

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Alle Labor- und Feinchemikalien sowie Lösungsmittel in p.a.-Qualität wurden von den Firmen:

Fluka, Neu-Ulm
Merck, Darmstadt
Roth, Karlsruhe
Sigma, Taufkirchen

bezogen.

3.1.1 Mikroorganismen

Die Stämme *Streptomyces mobaraensis* (Nr.: 40847) und *Streptomyces coelicolor* (Synonym: *Streptomyces violaceoruber*; Nr.: 40783) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, bezogen.

3.1.2 Materialien zur Herstellung von Nährmedien

Agar	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Calciumcarbonat, gepulvert. p.a.	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-dihydrat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei, p.a.	Merck, Darmstadt
Eisen(III)-citrat	Fluka, Neu-Ulm
Glucose	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt, granuliert	Merck, Darmstadt
Kobalt(II)-chlorid	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-sulfat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck, Darmstadt
Malzextrakt	Merck, Darmstadt
Mangansulfat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumborat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, reinst	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat	Fluka, Neu-Ulm
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Merck, Darmstadt
Native Kartoffelstärke f. biochem. Zwecke	Merck, Darmstadt
Zink(II)-chlorid	Merck, Darmstadt

3.1.3 Enzyme

Dispase I (<i>Bacillus polymyxa</i>), > 6 U/mg	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin (Rinderpankreas) geb. an Agarose, 24,1 U/ml, TPCCK behandelt	Sigma, Taufkirchen
α -Chymotrypsin (Rinderpankreas) geb. an Agarose 55 U/mg, TLCK behandelt	Sigma, Taufkirchen
Thermolysin (<i>B. thermoproteolyticus</i> rokko) 36 U/mg	Sigma, Taufkirchen

3.1.4 Materialien zur Bestimmung von Endo-Proteaseaktivität

Bz-Arg-pNA	Sigma, Taufkirchen
Cbz-Gly-Pro-pNA	Bachem, Heidelberg
Cbz-Phe-Arg-pNA	Bachem, Heidelberg
Cbz-Pro-Phe-Arg-pNA	Bachem, Heidelberg
Suc-Ala-Pro-pNA	Bachem, Heidelberg
Suc-Ala-Ala-Phe-pNA	Bachem, Heidelberg
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	Bachem, Heidelberg
Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA	Sigma, Taufkirchen

3.1.5 Materialien zur Bestimmung von Exo-Proteaseaktivität

Ala-pNA	Bachem, Heidelberg
Leu-pNA	Bachem, Heidelberg
Phe-pNA	Bachem, Heidelberg
Pro-pNA	Bachem, Heidelberg
Ala-Ala-pNA	Sigma, Taufkirchen
Ala-Phe-pNA	Bachem, Heidelberg
Ala-Pro-pNA	Bachem, Heidelberg
Gly-Arg-pNA	Bachem, Heidelberg
Gly-Glu-pNA	Bachem, Heidelberg
Gly-Pro-pNA	Bachem, Heidelberg
Ala-Ala-Ala-pNA	Bachem, Heidelberg
Ala-Ala-Pro-pNA	Bachem, Heidelberg
Ala-Ala-Phe-pNA	Bachem, Heidelberg
Ala-Phe-Pro-pNA	Bachem, Heidelberg
Pro-Leu-Gly-pNA	Bachem, Heidelberg
Val-Leu-Lys-pNA	Bachem, Heidelberg
Ala-Ala-Val-Ala-pNA	Sigma, Taufkirchen
Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	Bachem, Heidelberg

3.1.6 Materialien zur Bestimmung von P1' Endo-Proteaseaktivität

FA-Ala-Phe-NH ₂	Bachem, Heidelberg
FA-Gly-Phe-NH ₂	Bachem, Heidelberg
FA-Gly-Leu-NH ₂	Bachem, Heidelberg

3.1.7 Materialien zur Bestimmung von Transglutaminaseaktivität

Carbobenzoxy-L-glutaminylglycin (CBZ-Gln-Gly)	Bachem, Heidelberg
Eisen(III)-chlorid	Merck, Darmstadt
L-Glutathion (reduziert)	Merck, Darmstadt
Hydroxylaminhydrochlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Tris, [Tris(hydroxymethyl)aminomethan]	Sigma, Taufkirchen

3.1.8 Materialien für elektrophoretische und proteinchemische Verfahren

Antibiotika-Testblättchen, ø 6 mm	Schleicher und Schuell, Dassel
α _s -Casein	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung, 30 %, 29:1	AppliChem, Darmstadt
Agarose	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APDS)	Merck, Darmstadt
Anodenpuffer für die IEF pH 3,0	Serva, Heidelberg
BCA Proteinbestimmungs-Assay	Pierce, Rockford, USA
Borsäure	Fluka, Neu-Ulm
Brilliant Blue R 250	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Dialyse-Schläuche	Serva, Heidelberg
ϵ -Aminocaprinsäure	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Faltenfilter 595 ¹ / ₂ , ø 185 mm	Schleicher und Schuell, Dassel
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
IEF-Gele, Servalyt Precotes 3-10	Serva, Heidelberg
IEF-Blotgele, Servalyt PreNets 3-10	Serva, Heidelberg
Iodessigsäure	Sigma, Taufkirchen
Marker-Proteinmischung 3-10 für die IEF	Serva, Heidelberg
Membranen PM-10	Amicon, Danvers, USA
Membranfilter (PES)	Membrapur, Bodenheim
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Mikrotiterplatten, Polystyrol	Nunc, Dänemark
Kathodenpuffer für die IEF, pH 10,0	Serva, Heidelberg
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen 0,2 μ m	BioRad, München
Rinder Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva, Heidelberg
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS-Proteinmarker (für die Kapillarelektrophorese)	Sigma, Taufkirchen
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Sterilfilter 0,2 oder 0,45 μ m	Sartorius, Göttingen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen
Vorgefärbter LMW-Proteinstandard	BioRad, München

3.1.9 Materialien für immunchemische Verfahren

BCIP / NBT -Substrattabletten	Schleicher & Schuell, Dassel
Blottingpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
DEAE-Affi-Gel Blue Fertigsäule	BioRad, München
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Kaninchenserum gegen mikrobielle TGase	Eurogentec, Seraing, Belgien
Nitrocellulosemembran 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Magermilchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Methanol, protein sequencing grade	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Ziegen IgG, Anti-(Kaninchen IgG)- Konjugat mit Alkalischer Phosphatase	Sigma, Taufkirchen

3.1.10 Materialien für chromatographische Verfahren

DEAE-Sepharose	Sigma, Taufkirchen
Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 (S)	Merck, Darmstadt
HiLoad 16/60; Superdex 200 prep grade	Pharmacia, Uppsala, Schweden
HiTrap TM HIC Test Kit (SV je 1 ml):	Pharmacia, Uppsala, Schweden
- Phenyl-Sepharose High Performance	
- Phenyl-Sepharose 6 FF (high sub)	
- Phenyl-Sepharose 6 FF(low sub)	
- Butyl-Sepharose 4 FF	
- Octyl-Sepharose 4 FF	
HiTrap TM IEX Selection Kit (SV je 1ml):	Pharmacia, Uppsala, Schweden
- SP Sepharose (starker Kationenaustauscher)	
- CM Sepharose (schwacher Kationenaustauscher)	
- Q Sepharose (starker Anionenaustauscher)	
- DEAE Sepharose (schwacher Anionenaustauscher)	
- ANX Sepharose (schwacher Anionenaustauscher)	
- Q XL (starker Anionenaustauscher)	
- SP XL (starker Kationenaustauscher)	
Arginin Sepharose 4B	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Benzamidin FF (high sub) 1 ml	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Entsalzungssäule HiPrep 26/10	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Entsalzungs Econo-Pac 10 DC	BioRad, München
Kalibrierungskit für die GPC	Sigma, Taufkirchen

3.1.11 Materialien für Inhibitionsversuche

4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid (AEBSF)	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin (Rinderlunge)	Sigma, Taufkirchen
Bestatin (Hydrochlorid)	Sigma, Taufkirchen
Benzamidin (Hydrochlorid-Hydrat)	Sigma, Taufkirchen
Chymostatin	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Titriplex III)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat (EGTA)	Sigma, Taufkirchen
DTT	Sigma, Taufkirchen

Iodacetamid	Sigma, Taufkirchen
Iodessigsäure	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
o-Phenanthrolin	Sigma, Taufkirchen
Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Phosphoramidon	ICN Biomedicals, Eschwege
N-Tosyl-L-lysin-chlormethylketon (TLCK)	Sigma, Taufkirchen
Trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan (E-64)	Sigma, Taufkirchen
Proteaseinhibitor-Cocktail für bakt. Zellextrakte	Sigma, Taufkirchen

3.2 Geräte

3.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen

Vertikaler Autoklav 3870 ELV	Tuttnauer, Breda, Niederlande
Brutschrank, 80 UL	Memmert, Schwalbach
Schüttler, B. Braun, LS 30/RO 30	Gerhardt, Bonn
Schüttler, KS 10, Bühler	Johanna Otto, Hechingen
Sicherheitswerkbank	Clean Air, Haan
Zentrifugen	Heraeus Christ, Osterode
Biofuge A	Heraeus Christ, Osterode
Suprafuge 22	Sigma, Osterode
3K30C Sigma	

3.2.2 Flüssigkeitschromatographie

Einkanal-Monitor UV-1-Kontrolleinheit	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Einkanal-Monitor UV-1-Optische Einheit	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Fraktionssammler, Frac-100	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Peristaltikpumpe, P-1	Pharmacia, Uppsala, Schweden
FPLC-Anlage:	
Ternäre Pumpe, L6210	Merck/Hitachi, Darmstadt
UV-Detektor, L4200	Merck/Hitachi, Darmstadt
Fraktionssammler, L5200	Merck/Hitachi, Darmstadt
Auftragsschleife, Ultraloop, 90 ml	Millipore, Eschborn
Chromatographie-Schrank, TC603-1	Tritec, Hannover
Schreiber	Knauer, Berlin

3.2.3 Konzentrierung von Proteinlösungen

Amicon-Zellen, 10, 50 und 150 ml	Amicon, Danvers, USA
Gefriertrocknungsanlage, ALPHA 2-4	Heraeus Christ, Osterode
Ultrafiltrationsröhrchen, Microsep 10k	Pall Filtron, Dreieich

3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität

Mikrotiterplattenlesegeräte

Steuereinheit, Peacock P 133 professional	Asys Hitech, Österreich
Software, Mikrowin 3.0	Mikrotek, Overath
Genios	Tecan, Crailsheim
Software, Magelan 2.0	Tecan, Crailsheim
Spektralphotometer, Lamda 2	Perkin Elmer, Überlingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

3.2.5 Elektrophoretische Verfahren

Mini-Protean II	Biorad, München
Trans-Blot Semi-Dry Transferzelle	Biorad, München
Power Supply	Pharmacia, Uppsala, Schweden
IEF LKB 2117 Multiphor II	Pharmacia, Uppsala, Schweden
LKB 2197 Power Supply	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Geldokumentationssystem, Image Master [®] VDS	Pharmacia, Uppsala, Schweden

3.3 Kultivierung von Streptomyceten

Alle mikrobiologischen Arbeitsschritte erfolgten aseptisch, um Kontaminationen der Kulturen oder die Freisetzung von bakteriellem Material auszuschließen. Die zur Kultivierung verwendeten Medien, nicht sterilverpackte Arbeitsmaterialien sowie alle Rückstände mikrobiellen Materials wurden in feuchter Hitze (20 min bei 121 °C) sterilisiert. Thermolabile Lösungen, wie beispielsweise die Spurenelementlösung nach Voelskow, wurden vor dem Animpfen über einen Sterilfilter (0,2 µm) zum autoklavierten Medium zugegeben. Glaswaren wurden im Trockenschrank bei 160 °C für mindestens 2 h sterilisiert. Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden mit vollentsalztem Wasser (VE-H₂O) angesetzt.

3.3.1 Nährmedien

3.3.1.1 GYM-Medium:

(Glucose-Yeast-Malt)

[Shirling und Gottlieb, 1966]

4 g/l	Glucose
4 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Malzextrakt
2 g/l	CaCO ₃

Für das Wachstum der Streptomyceten auf Oberflächenkulturen wurden dem GYM-Medium 15 g/l Agar zugegeben (GYM-Platten). Der pH-Wert wurde mit 5 M Natronlauge auf 7,2 eingestellt.

3.3.1.2 Komplexmedium:

(Stärke-Mineralsalz-Medium)

[Shirling und Gottlieb, 1966]

10 g/l	Stärke
2 g/l	(NH ₄) ₂ SO ₄
1 g/l	K ₂ HPO ₄
1 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
1 g/l	NaCl
2 g/l	CaCO ₃

Flüssigkultur-Medium:

[Korn-Wendisch und Kutzner, 1981]

20 g/l	Pepton
2 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Glucose
in Stärke-Mineralsalz-Medium	

Der pH-Wert wurde bei beiden Medien mit 5 M Natronlauge auf 7,0 eingestellt.

Spurenelementlösung:

[Voelskow, 1989]

4000 mg/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
1000 mg/l	Fe(III)-citrat x H ₂ O
200 mg/l	MnSO ₄
100 mg/l	ZnCl ₂
40 mg/l	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
30 mg/l	CoCl ₂ x 6 H ₂ O
30 mg/l	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O
60 mg/l	Na ₂ B ₄ O ₇

3.3.2 Kultivierung auf Agarmedien

Die Anzucht der Mikroorganismen zur Inokulation von Flüssigmedien, zur Extraktion von Proteasen sowie das Anlegen von Dauerkulturen erfolgte auf GYM-Agarplatten. Ausgehend von einer Reinkultur der DSMZ wurden die Bakterienstämme *Streptomyces mobaraensis* und *Streptomyces coelicolor* in sterilem Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde mit einer Pipette auf GYM-Platten überführt und mit einem Trigalski-Spatel verteilt. Mittels Reinigungsausstrich wurden die Streptomyceten-Stämme weitere 2-4mal auf neue GYM-Platten überführt. Zur Stammkonservierung wurden die Streptomyceten nach etwa 20 d auf eine neue GYM-Agarplatte überimpft, anschließend mit einem Kunststofffilm verschlossen und bei 28 °C gelagert.

3.3.3 Enzymgewinnung aus Agar-Platten

Zur Extraktion von Enzymen aus Agar-Platten wurden 24 h bis 60 d alte Festmedienkulturen mit sterilem 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0-8,0, der 1 mM CaCl₂ enthielt, überschichtet, mit Kunststofffilm verschlossen und für 24-48 h bei 28-29 °C auf einen Querschüttler (Frequenz 90 pro min) gestellt. Der entnommene Extrakt der Festmedienkultur wurde anschließend mikroskopisch auf Kontaminationen überprüft. Konnte keine Kontamination in den Plattenüberständen nachgewiesen werden, so wurde dieser durch Filtration von unlöslichen Stoffen befreit. Die Aufbewahrung der Extrakte der Agarfestmedien erfolgte bei -20 °C.

3.3.4 Enzymgewinnung aus Flüssigmedien

Zur präparativen Enzymproduktion wurden 1 Liter Erlenmeyer-Kulturkolben mit 120 ml Flüssigmedium verwendet. Nach dem Autoklavieren der Kulturmedien wurde über einen Sterilfilter (0,2 µm) 1 ml Spurenelementlösung nach Voelskow zugegeben.

Anschließend wurde mit einem sterilen Korkbohrer aus einer mit *Streptomyces* bewachsenen GYM-Agarplatte (> 7 Tage) eine 1 cm² große Fläche ausgestanzt und damit das Flüssigmedium beimpft.

Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 28 °C bis zum Erreichen der gewünschten Enzymaktivität. Der Sauerstoffeintrag, der für das Wachstum der aeroben Bakterien benötigt wird, erfolgte durch intensive Bewegung der Flüssigkultur auf einem Rundschüttler mit einer Frequenz von 150 pro Minute. In regelmäßigen Abständen wurden unter sterilen Bedingungen Proben entnommen und Enzymaktivitäten bestimmt. Bei Bedarf wurde das Kulturmedium durch Zentrifugieren und Filtration weitgehend von den Mikroorganismen getrennt, direkt weiter verarbeitet oder bei -20 °C eingefroren.

3.4 Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem Tris-Glycin-Puffersystem. Aufgrund der besseren Auflösung im Bereich zwischen 10 und 50 kDa wurden Proteine für die Sequenzanalyse mit einem Boratgelsystem getrennt. Die Durchführung aller Gelelektrophoresen fand mit einer Mini-Protean II Apparatur statt. Die Komponenten zur Herstellung der Gele wurden entsprechend der nachfolgend aufgeführten Reihenfolge

zusammengegeben und durchmischt. Das Trenngel wurde gegossen und für die Dauer der Polymerisation (mind. 45 min) mit Isopropanol überschichtet. Die Größe der Trenngele betrug ca. 52 x 83 x 0,75-1,5 mm. Analog erfolgte die Präparation des Sammelgels. Nach Einsetzen der Taschenformer und Polymerisation wurden die Gele sofort verwendet oder maximal eine Woche in feuchten Tüchern bei 4 °C aufbewahrt. Die Protein enthaltenden Proben wurden mit dem für das Gelsystem angegebenen Auftragspuffer versetzt und 10 min bei 100 °C denaturiert. Nach Einfüllen des jeweiligen Elektrodenpuffers und Applikation von 2-500 µl der Proben wurden die Proteine bei einer konstanten Spannung von 200 V bzw. von 150 V bei Verwendung des Boratgelsystems getrennt. Mit Auslaufen von Bromphenolblau nach 45 bzw. 180 min wurde die Elektrophorese beendet.

Die Proteine wurden anschließend entweder mit Silbernitrat oder Coomassie-Blau angefärbt. Die Zuordnung der Molmasse erfolgte anhand von Markerproteinen.

3.4.1 Analytische Tris-Glycin-Gele [Laemmli, 1970]

Die Bedienung der Elektrophoresekammern erfolgte entsprechend der Gerätebeschreibung des Herstellers.

Acrylamidlösung:	29,2 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
Elektrodenpuffer:	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris-Base
	0,1 % (w/v)	SDS
Auftragspuffer (5x):	4 % (w/v)	SDS
	40 % (w/v)	Glycerin (87 %)
	0,5 M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,1 % (w/v)	gesät. Bromphenolblaulsg.

(wenn gesondert vermerkt, wurde zur Spaltung von Disulfidbrücken 10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol zugegeben)

Tab. 3-1: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.

Komponente	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 5 %
Acrylamidlösung	5 ml	1,3 ml
1 M Tris-HCl pH 8,9	4,5 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	1 ml
Wasser	2,2 ml	5,5 ml
20 % (w/v) SDS	60 µl	40 µl
TEMED	10 µl	10 µl
10 % (w/v) APDS	50 µl	50 µl

3.4.2 Boratgele zur Isolierung von Proteinen für die Sequenzanalyse [Poduslo, 1981]

Acrylamidlösung:	29,2 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
Elektrodenpuffer: (P1-Puffer, pH 8,3)	0,1 M	Tris-Base
	0,1 M	Borsäure
	2,5 mM	EDTA
	0,1 % (w/v)	SDS
Gelpuffer : (P2-Puffer, pH 8,3)	3 M	Tris-Base
	3 M	Borsäure
	10 mM	EDTA
	0,4 % (w/v)	SDS
Sammelgelpuffer:	0,4 M	Tris-HCl pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS
Auftragspuffer:	4 ml	P1-Puffer
	1 ml	gesät. Bromphenolblaulsg.
	11 ml	bidest. Wasser
	5 g	Saccharose
	2 % (w/v)	SDS

Tab. 3-2: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Boratpuffer.

Komponente	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 5 %
Acrylamidlösung	5,0 ml	1,3 ml
Gelpuffer P2	4,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,0 ml
Wasser	2,2 ml	5,5 ml
20 % (w/v) SDS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
12,5 % (w/v) APDS	50 µl	50µl

Die im elektrischen Feld getrennten Proteine wurden anschließend mittels Semi-Dry-Blot (3.13.1) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit Coomassie-Blau gefärbt. Die Proteinbande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gelstück wurde bis zur Sequenzanalyse bei -20 °C eingefroren.

3.4.2.1 Protein-Molekulargewichtsstandards

Zur Zuordnung der Molmasse elektrophoretisch getrennter Proteine wurde auf jedes Gel mindestens eine der Spuren mit einem Gemisch von Markerproteinen belegt. Der SDS-Proteinstandard von Sigma wurde bei SDS-Gelen verwendet, deren Proteine durch Silber- oder Coomassiefärbung sichtbar gemacht wurden. Bei der Übertragung von Proteinen nach der Elektrophorese auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen wurde der vorgefärbte LMW-Marker von BioRad eingesetzt. Die Proteine der beiden Markermischungen sind in den nachstehenden Tabellen aufgelistet.

Tab. 3-3: Zusammensetzung des Sigma-SDS-Proteinmarkers (M-2789).

Protein	Herkunft	Molmasse [kDa]
Myosin	Kaninchenmuskel	205
β-Galactosidase	<i>Escherichia coli</i>	116
Phosphorylase B	Kaninchenmuskel	97,4
Serumalbumin	Rind	66,0
Ovalbumin	Hühnerei	45,0
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	29,0
Trypsininhibitor	Sojabohne	20,1
α-Lactalbumin	Kuhmilch	14,1

Tab. 3-4: Zusammensetzung des vorgefärbten LMW-Markers der Fa. BioRad (161-0305).

Protein	Herkunft	Molmasse [kDa]
Phosphorylase B	Kaninchenmuskel	110
Serumalbumin	Rind	90,0
Ovalbumin	Hühnerei	51,2
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	36,2
Trypsininhibitor	Sojabohne	29,0
Lysozym	Hühnerei	21,4

3.4.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts von Proteinen unter nativen Bedingungen wurden eine Horizontalgelelektrophorese-Apparatur und Servalylt Precote-Fertigel verwendet.

In den mit Ampholyten versetzten Gelen bildet sich bei Anlegen eines elektrischen Feldes ein stabiler pH-Gradient aus. Die Proteine wandern entsprechend ihrer Nettoladung zu dem pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht.

Anodenpuffer:	0,17 g	L-Asparaginsäure
(Fertiglösung, Serva)	0,18 g	L-Glutaminsäure
	ad. 50 ml	Wasser

Kathodenpuffer:	0,22 g	L-Arginin
(Fertiglösung, Serva)	0,18 g	L-Lysin
	6 ml	Ethylendiamin
	ad. 50 ml	Wasser

Nach Temperieren der horizontal angeordneten Kühlplatte auf 4 °C wurde etwa 1 ml Silikonöl gleichmäßig auf der Platte verteilt. Anschließend wurden das Gel, die in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkten Elektrodendochte sowie der Applikatorstreifen aufgelegt. Zur Verbesserung der Trennschärfe erfolgte vor dem Probenauftrag eine Vorfokussierung. Dazu wurde eine Spannung von 200 V angelegt, die innerhalb von 30 min sukzessive auf 300 V erhöht wurde.

1-50 µl der gegebenenfalls entsalzten Proteinlösungen (Salzkonzentration < 50 mM) wurden anschließend in die Taschen des Applikatorstreifens pipettiert. Die Höchstleistung der Spannungsquelle wurde auf 2 W (für ein Gel der Abmessung 125 mm x 62,5 mm), die Endspannung auf 2000 V begrenzt. Die Fokussierung lief über einen Zeitraum von etwa 3 h.

Die Proteine wurden danach mit Silbernitrat gefärbt oder durch Auflegen einer Agarose-Matrix mit Protease-Substraten (3.5.2.1) sichtbar gemacht.

3.4.3.1 Markerproteine für die isoelektrische Fokussierung

Die Zuordnung der isoelektrischen Punkte erfolgte anhand einer käuflichen Präparation von Markerproteinen (Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Zusammensetzung des IEF-Markers 3-10 der Fa. Serva (39211).

Protein	Herkunft	Isoelektrischer Punkt
Cytochrom C	Pferd	10,7
Ribonuclease A	Rinderpankreas	9,5
Lectin	<i>Lens culinaris</i>	8,3; 8,0; 7,8
Myoglobin	Pferd	7,4; 6,9
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	6,0
β -Lactoglobulin	Kuhmilch	5,3; 5,2
Trypsininhibitor	Sojabohne	4,5
Glucoseoxidase	<i>Aspergillus niger</i>	4,2
Amyloglucosidase	<i>Aspergillus niger</i>	3,5

3.5 Visualisierung von Proteinen

3.5.1 Coomassie-Färbung

Die Färbemethode wird bei Proteinkonzentrationen $> 0,2 \mu\text{g}$ pro Bande angewandt. Sie beruht auf einer hydrophoben Adsorption des Farbstoffs Brilliantblau durch die denaturierten Proteine.

3.5.1.1 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese 20 min mit der Färbelösung der nachstehenden Zusammensetzung gefärbt. Zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff aus dem Gel wurde die Färbelösung durch die Entfärbelösung ersetzt und durch mehrmaliges Waschen solange mit dem Gel inkubiert, bis der Gelhintergrund klar war und die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden (etwa 3 h).

Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in
 45 % (v/v) Ethanol
 45 % (v/v) VE-Wasser
 10 % (v/v) Eisessig

Entfärbelösung: 30 % (v/v) Ethanol
 60 % (v/v) VE-Wasser
 10 % (v/v) Eisessig

3.5.1.2 Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen

[Matsudaira, 1987]

Coomassie-Färbung nach der Methode von Matsudaira [1987] erfolgte nach dem Protein-Transfer auf PVDF-Membranen. Die PVDF-Membran mit den immobilisierten Proteinen wurde unmittelbar nach dem Blot in eine Kunststoffschale überführt, 5 min mit der Färbelösung behandelt und anschließend solange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren (2-4 h). Die Membran wurde auf Filterpapier getrocknet, die entsprechenden Protein-Banden wurden für die Proteinsequenzierung mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Färbelösung: 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
 50 % (v/v) Methanol, sequencing grade

Entfärbelösung: 50 % (v/v) Methanol, sequencing grade

3.5.2 Silberfärbung

[Blum *et al.*, 1987]

Die Methode zeichnet sich durch eine niedrige Nachweisgrenze (ca. 5 ng je Proteinbande, wodurch sie über 40fach empfindlicher ist als die Coomassie-Färbung) und einen hohen Kontrast aus. Bei der Silberfärbung bilden Ag^+ -Ionen mit den Aminosäureseitenketten Glu, Asp und Cys bei pH-Werten über 10,5 Komplexe aus. Durch den Zusatz von Formaldehyd wird das Ag^+ der Komplexe zu metallischem Silber reduziert.

3.5.2.1 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE- oder IEF-Gelen

Ein Polyacrylamid- oder IEF-Gel wurde nach der Elektrophorese in eine Schale überführt und entsprechend Tab. 3-6 behandelt (Reagenzienmenge für ein Gel).

Tab. 3-6: Verfahrensschritte zur Anfärbung von Elektrophoresegelen mit Silbernitrat.

Schritt	Verwendete Lösung	Dauer
Fixieren	Ethanol / Essigsäure / Wasser 50 / 12 / 38	ca. 1 h.
Waschen	50 % (v/v) Ethanol	3 x 20 min
Vorbehandeln	0,1 g Natriumthiosulfat in 500 ml Wasser	1 min
Waschen	Wasser	3 x 20 s
Imprägnieren	0,4 g Silbernitrat, 100 µl Formalin in 200 ml Wasser	20 min
Waschen	Wasser	3 x 20 s
Entwickeln	8 g Natriumcarbonat, 100 µl Formalinlsg. in 200 ml Wasser	bis zur gewünschten Bandenintensität
Waschen	Wasser	1 x 10 s
Stoppen	Ethanol / Essigsäure / Wasser 50 / 12 / 38	2 min

Die Gele wurden photographiert und anschließend für die weitere Dokumentation zusammen mit Zellophan-Blättern für 30 min in 20 % EtOH und 10 % Glycerin äquilibriert. Die zwischen zwei Zellophan-Blättern getrockneten Gele (Dauer: ca. 4 d) sind unbegrenzt haltbar.

3.6 Immunchemische Methoden

3.6.1 Herstellung polyklonaler TAMEP- und TAMEP-Inhibitor-Antikörper

Die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen TAMEP und P14 wurde als externe Auftragsarbeit von der Firma Eurogentec, Serain (Belgien) durchgeführt.

TAMEP und P14 von *S. mobaraensis* wurden wie unter 3.12.3 und 3.12.6 beschrieben gereinigt. Entsprechend der empfohlenen Antigenmenge der Firma Eurogentec wurden 400 µg TAMEP und 800 µg P14 mit Auftragspuffer, der zusätzlich 20 mM EDTA und 5 mM

PMSF enthielt, um die Eigenhydrolyse auszuschließen, versetzt. Nach der Denaturierung der Proben für 10 min bei 100 °C wurden die Antigene durch SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie gefärbt. Um Essigsäure und Methanol möglichst quantitativ zu entfernen, wurden die Gele für 10 min mit Wasser gewaschen. Die ausgeschnittenen TAMEP- und P14-Banden wurden in jeweils vier gleiche Gelfragmente geteilt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und ohne Kühlung an Eurogentec verschickt. Die Immunisierung von zwei Kaninchen mit denaturierter TAMEP und P14 erfolgte nach einem Standardprotokoll. Nach drei Monaten wurden jeweils etwa 60 ml der Antiseren auf Trockeneis geliefert.

3.6.2 Isolierung von IgG aus Kaninchenserum

Die polyklonalen Antikörper wurden aus dem Kaninchenserum durch einen Chromatographieschritt von Albuminen, Lipoproteinen und Proteasen befreit. Eine DEAE-Affi-Gel Blue Säule ermöglichte die Elution der Immunglobuline G und geringe Mengen an Transferrin ohne Kontamination weiterer Serumproteine.

Vor der Chromatographie wurde das Kaninchenserum für 6 h bei 4 °C gegen 28 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 (Applikationspuffer) dialysiert. Die DEAE-Affi-Gel Säule wurde vor Gebrauch mit 2 M Guanidinium-Hydrochlorid in 40 ml Applikationspuffer (Regenerationspuffer) gewaschen und anschließend mit 80 ml Applikationspuffer äquilibriert. Nach dem Auftrag von 2,75 ml äquilibriertem Kaninchenserum auf die 10 ml Säule wurden die Antikörper mit 20 ml Applikationspuffer eluiert, und Fraktionen von je 1 ml wurden gesammelt. Fraktionen mit einer Proteinkonzentration > 0,5 mg/ml (ca. 10 ml) wurden vereinigt, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Nach IgG-Isolierung folgte die Elution der gebundenen Serumproteine mit 20 ml Regenerationspuffer, zur Aufbewahrung wurde die Säule mit 20 ml Applikationspuffer mit 0,02 % Natriumazid gespült und bis zur nächsten IgG-Reinigung bei 4 °C gelagert.

3.6.3 Dot-Blot

Zur Überprüfung der Antigen-Antikörper-Bindung wurden die gereinigten Antikörper gegen TAMEP und P14 mit den entsprechenden Antigenen durch Dot-Blots untersucht. Hierzu wurden jeweils 2 µl von sieben seriellen Verdünnungsreihen der TAMEP (100 ng-0,8 ng) und des TAMEP-Inhibitors (140-0,5 ng) auf eine Nitrocellulosemembran pipettiert. Nach dem

Trocknen an der Luft wurden die Membranen mit den TAMEP- bzw. P14-Proben in jeweils sieben identische Streifen geschnitten und in insgesamt vierzehn Kunststoffschalen überführt. Die immunchemische Färbung (3.6.5) erfolgte mit seriellen Erstantikörperverdünnungsreihen der TAMEP und des TAMEP-Inhibitors von 1 : 100 bis 1 : 20000 in TBST-Puffer (TBST-Puffer, siehe 3.6.5).

3.6.4 Western-Blot

Mit dieser Methode werden Proteine, die durch SDS-Gelelektrophorese getrennt wurden, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die auf der Membranoberfläche adsorbierten Proteine sind für Antikörper zugänglich. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte mittels einer Semi-Dry Blot Apparatur mit Platin / Edelstahl-Elektroden und dem Transferpuffer-System von Towbin *et al.* [1979].

Transferpuffer:	48 mM	Tris-Base
	39 mM	Glycin
	1,3 mM	SDS
	20 % (v/v)	Methanol sequencing grade; pH 9,1

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde bei SDS-Polyacrylamidgelen das Sammelgel entfernt und das Trenngel 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Vier Filterpapiere sowie die Nitrocellulosemembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau erfolgte von unten nach oben, beginnend auf der Anode der Semi-Dry-Blotapparatur (Abb. 3-1).

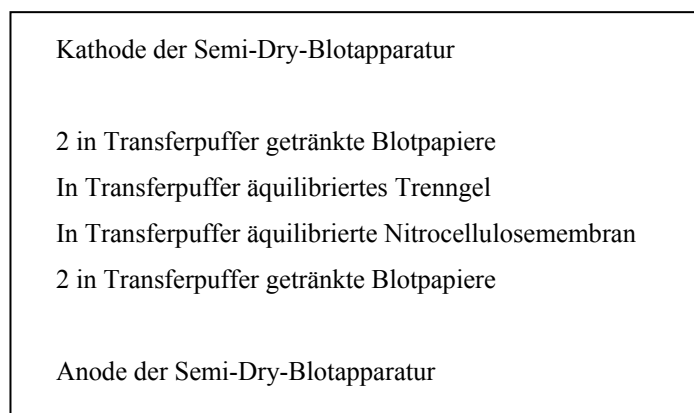


Abb. 3-1: Aufbau einer Western-Blot-Anordnung für den Spannungs-induzierten Proteintransfer von einem Elektrophoresegel auf eine Nitrocellulosemembran.

Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 20 V. Nach 45 bis 60 min wurde die Membran in eine Kunststoffschale der Abmessung 7 x 13 cm überführt, mit Wasser gewaschen und immunchemisch gefärbt.

3.6.5 Immunchemische Färbung

Der Nachweis von immobilisierten Antigenen nach Western- bzw. Dot-Blots erfolgt mittels spezifischer Antikörper. Die Erstantikörper wurden danach durch enzymkonjugierte Zweitantikörper gebunden und durch einen präzipitierenden Farbstoff sichtbar gemacht.

TBST-Puffer	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	150	mM	NaCl
	0,05	% (v/v)	Tween 20
TBST-Blotto:	2,5	g	Magermilchpulver in 50 ml TBST
Erstantikörperlösung:	2	µl	gereinigte IgG gegen BTGase in 30 ml TBST
	oder 7,5	µl	gereinigte IgG gegen P14 in 30 ml TBST
	oder 50	µl	gereinigte IgG gegen TAMEP in 30 ml TBST
Zweitantikörperlösung:	2	µl	Anti-(Kaninchen-IgG)-IgG aus Ziege, in 30 ml TBST
AP-Puffer:	100	mM	Tris-HCl pH 9,5
	100	mM	NaCl
	5	mM	MgCl ₂
Substratlösung:		½	BCIP / NBT-Tablette in 15 ml bidest. Wasser
Stoppuffer:	20	mM	Tris-HCl pH 8,0
	5	mM	EDTA-NaOH pH 8,0

Die immunchemische Färbung immobilisierter Proteine ist nachfolgend tabellarisch aufgeführt:

Tab. 3-7: Verfahrensschritte zur Anfärbung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen.

Schritt	Lösung	Zeit
Waschen	TBST	3 x 5 min
Sättigen	TBST-Blotto	60 min
Waschen	TBST	3 x 5 min
Erstantikörperbindung	Erstantikörperlösung	90 min
Waschen	TBST	3 x 5 min
Zweitantikörperbindung	Zweitantikörperlösung	90 min
Waschen	TBST	3 x 5 min
Aquilibrieren	AP-Puffer	1 min
Farbreaktion	Substratlösung	bis zur gewünschten Bandenintensität
Stoppen	Stoppuffer	1 min
Waschen	Wasser	1 min

Die angefärbte Membran wurde zwischen zwei Filterpapieren getrocknet, dokumentiert und unter Lichtausschluss aufbewahrt.

3.7 Konzentrieren, Entsalzen und Teilreinigen von Proteinlösungen

3.7.1 EtOH-Fällung

Protisch, dipolare Lösungsmittel wie Ethanol setzen die Löslichkeit von Ionen (Salze, Proteine) im wässrigen Milieu aufgrund ihrer niedrigen Dielektrizitätskonstante herab. Die Ethanolfällung wurde zur Aufkonzentrierung von Proteinen bzw. zum Umpuffern verwendet. Um die Denaturierung der Proteine durch Ethanol zu verringern, wurde die Fällung in einem Eisbad durchgeführt. Unter ständigem Rühren wurde zu dem vorgekühlten Kulturmedium oder der Proteinlösung langsam Ethanol (-20 °C) bis zu einer Volumenkonzentration von 70 Prozent zugegeben. Der durch Zentrifugieren (10000 x g, 15 min, 4 °C) erhaltene Niederschlag wurde anschließend im gewünschten wässrigen Puffersystem aufgenommen.

3.7.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Durch die Zugabe von Salzionen mit hoher Ionenstärke wird die Löslichkeit von Proteinen herabgesetzt. Die Salzionen entziehen einem Protein solange die Wassermoleküle, die es für die Solvation benötigt, bis es unlöslich wird und ausfällt.

Die Ammoniumsulfat-Fällung (AS-Fällung) wurde zur Konzentrierung von Proteinlösungen angewendet, oder es wurde eine fraktionierende AS-Fällung durchgeführt, die zur Teilreinigung des gesuchten Proteins führen konnte. Die hierbei angewendeten Ammoniumsulfat-Konzentrationen für die Fällung von Proteinen bei 0 °C wurden Dawson *et al.* (1955) entnommen (Abb. 3-2).

		% Endsättigung						
		20	30	40	50	60	70	80
% Ausgangssättigung	/	107	166	229	295	366	442	523
	0		56	115	177	244	316	392
	20			57	119	184	253	328
	30				59	122	190	262
	40					61	127	197
	50						63	131
	60							66
	70							

Abb. 3-2: Ammoniumsulfatmengen in g/l zur Herstellung definierter Prozentgehalte bei 0 °C nach Dawson *et al.* (1955).

Die AS-Fällung wurde in einem Eisbad durchgeführt. Bei der fraktionierenden AS-Fällung wurde die Salzkonzentration stufenweise in der Regel um 10 Prozent erhöht. Zur Vermeidung lokaler Übersättigung wurden dabei nur kleine Mengen AS zugegeben. Ausgefällene Proteine wurden durch Zentrifugieren (10000 x g, 15 min, 4 °C) sedimentiert, erneut in Puffer gelöst oder verworfen. Die AS-Konzentration im Überstand wurde unter Berücksichtigung der Volumenzunahme solange weiter erhöht, bis das Zielprotein ausgefallen war.

3.7.3 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration wie auch die Druckfiltration (s.u.) ermöglicht die Entfernung niedermolekularer Substanzen sowie die Konzentrierung von Proteinlösungen. Die Proben mit einem Volumen bis zu 3,5 ml wurden in Microsep 10K Röhrchen gegeben und bei 3000-7500 x g (4 °C) durch die Membran mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa gedrückt.

Durch alternierende Zugabe von Puffer und Zentrifugation wurde die Ausgangslösung umgepuffert, entsalzt und bis auf ein Volumen von 35-50 µl eingengt.

3.7.4 Druckfiltration

Die Druckfiltration wurde mit Amicon-Zellen (10, 50 und 150 ml) unter Rühren und Eiskühlung durchgeführt. Proteinlösungen wurden mit Stickstoff durch eine semipermeable Membran, die in das Bodenstück der Apparatur eingesetzt wurde, gepresst. Der Druck betrug 3,0 bis 3,5 bar, die PES-Membran hatte ein Ausschlussvolumen von 10 kDa.

3.7.5 Lyophilisation

Die Lyophilisation (Gefriertrocknung) ermöglicht die schonende Konzentrierung von Proteinlösungen. Im Vakuum wird einer Proteinprobe Wasser durch Sublimation entzogen. Vor der Gefriertrocknung wurde die Probe bei -20 °C eingefroren. Bei einer Eiskondensator-Temperatur von -70 bis -80 °C, einem Druck von 0,04-0,08 mbar und einer Stellflächen-Temperatur von -10 bis -6 °C wurden Proteinproben von 100 µl bis 100 ml bis zum gewünschten Volumen eingengt oder getrocknet.

3.7.6 Dialyse

Die Abtrennung von hydrophilen Verunreinigungen und Salzen erfolgte auch durch Dialyse. Hierzu wurden Dialyse-Schläuche (MWCO 6000-8000) vor ihrem Gebrauch in dest. Wasser mit 10 mM EDTA gekocht und anschließend mehrfach mit dest. Wasser gespült. Die Aufbewahrung vorbehandelter Schläuche erfolgte in EtOH (20 % (v/v)) bei 4 °C.

Die Dialyse wurde bei 2-3 maligem Pufferwechsel bei 4 °C für die Dauer von 4-6 h oder über Nacht durchgeführt.

3.7.7 Entsalzen mittels GPC

Für die Entsalzung von Proteinlösungen oder von Seren wurden auch Entsalzungssäulen verwendet. Die Gelfiltration ermöglicht die schnelle und einfache Trennung von Proteinen (Molmasse > 6000 Da) und niedermolekularen Substanzen, insbesondere von Salzen. Bei größeren Volumina wurde eine 2,6 cm x 10 cm HiPrep-Säule 26/10 gefüllt mit Sephadex G-25 F (Bettvolumen: 53 ml) der Fa. Pharmacia verwendet, bei kleineren Volumina eine

Econo Pac 10 DC-Säule (Bettvolumen: 10 ml) der Fa. BioRad. Die Fließgeschwindigkeiten betragen 6 ml/min bzw. 1 ml/min.

HiPrep-Chromatographie wurde mit der FPLC-Anlage (Merck/Hitachi) durchgeführt. Vor dem Probenauftrag (< 70 mg/ml Proteine) wurde die Säule mit 100 bis 150 ml Puffer äquilibriert. Die erhaltenen 6 ml Fraktionen wurden mittels Aktivitätstest und SDS-PAGE überprüft.

Auf Econo-Pac 10 DC-Entsalzungssäulen äquilibriert mit 20 ml eines beliebigen Puffers, wurden die Proteinlösungen bis zum vollständigen Einlauf in das Gelbett aufgegeben. Anschließend wurden die Proteine mit Puffer eluiert, wobei manuell 1-1,5 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Ermittlung der Protein enthaltenden Fraktionen erfolgte entweder durch Bestimmung der Aktivität oder SDS-PAGE.

3.8 Molekulargewichtsbestimmungen

3.8.1 SDS-PAGE

Markerproteine und die Probe mit unbekanntem Molekulargewicht wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Durch halblogarithmische Auftragung der bekannten Molekulargewichte der Eichproteine gegen die Laufstrecken wurde das unbekannte Molekulargewicht der Probe ermittelt.

3.8.2 Gelpermeationschromatographie

Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte mit einer 1,6 cm x 60 cm Hiloal 16/60 GPC-Säule mit Superdex 200 prep grade (Bettvolumen: 120 ml) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Als Laufpuffer wurde 150 mM NaCl und 2 mM CaCl₂ in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 oder pH 8,0 verwendet.

Zur Kalibrierung wurde eine Mischung der in Tab. 3-8 aufgelisteten Proteine vor der eigentlichen Probe getrennt. Die halblogarithmische Auftragung der Molekulargewichte der Eichproteine gegen die Retentionszeiten lieferte die unbekannte Molmasse der Probe.

Tab.3-8: Eichproteine zur Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelpermeationschromatographie

Marker-Proteine	Herkunft	Molekularmasse [kDa]
Blue Dextran		2000
Thyroglobulin	Rind	669
Apoferritin	Pferdemilz	443
β -Amylase	Kartoffel	200
Alkohol-Dehydrogenase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	150
Albumin	Rind	66
Carboanhydrase	Rindererythrocyten	29
Cytochrom C	Rinderherz	12,4

Die GPC-Säule wurde mit 0,2 M NaOH gereinigt und mit 20 % (v/v) Ethanol konserviert.

3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

[Smith *et al.*, 1985]

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen erfolgte nach der Bicinchoninsäure-Methode von Smith *et al.* [1985].

Proteine reduzieren in alkalischer Lösung Kupfer(II)- zu Kupfer(I)-Ionen. Dafür sind in erster Linie Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und Peptidbindungen verantwortlich. Die einwertigen Kupferionen bilden in Gegenwart von Bicinchoninsäure (BCA) einen violettfarbenen Komplex, dessen Extinktion mit der Proteinkonzentration korreliert. Der BCA-Test wurde in Anlehnung an Sorensen und Brodbeck [1986] sowie Redinbaugh und Turley [1986] in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Die Testlösung setzt sich aus den bei der Firma Pierce erhältlichen Reagenzien zusammen:

Reagenz A:

1 % (w/v)	Bicinchoninsäure, Dinatriumsalz
2 % (w/v)	Natriumcarbonat
0,16 % (w/v)	Natriumtartrat
0,4 % (w/v)	Natriumhydroxid
0,95 % (w/v)	Natriumhydrogencarbonat
	mit Natronlauge auf pH 11,25 eingestellt

Reagenz B: 4 % (w/v) Kupfersulfat

Testlösung: Reagenz A : Reagenz B = 50 : 1

Zu 25 µl der zu analysierenden Proteinlösung sowie je 25 µl einer BSA-Verdünnungsreihe (1,0; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 mg/ml) wurden 200 µl der Testlösung in die Vertiefung der Mikrotiterplatten gegeben, mit einer Kunststofffolie abgedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Messung der Absorption des Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 550 nm. Nach Abzug des Referenzwerts (entsprechende Puffer) wurde mit den Werten der BSA-Verdünnungsreihe durch das Genios-Programm des Lesegeräts eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentration der Probe ermittelt.

3.10 Bestimmungen der Enzymaktivität von Transglutaminasen [Grossowicz *et al.*, 1950]

Grundlage zur Bestimmung der Aktivität von bakteriellen Transglutaminasen bildet der enzymkatalysierte Einbau von Hydroxylamin in das synthetische Substrat Carbobenzoxyl-L-glutaminylglycin (CBZ-Gln-Gly). Die an der Glutamyl-Seitenkette des Peptidderivats gebildete Hydroxamsäure wird mit Eisen(III)-Ionen komplexiert und photometrisch quantifiziert.

Reagenz 1:	0,1 M	Hydroxylamin
	10 mM	Glutathion
	30 mM	CBZ-Gln-Gly
in:	0,2 M	Tris-Acetat pH 6,0

Reagenz 2: Entsprechend der Anzahl zu analysierender Proben wurden gleiche Volumina von

12 % (w/v)	HCl
5 % (w/v)	FeCl ₃ in 0,1 M HCl
12 % (w/v)	CCl ₃ COOH

gemischt.

3.10.1 Bestimmung der TGase-Aktivität in 1,5 ml Reaktionsgefäßen

Die Durchführung der Analyse erfolgte nach dem Pipettierschema von Abb. 3-3 Die Bestimmung der Transglutaminaseaktivität in Kulturmedien erforderte aufgrund der teilweise intensiven Eigenfärbung die zusätzliche Messung eines Probenblindwerts. Die Zugabe des stark sauren Reagenzes 2 vor der Probelösung inhibiert die enzymatische Reaktion, so dass ausschließlich die Absorption der Eigenfärbung bestimmt wird. Die Enzymaktivität berechnet sich entsprechend aus der Extinktionsdifferenz von Probe und Blindproben.

	Reagenzienblindwert	Probenblindwert (bei Bestimmung der Enzymaktivität in Kulturmedien)	Probenwert
Inkubationsansatz	550 µl Reagenz 1	500 µl Reagenz 1 500 µl Reagenz 2	500 µl Reagenz 1
Temperieren	10 min bei 37 °C		
Reaktionsstart durch Zugabe von	-	50 µl Probelösung	50 µl Probelösung
Inkubation	10 min bei 37 °C		
Termination	500 µl Reagenz 2	-	500 µl Reagenz 2
Zentrifugation zum Abtrennen von prä- zipitierten Proteinen	5 min, 10.000 x g		
Bestimmung der Extinktion gegen den Referenzwert	unmittelbar im Anschluß bei $\lambda = 525 \text{ nm}$		

Abb. 3-3: Pipettierschema zur Bestimmung von Transglutaminase in 1,5 ml Mikroküvetten.

Die Enzymaktivität der Transglutaminasen ist definiert als:

$$1 \text{ U} = \frac{1 \text{ } \mu\text{mol gebildete Hydroxamsäure}}{\text{min}}$$

Die Volumenaktivität der Probelösung berechnet sich aus der Konzentration der gebildeten Hydroxamsäure bzw. aus der gemessenen Extinktionsdifferenz.

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot t}$$

- mit
- ΔE Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Kontrollwert bzw. Referenzwert
 - V Gesamtvolumen (1,05 ml)
 - ε Extinktionskoeffizient Eisen(III)-Glutamylhydroxamat (0,470 ml / $\mu\text{mol cm}$)
 - d Schichtdicke der Küvette (1 cm)
 - v Probenvolumen (50 μl)
 - t Reaktionszeit (10 min)

Einsetzen der aufgeführten Größen ergibt aus der gemessenen Extinktionsdifferenz direkt die Volumenaktivität:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]_{525\text{nm}} = \Delta E \cdot 4.47 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

3.10.2 Bestimmung der TGase-Aktivität in Mikrotiterplatten

Die Durchführung des Hydroxamat-Tests in Mikrotiterplatten ermöglicht die Einsparung von Reagenzien und die Ermittlung der TGase-Aktivität von bis zu 96 Proben mit einer Messung. Die Bestimmung der TGase-Aktivität mit Mikrotiterplatten stellte die Grundlage für die Etablierung eines Transglutaminase-Aktivierungstests (3.11.2) dar.

	Reagenzienblindwert	Probenblindwert (bei Bestimmung der Enzymaktivität in Kulturmedien)	Probenwert
Inkubationsansatz	100 µl Reagenz 1	100 µl Reagenz 1 100 µl Reagenz 2	100 µl Reagenz 1
Temperieren	10 min bei 37 °C		
Reaktionsstart durch Zugabe von	-	50 µl Probelösung	50 µl Probelösung
Inkubation	10 min bei 37 °C		
Termination	100 µl Reagenz 2	-	100 µl Reagenz 2
Bestimmung der Extinktion gegen den Referenzwert	Messung bei $\lambda = 492 \text{ nm}$		

Abb. 3-4: Pipettierschema zur Bestimmung von Transglutaminase-Aktivität in Mikrotiterplatten.

Für die Messungen der Transglutaminaseaktivität in Mikrotiterplatten wurde mit Glutaminsäure- γ -monohydroxamat bei einer Wellenlänge von 492 nm und einem Volumen von 200 μ l ein molarer Extinktionskoeffizient von 50,15 ml/mmol ermittelt.

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E \cdot V}{\epsilon_{492}^{200\mu l} \cdot v \cdot t}$$

mit	ΔE	Extinktionsdifferenz zwischen Proben- und Kontrollwert bzw. Referenzwert
	V	Gesamtvolumen (250 μ l)
	ϵ	Extinktionskoeffizient Eisen(III)-Glutamylhydroxamat (0,05015 ml/ μ mol)
	v	Probenvolumen (50 μ l)
	t	Reaktionszeit (10 min)

Analog zu 3.10.1 errechnet sich durch Einsetzen der aufgeführten Größen und aus der gemessenen Extinktionsdifferenz mit dem Mikrotiter-Messgerät die Volumenaktivität:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]_{492\text{nm}} = \Delta E \cdot 9,97 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

3.10.3 Bestimmung der TGase-Aktivität auf bewachsenen Agar-Platten

Eine auf Agarfestmedium angezogene *Streptomyces mobaraensis* Kultur wurde mit 1,0 ml Reagenz 1 (siehe 3.10) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Entnahme des Überstandes wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,0 ml Reagenz 2 (siehe 3.10) abgestoppt. 250 μ l der überstehenden Lösung wurden am MTP-Reader bei 492 nm gemessen. Die Berechnung erfolgt wie unter 3.10.2 beschrieben. Bei der Messung der Transglutaminaseaktivität diente eine unbewachsene GYM-Platte als Probenblindwert.

3.11 Methoden zur Bestimmung von Proteaseaktivität

3.11.1. Proteinverdauungstest für Metalloproteasen auf SDS-Gelen

In Anlehnung an Raser *et al.* [1995] kann die hydrolytische Aktivität von Proteinen gegen Casein oder Gelatine direkt nach elektrophoretischer Trennung mit SDS-Gelen nachgewiesen werden. Dieser Test findet bei Metalloproteasen Anwendung (Nachweisgrenze 2-10 ng), die im Gegensatz zu anderen Proteasen die denaturierenden Bedingungen oft überstehen. SDS-

sensitive Proteasen müssen zuvor unter nicht-denaturierenden Bedingungen getrennt werden. Für den Nachweis der Metalloproteasen wurden die Gele entsprechend 3.4.1 hergestellt mit der Ausnahme, dass in das Trenngel zusätzlich 0,2 % (w/v) α_S -Casein einpolymerisiert wurde. 15 μ l der Protease-enthaltenden Proben wurden mit 5 μ l Auftragspuffer aus 10 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau und 200 mM Tris-HCl, pH 6,8 gemischt und ohne Erhitzen in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Nach der Elektrophorese mit Elektrodenpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base und 0,1 % (w/v) SDS) wurde das Gel in Renaturierungspuffer P1 aus 2,5 % (v/v) Triton X-100 und 100 mM Glycin, pH 8,3, ca. 3 h bei 2-3fachem Pufferwechsel bei Zimmertemperatur gewaschen. Nach Inkubation in Proteolysepuffer P2 aus 2 mM CaCl_2 , 100 mM Glycin pH 8,3 (ggf. 1 mM ZnCl_2) bei 28 °C für 8-20 h (zwei bis drei Pufferwechsel) wurde das Gel mit Wasser bei zweifachem Wechsel 15 min gewaschen und anschließend Coomassie gefärbt. Eine im Gel befindliche stabile Protease hydrolysiert das eingebettete Casein. Coomassie-Färbung ermöglicht die Identifizierung der Protease durch Unterscheidung eines proteinfreien, farblosen Flecks von der blau gefärbten Gel-Umgebung.

3.11.2 Transglutaminase-Aktivierungstest

20 μ l ProTGase (0,37 mg/ml) wurden in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit 40 μ l Dispase (0,1-100 μ g/ml) und 2 mM CaCl_2 in 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 oder 20 μ l Probe und 30 μ l Puffer gemischt und 30 min bei 28 °C inkubiert. In den Kontrollansätzen wurde anstelle von Dispase oder Probe Puffer verwendet. Zusätzlich wurden nach Ablauf der Reaktionszeit 10 μ l bzw. 20 μ l des Gemischs entnommen und via SDS-PAGE charakterisiert. Zu den verbliebenen 50 μ l wurden 100 μ l Reagenz 1 (siehe 3.10) pipettiert, vermischt und weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Transglutaminase-Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 μ l Reagenz 2 (3.10) beendet, und die Absorption des entstandenen roten Eisen(III)-hydroxamat-Komplexes wurde mit dem Genios Multifunktions-Lesegerät bei 492 nm ermittelt. Die Transglutaminase-Aktivität wurde, wie unter 3.10.2 beschrieben, berechnet.

Mit einer spez. Transglutaminase-Aktivität von 36 U/mg lässt sich die TAMEP-Aktivität wie folgt berechnen:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{x \text{ U/ml} \cdot 10^{-3}}{42500 \text{ g/mol} \cdot 36 \text{ U/mg} \cdot 30 \text{ min}} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

mit: x U/ml gemessene TGase-Aktivität im TGase-Aktivierungstest
 42500 g/mol ermittelte Molmasse der ProTGase
 36 U/mg spezifische Aktivität der TGase
 30 min Inkubationszeit

Einsetzen der aufgeführten Größen ergibt aus der gemessenen TGase-Aktivität in Mikrotiterplatten direkt die Volumenaktivität:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{x \text{ U/ml}}{45,9 \cdot 10^9 \text{ min}} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

3.11.3 Bestimmung von Proteaseaktivität mit p-Nitroanilid-Derivaten

Durch die enzymatische Hydrolyse der Amidbindung von farblosen Peptidyl-4-nitroaniliden wird gelbes para-Nitroanilin abgespalten. Die Freisetzung des Farbstoffs kann durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 405 nm photometrisch verfolgt werden. Für die Messungen in 96-Well-Mikrotiterplatten wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von 4.642,9 ml/mmol mit *para*-Nitroanilin für ein Gesamtvolumen von 200 µl pro Kavität ermittelt.

Zur Bestimmung der Volumenaktivität wurden 100 µl Substratlösung (0,4 mM) mit bis zu 20 % (v/v) DMSO, EtOH oder MeOH vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Proteaselösung gestartet, und bei 28 °C wurde der Anstieg der Absorption für 20 min gemessen. Die Volumenaktivität errechnete sich wie folgt:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{V}{\epsilon_{405}^{200 \mu\text{l}} \cdot v} * \frac{\Delta E}{\Delta t} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} * \text{ml} * 10^{-3}} = \frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]$$

mit	$\Delta E/\Delta t$	lineare Extinktionszunahme pro Zeiteinheit in [min]
	V	Gesamtvolumen (200 μ l)
	v	Probenvolumen (100 μ l)
	ϵ	Extinktionskoeffizient von p-Nitroanilin (4.642,9 ml/mmol)

Eine Enzymeinheit [U] entspricht der Proteasenmenge, die unter den gewählten Reaktionsbedingungen die Bildung von 1 nmol p-Nitroanilin pro min katalysiert.

Einsetzen der aufgeführten Größen ergibt aus der gemessenen linearen Extinktionszunahme pro Zeiteinheit direkt die Volumenaktivität:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]_{405\text{nm}} = \Delta E/\Delta t \cdot 430,76 \left[\frac{\text{nmol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} \right]$$

3.11.4 Bestimmung von Proteaseaktivität mit Furylacryloylpeptidyl-Derivaten

Eine einfache photometrische Bestimmung von Proteasen mit P1'-Spezifität ist mit Furylacryloylpeptiden möglich. Diese Verbindungen haben ihr Absorptionsmaximum bei 337 nm, durch die Hydrolyse wird die Intensität der Absorption vermindert. Die Abnahme der Extinktion wird üblicherweise bei 340 nm gemessen. Für die Bestimmung der Proteasenaktivität in Mikrotiterplatten wurden zuvor die Extinktionskoeffizienten für ein Gesamtvolumen von 200 μ l pro Kavität von 608 ml/mmol (FAAFA), 527 ml/mmol (FAGFA) und 389 ml/mmol (FAGLA) ermittelt.

Die Volumenaktivität für die Hydrolyse der FA-Substrate errechnet sich aus dem linearen Bereich der Absorptionsabnahme pro Zeiteinheit wie folgt:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{V}{\epsilon_{340}^{200\mu\text{l}} \cdot v} * - \frac{\Delta E}{\Delta t} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{ml} * 10^{-3}} = \frac{U}{\text{ml}} \right]$$

mit	$\Delta E/\Delta t$	Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit im linearen Bereich
	V	Gesamtvolumen (200 μ l)
	v	Probenvolumen (1-10 μ l)
	$\Delta \epsilon_{340}$	FAAFA: - 608 ml/mmol; FAGFA: - 527 ml/mmol, FAGLA: - 389 ml/mmol bei einer Substratkonzentration von 0,5 mM

Eine Enzymeinheit [U] entspricht der Proteasekonzentration, die unter den gewählten Reaktionsbedingungen die Hydrolyse von 1 μmol Furylacryloyl-Peptid pro min katalysiert.

Methode a: 30 μl Protease-Probe wurden zu 160 μl 2 mM CaCl_2 in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl eines FA-Substrats (10 mM) in DMSO gestartet. Die Messung der Abnahme der Absorption bei 340 nm fand für eine Dauer von 20 min bei Zimmertemperatur statt.

Methode b: Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass die Messung nur im linearen Bereich bei 340 nm erfolgte. Hierzu wurden 170-180 μl Tris-MES-Puffer in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten auf 37 °C temperiert, mit 1-10 μl Enzymlösung gemischt und die Reaktion mit 10 μl eines Furylacryloyl-Substrats (10 mM in DMSO) gestartet. Die Absorptionsabnahme bei 340 nm wurde für 20 min bei 37 °C mit dem Genios-MTP-Lesegerät gemessen.

3.11.5 Spezifischer Nachweis von Proteaseaktivitäten in IEF-Gelen

Durch Auflegen eines Agarosegels mit Proteasesubstraten (meist Casein) auf ein IEF-Gel kann eine gesuchte Protease und ihr isoelektrischer Punkt ermittelt werden. Zur spezifischen Identifizierung von TAMEP und der Peptidyl-Aminopeptidase wurde eine Caseinkonzentration von 0,2 mg/ml bzw. eine Ala-Pro-pNA-Konzentration von 0,3 mg/ml in der Agarosematrix gewählt.

Die Substrat-Gele wurden nach dem Abkühlen luftblasenfrei auf die IEF-Gele gelegt und 2 h (Peptidyl-Aminopeptidase) bzw. 10 h (Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease) bei 28 °C inkubiert. Aminopeptidase-Aktivität wurde durch die Freisetzung von gelbem para-Nitroanilin, Endoproteasenaktivität nach Coomassie-Färbung (3.5.1) durch farblose Flecken im blauen Agarosegel nachgewiesen.

3.12 Reinigung der Enzyme von *Streptomyces mobaraensis*

Zur Gewinnung von Proteinen aus dem Kulturmedium wurde *Streptomyces mobaraensis* im Komplexmedium kultiviert. Außerdem wurden Proteine aus der Extraktion von mit *Streptomyces* bewachsenen GYM-Platten erhalten.

Die zentrifugierten und filtrierten Kulturmedien bzw. Kulturextrakte wurden über AS- oder EtOH-Fällung konzentriert, ggf. entsalzt und umgepuffert. Die anschließende Chromatographie der Proteine erfolgte nur im Falle der Isolierung einer Arg-C-Protease aus dem Kulturmedium mit einer Pharmacia-Standardchromatographie-Anlage. Ansonsten wurde mit der beschriebenen Merck-Hitachi-FPLC-Anlage gearbeitet, wobei unterschiedliche Chromatographie-Materialien eingesetzt wurden. Puffer wurden in destilliertem Wasser angesetzt und vor der Chromatographie im Ultraschallbad entgast. Jede Säule wurde dabei mit dem 2-3fachen Säulenvolumen an Äquilibriumspuffer auf den notwendigen pH eingestellt. Die Elution der Proteine während des Chromatographie-Verlaufes wurde durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 280 nm verfolgt. Chromatographien erfolgten bei Raumtemperatur, während die Fraktionen bei 4 °C gesammelt wurden. Nach Abschluss des Verfahrens wurden die Säulen zunächst mit 0,2 M NaOH, dann mit Puffer A und B gespült und mit 20 % (v/v) Ethanol oder 0,02 % (w/v) Natriumazid bei Raumtemperatur gelagert.

3.12.1 Isolierung von ProTGase und TGase

In Anlehnung an Pasternack *et al.* [1998] wurde ein modifiziertes ProTGase-Reinigungsschema etabliert, welches die Gewinnung von ProTGase ohne TGase und P14 ermöglichte.

Zur Isolierung der Proteine wurde *S. mobaraensis* für etwa 48 h bei 28 °C im Komplexmedium kultiviert. Das Kulturmedium wurde durch Zentrifugieren und Filtrieren von unlöslichen Stoffen und Zellen befreit und anschließend durch EtOH-Fällung eingeeengt. Der aus der Lösungsmittel-Fällung erhaltene Niederschlag wurde in Puffer A aufgenommen, so dass eine 3-4fache Konzentrierung der Proteinlösung im Vergleich zum ursprünglichen Kulturmedium erreicht wurde. Chromatographiebedingungen und -verlauf sind in Tab. 3-9 und 3-10 wiedergegeben.

Tab. 3-9: Gewählte IAC-Chromatographiebedingungen für die Teilreinigung von ProTGase und TGase aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Stationäre Phase	Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 (S) Durchmesser: 2,6 cm Betthöhe: 13 cm Bettvolumen: 69 cm ³
Mobile Phasen	50 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0 (Puffer A) 1 M NaCl in Puffer A (Puffer B)
Flussrate	6,5 ml/min
Fraktionen	6,5 ml

Tab. 3-10: Zeitlicher Verlauf einer IAC-Chromatographie für die Teilreinigung von ProTGase und TGase aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	70-80 ml
Durchlauf nichtbindender Proteine	100	-	ca. 250 ml
Plateau (0,1 M NaCl)	90	10	ca. 325 ml
Linearer Gradient [0,33 % B/min]	90-50	10-50	ca. 750 ml

Nach dem ersten Chromatographieschritt wurde bereits aktivierte TGase in den vereinigten ProTGase-fraktionen durch Hitzedenaturierung ausgefällt. Hierfür wurde die Mischung für 30 min bei 60 °C inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C gekühlt. Ausgefällene TGase wurde durch Zentrifugieren (10000 g, 15 min, 4 °C) abgetrennt. Noch vorhandenes P14 wurde durch eine nachfolgender Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Sephrose, Durchmesser 1,0 cm, Betthöhe 10,2 cm, Bettvolumen: 8,0 cm³) abgetrennt. Die Säule wurde mit 50 mM Tris-HCl pH 9,0 aquilibriert und mit dem Überstand des hitzedenaturierten Probe, die mit dem gleichen Puffer umgepuffert wurde, mit einer Flussrate von 1 ml/min beladen. P14 eluierte im Vorlauf, während ProTGase durch Erniedrigen des pH-Wertes mit 50 mM Tris-HCl pH 7,0 bei einem pH-Wert um 8,0 von der Säule gespült wurde. Die ProTGase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und bei -20 °C gelagert.

Reife TGase, die für Referenzmessungen benötigt wurde, eluierte bei der Ionenaustausch-Chromatographie an Fractogel SO_3^- bei pH 5,0 in einem separaten Peak und konnte durch eine zweite IAC an Fractogel SO_3^- nach der Methode von Gerber *et al.* [1994] bis zu Homogenität gereinigt werden.

3.12.2 Teilreinigung einer Arg-C Endoprotease

S. mobaraensis wurde etwa 70 h in Komplexmedium kultiviert, das Kulturmedium wurde durch Zentrifugieren (10000 x g, 15 min, 4 °C) und Filtrieren über einen Faltenfilter von unlöslichen Bestandteilen und Mikroorganismen befreit. Gut lösliche Proteine wurden durch eine 40 %ige Ammoniumsulfat-Fällung abgetrennt. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert und filtriert (0,45 μm) und ohne weitere Vorbehandlung für eine nachfolgende Hydrophobe Interaktions-Chromatographie verwendet. Chromatographiebedingungen und -verlauf sind in den Tab. 3-11 und 3-12 wiedergegeben.

Tab. 3-11: Gewählte HIC-Chromatographie-Bedingungen für die Abtrennung einer Arg-C-Protease aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Stationäre Phase	Phenyl Sepharose 6 FF (low sub) Durchmesser: 0,7 cm Betthöhe: 2,5 cm Bettvolumen: 1,0 cm ³
Mobile Phasen	50 mMTris-HCl pH 7,0 + 1,73 M Ammoniumsulfat (Puffer A) 50 mMTris-HCl pH 7,0 (Puffer B)
Flussrate	1 ml/min
Fraktionen	1 ml

Tab. 3-12: Zeitlicher Verlauf der HIC-Chromatographie (Phenylsepharose) für eine Arg-C-Protease aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	4 ml
Durchlauf nichtbindender Proteine	100	-	30-40 ml
Stufengradient			
Stufe 1 (0,87 M)	50	50	10-15 ml
Stufe 2 (0,43 M)	25	75	ca. 5 ml
Stufe 3 (0,22 M)	12,5	87,5	ca. 5 ml
Stufe 4 (0,00 M)	-	100	ca. 5 ml

Die Ammoniumsulfat-Konzentrationsstufen wurden so lange aufrechterhalten bis die Absorption annähernd die Basislinie bei 280 nm erreichte. Die Fraktionen wurden auf TGase- (Hydroxamat-Test) und Proteaseaktivität (Verwendung von CBZ-Pro-Phe-Arg-pNA und Ala-Pro-pNA) untersucht sowie durch SDS-PAGE charakterisiert. Arg-C Endoprotease-enthaltende Fraktionen wurden entsalzt, vereinigt und bei -20 °C eingefroren.

3.12.3 Reinigung von TAMEP

Zur Gewinnung der Transglutaminase aktivierenden Metalloprotease wurde *Streptomyces mobaraensis* zwischen 24 h und 2 Monaten auf GYM-Agarplatten kultiviert. Ein Extrakt der löslichen Proteine wurde mit 15-20 ml 2 mM CaCl₂ in Tris-HCl-Puffer pH 7,5 hergestellt, filtriert und durch Fällung mit Ammoniumsulfat bis 80 % (w/v) eingengt. Der Niederschlag wurde in Puffer A gelöst, so dass eine 8 bis 14fache Konzentrierung resultierte, durch Filtration (0,45 µm) von Schwebstoffen befreit, über Gelpermeations-Chromatographie (HiPrep 26/10-Säulen) entsalzt, mit verdünnter Natronlauge auf pH 8,5 eingestellt und anschließend durch Filtration (0,45 µm Filter) von unlöslichen Bestandteilen befreit. Die Proteine der so behandelten Lösung wurden anschließend, wie in den Tab. 3-13 und 3-14 dargestellt, durch Anionenaustauschchromatographie getrennt.

Tab. 3-13: Gewählte IAC-Chromatographie-Bedingungen für die Abtrennung der TAMEP aus Extrakten der Festmedienkulturen von *S. mobaraensis*.

Stationäre Phase	DEAE-Sepharose Durchmesser: 1,0 cm Betthöhe: 10,2 cm Bettvolumen: 8,0 cm ³	
Mobile Phasen	50 mM Tris-HCl pH 8,5 + 2 mM CaCl ₂ 50 mM Tris-HCl pH 8,0 + 2 mM CaCl ₂ 1 M NaCl in Puffer B	(Puffer A) (Puffer B) (Puffer C)
Flussrate	1 ml/min	
Fraktionen	1 ml	

Tab. 3-14: Zeitlicher Verlauf der IAC-Chromatographie (DEAE-Sepharose) für die Teilreinigung der TAMEP.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Puffer C [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	-	10-25 ml
Durchlauf nicht bindender Proteine, pH 8,5	100	-	-	20-50 ml
Durchlauf nicht bindender Proteine, pH 8,0	-	100	-	10-20 ml
Stufengradient				
Stufe 1 (20 mM)	-	98	2	10-20 ml
Stufe 2 (40 mM)	-	96	4	20-40 ml
Stufe 3 (60 mM)	-	94	6	20-30 ml
Stufe 4 (150 oder 200 mM)	-	85-80	15-20	30-40 ml

Die Reinheit der TAMEP-enthaltenden Fraktionen wurde mit Exo- und Endoprotease-Substraten sowie über SDS-PAGE überprüft. Fraktionen mit vergleichbar hohen Aktivitäten gegenüber Furylacryloylderivaten bzw. Pro-Transglutaminase wurden vereinigt und bei -20 °C ohne Konzentrieren eingefroren.

TAMEP-Präparate, die Spuren einer Arg-C-Endoprotease enthielten, wurden durch Arg-Sepharose-Chromatographie weiter gereinigt. Dazu wurde mit den Proben wie in den Tab. 3-15 und 3-16 gezeigt, weiter verfahren.

Tab. 3-15: Gewählte Chromatographie-Bedingungen (Arg-Sepharose 4B) für die Abtrennung der TAMEP von einer Arg-C-Protease.

Stationäre Phase	Arg-Sepharose 4B Durchmesser: 1,0 cm Betthöhe: 7,6 cm Bettvolumen: 6,0 cm ³	
Mobile Phasen	50 mM Tris-HCl pH 8,0 + 2 mM CaCl ₂ (Puffer A) 1 M NaCl in Puffer A (Puffer B)	
Flussrate	1 ml/min	
Fraktionen	1 ml	

Tab. 3-16: Zeitlicher Verlauf der Chromatographie (Arg-Sepharose 4B) für die Reinigung der TAMEP.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	8-11 ml
Peak I nicht bindender Proteine	100	-	10-20 ml
Peak II nicht bindender Proteine	100	-	25-30 ml
Stufengradient bis 100 % B	100-0	0-100	80-100 ml

TAMEP bindet nicht an das Säulenmaterial und eluierte mit der Arg-C-Protease und weiteren Proteinen im Durchlauf. Die Fraktionen des zweiten Peaks enthielten TAMEP. Sie wurden vereinigt, lyophilisiert und anschließend gegen 2 mM CaCl₂ in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, dialysiert. Das 15fach konzentrierte Präparat wurde auf Arg-C-Endoprotease und Transglutaminase-aktivierende Protease kontrolliert und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.12.3 Reinigung einer Peptidyl-Aminopeptidase

Ausgangsmaterial zur chromatographischen Reinigung der Peptidyl-Aminopeptidase waren nach einer Kultivierung im Komplexmedium erhaltene, zellfreie, durch Ethanol-Fällung eingengte 50-70 h alte Kulturmedien.

Der 3-5fach konzentrierte, in Puffer A gelöste Niederschlag der Ethanol-Fällung wurde zum Abtrennen größerer Partikel zentrifugiert (10000 x g, 4 °C, 10 min) und sterilfiltriert (0,45 µm Filter). Die Peptidyl-Aminopeptidase wurde durch Kationenaustausch-Chromatographie teilgereinigt. Chromatographiebedingungen und -verlauf sind in den Tab. 3-17 und 3-18 zusammengefasst.

Tab. 3-17: Gewählte IAC-Chromatographie-Bedingungen für die Abtrennung einer Peptidyl-Aminopeptidase aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Stationäre Phase	Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 (S) Durchmesser: 2,6 cm Betthöhe: 13 cm Bettvolumen: 69 cm ³	
Mobile Phasen	50 mM Tris-HCl pH 7,0 1 M NaCl in Puffer A	(Puffer A) (Puffer B)
Flussrate	6,5 ml/min	
Fraktionen	6,5 ml	

Tab. 3-18: Zeitlicher Verlauf der IAC-Chromatographie für eine Peptidyl-Aminopeptidase aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	40-80 ml
Durchlauf nicht bindender Proteine	100	-	ca. 300 ml
Plateau	90	10	ca. 130 ml
Linearer Gradient [1 % B/min]	90-10	10-90	ca. 650 ml

Alle proteinhaltenden Fraktionen wurden auf Aktivität und Proteingehalt überprüft und durch SDS-PAGE, Western-Blot und charakterisiert. Die Peptidyl-Aminopeptidase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und bei -20 °C gelagert.

In der Regel wurden die Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität in einer Mischung A, die übrigen in einer Mischung B vereinigt. Zur Abtrennung hochmolekularer Proteine wurde zusätzlich eine Phenylsepharose-Chromatographie durchgeführt.

Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC):

Die Präparate A oder B wurden mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 1,73 M versetzt. Durch Filtration (0,45 µm) wurde die Lösung von ausgefallenen Proteinen und Schwebstoffen befreit und anschließend auf die Säule gegeben. Der Chromatographie-Verlauf und die verwendeten Parameter sind in den Tab. 3-19 und 3-20 aufgeführt.

Tab. 3-19: Gewählte HIC-Chromatographie-Bedingungen für die Reinigung einer Peptidyl-Aminopeptidase.

Stationäre Phase	Phenyl-Sepharose High Performance	
	Durchmesser: 1,0 cm	
	Betthöhe: 9,5 cm	
	Bettvolumen: 7,5 cm ³	
Mobile Phasen	1,73 M Ammoniumsulfat in	(Puffer A)
	50 mM Tris-HCl pH 7,0	
	50 mM Tris-HCl pH 7,0	(Puffer B)
Flussrate	1,0 ml/min	
Fraktion	1,0 ml	

Tab. 3-20: Zeitlicher Verlauf der HIC-Chromatographie (Phenylsepharose) für eine Peptidyl-Aminopeptidase.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	15-35 ml
Durchlauf nichtbindender Proteine	100	-	ca. 45 ml
Plateau	50	50	ca. 20 ml
Linearer Gradient [1 % B / min]	50-0	50-100	20-50 ml

Die Peptidyl-Aminopeptidase-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Konzentrierung und Umpufferung erfolgten durch Ultrafiltration, die Lagerung bei -20 °C.

3.12.5 Reinigung einer Leu/Phe-Protease

S. mobaraensis wurde im Komplexmedium zwischen 60 und 110 h bei 28 °C kultiviert. Das durch Zentrifugation und Filtration zellfreie, durch Ethanol-Fällung konzentrierte Kulturmedium war Ausgangsmaterial für den ersten von drei chromatographischen Reinigungsschritten.

Das 4-5fach eingeeengte Kulturmedium, gelöst in Puffer A, wurde vor dem Aufgeben auf die IAC-Säule durch Zentrifugieren und Filtration von Schwebstoffen befreit. Der erste Chromatographie-Schritt zur Reinigung der Peptidase war eine Anionenaustausch-Chromatographie. Diese wurde entsprechend den nachstehenden Tab. 3-21 und 3-22 durchgeführt.

Tab. 3-21: Gewählte IAC-Chromatographie-Bedingungen für die Abtrennung einer Leu/Phe-Protease aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Stationäre Phase	DEAE-Sepharose Durchmesser: 2,6 cm Betthöhe: 10,2 cm Bettvolumen: 54 cm ³	
Mobile Phasen	10 mM Tris-HCl pH 9,0 1 M NaCl in Puffer A	(Puffer A) (Puffer B)
Flussrate	2 ml/min	
Fraktionen	2 ml	

Tab. 3-22: Zeitlicher Verlauf der IAC-Chromatographie Leu/Phe-Protease aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	15-25 ml
Durchlauf nicht bindender Proteine Fraktionen ca. 6-15	100	-	ca. 20 ml
Durchlauf nicht bindender Proteine Fraktionen ca. F16-F21	100	-	ca. 12 ml
Elution der bindenden Proteine	-	100	ca. 60 ml

Die Fraktionen wurden auf proteolytische Aktivitäten gegenüber H-Phe-pNA und H-Leu-pNA untersucht und durch SDS-PAGE weiter charakterisiert. Aktive Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität gegenüber den chromophoren Aminosäuren wurden in einer Mischung A, der Rest in einer Mischung B vereinigt. Die weitere Reinigung der Aminopeptidase wurde mittels Kationenaustausch-Chromatographie durchgeführt (Tab. 3-23 und 3-24). Präparat A wurde hierzu ohne pH-Änderung auf die Säule gegeben.

Tab. 3-23: Gewählte Chromatographie-Bedingungen (Fractogel EMD SO_3^- 650 (S)) für die Reinigung der Leu/Phe-Protease aus Pool A.

Stationäre Phase	Fractogel EMD SO_3^- 650 (S)	
	Durchmesser: 2,6 cm	
	Betthöhe: 13 cm	
	Bettvolumen: 69 cm ³	
Mobile Phasen	50 mM Tris-HCl pH 7,0	(Puffer A)
	1 M NaCl in Puffer A	(Puffer B)
Flussrate	3 ml/min	
Fraktionen	3 ml	

Tab. 3-24: Zeitlicher Verlauf der IAC-Chromatographie für die Reinigung der Leu/Phe-Protease aus Pool A.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	10-20 ml
Durchlauf nicht bindender Proteine	100	-	ca. 80 ml
Stufengradient			
Stufe 1 (0,2 M) - Peak I	80	20	ca. 30 ml
Stufe 1 (0,2 M) - Peak II	80	20	ca. 30 ml
Stufe 2 (1,0 M)	0	100	ca. 45 ml

Die Hauptfraktionen wurden zu Mischung AA und die Nebenfraktionen zu Mischung AB zusammengefasst und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

Zur Abtrennung von P14 wurde mit Präparat AA eine Benzamidin-Chromatographie mit den in den Tab. 3-25 und Tab. 3-26 angegebenen Bedingungen durchgeführt

Tab. 3-25: Gewählte Chromatographie-Bedingungen (Fractogel EMD SO₃⁻ 650 (S)) für die Reinigung der Leu/Phe-Protease aus Pool AA.

Stationäre Phase	Benzamidin FF (high sub) Durchmesser: 0,7 cm Betthöhe: 2,5 cm Bettvolumen: 1,0 cm ³	
Mobile Phasen	50 mM Tris-HCl pH 8,0 + 2 mM CaCl ₂ 1 M NaCl in Puffer A	(Puffer A) (Puffer B)
Flussrate	1 ml/min	
Fraktionen	1 ml	

Tab. 3-26: Zeitlicher Verlauf der IAC-Chromatographie für die Reinigung der Leu/Phe-Protease aus Pool AA.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	5-15 ml
Durchlauf nicht bindender Proteine	100	-	ca. 15-20 ml
Plateau (1,0 M)	0	100	ca. 5 ml

Die Peptidase-enhaltenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen 2 mM CaCl₂ in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 oder destilliertes Wasser dialysiert und bei -20 °C gelagert.

3.12.6 Reinigung von P14

S. mobaraensis wurde zur Reinigung des TAMEP-Inhibitors P14 für etwa 48 h bei 28 °C im Komplexmedium kultiviert. Durch Zentrifugation und Filtration wurde das Kulturmedium von unlöslichen Stoffen und Zellen befreit und anschließend durch EtOH-Fällung eingeeengt. Der Niederschlag der Lösungsmittel-Fällung wurde in Puffer A aufgenommen, so dass eine 3-4fache Konzentrierung der Proteinlösung im Vergleich zum ursprünglichen Kulturmedium erreicht wurde. Chromatographiebedingungen und -verlauf sind in Tab. 3-27 und 3-28 wiedergegeben.

Tab. 3-27: Gewählte IAC-Chromatographiebedingungen für die Teilreinigung von P14 aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Stationäre Phase	Fractogel EMD SO ₃ ⁻ 650 (S) Durchmesser: 2,6 cm Betthöhe: 13 cm Bettvolumen: 69 cm ³
Mobile Phasen	50 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0 (Puffer A) 1 M NaCl in Puffer A (Puffer B)
Flussrate	6,5 ml/min
Fraktionen	6,5 ml

Tab. 3-28: Zeitlicher Verlauf der IAC-Chromatographie für die Teilreinigung von P14 aus dem Kulturmedium von *S. mobaraensis*.

Funktion	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Volumen [ml]
Auftrag der Proteinlösung	-	-	70-80 ml
Durchlauf nicht bindender Proteine	100	-	ca. 250 ml
Plateau (0,1 M NaCl)	90	10	ca. 325 ml
Linearer Gradient [0,33 % B/min]	90-50	10-50	ca. 750 ml

Die Fraktionen der IAC-Chromatographie wurden durch SDS-PAGE charakterisiert, P14-enthaltende Fraktionen wurden vereinigt.

Das P14-Präparat wies nach der IAC-Chromatographie oftmals noch Spuren anderer Proteine auf. Diese Verunreinigungen wurden durch eine zweite Kationenaustausch-Chromatographie (Fractogel EMD SO₃⁻ 650 (S), Durchmesser 2,6 cm, Betthöhe 13 cm, Bettvolumen 69 cm²) entfernt. Dazu wurde die Probe über Ultrafiltration (siehe 3.7.3) mit 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0 umgepuffert und mit einer Fließgeschwindigkeit von 6,5 ml/min auf die Säule gepumpt. Die Chromatographie erfolgte mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten von 0-1 M, P14 eluierte bei einer Salz-Konzentration von 0,1 M. Fraktionen mit P14 wurden vereinigt und bei -20 °C eingefroren.

3.13 Sequenzanalyse der gereinigten Proteine

3.13.1 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Neben der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie können zu sequenzierende Proteine oder Proteinfragmente, deren Länge mindestens 60 Aminosäuren beträgt, durch Borat-Gelelektrophorese getrennt werden. Sind die Proteinmengen größer als 10 pmol, kann die Trennung des zu sequenzierenden Proteins auch über Tris-Glycin-Gele erfolgen.

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran und anschließendem Anfärben mit Coomassie (3.5.1.2) werden die Proteine ausgeschnitten und direkt zum Sequenzieren eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde das durch Borat- oder Tris-Glycin-Gelelektrophorese separierte Protein mit einer Semi-Dry-Blot-Apparatur auf eine PVDF-Membran transferiert. Um die nachfolgende Sequenzierungsreaktion nicht zu beeinträchtigen, wurde hierzu ein Puffersystem ohne Glycin nach Khyse-Anderson [1984] verwendet:

Anodenlösung 1:	0,3 M 20 % (v/v)	Tris-Base Methanol, sequencing grade pH 10,4
Anodenlösung 2:	25 mM 20 % (v/v)	Tris-Base Methanol, sequencing grade pH 10,4
Kathodenlösung:	25 mM 40 mM 0,1 % (w/v) 20 % (v/v)	Tris-Base ϵ -Aminocaprinsäure SDS Methanol, sequencing grade pH 9,4

Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel vom Sammelgel separiert und in Anodenlösung 2 äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte wie nachfolgend aufgeführt, wobei die PVDF-Membran zuvor 30 s in Methanol geschwenkt und anschließend ebenfalls in Anodenlösung 2 äquilibriert wurde.

Insgesamt sechs auf die Größe des Trenngels zugeschnittene Blotpapiere sowie die Membran wurden in den entsprechenden Lösungen getränkt.

Der Aufbau des Blots erfolgte von unten nach oben, beginnend auf der Anode der Semi-Dry Transferapparatur (Abb. 3-5):

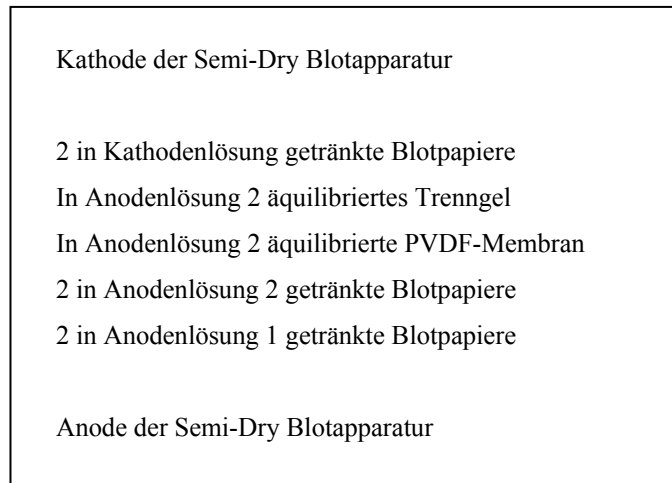


Abb. 3-5: Aufbau des Semi-Dry-Blots nach Khyse-Andersen [1984] für den Spannungsinduzierten Proteintransfer auf eine PVDF-Membran.

Der Transfer von Proteinen oder Proteinfragmenten erfolgte bei einer konstanten Spannung von 20 V für die Dauer von bis zu 90 min. Im Anschluss daran wurden die Proteine mit Coomassie angefärbt (3.5.1.2). Nach dem Trocknen der Membran auf einem Blotpapier wurden distinkte Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Lagerung der immobilisierten Proteine erfolgte bis zur Sequenzierung bei -20 °C.

3.13.2 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen der gereinigten Proteine

Die Sequenzierungen der auf PVDF-Membranen transferierten Proteine wurden von Esplora GmbH (Darmstadt) mittels automatisiertem Edman-Abbau durchgeführt. Beginnend mit der jeweilig N-terminalen Aminosäure wird die Peptidkette mit Phenylisothiocyanat sequentiell degradiert. Nachfolgend wird die freigesetzte Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäure durch Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie anhand ihrer Retentionszeit identifiziert.

3.14 Bestimmung von Proteaseschnittstellen durch Sequenzanalysen

3.14.1 ProTGase als Substrat für Trypsin, Chymotrypsin und TAMEP

500 µl Agarose-immobilisiertes Trypsin und Chymotrypsin wurden dreimal mit jeweils 500 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,0 gewaschen. 500 µl ProTGase (0,4 mg/ml) wurden mit 5 U Trypsin-, 20 U Chymotrypsin-Immobilisat oder 400 µl TAMEP (2,2 µg/ml) in 100 mM Tris-HCl Puffer pH 7,0, der 2 mM CaCl₂ enthielt, 45 min bei 30 °C in einem Thermomixer (300 rpm) inkubiert. 200 µl der Mischung wurden jedem Reaktionsansatz entnommen, durch SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, und jeweils die ersten drei Aminosäuren der Protease-aktivierten Transglutaminase wurden über Edman-Abbau bestimmt.

3.14.2 Trypsin-, Chymotrypsin- und TAMEP-aktivierte TGase als Substrat für die Peptidyl-Aminopeptidase und die Leu/Phe-Protease

150 µl von Chymotrypsin-, Trypsin- oder TAMEP-aktivierter TGase wurden mit 30 µl PAP (0,1 mg/ml) bei 30 °C für 45 min im Thermomixer (300 rpm) inkubiert. In einem weiteren Reaktionsansatz wurden 150 µl TAMEP-aktivierte TGase mit 30 µl Leu/Phe-Aminopeptidase (Umsatz von 4,6 nmol Leu-pNA/min*ml) entsprechend behandelt. Die Mischungen wurden durch SDS-PAGE getrennt und nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran jeweils die ersten drei Aminosäuren der isolierten TGase via Edman-Abbau analysiert.

3.15 Inhibierungsversuche

3.15.1 Inhibitoren

Für die Protease-Inhibitionsstudien wurden die Inhibitoren von Tab. 3-29 verwendet.

Tabelle 3-29: Protease-Inhibitoren zur Charakterisierung von Peptidasen

Inhibitor	Stammlösung	Empf. Konz.	Inhibitorklasse
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	20 mM in EtOH oder DMSO	0,1-1 mM	Irreversibler Inhibitor für Serinproteasen
4-(2-Aminoethyl) benzolsulfonylfluorid (AEBSF)	20 mM in VE-H ₂ O	0,1-2 mM	Irreversibler Inhibitor für Serinproteasen
Benzamidin	10 mM in VE-H ₂ O	1-5 mM	Kompetetiver Serinproteaseinhibitor
Aprotinin (Polypeptid aus der Rinderlunge)	etwa 0,02 mM in VE-H ₂ O	1-10 µM	Inhibitor durch die Bildung starker Komplexe mit Serinproteasen.
L-1-Chlor-3-(4-tosylamido)-7-amino-2-heptanon (TLCK)	2 mM in VE-H ₂ O	10-1000 µM	Irreversibler Trypsin-Inhibitor
P14 (Polypeptid, eigene Isolierung aus <i>S. mobaraensis</i> siehe 3.12.6)	etwa 0,1 mM in 50 mM Tris-HCl, pH 7,0	-	Inhibitor der SSI-Familie, bekannt als Serin- und Metalloproteaseinhibitoren;
Leupeptin (Acetyl-Leucyl-Leucyl-Arginal)	1 mM in VE-H ₂ O	10-100 µM	Reversibler, kompetetiver Inhibitor von Serin- und Cysteinproteasen
Chymostatin (Peptidalddehyd-Mischung aus drei Komponenten)	5 mM in 50 % in (v/v) EtOH	10-100 µM	Reversibler, kompetetiver Inhibitor von Serin- und Cysteinproteasen
Trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan (E-64)	0,5 mM in VE-H ₂ O	1-10 µM	Irreversibler Inhibitor von Cysteinproteasen
Iodacetamid	50 mM in VE-H ₂ O	1-10 mM	Irreversibler Inhibitor von Cysteinproteasen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	200 mM in 50 mM Tris-HCl, pH 7,0	1-10 mM	Reversibler Inhibitor von Metalloproteasen
(Ehtylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat) (EGTA)	200 mM in 50 mM Tris-HCl, pH 7,0	1-10 mM	Reversibler Inhibitor von Metalloproteasen
o-Phenanthrolin	200 mM in DMSO	1-10 mM	Reversibler Inhibitor von Metalloproteasen
Phosphoramidon (N-alpha-L-rhamnopyranosyloxy-(hydroxyphosphonyl)-L-leucyl-L-tryptophan)	30 mM in VE-H ₂ O	1-100 µM	Reversibler Inhibitor von Metalloproteasen
Pepstatin A (Isovaleryl-Val-Val-Sta*-Ala-Sta*-OH)	1 mM in 5 % (v/v) DMSO	1-10 µM	Inhibitor von Sauren Proteasen
Bestatin ([[(2S,2R)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl]-L-leucin)	0,5 mM in VE-H ₂ O	1-150 µM	Kompetetiver Aminopeptidasen-Inhibitor

* Sta = 3-hydroxy-6-methylheptanoyl

3.15.2 Inhibierung der Peptidyl-Aminopeptidase

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Inhibitoren in VE-Wasser oder in 50 mM Tris-HCl pH 7,0 gelöst. Vor jeder Kinetikmessung wurden die Inhibitoren zusammen mit der Peptidyl-Aminopeptidase für 20 min bei 28 °C in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorinkubiert, um eine ausreichende Wechselwirkung der Inhibitoren mit der Protease zu gewährleisten. Eine Konzentration von 10 % EtOH (v/v) im Reaktionsansatz führte zur Stabilisierung der Aminopeptidase. Die Inhibitorkonzentration im Reaktionsansatz wurde entsprechend der Tab. 3-29 im Ergebnisteil eingestellt. Je Versuch wurde Exoprotease mit einer Aktivität gegen Ala-Ala-Pro-pNA von 3 µmol/min eingesetzt. Das Gesamtvolumen im Reaktionsansatz betrug 200 µl. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 0,4 mM Ala-Ala-Pro-pNA gestartet. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte wie unter 3.11.3 beschrieben.

3.16.3 Inhibierung der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease

Methode a mit ProTGase als Substrat: 20 µl TAMEP (10-60 µg/ml) wurden mit 20 µl TAMEP-Inhibitor (0,14-40 µg/ml) oder anderen Inhibitoren (s.o.) für 15 min bei 28 °C vorinkubiert. Aus diesem Ansatz wurden 20 µl entnommen, mit 20 µl ProTGase (0,37 mg/ml) und 30 µl 2 mM CaCl₂ in 100 mM Tris-HCl pH 7,0 gemischt und bei 28 °C für 30 min inkubiert. 20 µl des Ansatzes wurden für die SDS-PAGE entnommen. Die Bestimmung der TGase-Aktivität im Rückstand entsprach der unter 3.11.2 beschriebenen Methode.

Methode b mit FAAFA als Substrat: 1-10 µl Enzymlösung (TAMEP, Dispase oder Thermolysin) wurden mit 10 µl Inhibitorlösung (s.o.) und 170-179 µl 50 mM Tris Puffer pH 7,2, der auch 50 mM MES, 2 mM CaCl₂ und 0,01 % Triton X-100 enthielt, gemischt und für 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 10 µl FAAFA (10 mM in DMSO) wurde die Reaktion gestartet (Endvolumen von 200 µl). Die Messung der Absorptionsabnahme bei 340 nm erfolgte für 20 min bei 28 °C oder 37 °C mit dem Genios-MTP-Lesegerät.