer generell schwächer ausgebildet wird (Hajdu et al., 1976) kann davon ausgegangen werden, daß das Reagenz vollkommen

funktionsfähig, die eingesetzte Proteinmenge (0,14 mg/ml) zu gering und die Reaktionszeit (30 Minuten) eventuell zu kurz gewählt war.

Als Argument verbleibt die Spacerlänge und damit die Frage, ob der Quervernetzer lang genug war, die erforderliche Distanz zu überspannen und die Frage nach dem Vorhandensein geeigneter funktioneller Gruppen im Protein.

Als Gründe dafür, welche das typische Wanderungsverhalten des Proteins beim Säulenlauf verfälschen können, sind Abweichungen von der globulären Proteinform und Aggregatbildung zu nennen. So konnte das Vorliegen eines durch Zuckerkomponenten modifizierten Proteins nachweislich ausgeschlossen werden. Eine mögliche intermolekulare Aggregatbildung sollte auch an dieser Stelle nicht außer Acht gelassen werden.

4.5 Sequenzanalyse nach Edman und mit Massenspektrometrie

Die Kenntnis der Aminosäureabfolge von N-terminaler Sequenz und internen Teilsequenzen sollten zur Identifizierung der isolierten Protease aus *T. thermophilus HB8* durch Vergleich mit bekannten Proteinsequenzen in zugänglichen Datenbanken herangezogen werden. Zusätzlich können die Sequenzen zur Herstellung von Sonden z.B. in Form chemisch synthetisierter Oligonucleotide dienen, welche mit den komplementären Genabschnitten der isolierten DNA hybridisieren. Die Auffindung des Gens, welches für die Protease codiert und damit verbundene Klonierungsversuche des Gens sollten damit möglich sein. Mit der nach Süßmuth et al. (1987) beschriebenen Methode zur Isolierung genomischer DNA konnten aus 1,1 g Zellen von *T. thermophilus HB8* 3,79 mg DNA mit hohem Reinheitsgrad problemlos isoliert werden.

Für die N-terminale Sequenzanalyse nach Edman wurde die 67 kDa-Bande aus dem SDS-PAGE-Gel an eine PVDF-Membran transferiert. Der Transfer, basierend auf dem Tank-Blotting-System nach Towbin et al. (1979) war nach 4-5 Stunden vollständig, so daß alles Protein über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden war. Die transferierte 67 kDa-Bande wurde aus der Membran präpariert und der automatischen Analyse im Sequenator unterzogen. Die Auftrennung der PTH-Aminosäuren an einer HPLC-C₁₈-Säule (2,1*250 mm) war erfolgreich. Insgesamt konnten von 20 Aminosäurepositionen 18 exakt bestimmt werden, und lediglich für zwei Positionen wurde kein eindeutiges Signal erhalten.

Der Vergleich dieser N-terminalen Sequenz mit bekannten Sequenzen in mehreren Datenbanken wie Swissprot, Prosite etc. ergab, daß derzeit noch keine thermophile Proteinsequenz mit völlig identischer oder homologer Aminosäureabfolge vorliegt. Dies weist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf hin, daß es sich bei der isolierten und gereinigten Protease um eine unbekannte Protease des Stammes *T. thermophilus HB8* handelt.

Die Bestimmung interner Teilsequenzen erfolgte mit dem LC-MS/MS-Experiment. Hierzu wurde die 67 kDa-Bande einem tryptischen Gelverdau unterworfen. Die Peptidauftrennung gelang an einer RP-Kapillarsäule TSK-Gel Super-ODS (120 mm*300 µm), was einen effizienten Gelverdau bestätigte. Die Auswertung der mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie erhaltenen internen Teilsequenzen und die im Anschluß daran erfolgte Datenbankabfrage erbrachte gleichermaßen keine Übereinstimmung mit bekannten thermophilen Proteinsequenzen, so daß davon auszugehen ist, daß eine noch nicht identifizierte Protease vorliegt.

Hingegen wurde das analoge Verfahren (LC-MS/MS) zur Bestimmung interner Teilsequenzen nach vorausgehendem Gelverdau zur Identifizierung einer ~55 kDa-Bande aus *T. thermophilus HB8* erfolgreich angewandt. Die anhand ihrer Massen bestimmten Sequenzen der eluierten Peptide wurden mit einer Trefferzahl von 540 und

einer Sequenzübereinstimmung von 73 % als NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase und Trypsin, welches für den Gelverdau zugesetzt wurde, bestimmt.

4.6 Reindarstellung extrazellulärer Proteasen aus *B. caldolyticus*

Die auffallende Abscheidung von Enzymen ins Kulturmedium, darunter Proteasen, durch *B. caldolyticus* erweckte das Interesse an einfachen Verfahren für deren Isolierung. Diese Verfahren unterscheiden sich insofern von jenen für intrazelluläre Enzyme als die Konzentrierung des Enzyms als erstem Schritt im Vordergrund steht.

Die Konzentrierung des proteolytisch aktiven Enzyms mit Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 gelang im Prinzip gut, eignete sich jedoch nur für relativ kleine Volumina, da Medienbestandteile und ausgeschiedene Produkte etc. gleichermaßen an das Säulenmaterial adsorbierten. Die Aufnahmekapazität von DEAE Sephadex A-25 der verwendeten Säule mit 60*2,1 cm war nach Auftragung von maximal 1,5 Litern zellfreiem Medium erschöpft. Eine weitere Schwierigkeit beim Konzentrierungsschritt lag in der ausgedehnten Auftragungsdauer des zellfreien Mediums infolge der durch das Gelmaterial bedingten geringen Flußrate und des großen Auftragungsvolumens. Mit einer Flußrate von 1 ml/min müssen wenigstens 24 Stunden Auftragungsdauer für 1,5 l eingeplant werden, was die nächste Schwierigkeit bedingt.

Das zellfreie Medium war innerhalb kürzester Zeiten selbst nach Aufenthalt bei 4°C mit einem Bakterienstamm bewachsen. Eine Sterilfiltration des bewachsenen Mediums war infolge der erhöhten Viskosität des so vorliegenden Mediums schwierig. Eine Konzentrierung des viskosen Mediums mit Hilfe der Ultrafiltration war ausgeschlossen, da selbst unter Verwendung von Membranen mit einer Ausschlußgrenze von 3 kDa im späteren Verlauf bei der Einengung der gesammelten

aktiven Fraktionen Aktivitätsverluste von 50-60 % bezogen auf die Aktivität der Ausgangsprobe auftraten. Auch bei diesem Reinigungsverfahren war die Konzentrierung der Proben das Hauptproblem. Eine Verbesserung ließe sich hier möglicherweise mit Membranen der Porengröße 1 bzw. 0,5 kDa erzielen.

Insgesamt war es jedoch gelungen, durch Zusammenfassung der beiden erhaltenen Enzymfraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 vor dem Konzentrierungsschritt von 1,47 Litern zellfreiem Medium 2,2 mg einer extrazellulären Protease mit einer molaren Masse von 57 kDa in Reinform zu isolieren. Nach dem Konzentrierungsschritt verblieben davon noch 0,4 mg Protein, ein Hinweis dafür, daß das Enzym die Membran aufgrund seiner möglichen fibrillären Form passierte.

Von der dritten Enzymfraktion nach Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephadex A-25 konnten von eingesetzten 3,6 mg Protein weitere 60 µg einer proteolytisch aktiven Enzymfraktion nach Gelfiltration an Superdex 200 in Reinform gewonnen werden, deren Größe im SDS-PAGE auf 69 kDa festgestellt wurde.

4.7 Immunisierung

Aufgrund der wesentlich aufwendigeren Gewinnung der 69 kDa-Proteasefraktion aus *B. caldolyticus* und den damit verbundenen geringen Enzymmengen wurde die Herstellung einer Affinitätssäule mit Antikörpern gegen dieses Enzym erwogen. Nach Immunisierung eines Kaninchens mit diesem Enzym als Antigen konnte die Bildung polyklonaler Antikörper nachgewiesen werden. Insgesamt war der Antikörpertiter im Serum jedoch eher gering. Nach Entnahme des Gesamtblutes des Tieres und anschließender Abtrennung der roten Blutzellen verblieb ein erstaunlich hoher Serumanteil von 98 ml. Der Proteingehalt im Serum wurde auf 56,5 mg/ml bestimmt. Mit dem angewandten Verfahren zur Reinigung der Antikörper wäre somit doch ein

Anteil von insgesamt 190,3 mg an polyklonalen Antikörpern gegen die Protease im Serum vorhanden.

4.8 Immunoreinigung

Nach einer Vorschrift aus Harris und Angal (1989) konnten 76,7 % der angereicherten Immunglobulinfraktion nach hydrophober Interaktionschromatographie ohne Spacer nach 25stündiger Inkubation an CNBr-aktivierte Sepharose 4B immobilisiert werden. Gemäß der Reinigungstabelle (Tabelle 6) macht der Antikörper-Anteil in dieser Fraktion ca 46,6 % aus, so daß der gebundene Anteil polyklonaler Antikörper rund 10 mg ausmachte. Da in dieser Antikörperfraktion alle Antikörper angereichert waren, verringert sich der Anteil mit der spezifischen Determinante gegen das Antigen aus *B. caldolyticus* entsprechend. Die Bindung größerer Mengen Antikörper an die präaktivierte Matrix könnte neben Verwendung der vollständig gereinigten IgG-Fraktion durch Kopplung einer raumschaffenden Diamin-Spacer-Gruppe wie z.B. Hexamethyldiamin erreicht werden.

Ferner mußte berücksichtigt werden, daß die direkte Inkubation des Affinitätsträgers im zellfreien Medium zur Adsorption von Medienbestandteilen etc. an den Affinitätsträger führen kann, was einen ausgedehnten Waschvorgang notwendig machte. So fanden sich in Fraktion 1, welche die Hauptenzymbande mit der höchsten Absorption bei 280 nm darstellte, selbst nach einem Waschschrift mit Kaliumphosphatpuffer über einen Zeitraum von mehreren Stunden stets leichte Verunreinigungen im niedermolekularen Bereich nach SDS-PAGE.

Die Elution des Antigens gelang mit 0,5 M Natriumchlorid in 0,1 M Natriumacetat pH 3,5. Der pH der gesammelten Fraktionen mußte unmittelbar nach der Elution neutralisiert werden. Insgesamt konnten mit Affinitätschromatographie nach dem Batchverfahren 83 µg für die erste Enzymfraktion und 16-60 µg für Enzymfraktion 2 erhalten werden.

4.9 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse, im besonderen die Untersuchungen zur Charakterisierung der gereinigten intrazellulären Protease aus *T. thermophilus* HB8, haben gezeigt, daß eine bisher unbekannte thermophile Protease mit beschriebener Spezifikation isoliert wurde. Eine eindeutige Aussage bzgl. deren Größe kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gemacht werden und erfordert zusätzliche Experimente. Vorbereitend wurden hingegen grundlegende Arbeiten für eine künftige gentechnische Gewinnung des Enzyms für bedarfsgerechte Anwendungen eingeleitet.

Zwei weitere gereinigte extrazelluläre thermophile Proteasen aus *B. caldolyticus*, können in Zukunft näher charakterisiert und hinsichtlich ihrer Eigenschaften im Vergleich mit bisher beschriebenen Proteasen eingeordnet werden. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse können neue Anwendungsbereiche erschlossen werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, neue intrazelluläre und extrazelluläre Proteasen aus den thermophilen Bakterienstämmen *Thermus thermophilus* HB8 und *Bacillus caldolyticus* zu isolieren.

Zwei intrazelluläre Proteaseaktivitäten aus *T. thermophilus* HB8 konnten unterschieden und mit Hilfe der Ionenaustauschchromatographie getrennt werden. Eine der beiden Proteasen wurde vollständig gereinigt und bezüglich ihrer Spezifität, Größe und Primärstruktur charakterisiert.

Die Untersuchung der katalytischen Aktivität des Enzyms aus *T. thermophilus* HB8 mit Hilfe unterschiedlicher synthetischer Substrate wies auf eine bevorzugte Hydrolyse der Säureamidbindung unter Beteiligung aromatischer Aminosäurereste, insbesondere Phenylalanin, hin. Der Verdau eines Pentapeptids ohne Schutzgruppe im Vergleich durch Chymotrypsin und durch die isolierte Protease bestätigte, nach Analyse der jeweiligen Hydrolyseprodukte, die Proteolyse nach aromatischen Resten, in diesem Fall Tyrosin. Ferner bewirkte der spezifische Serinproteaseinhibitor 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluoridhydrochlorid in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration eine vollständige Inaktivierung der Protease, was ebenso auf eine Serinprotease mit chymotrypsinähnlicher Spezifikation hinweist.

Die Größenbestimmung der gereinigten Protease aus *T. thermophilus* HB8 erfolgte mit mehreren Methoden und ergab nach SDS-PAGE eine Bande mit der molaren Masse von 67 kDa. Hingegen wurde für das native Enzym mit Gelchromatographie eine Molmasse von ~194 kDa ermittelt, entsprechend einem Homotrimeren. Durch kovalente Quervernetzung mit Dimethylsuberimidat und anschließendem SDS-PAGE konnte dies jedoch nicht bestätigt werden.

Es wurde ein Temperaturmaximum bei 90°C und ein pH-Optimum von 8 für die Protease gefunden. Zusätzlich wurde für das Substrat Ala-Ala-Phe-AMC die Michaelis-Konstante unter den beschriebenen Bedingungen zu 200 µM bestimmt.

Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz der Protease aus *T. thermophilus HB8* nach Edman ergab eine definierte Abfolge aus 20 Aminosäuren. Ferner konnten durch tryptischen Verdau dieser Protease, sowie einer ~55 kDa-Proteinbande interne Peptide erzeugt werden, deren Sequenz mit dem LC-MS/MS-Experiment ermittelt und zur Identifizierung der Proteine mit Hilfe von Datenbanken herangezogen wurde. Für die Protease konnte keine homologe oder ähnliche Sequenz gefunden werden, es handelt sich offensichtlich um ein noch nicht identifiziertes Protein dieser Gattung. Hingegen wurde die ~55 kDa-Bande mit hoher Trefferzahl und großer Sequenzübereinstimmung als NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase der taxonomischen Einordnung *T. thermophilus HB8* identifiziert.

Die Kultivierung des Bakterienstamms *B. caldolyticus* unter den beschriebenen Bedingungen führte zur Anreicherung extrazellulärer Proteasen im Kulturmedium. Zwei verschiedene Formen extrazellulärer Proteasen, welche sich hinsichtlich ihrer Größe unterschieden, konnten in Reinform gewonnen werden.

Die Bestimmung der Molmassen erfolgte mit SDS-PAGE. Es wurde eine 57 kDa-Bande und eine 69 kDa-Bande für die jeweilige Protease unter denaturierenden Bedingungen nachgewiesen. Mit Hilfe der nicht-dissozierenden diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese ließ sich die monomere Form für die 57 kDa-Bande bestätigen.

Ferner gelang es, polyklonale Antikörper gegen die 69 kDa-Bande zu gewinnen, zu reinigen und an eine präaktivierte Matrix zu immobilisieren. Damit wird es möglich, diese Protease künftig direkt aus dem zellfreien Medium hochspezifisch zu isolieren.

6 Literaturverzeichnis

- Achenbach-Richter, L., Gupta, R., Stetter, K. O. und Woese, C. R. (1987) System. Appl. Microbiol., 9, 34-39.
- Andrews, P. (1965) Biochem. J., 96, 595-606.
- Anson, M. L. (1939) J. Gen. Physiol., 22, 79-89.
- Beck, A. (2002) Dissertation, 62-64.
- Bergmeyer, H. U. (1970) Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Vol. 1,2, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Bergmeyer, H. U. (1977) Grundlagen der enzymatischen Analyse, 1. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Bergmeyer, H. U. (1983) Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., Vol. 3, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Bergmeyer, H. U. (1984) Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., Vol. 5, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Bisswanger, H. (2000) Enzymkinetik, 3. Aufl., Wiley-VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D. und Smith, N. R. (1957) Bergey's manual of determinative bacteriology, 7th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Brock, T. D. (1967) Science, 158, 1012-1019.
- Bruins, M. E., Janssen, E. M. und Boom, R. M. (2001) Appl. Biochem. Biotechnol., 90, 155-186.
- Dalbey, R. E., Lively, M. O., Bron, S. und van Dijl, J. M. (1997) Protein Science, 6, 1129-1138.
- Davies, G. E. und Stark, G. R. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 66, 651-656.
- Degryse, E., Glabsdorff, N. und Pierard, A. (1978), Arch. Microbiol., 117, 189-196.
- Edman, P. und Begg G. (1967) Eur. J. Biochem., 1, 80-91.
- Farrell, J. und Campbell, L. L. (1969) Adv. Microbial Physiol., 3, 83-109.
- Feder, J. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 326-332.

- Gershoni, J. M. und Palade, G. E. (1983) *Anal. Biochem.*, 131, 1-15.
- Glossmann, H. und Neville, D. M. jr. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 6339-6346.
- Grootegeod, J. A., Lauwers, A. M. und Heinen, W. (1973) *Arch. Microbiol.*, 90, 223-232.
- Grütter, M. G., Hawkes, R. B. und Matthews, B. W. (1979) *Nature*, 277, 667-669.
- Hajdu, J., Bartha, F. und Friedrich, P. (1976), *Eur. J. Biochem.*, 68, 373-383.
- Hames, B. D. (1988) *Gelelectrophoresis of proteins*, IRL Press Oxford.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988) *Antibodies, a practical laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Harris, E. L. V. und Angal, S. (1989) *Protein purification methods*, IRL Press Oxford.
- Heinen, U. J. und Heinen, W. (1972) *Arch. Microbiol.*, 82, 1-23.
- Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E. und Tanford, C. (1979) *Meth. Enzymol.*, 56, 734-749.
- Henschen, A., Hupe, K. P., Lottspeich, F. und Voelter, W. (1985) *High performance liquid chromatography in biochemistry*, 1st ed., VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Herbert, R.A. und Codd, G.A. (1986) *Microbes in extreme environments*, 1st ed., Academic press.
- Hunter, M. J. und Ludwig, M. L. (1970) *Meth. Enzymol.*, 25 B, 585-596.
- James, G. T. (1978) *Anal. Biochem.*, 86, 574-579.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- Lauwers, A. M., Koninkx, J. F. und Heinen, W. (1970) *Ames Research Center, NASA, Abstracts*, 23.
- Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 10035-10038.
- Murray, R. G. E., Brenner, D. J. , Bryant, M. P., Holt, J. G., Krieg, N. R., Moulder, J. W., Pfennig, N., Sneath, P. H. A. und Staley J. T. (1984) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Oshima, T. und Imahori, K. (1974) *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24, 102-112.
- Oshima, M. und Yamakawa, T. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49, 185-191.
- Oshima, T. und Imahori, K. (1974) *J. Biochem.*, 75, 179-183.

- Oshima, T. und Imahori, K. (1971) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 17, 513-517.
- Perutz, M. F. (1978) *Science*, 201, 1187-1191.
- Peterson, G. L. (1979) *Anal. Biochem.*, 100, 201-220.
- Ray, P. H., White, D. C. und Brock, T. D. (1971) *J. Bacteriol.*, 106, 25-30.
- Rao, K. N. und Lombardi, B. (1975) *Anal. Biochem.*, 65, 548-551.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge M. S. und Deshpande, V. V. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 597-635.
- Siefert, J. L. und Fox, G. E. (1998) *Microbiology*, 144, 2803-2808.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R. und Springer, W. (1987) *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*, 1. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Singleton, R. jr. und Amelunxen, R. E. (1973) *Bacteriol. Rev.*, 37, 320-342.
- Taguchi, H., Konishi, J., Ishii, N. und Yoshida, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 22411-22418.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
- Walsh, K. A. und Wilcox, P. E. (1979) *Meth. Enzymol.*, 19, 31-41.
- Weisburg, W. G., Giovannoni, S. J. und Woese, C. R. (1989) *System. Appl. Microbiol.*, 11, 128-134.
- White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Dodson, R. J., Haft, D. H., Gwinn, M. L., Nelson, W. C., Richardson, D. L., Moffat, K. S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J. J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K. S., Aravind, L., Daly, M. J., Minton, K. W., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Nelson, K. E., Salzberg, S., Smith, H. O., Venter, J. C., Fraser, C. M. (1999) *Science*, 286, 1571-1577.
- Woese, C. R. und Fox, G. E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5088-5090.
- Woese, C. R. (1996) *Current Biology*, 6, 1060-1063.
- Woese, C. R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8392-8396.
- Yutani, K., Ogasahara, K., Sugino, Y. und Matsushiro, A. (1977) *Nature*, 267, 274-275.
- Zeikus, J. G. (1979) *Enzyme Microb. Technol.*, 1, 243-252.

Zimmerman, M., Ashe, B., Yurewicz, E. C. und Patel, G. (1977) *Anal. Biochem.*,
78, 47-51.

Meine akademischen Lehrer waren:

Mathematik:	Prof. Dr. G. Bach
Experimentalphysik:	Prof. Dr. H. Seiler, Dr. U. Haas
Anorganische Experimental- chemie:	Prof. Dr. W. Haubold
Organische Chemie:	Prof. Dr. W. Kraus
Biologische Chemie:	Prof. Dr. H. Bisswanger, Prof. Dr. P. Renz, Prof. Dr. J. Koch
Pflanzenphysiologie:	Prof. Dr. D. Heß, Prof. Dr. E. Kuhn
Botanik:	Prof. Dr. E. Götz, Dr. K. Haas, Dr. K. Loris, Dr. R. Geranmayeh
Zoologie:	Prof. Dr. H. Rahmann, Prof. Dr. H. Rösner
Genetik:	Prof. Dr. F. Mechelke, Prof. Dr. C. U. Hesemann, Prof. Dr. H. Geldermann
Mikrobiologie:	Prof. Dr. F. Lingens, Prof. Dr. R. Süßmuth, Dr. J. Eberspächer, Priv. Doz. Dr. K. H. van Pée

Lebenslauf

Name: Christa Steinbrenner
Geboren: 07.01.1964 in 70173 Bad Cannstatt
Familienstand: ledig
Wohnort: Winnender Str. 4
71404 Korb

Werdegang:

1970-1974 Grundschule in 71404 Korb
1974-1975 Hauptschule in 71404 Korb
1975-1980 Salier-Realschule in 71334 Waiblingen
1980-1981 Schloß-Realschule in 70176 Stuttgart
1981-1984 Salier-Gymnasium in 71334 Waiblingen
1985-1987 Berufsausbildung mit Berufsabschluß
1987-1993 Immatrikulation an der Universität Hohenheim
Studium der Biologie mit den Schwerpunkten
Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und organische
Chemie
1994 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der
Universität Hohenheim unter Anleitung von
Prof. Dr. F. Lingens mit dem Thema: „Anreicherung
der Flavonol-2,4-Dioxygenase aus *Aspergillus flavus*”

1998-2003 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am
Physiologisch-chemischen Institut der Universität
Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H. Bisswanger
mit dem Thema: „Isolierung und Charakterisierung
thermophiler Proteasen aus Bakterien”