

**Freisetzung bioaktiver Peptide aus Milchproteinen durch  
proteolytische Enzyme von Milchsäurebakterien  
Klonierung und Expression zweier zellwandgebundener  
Proteasen**

Dissertation zur Erlangung eines Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts Universität zu Kiel

vorgelegt von  
M. Sc. Bo Li  
aus Shanxi, China  
im Mai 2016

Gutachter

Herr Prof. Dr. rer. nat. Knut J. Heller

Herr Prof. Dr. rer. nat. Peter Schönheit

Referent: Herr Professor Dr. rer. nat. Knut J. Heller

Koreferent: Herr Professor Dr. rer. nat. Peter Schönheit

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2016

Zum Druck genehmigt: 01.07.2016

gez. Herr Professor Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	7
1.1	Bioaktive Peptide .....	7
1.1.1	Grundlagen und Freisetzungen bioaktiver Peptide .....	7
1.1.2	Wirkungen bioaktiver Peptide .....	7
1.2	Milchsäurebakterien (MSB) .....	13
1.3	Das proteolytische System von MSB .....	14
1.3.1	Physiologische Rolle des proteolytischen Systems .....	15
1.3.2	Regulation des proteolytischen Systems .....	16
1.3.3	Proteasen PrtP und PrtB .....	18
2	Zielsetzungen .....	22
3	Materialien und Methoden .....	23
3.1	Materialien .....	23
3.1.1	Stämme .....	23
3.1.2	Plasmide .....	24
3.1.3	Nährmedien und Puffer .....	25
3.2	Mikrobiologische Methoden .....	28
3.2.1	Kultivierung und Stammhaltung .....	28
3.2.2	Zuckerfermentationstest .....	28
3.3	Molekularbiologische Methoden .....	28
3.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Gram-positiven Bakterien .....	28
3.3.2	Isolierung Plasmid-DNA .....	29
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	30
3.3.4	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	31
3.3.5	PCR .....	31
3.3.6	Sequenzierung .....	32
3.3.7	Erstellung des phylogenetischen Stammbaums anhand von 16S rDNA -Sequenzen .....	32
3.3.8	Restriktionsverdau .....	33
3.3.9	Southern Blot .....	33
3.3.10	Aufreinigung von DNA .....	35
3.3.11	Ligation .....	36
3.3.12	Dialyse .....	36
3.3.13	<i>In vitro</i> Amplifikation von zirkulärer DNA .....	36
3.3.14	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Transformation in <i>E. coli</i> 38	
3.3.15	Herstellung elektrokompenter <i>L. lactis</i> Zellen und Elektroporation in <i>L. lactis</i> .....	39
3.3.16	Konstruktion von Plasmiden .....	39
3.4	Biochemische Methoden .....	43
3.4.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	43
3.4.2	Expression rekombinanter Proteine in <i>L. lactis</i> .....	45
3.4.3	His-Tag Aufreinigung .....	47
3.4.4	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	48
3.4.5	Konzentrierung von Proteinen .....	48
3.4.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	48
3.4.7	Western Blot .....	49
3.4.8	Untersuchung der proteolytischen Aktivität .....	51
3.5	Chemisch analytische Methoden .....	53
3.5.1	Charakterisierung des Caseinhydrolysats mittels HPLC .....	53

3.5.2	Trennung und Identifizierung der Peptide mittels HPLC-ESI-MS <sup>n</sup> .....	53
3.5.3	Festphasenextraktion (SPE) zur Aufreinigung des Caseinhydrolysats.....	54
3.5.4	Gefriertrocknung des Caseinhydrolysats .....	55
3.5.5	Untersuchung des Caseinhydrolysats auf Bioaktivität .....	56
4	Ergebnisse .....	60
4.1	Spezies Identifikation (16S rDNA Sequenzierung und physiologische Untersuchungen).....	60
4.2	Prüfung der Anwesenheit eines Proteasegens in den Genomen der Isolate 92059 und 92202 .....	61
4.3	Expression der Protease .....	62
4.3.1	Gezielte Amplifikation der <i>prtB</i> Gene .....	62
4.3.2	Klonierung in Vector pSMART .....	63
4.3.3	Expression der Protease-Derivate in <i>E.coli</i> .....	65
4.3.4	Expression der Protease in <i>L. lactis</i> .....	68
4.3.5	Charakterisierung der gereinigten Protease-Derivate aus Stamm 92059 .....	74
4.4	Chemische Analyse des Caseinhydrolysats .....	76
4.4.1	HPLC-Untersuchung des Caseinhydrolysats.....	76
4.4.2	MS-LC-Untersuchung des Caseinhydrolysats.....	77
4.5	Untersuchung des Caseinhydrolysats auf Bioaktivität .....	78
4.5.1	Anti-inflammatorische Aktivität und Zytotoxische Aktivität .....	78
4.5.2	ACE-inhibitorische Aktivität .....	79
4.5.3	Antimikrobielle Aktivität .....	80
5	Diskussion.....	82
5.1	Expression der Proteasegene .....	82
5.2	Bioaktivität des Caseinhydrolysats .....	86
6	Zusammenfassung .....	92
7	Summary .....	93
8	Literaturverzeichnis .....	94
9	Abbildungsverzeichnis.....	103
10	Tabellenverzeichnis.....	105
11	Anhang.....	106
11.1	Standards für die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen .....	106
11.2	Übersicht der verwendeten PCR-Primer.....	106
11.3	DNA-Sequenzen der Proteinase Gene aus 92202 und 92059.....	107
12	Danksagung .....	111
13	Eidesstattliche Erklärung .....	112

**Abkürzungsverzeichnis**

ACE	Angiotensin-I-konvertierendes Enzym
ACN	Acetonitril
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin resistent
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ccp	„catabolite control protein“
CEP	„cell-envelope proteinase“
CmR	Chloramphenicol-Resistenz
CN	Casein
CPP	Caseinphosphopeptid
CRP	cAMP Regulator Protein
CRE	„catabolite-responsive elements“
DDW	2-fach entionisiertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DIPF	Diisopropylfluorophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpp	Dipeptidtransporter
DtpT	Di- und Tripeptidtransporter
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GMP	Glycomarkopeptid
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC-50	mittlere inhibitorische Konzentration
IPP	Isoleucin-Prolin-Prolin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
kV	Kilo-Volt
LAB	„Lactic acid bacteria“
LAD	„Ligation during amplifikation“
LB	„Lysogeny broth“
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LM	Laufmittel
M	mol/l
MCS	„multiple cloning site“
MIC	„minimal inhibitory concentration“
min	Minute
ml	Milliliter

mod.	modifiziert
MRS	deMan, Rogosa, Sharpe
MS	Massenspektometrie
MSB	Milchsäurebakterien
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England Biolabs
NF $\kappa$ B	„nuclear factor-kappa B“
NICE	„nisin controlled gene expression“
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel(II) -Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
Opp	Oligopeptidtransporter
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“
Pep	Peptidase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	„Reversed-Phase“
RRG	Rollrandgläschen
POD	Peroxidase
Rpm	„revolutions per minute“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Festphasenextraktion
ssp.	Subspezies
S	<i>Streptococcus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamid
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
VPP	Valin-Prolin-Prolin
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

## 1 Einleitung

### 1.1 Bioaktive Peptide

#### 1.1.1 Grundlagen und Freisetzungen bioaktiver Peptide

Milchprodukte spielen eine wichtige Rolle in der Ernährung des Menschen. Sie besitzen neben ihrem Ernährungswert auch potentiell funktionelle Wirkungen. Viele Milchproteine beinhalten in ihrer primären Struktur spezifische Fragmente, die Hormon- oder Medikament-ähnliche Aktivitäten aufweisen und physiologische Wirkungen auf Wirtsorganismen ausüben können. Diese Fragmente werden als bioaktive Peptide bezeichnet (Kitts & Weiler 2003). Durch die zunehmende Forschung in den letzten Jahren wurde die Bedeutung bioaktiver Peptide als gesundheitsfördernde Substanzen untermauert und ihr Vorkommen in verschiedenen Nahrungsproteinen beschrieben. Zurzeit werden Milchprodukte als die wichtigsten Lieferanten für bioaktive Peptide angesehen, auch wenn sowohl andere tierische als auch pflanzliche Proteine potentiell bioaktive Peptide enthalten können. Bioaktive Peptide setzen sich in der Regel aus drei bis 20 Aminosäuren zusammen. Sie sind innerhalb der Primärstruktur des Proteins inaktiv und müssen durch enzymatische Proteolyse freigesetzt und dadurch aktiviert werden. Dies kann *in vivo* durch Verdauungsenzyme im Magen und Darmtrakt erfolgen (Kekkonen 2009; Korhonen 2009). Bei Neugeborenen, wie auch bei Erwachsenen, wurden nach Milchverzehr im Gastrointestinaltrakt bzw. im Blutplasma Peptide gefunden, die im Vergleich zu unverdauten Precursor-Molekülen neue biologische Aktivitäten besitzen (Chatterton *et al.* 2013). *In vitro* können bioaktive Peptide durch Verarbeitungsprozesse, wie Fermentation mit proteolytischen Stämmen und/oder Hydrolyse mit proteolytischen Enzymen freigesetzt werden (Korhonen & Pihlanto 2006). Die durch verschiedene Wege generierten Peptide unterscheiden sich deutlich in ihren Aktivitäten, die von dem Ausgangsprotein und der Substratspezifität des proteolytischen Enzyms abhängig sind (Raikos & Dassios 2014).

#### 1.1.2 Wirkungen bioaktiver Peptide

Nach der Freisetzung bioaktiver Peptide aus Proteinsequenzen sind sie in der Lage ihre potentielle physiologische Aktivität auszuüben. Es wurde belegt, dass bioaktive Peptide *in vivo* spezifische physiologische Funktionen regulieren können. Die Funktionen betreffen die Regulation des Immunsystems, des gastrointestinalen Systems, des Nervensystems und des kardiovaskulären Systems (Kitts & Weiler 2003).

### 1.1.2.1 Immunmodulierende Aktivität

Immunmodulierende Aktivität bezeichnet die Fähigkeit zur Beeinflussung des Immunsystems durch wirksame Stoffe, diese konnten in humanen und in bovinen Milchproteinhydrolysaten detektiert werden (Migliore-Samour & Jolles 1988). Die Peptide konnten verschiedene Immunmodulierende Aktivitäten ausüben, wie Modulation der Proliferation von Lymphozyten, Regulation der Produktion von Zytokin und Stimulation der phagozytischen Aktivität von Makrophagen (Meisel & FitzGerald 2003; Korhonen & Pihlanto 2006; Matar *et al.* 2003). Aus enzymatischer Hydrolyse von humanem Casein wurde ein Peptid, mit der Sequenz Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, isoliert. Es wurde nachgewiesen, dass es *in vivo* die phagozytische Aktivität der murinen peritonealen Makrophagen gegen opsonisierte rote Blutkörperchen stimulieren konnte (Parker *et al.* 1984). Außerdem zeigte das Hexapeptid nach intravenöser Injektion in Mäuse eine Schutzfunktion gegen mikrobielle Infektion durch *Klebsiella pneumoniae* (Migliore-Samour *et al.* 1989). Aus bovinem Milchprotein wurden die Immunmodulierenden Peptide  $\beta$ -Casomorphin-7 und  $\beta$ -Casokinin-10 isoliert. Abhängig von der Konzentration regulieren sie die Proliferation von humanem peripheren Blut Lymphozyten positiv oder negativ (Kayser & Meisel 1996). Für die synthetischen Peptide Tyr-Gly und Tyr-Gly-Gly, die Fragmenten von  $\kappa$ -Casein und  $\alpha$ -Laktalbumin entsprechen, wurde gezeigt, dass sie die Proliferation humaner peripherer Blut Lymphozyten positiv regulieren konnten (Kayser & Meisel 1996). Der Wirkungsmechanismus der Immunmodulierenden Aktivität und in welchem Zusammenhang dieser mit der Struktur des Peptids steht, ist noch unbekannt. Es wurde behauptet, dass der Aminosäure-Rest Arginin am N- oder C-Terminus des Peptids wichtig ist, für die spezifische Erkennung durch den Membran Rezeptor (Paegelow & Werner 1986). Ein gemeinsames strukturelles Merkmal von vielen Immunmodulierenden Peptiden scheint das Vorhandensein eines Arginins am C-Terminus des Peptids zu sein (Nagpal *et al.* 2011). In einige Studien wurde beschrieben, dass die aus Milchprotein freigesetzten Immun-Peptide Wirkung auf die Tumorentwicklung zeigten (Matar *et al.* 2003). Solche Peptide können das Wachstum von Tumorzellen inhibieren und die Aktivität immunkompetenter Zellen und die Neubildung intestinaler Zellen stimulieren (Meisel & FitzGerald 2003).

NF $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die „immunoglobulin kappa light chain“ in B-Zellen reguliert. Er ist von großer Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort,



der Zellproliferation und der Apoptose einer Zelle. Die Aktivierung von NF $\kappa$ B gilt als kritisch für die Proinflammation und kann durch extrazelluläre Signale wie inflammatorische Cytokine, Infektion und Stress erfolgen (Singh *et al.* 1986; Sen & Baltimore 1986; Diamant & Dikstein 2013). Der NF $\kappa$ B liegt im Zytoplasma, durch die Interaktion mit inhibitorischem I $\kappa$ B-Protein, in einem inaktiven Zustand vor und durch die Aktivierung wird dieser Regulator von der I $\kappa$ B-Kinase phosphoryliert. Diese setzt den vorher gebundenen und inaktivierten Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B frei. Der aktivierte NF $\kappa$ B bindet an die regulatorische DNA-Sequenzen und kann somit die Transkription der entsprechenden Gene, die an der Inflammation beteiligt sind, regulieren (Diamant & Dikstein 2013). Ein NF $\kappa$ B inhibierendes Peptid  $\beta$ -Casein f(184–202) aus  $\beta$ -Caseinhydrolyse wurde zum ersten Mal *in vitro* in humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) identifiziert. Es wurde gezeigt, dass das Peptid eine anti-inflammatorische Aktivität anhand der Reduktion der durch Tunornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzierte NF $\kappa$ B Aktivierung aufweist (Malinowski *et al.* 2014). Außerdem zeigten Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-hemmende Peptide neben einer Blutdruck senkenden Wirkung noch eine anti-inflammatorische Aktivität (Chatterton *et al.* 2013). Diese beruhte auf der Hemmung des ACEs, wodurch die Umsetzung von Angiotensin I in Angiotensin II inhibiert wurde (Meisel 2005). Angiotensin II ist ein Pro-Inflammationsmediator (Ruiz-Ortega *et al.* 2001), somit wird durch Inhibition der ACE der Inflammationsprozess moduliert (Chatterton *et al.* 2013).

#### 1.1.2.2 Mineral-bindende Aktivität

Wie Mellander 1950 bereits erwähnte, sind die Caseinphosphopeptide (CPPs) fähig mit Metall-Ionen (z. B. Calcium-Ionen) Komplexe zu bilden, wodurch sich die Absorption verbessert. Diese Peptide stammen aus Casein und besitzen das gemeinsame Sequenzmotiv -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu. Diese Struktur verleiht dem Peptid die Möglichkeit mit Calcium und anderen Mineralstoffen im pH-Bereich des Intestinums zu binden (Nagpal *et al.* 2011). Die Interaktion der Ser(P)-Gruppe von CPP mit Calcium ermöglicht die Bildung eines löslichen Calcium-Phosphat-Komplexes, das sogenannte kolloidale Calcium, und verhindert so die Präzipitation von unlöslichem Calciumphosphat (Sato *et al.* 1986; Berrocal *et al.* 1989; Gagnaire *et al.* 2001). Die Interaktion von CPPs mit Calcium ist von dem Phosphorylierungsgrad des individuellen CPPs und den Umgebungsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke abhängig. Viele CPPs wurden durch enzymatische Hydrolyse von Milchproteinen

freigesetzt, z. B.  $\alpha_{S1}$ -Casein f(43-58), f(57-79), f(43-79),  $\alpha_{S2}$ -Casein f(1-24) und f(46-70) und  $\beta$ -Casein f(1-28), f(2-28), f(1-25), f(33-48) (Gagnaire *et al.* 2001). Aufgrund hoher negativer Ladungen sind die Peptide gegen weiteren proteolytischen Abbau resistent. Das kolloidale Calcium ist mit einer verbesserten Bioverfügbarkeit verbunden und kann im intestinalen Epithel leicht absorbiert werden (Lee *et al.* 1992). Außerdem wird dem CPP aufgrund der Mineralbindungsfähigkeit eine anti-kariogene Wirkung durch Rekalzifikation von Zahnschmelz zugeschrieben. Das aus  $\kappa$ -Casein resultierendem Glycomarkopeptid (GMP) inhibiert die Adhäsion bzw. das Wachstum von Plaque-bildenden Bakterien (Brody 2000; Malkoski *et al.* 2001). Verschiedene dentale Produkte mit CPPs als Inhaltsstoff wurden bereits auf dem Markt gebracht (Korhonen & Pihlanto 2006).

### 1.1.2.3 Antimikrobielle Aktivität

Antimikrobielle Peptide konnten in vielen Milchproteinhydrolysaten identifiziert werden. Das am meisten untersuchte antimikrobielle Peptid ist das Lactoferricin, das aus dem Molkeprotein Lactoferrin stammt (Korhonen & Pihlanto 2006; Kitts & Weiler 2003). Das freigesetzte Peptid wirkt effektiver antimikrobiell als das ursprüngliche Protein, das Lactoferrin (Nagpal *et al.* 2011). Die antimikrobielle Aktivität des Lactoferrins wurde mit ihrer Eisen-Ionen-bindenden Eigenschaft assoziiert (Arnold *et al.* 1980). Zwei antimikrobielle Peptide Lactoferricin B und Lactoferricin H wurden aus dem N-terminalen Ende des bovinen und humanen Lactoferrins isoliert (Bellamy *et al.* 1992). Die Sequenzen der identifizierten Peptide unterscheiden sich deutlich von den Eisen-bindenden Teilen des Lactoferrins, folglich ist die antimikrobielle Aktivität der Lactoferricine nicht an die Eisen-Ionen-bindende Eigenschaft des Lactoferrins gebunden (Sharma *et al.* 2011; Bellamy *et al.* 1992). Innerhalb des Caseins konnten antimikrobiell wirkende Peptidsequenzen identifiziert werden, z.B. das Casocidin I aus  $\alpha_{S2}$ -Casein f(165-203) mit hohem Anteil an basischen Aminosäuren und das aus  $\alpha_{S1}$ -casein B Fragment f(1-23) stammende Isracidin (Zucht *et al.* 1995; Lahov & Regelson 1996). Die aus Milchprotein freigesetzten antimikrobiellen Peptide können das Wachstum Gram-positiver und -negativer Bakterien z.B. *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* und *Staphylococcus*, Hefen und filamentöser Pilze hemmen (Meisel 2004; Korhonen & Pihlanto 2006). Die meisten antimikrobiell wirkenden Peptide besitzen eine  $\alpha$ -Helixstruktur, welche positiv geladen und amphipatisch ist. Die antimikrobielle Wirkung kann auf ihre positiven Ladungen zurückgeführt werden (Kitts

& Weiler 2003). Die positive Ladung führt zur Interaktion der Peptide mit anionischen Phospholipiden der Zellwand, die daraus resultierende erhöhte Zellmembranpermeabilität führt zur Abtötung der Zelle (Meisel 2004; Korhonen & Pihlanto 2006). Die aus  $\beta$ -Casein abgeleiteten Glykopeptide (f106-169) üben ihre Schutzfunktion aufgrund der Bindung an Enterotoxin (Lipid A) sowie der Verhinderung der Adhäsion von Bakterien und Viren aus (Brody 2000; Meisel 2004). Im Vergleich zu Antibiotika weisen Antimikrobielle Peptide Vorteile zur Hemmung mikrobiellem Wachstum auf. Sie besetzen ein breites Spektrum der Aktivität, wie z.B. Aktivität gegen einige Antibiotika resistente pathogene Stämme in der Krankenhausumgebung (Minervini *et al.* 2003).

#### 1.1.2.4 Opioid-Aktivität

Opioid-Peptide werden als Opioid-Rezeptor-Ligand mit agonistischen oder antagonistischen Aktivitäten bezeichnet (Korhonen & Pihlanto 2006). Die typischen opioiden Peptide stammen aus den drei Precursorproteinen Proopiomelanocortin (Endorphin), Proenkephalin (Enkephalin) und Prodynorphin (Dynorphin), mit identischer N-terminaler Sequenz Try-Gly-Gly-Phe, und weisen Naloxon-inhibierende opioide Aktivität auf (Quirion & Weiss 1983; Nagpal *et al.* 2011). Opioid-Peptide aus Milchprotein werden „untypische opioide Peptide“ genannt, sie unterscheiden sich von den typischen endogenen opioiden Peptiden durch die N-terminale Sequenz. Das gemeinsame strukturelle Merkmal von exogenen und endogenen opioiden Peptiden ist das Vorhandensein eines Tyrosin-Rests an der ersten Stelle am N-Terminus und einer aromatischen Aminosäure Phenylalanin oder Tyrosin an der dritten oder vierten Position (Tyr-X-Phe oder Tyr-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-Phe). Die letzten vier Aminosäure bilden das Motiv, welches für die Bindung an den Opioid-Rezeptor zuständig ist (Nagpal *et al.* 2011). Opioid-Rezeptoren sind in Nerven, im endokrinen System, im Immun-System und auch im gastrointestinalen Trakt verteilt und können mit den endogenen Liganden oder exogenen Opioiden und opioiden Antagonisten interagieren (Korhonen & Pihlanto 2006). Abhängig von dem individuellen Rezeptor übt das Opioid-Peptid unterschiedliche Aktivität aus, wobei der  $\mu$ -Rezeptor das emotionale Verhalten und die Darmaktivität reguliert, während der  $\delta$ -Rezeptor das emotionale Verhalten beeinflussen und der  $\kappa$ -Rezeptor Gelassenheit und Appetit modulieren kann (Nagpal *et al.* 2011). Opioid-Peptide konnten *in vitro* durch enzymatische Hydrolyse aus Casein freigesetzt werden. Das erste untersuchte exogene opioide Peptid ist das  $\beta$ -Casomorphin, das aus  $\beta$ -Casein

f(60-70) isoliert und als  $\mu$ -Type Ligand identifiziert wurde (Meisel 1986; Rokka *et al.* 1997). Ein weiteres opioides Peptid, das  $\alpha$ -Casein Exorphin entsprach dem  $\alpha_{S1}$ -Casein f(90-96) und ist ein  $\delta$ -selektiver Rezeptor Ligand (Pihlanto-Leppälä *et al.* 1994; Loukas *et al.* 1983). Aus  $\kappa$ -Casein konnte das Casoxins C mit opioid-antagonistischer Aktivität identifiziert werden (Chiba *et al.* 1989). Molkeprotein beinhaltet ebenfalls opioide Peptidsequenzen, so konnten z.B.  $\alpha$ -Lactorphin und  $\beta$ -Lactorphin aus  $\alpha$ -Lactalbumin und  $\beta$ -Lactoglobulin generiert werden. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lactophine sind  $\mu$ -Rezeptor Liganden (Loukas *et al.* 1983; Pihlanto-Leppälä 2000). Die opioiden Peptide besitzen Morphin ähnliche Effekte. Sie können die Absorptionsprozesse im Darm regulieren, die gastrointestinale Funktion durch Verlängerung der Resorption von Nährstoffen beeinflussen und ferner anti-diarrhötisch wirken (Teschemacher *et al.* 1997).

#### 1.1.2.5 ACE-hemmende Aktivität

Eine der bekanntesten Wirkungen der bioaktiven Peptide ist der Einfluss auf den Blutdruck, der durch die in Abbildung 1 dargestellten Regulationssysteme, das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und das Kallikrein-Kinin-System reguliert wird (Meisel 2004; Korhonen & Pihlanto 2006; Nagpal *et al.* 2011). Das ACE ist ein Schlüsselenzym dieser Regulation. Es setzt das Angiotensin I in das gefäßverengende Angiotensin II um. Das bioaktive Peptid wirkt als Inhibitor des ACEs, sodass die Produktion von Angiotensin II gehemmt wird. Zudem verhindert es die Degradation von Bradykinin, welches die gefäßerweiternde Wirkung hat (Ariyoshi 1993; Yamamoto & Takano 1999; FitzGerald & Meisel 2000). ACE-hemmende Peptide, z.B. die Kasokinine, konnten aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Caseinhydrolysaten freigesetzt werden und die Laktokinine aus  $\alpha$ -Laktalbumin und  $\beta$ -Laktoglobulin (FitzGerald & Meisel 1999; Meisel 2004). Aus dem Zusammenhang von Struktur und Aktivität unterschiedlicher ACE-inhibierender Peptide lässt sich feststellen, dass die Bindung von ACE-hemmenden Peptiden an ACE durch C-terminale Tripeptide beeinflusst wird (Meyer *et al.* 2009; Foltz *et al.* 2009). Peptide mit hydrophoben Aminosäuren am C-Terminus wurde am effektivsten an ACE gebunden (Meisel 2004). Zwei ACE-inhibierende Tripeptide, VPP und IPP, wurden von dem Unternehmen Calpis mit *Lactobacillus helveticus* und *Saccharomyces cerevisiae* aus Casein generiert (Nakamura *et al.* 1995). Bei einer Humanstudie wurde belegt, dass das tägliche Verzehren von 95 ml fermentierter Calpis Milch, die ca. 2,8 mg der Peptide VPP und IPP enthielt, über einen Zeitraum von 4 Wochen zu einer signifikanten Blutdrucksenkung bei hypertensiven Patienten führte (Hata *et al.* 1996). In einer anderen

Studie zeigte die „Dahi“ Milch, die durch Fermentation von Milch mit *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* und *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* produziert wurde und das ACE-inhibierende Peptid SKVYP enthielt, eine anti-hypertensive Wirkung (Ashar & Chang 2004).

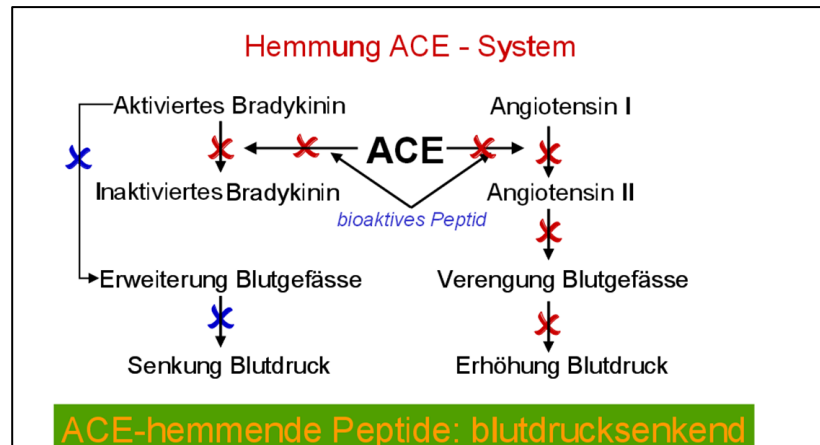


Abbildung 1: Blutdruckregulation durch bioaktive Peptide über das Angiotensin- und Brandykinin-System

Rotes Kreuzchen bedeutet, dass die geschilderte Umsetzung bzw. Wirkung gehemmt wird. Die aktivierte Wirkung wurde durch blaues Kreuzchen gezeichnet (Walther 2006).

Einige aus Milchprotein freigesetzte Peptide besitzen multiple Bioaktivitäten, z. B weist das Peptid  $\beta$ -Immunocasokinin aus  $\beta$ -Casein f(193-198) Immunmodulierende und ACE-inhibierende Aktivitäten auf. Eine solche Region mit überlappenden Funktionen wird als „Strategie Zone“ bezeichnet und ist stabil gegen weitere proteolytische Hydrolyse (Meisel 2004).

## 1.2 Milchsäurebakterien (MSB)

Milchsäurebakterien zählen zu den Gram-positiven Bakterien und sind morphologisch koken- oder stäbchenförmig (Madigan *et al.* 2001; Teuber & Geis 1981). Sie sind nicht-sporenbildend, Katalase-negativ, fakultativ anaerob und zeichnen sich durch einen homo- oder heterofermentativen Metabolismus von Laktose aus (Axelsson 1998). Man unterscheidet als wichtigste Gattungen *Lactobacillus* (*Lb.*), *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* (*L.*) und *Streptococcus* (*S.*). *L. lactis* ist das bisher am meisten untersuchende MSB und das am zweit besten erforschte Gram-positive Bakterium hinsichtlich Genetik, Physiologie und Molekularbiologie (Savijoki *et al.* 2006).

Die MSB werden seit mehr als hundert Jahren in der Lebensmittelindustrie gezielt als

Starterkulturen zur Herstellung fermentierter Milchprodukte eingesetzt (Kunji *et al.* 1996). Aufgrund der effizienten und zuverlässigen Verwertung der Milchkomponenten Laktose und Casein haben MSB bei der Fermentation von Milchprodukten eine wichtige Bedeutung. Durch homo- oder hetero-fermentativen Metabolismus von Laktose wird Laktat gebildet, was eine pH-Absenkung verursacht. Dies verhindert das Wachstum unerwünschter Mikroorganismen und führt zur einer verlängerten Haltbarkeit der Produkte (Teuber & Geis 1981). In dem Fermentationsprozess spielt das proteolytische System eine entscheidende Rolle. Die MSB besitzen multiple Aminosäureauxtrophie (Kunji *et al.* 1996). Die für das Wachstum benötigten Nährstoffe wie Aminosäuren und Peptide befinden sich in nur sehr geringen Mengen frei in Milch. Das Casein beinhaltet jedoch alle für das Wachstum essentiellen Aminosäuren und es macht mit ca. 80% den größten Anteil der Milchproteine aus. Durch Proteolyse von Casein werden diese Nährstoffe für MSB bereitgestellt und dadurch das Wachstum in Milch ermöglicht. Eine weitere Bedeutung des Caseinabbaus liegt in der Aromabildung während der Käseherstellung (Law & Kolstad 1983).

### 1.3 Das proteolytische System von MSB

Das proteolytische System der MSB ist essentiell für das Wachstum der MSB in Milch und stellt Nährstoffe durch Proteolyse aus Milchprotein her. Laktokokken und Laktobazillen besitzen ein sehr ähnliches proteolytisches System. Es setzt sich strukturell aus drei Gruppen zusammen: einer zellwandgebundenen extrazellulär lokalisierten Protease (CEP), spezifischen Peptidtransportern (Dipeptid-, Oligopeptid- und Di-/Tripeptidtransporter) und vielen spezifischen und unspezifischen intrazellulären Peptidasen. Durch die Wirkung von Proteasen wird das Casein in unterschiedlich lange Peptide gespalten, die von den verschiedenen Transportern in die Zellen transportiert und schließlich durch intrazelluläre Peptidasen bis zu einzelnen Aminosäuren zerlegt und von den Zellen verwertet werden.

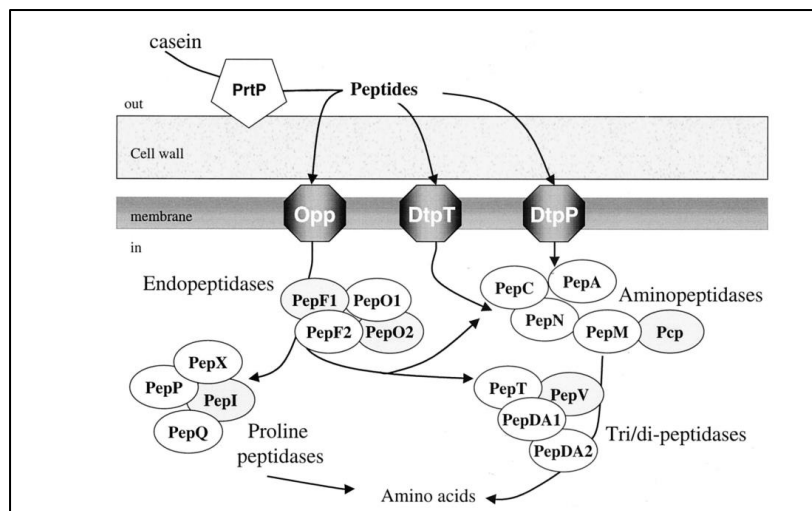


Abbildung 2: Schematische Darstellung des proteolytischen Systems in *L. lactis*

Protease PrtP, Transporter Opp, DtpT und Dpp (DtpP) sowie die intrazellulären Peptidasen sind an der entsprechenden Lokalisierung in den Zellen gezeigt. Peptidasen sind nach der Substrat-Spezifität in vier Gruppen geteilt (Guedon *et al.* 2001a). Opp: Oligopeptidtransporter; DtpT: Di-/Tripeptidtransporter, Dpp(DtpP):Dipeptidtransporter

### 1.3.1 Physiologische Rolle des proteolytischen Systems

Die Untersuchung der physiologischen Wirkung der proteolytischen Komponente des proteolytischen Systems erfolgte durch eine Reihe von Mutantanalysen in *L. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. rhamnosus* und *S. thermophilus*, wobei eine oder mehrere Komponente(n) des proteolytischen Systems inaktiviert wurden. Die Studie von Kunji *et al.* (1996) mit einem mutierten *L. lactis* Stamm zeigte, dass die Protease und der Transporter Opp eine entscheidende Rolle für das Wachstum in Medium mit Casein als Hauptaminosäurequelle spielten, die Inaktivierung des DtpTs beeinflusste das Wachstum dagegen nicht (Christensen *et al.* 1999; Kunji *et al.* 1996). Dies bedeutet, dass der Transporter Opp für die Stickstoff-Aufnahme essentiell ist. Die Di- und Tripeptidtransporter scheinen keinen direkten Einfluss auf die Metabolisierung der aus Casein gebildeten Oligopeptide zu haben, da keine signifikanten Mengen an freien Aminosäuren und Di- bzw. Tripeptiden durch CEPs gebildet werden (Juillard *et al.* 1995). Im Gegensatz dazu spielen die Di- und Tripeptidtransporter eine Rolle bei der Regulation der proteolytischen Komponenten (Marugg *et al.* 1995; Guedon *et al.* 2001b; Guedon *et al.* 2001a). MSB Stämme mit Mutationen in einzelnen und in mehreren Peptidase-Genen wurden auf ihr Wachstum in Milch untersucht. Bei *L. lactis* mit einer einzelnen Mutation in *pepX*, *pepO*, *pepC*, *pepT* oder *pepN* wurde das Wachstum unwesentlich beeinflusst, dagegen führte eine Kombination der Mutationen zu einem deutlich schlechteren Wachstum. Es wird davon ausgegangen, dass eine einzelne mutierte Aktivität durch

andere Peptidasen kompensiert werden kann (Varmanen *et al.* 2000b; Savijoki *et al.* 2006; Christensen *et al.* 1999; Mierau *et al.* 1996). Das verlangsamte Wachstum kann durch multiple Inaktivierung der Peptidasengene verursacht werden. In diesem Zustand sind die Expression und Aktivität von CEP, Opp bzw. anderen Peptidasen nicht signifikant beeinflusst, der intrazelluläre Aminosäurespiegel ist jedoch niedriger als beim Wildtyp, da bestimmte Peptide nicht mehr gespalten werden können. Dieser verringerte Spiegel, insbesondere der der essentiellen Aminosäuren, bewirkt das verlangsamte Wachstum (Mierau *et al.* 1996).

### 1.3.2 Regulation des proteolytischen Systems

Anhand der verfügbaren Menge an Stickstoff im Medium regulieren die MSB das proteolytische System, um so eine ausgeglichene Stickstoff-Bilanz in den Zellen zu gewährleisten. Es wurde vermutet, dass Di- und Tripeptide mit hydrophoben Resten als Effektor-Moleküle die Expression des Opp-Transporters bzw. des komplexen proteolytischen Systems in *L. lactis* beeinflussen können (Kunji *et al.* 1995; Detmers *et al.* 1998; Kunji *et al.* 1996). Ein Studie von Guedon *et al.* (2001a), die die Auswirkung der Mediumzusammensetzung auf die Expression von 16 verschiedene Genen des proteolytischen Systems in *L. lactis* MG 1363 untersuchte, zeigte, dass durch Zugabe von Casiton (80% Peptide und 20% Aminosäuren) zum Medium das Transkriptionsniveau von sechs Genen, und zwar das Proteasegen *prtP*, die Peptidasegene *pepD*, *pepN*, *pepC*, *pepX* und das Transportergen *opp-pepO1*, um das fünf- bis 150-fache reduziert wurde. Die Repression wurde aufgehoben, wenn sich die Zellen wieder unter Stickstoff-limitierten Bedingungen befanden. Anhand des Ergebnisses aus einer Proteomanalyse mit *L. lactis* subsp. *cremoris* NCDO763 in unterschiedlichen Medien wurde belegt, dass eine erhöhte Expression von Opp, PepO1, PepN, PepC und dem putativem Peptid-Bindeprotein (OptS) in aminosäure- und peptidfreiem Medium stattfand (Gitton *et al.* 2005). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in stickstoffreichem Medium die Expression des proteolytischen Systems unterdrückt wird. Diese Repression wird wieder aufgehoben, sobald Stickstoff- bzw. Aminosäuremangel vorliegt (den Hengst *et al.* 2005b; Guedon *et al.* 2001b). Die so regulierten Gene gehören zum CodY Regulon in *L. lactis* (Guedon *et al.* 2001b). Ihre Transkription wird durch den Transkription-Regulator CodY reprimiert. CodY bindet vor dem *opp*-Operon und diese Bindung ist von der Anwesenheit der intrazellulären verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin abhängig (Petranovic *et al.* 2004; Guedon *et al.* 2001b; den



Hengst *et al.* 2005b). Die Expression des Proteasegens *pepP* in *L. lactis* ist dagegen unabhängig von dem CodY-Regulator (Gitton *et al.* 2005). Durch Zugabe von Galaktose in M17 Medium wurde das Transkriptionsniveau des *pepP* Gens bis zum 8,5-fachen erhöht (Guedon *et al.* 2001a). Eine Analyse der Promotor-Region zeigte, dass vier potentielle *catabolite-responsive elements* (CRE) 4 und 20 bp vor bzw. 151 und 177 bp hinter der -10 Sequenz des Promoters zu finden waren. Aufgrund der durch verschiedene Kohlenhydrate veränderten Transkription des *pepP* und der Anwesenheit potentieller CRE in der Nähe der Promotorregion, wurde davon ausgegangen, dass das *pepP* Gen durch das *catabolite control protein* CcpA reguliert wird (Guedon *et al.* 2001a). Es sind noch zwei weitere Regulatoren an der Regulation des proteolytischen Systems beteiligt. Der Regulator CtsR reagiert auf Stress, er kontrolliert die Expression der Gene der proteolytischen Einheit der Protease Clp (*clpP*) und der regulatorischen Einheit (*clpC*, *clpE* und *clpB*) (Varmanen *et al.* 2000a). Der Regulator TrmA ist ein negativer Regulator, dessen Inaktivierung die Hydrolyse von fremdem Protein in *L. lactis* stimuliert (Frees *et al.* 2001). In *E. coli* wurde beobachtet, dass die Expression von Peptidasen durch Hitze beeinflusst wird (Gottesman 1996), dieser Effekt konnte in *L. lactis* nicht nachgewiesen werden (Guedon *et al.* 2001a).

Im Gegensatz zu den Laktokokken ist die Regulation des proteolytischen Systems bei Laktobazillen wesentlich weniger aufgeklärt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Peptidkonzentration in Wachstumsmedien Einfluss auf die Expression des PrtH in *Lb. helveticus*, PrtR in *Lb. rhamnosus*, Opp, DtpT und PepT in *Lb. sanfranciscensis* DSM 20451 hat (Vermeulen *et al.* 2005; Hebert *et al.* 2000; Pastar *et al.* 2003). Für andere Wachstumsbedingungen, wie zum Beispiel in Gegenwart von Sauerstoff, wurde gezeigt, dass die Expression einer Tripeptidase PepR von *Lb. sakei* inhibiert wurde, während sie unter anaeroben Bedingungen um das 20-fache anstieg (Champonier-Verges *et al.*, 2002). Bisher wurde nur ein regulatorisches Protein identifiziert, das die Transkription der proteolytischen Komponenten direkt kontrolliert (Stucky *et al.* 1996; Schick *et al.* 1999). Der CcpA homologe Regulator PepR1, der vor der Promotorregion von *pepQ* bindet und die Transkription von *pepQ* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reguliert. Die *pepQ* Synthese in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ist von der Kohlenhydratzusammensetzung aber nicht von der Peptidkonzentration des Mediums abhängig (Morel *et al.* 2001; Schick *et al.* 1999).

### 1.3.3 Proteasen PrtP und PrtB

Die Caseinhydrolyse wird durch die CEP initiiert. Bisher wurden fünf verschiedene Arten von CEPs kodierenden Genen aus Milchsäurebakterien charakterisiert: *prtB* bei *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Gilbert *et al.* 1996) , *prtP* aus *L. lactis* Wg2 (Kok *et al.* 1988), SK11 (Vos *et al.* 1989) und *Lb. paracasei* (Holck & Naes 1992) , *prtR* aus *Lb. rhamnusus* (Pastar, 2003), *prtS* von *S. thermophilus* (Fernandez-Espla *et al.* 2000) und *prtH* bei *Lb. helveticus* (Pederson *et al.* 1999). In Laktokokken liegt *prtP* entweder Plasmid- oder Chromosom-kodiert vor, wobei die Proteinsequenzen über 95% homolog sind (Kunji *et al.* 1996). Im Gegensatz dazu ist das Proteasegen in Laktobazillen nur im Genom vorhanden (Kok *et al.* 1988). Die meisten MSB besitzen nur eine Protease, bis auf *Lb. helveticus* und *Lb. bulgaricus*, die jeweils zwei besitzen (Pederson *et al.* 1999; Stefanitsi *et al.* 1995). Die zellwandgebundene Protease aus Laktokokken kann durch Behandlung mit Calcium-freiem Puffer oder durch leichte Lyse mit Lysozym von der Zellwand freigesetzt werden, wohingegen sich die Proteasen von *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397 und *Lb. helveticus* L89 im Calcium-freien Puffer nicht von der Zellwand trennen (Gilbert *et al.* 1996).

Die CEPs aus Laktokokken gehören zu den Serinproteasen, weil sie einerseits durch die typischen Serinprotease-Inhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Diisopropylfluorophosphat (DIPF) inhibiert werden und andererseits hohe Homologie mit Subtilisin, einer Serinprotease aus *Bacillus* spp. besitzen (Kok 1990; Pritchard & Coolbear 1993; Tan *et al.* 1993). Sie werden als inaktive Präproteine mit einem Molekulargewicht von 180-190 kDa in den Zellen synthetisiert. Sie setzen sich strukturell aus acht bis neun funktionellen Domänen mit insgesamt ca. 1900 Aminosäuren zusammen. Der N-Terminus entspricht der Prä-Domäne, die für die Sekretion verantwortlich ist und bei der Translokation durch die Zytoplasmamembran durch eine spezifische Peptidase abgespalten wird. Die Pro-Domäne mit ca. 150 Aminosäuren ist essentiell für die korrekte Faltung bzw. Aktivierung des Enzyms und wird bei der Aktivierung des Enzyms mit Hilfe eines von *prtM* kodierten Chaperons abgespalten. Ebenfalls noch im N-terminalen Bereich des aktiven Enzyms befindet sich die katalytische Domäne mit einer kleinen Insertionsdomäne, die die Substratspezifität des Enzyms eventuell modulieren kann. Die katalytische Domäne zeigt hohe Homologie zwischen den verschiedenen CEPs. Innerhalb der katalytischen Domäne wurden einige konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum und in den Substratbindungsstellen

identifiziert (Ser433, His94, Asp30, Asn196 in PrtP von *L. lactis* SK11) (Vos & Siezen 1994). Die A-Domäne besitzt  $\beta$ -Faltblatt Struktur und fungiert lediglich als Spacer. Ihr folgt die B-Domäne, die nicht essentiell für die proteolytische Aktivität ist und die Aktivität bzw. Spezifität der Protease stabilisiert. Die H-Domäne hat die Form einer langen Helix und ermöglicht die Positionierung der katalytischen Domäne außerhalb der Zellwand. Die W-Domäne ist hydrophil und dient als Abstandshalter zur Zellwand. In PrtP und PrtS ist die W-Domäne mit einer Anker (AN) -Domäne verbunden. Sie zeichnet sich durch ein typisches „Sorting“ Signal (LPXTG) in Gram-positiven Zellen aus, gefolgt von einem hydrophoben Bereich mit  $\alpha$ -Helix und einem kurzen positiv geladenen Schwanz (Navarre & Schneewind 1994). Nach der Translokation wird die Bindung zwischen T und G innerhalb LPXTG durch eine Sortase gespalten, die die Carboxylgruppe des Threonins kovalent an ein N-terminales Glycin aus dem Peptidoglycan der Zellwand bindet (Navarre & Schneewind 1994).

Die Protease PrtB aus *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* wird als ein Präproprotein mit 1946 Aminosäuren synthetisiert. Sie unterscheidet sich von PrtP aus *L. lactis* durch die Abwesenheit eines *prtM*-ähnlichen Gens in der *prtB* flankierenden Region und den Anheftungsmechanismus an die Zellwand. In *L. lactis* wird PrtP durch ein *prtM* kodiertes, membrangebundenes Lipoprotein aktiviert (Haandrikman *et al.* 1989; Haandrikman *et al.* 1991). Für die Aktivierung des PrtB kommen vermutlich zwei Möglichkeiten in Betracht: Zum einen könnte das PrtB durch ein PrtM-ähnliches Chaperon aktiviert werden, dessen kodierendes Gen nicht in der Umgebung des *prtB* Gens in *Lb. bulgaricus* lokalisiert ist (Gilbert *et al.* 1996; Germond *et al.* 2003). Zum anderen könnte PrtB durch ein generelles Chaperon aktiviert werden, welches die Reifung von mehreren extracytoplasmatischen Proteinen bewirkt, wie z.B. PrsA, das an der Aktivierung und dem Export von Subtilisin und  $\alpha$ -Amylase in *B. subtilis* beteiligt ist (Jacobs *et al.* 1993). Die H-Domäne in PrtB entspricht nicht der klassischen H-Domäne wie bei PrtP und wird durch zwei Bereiche von ca. 10 Aminosäuren mit einer  $\alpha$ -Helix Struktur gekennzeichnet (Germond *et al.* 2003). Außerdem ist in PrtB keine AN-Domäne zu finden. Die Verankerung mit der Zellwand ist vermutlich auf die W-Domäne zurückzuführen. Die W-Domäne enthält eine unvollkommene Wiederholung von 41 Aminosäuren mit einem hohen Anteil an Lysin. Das Protein ist vermutlich aufgrund der elektrostatischen Wirkung an die Zellwand gebunden (Gilbert *et al.* 1996). Die Proteasen aus Laktokokken und Laktobazillen sind alle zellwandgebunden, mit einem Molekulargewicht von 180-210 kDa, einem

pH-Optimum von 6.0 in Laktokokken und 5,5-7 in Laktobazillen, und mit einem Temperaturoptimum bei 37-42 °C (Kunji *et al.* 1996).

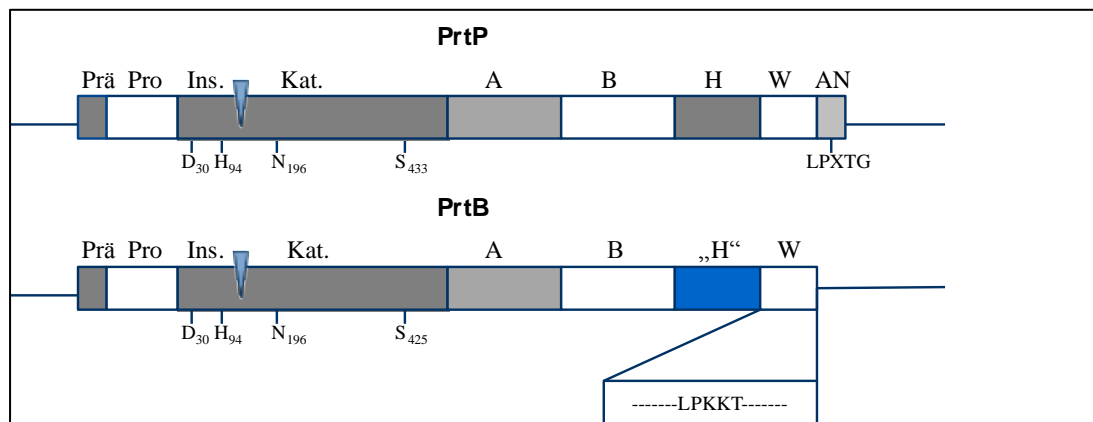


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des PrtP aus *L. lactis* und PrtB aus *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*

Dieses Enzym setzt sich aus folgenden Domänen zusammen: Prä-, Pro, Insertionsdomäne (Ins.) innerhalb der katalytischen Domäne (Kat), A-, B-, H- („H“ bei PrtB), W und AN-Domäne. Die konservierten Aminosäuren (D, H, N, und S) in der katalytischen Domäne wurden gekennzeichnet. Die gestrichelten horizontalen Linien in der W-Domäne des PrtBs entsprechen den zwei unvollkommenen Wiederholungseinheiten, die das degenerierte Sortiersignal LPKKT flankieren (modifiziert nach Germond *et al.*, 2003; Vos & Siezen, 1994).

Casein ist das Hauptsubstrat für CEPs. Es setzt sich aus  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ -, und  $\kappa$ -Casein zusammen. Aufgrund des Spaltungsvermögens von  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ -, und  $\kappa$ -Casein werden die PrtPs in zwei Typen (PI und PIII) geteilt. Der PI Typ spaltet hauptsächlich das  $\beta$ -Casein und weniger effektiv das  $\kappa$ -Casein während der PIII-Typ  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein gleichmäßig abbaut. Die Proteasen aus *L. lactis* PrtPs werden darüber hinaus noch in sieben verschiedene Typen (a, b, c, d, e, f, und g) klassifiziert, basierend auf ihrer Spezifität zu dem  $\alpha_{S1}$ -Casein Fragment von Position 1 bis 23 (Kunji *et al.* 1996).

Aus  $\beta$ -Casein wurden nach der Hydrolyse mit der Protease aus *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 über 100 Oligopeptide mit 4-10 Aminosäuren freigesetzt. Mehr als 50% der Peptide stammten aus dem C-Terminus von  $\beta$ -Casein und ungefähr die Hälfte der restlichen Peptide waren aus der Region 60-105 des  $\beta$ -Caseins (Kunji *et al.* 1996). Aus der Spaltung von  $\kappa$ -Casein durch die Protease aus *L. lactis* NCDO763, SK11, H2 und AM1 wurden die gleichen Peptide identifiziert, sie variierten lediglich in der Menge. Die meisten Oligopeptide stammten aus der Region 96-106 und dem C-terminalen Ende (Kunji *et al.* 1996). Eine Hydrolyse von  $\alpha_{S1}$ -Casein wurde nur bei PIII und Intermedia-Typ Proteasen beobachtet. Mittels SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese wurden 25 Oligopeptide nach der Hydrolyse mit Proteasen detektiert. Die Hälfte davon stammten vom

C-Terminus des  $\alpha$ -Caseins (Kunji *et al.* 1996).

## **2 Zielsetzungen**

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Teilprojekts des BMBF-geförderten Projekts „FoCus - Food Chain Plus“ durchgeführt. Ziel des Projekts war es, neue, bioaktive Peptide enthaltende, funktionelle Milchprodukte herzustellen.

In dieser Arbeit sollten mikrobielle Proteasen isoliert werden, die in der Lage sind, bioaktive Peptide mit unterschiedlichen physiologischen Wirkungen (ACE-inhibitorisch und anti-inflammatorisch) aus Milchprotein freizusetzen. Dazu sollten die Proteasogene aus MSB, welche nachgewiesenermaßen über die Fähigkeit zur Freisetzung bioaktiver Peptide verfügen, isoliert, charakterisiert, in geeigneten Expressionsvektoren kloniert und in Form von sekretiertem, löslichem Protein exprimiert werden. Nach Aufreinigung und Anreicherung der hergestellten Protease-Derivate sollte die Kinetik zur enzymatischen Peptid-Freisetzung aus Casein ermittelt und die freigesetzten Peptide identifiziert werden. Abschließend sollten die abgespaltenen freigesetzten Peptide auf Bioaktivität geprüft werden.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme und ihre Eigenschaften sind in den Tabellen 1 aufgeführt. Sie wurden in die Stammsammlung des Max Rubner-Instituts, Kiel aufgenommen.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Stämme, Teil I

Stamm	Eigenschaften	Referenz/Quelle
<i>Lactobacillus</i> spec. 92059	proteolytisch aktiver Stamm	Institutssammlung
<i>Lactobacillus</i> spec. 92202	proteolytisch aktiver Stamm	Institutssammlung
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Klonierungsstamm F $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 <math>\lambda^-</math></i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i> NEB5 $\alpha$	Klonierungsstamm <i>fhuA2 <math>\Delta</math>(argF-lacZ)U169 phoA glnV44<math>\Phi</math>80 <math>\Delta</math>(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England BioLabs, Frankfurt am Main
<i>E. coli</i> Top10	Klonierungsstamm F <i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15<math>\Delta</math>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i> LMG194	Expressionsstamm für toxisches Insert F $\Delta$ <i>lacX74 galE thi rpsL <math>\Delta</math>phoA (Pvu II) <math>\Delta</math>ara714 leu::Tn10</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i> GM2163	F <i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL 136 dam13::Tn9 xylA5mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>	Institutssammlung
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	Klonierungsstamm plasmidfreies Derivat von NCDO 712, Sm <sup>r</sup>	Gasson, 1983/ Institutssammlung
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	Expressionsstamm für NICE System plasmidfreies Derivat von NCDO 712, Sm <sup>r</sup> , <i>pepN::nisRK</i>	Kuipers <i>et al.</i> , 1998/ Institutssammlung

Sm<sup>r</sup>: Streptomycin-resistent

Tabelle 1: Liste der verwendeten Stämme, Teil II: Stämme, die das Proteasegen tragen.

Bezeichnung	Stamm	Konstrukt
S1-100	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pBL1: pSmart <i>prtB</i> 202
S1-102	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pBL2: pSmart <i>prtB</i> 59
S1-112	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pBL4: pSmart <i>prtB</i> Pro-B59
S1-113	<i>E. coli</i> GM2163	pBL4: pSmart <i>prtB</i> Pro-B59
S1-116	<i>E. coli</i> LMG194	pBL8: pBad <i>prtB</i> Pro-B59
S1-114	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	pBL3: pSmart <i>prtB</i> Pro+B59
S1-115	<i>E. coli</i> GM2163	pBL3: pSmart <i>prtB</i> Pro+B59
S1-117	<i>E. coli</i> LMG194	pBL7: pBad <i>prtB</i> Pro+B59
S1-118	<i>E. coli</i> Top10	pBL5: pSmart <i>prtB</i> Pro+B202
S1-119	<i>E. coli</i> GM2163	pBL5: pSmart <i>prtB</i> Pro+B202
S1-122	<i>E. coli</i> LMG194	pBL9 :pBad <i>prtB</i> Pro+B202
S1-120	<i>E. coli</i> Top10	pBL6 :pSmart <i>prtB</i> Pro-B202
S1-121	<i>E. coli</i> GM2163	pBL6: pSmart <i>prtB</i> Pro-B202
S1-123	<i>E. coli</i> LMG194	pBL10: pBad <i>prtB</i> Pro-B202
S1-124	<i>E. coli</i> Top10	pBL13: pSmart <i>prtB</i> Pro+B202NX <sub>2</sub>
S1-125	<i>E. coli</i> Top10	pBL11: pSmart <i>prtB</i> PräH59
S1-126	<i>E. coli</i> Top10	pBL12: pSmart <i>prtB</i> PräH202
S1-127	<i>E. coli</i> Top 10	pBL14: pBad <i>prtB</i> PräH59
S1-132	<i>L.lactis</i> NZ9000	pBL15: pNZ8048 <i>prtB</i> PräH59
S1-133	<i>L.lactis</i> NZ9000	pBL16: pNZssp <i>prtB</i> PräH59
S1-134	<i>L.lactis</i> NZ9000	pBL17: pNZ8048 <i>prtB</i> PräH202
S1-135	<i>L.lactis</i> MG1363	pBL19: pNZssp <i>prtB</i> Pro+B202NX <sub>2</sub>
S1-136	<i>L.lactis</i> MG1363	pBL18: pNZssp <i>prtB</i> Pro+B59
S1-137	<i>L.lactis</i> NZ9000	pBL19: pNZssp <i>prtB</i> Pro+B202NX <sub>2</sub>
S1-138	<i>L.lactis</i> NZ9000	pBL18: pNZssp <i>prtB</i> Pro+B59
S1-139	<i>L.lactis</i> NZ9000	pBL19*: pNZssp <i>prtB</i> Pro+B202NX <sub>3</sub>
S1-140	<i>L.lactis</i> NZ9000	pBL15*: pNZ8048 <i>prtB</i> PräH59
S1-141	<i>L.lactis</i> NZ9000	pBL17*: pNZ8048 <i>prtB</i> PräH202

\*:Mutation in dem Plasmid wurde korrigiert.

### 3.1.2 Plasmide

Tabelle 2: Liste der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pSM	pSmart	Klonierungsvektor, KanR, <i>low copy</i>	Lucigen, USA



pBad	pBad/gIII A	Expressionsvektor, <i>araBad</i> Promotor, C-term.His6-Tag, Amp <sup>R</sup> ,	Life Technologies, Darmstadt
pNZ8048	pNZ8048	Expressionsvektor NICE-System, <i>NisA</i> Promotor Cm <sup>R</sup>	Kuipers <i>et al.</i> , 1998
pNZssp	pNZ8121	Expressionsvektor NICE-System, <i>NisA</i> Promotor, Signalpeptide von PrtP, Cm <sup>R</sup>	MoBiTec, Göttingen
pBL1	pSmart <i>prtB</i> 202	pSmart mit <i>prtB</i> aus Stamm 92202	diese Arbeit
pBL2	pSmart <i>prtB</i> 59	pSmart mit <i>prtB</i> aus Stamm 92059	diese Arbeit
pBL3	pSmart <i>prtB</i> Pro+B59	pSmart mit <i>prtB</i> (Pro bis B) aus 92059	diese Arbeit
pBL4	pSmart <i>prtB</i> Pro-B59	pSmart mit <i>prtB</i> (ohne Pro bis B) aus 92059	diese Arbeit
pBL5	pSmart <i>prtB</i> Pro+B202	pSmart mit <i>prtB</i> (Pro bis B) aus 92202	diese Arbeit
pBL6	pSmart <i>prtB</i> Pro-B202	pSmart mit <i>prtB</i> (ohne Pro bis B) aus 92202	diese Arbeit
pBL7	pBad <i>prtB</i> Pro+B59	pBad mit <i>prtB</i> (Pro bis B) aus 92059	diese Arbeit
pBL8	pBad <i>prtB</i> Pro-B59	pBad mit <i>prtB</i> (ohne Pro bis B) aus 92059	diese Arbeit
pBL9	pBad <i>prtB</i> Pro+B202	pBad mit <i>prtB</i> (Pro bis B) aus 92202	diese Arbeit
pBL10	pBad <i>prtB</i> Pro-B202	pBad mit <i>prtB</i> (ohne Pro bis B) aus 92202	diese Arbeit
pBL11	pSmart <i>prtB</i> PräH59	pSmart mit <i>prtB</i> (Prä bis H) aus 92059	diese Arbeit
pBL12	pSmart <i>prtB</i> PräH202	pSmart mit <i>prtB</i> (Prä bis H) aus 92202	diese Arbeit
pBL13	pSmart <i>prtB</i> Pro+B202NX <sub>2</sub>	pBad mit <i>prtB</i> (Pro bis B NX <sub>2</sub> ) aus 92202	diese Arbeit
pBL14	pBad <i>prtB</i> PräH59	pBad mit <i>prtB</i> (Prä bis H) aus 92059	diese Arbeit
pBL15	pNZ8048 <i>prtB</i> PräH59	pNZ8048 mit <i>prtB</i> (Prä bis H) aus 92059 MycHis6	diese Arbeit
pBL16	pNZssp <i>prtB</i> PräH59	pNZssp mit <i>prtB</i> (Prä bis H) aus 92059 MycHis6	diese Arbeit
pBL17	pNZ8048 <i>prtB</i> PräH202	pNZ8048 mit <i>prtB</i> (Prä bis H) aus 92202 MycHis6	diese Arbeit
pBL18	pNZssp <i>prtB</i> Pro+B59	pNZssp mit <i>prtB</i> (Pro bis B) aus 92059	diese Arbeit
pBL19	pNZssp <i>prtB</i> Pro+B202NX <sub>2</sub>	pNZssp mit <i>prtB</i> (Pro bis B) aus 92202NX <sub>2</sub>	diese Arbeit

Cm<sup>R</sup>: Chloramphenicol resistant; Amp<sup>R</sup>: Ampicillin resistant

### 3.1.3 Nährmedien und Puffer

Die in der Arbeit verwendeten Medien wurden mit 2-fach entionisiertem Wasser (DDW, SG-Reinstwasser-System Clear, Hamburg) angesetzt. Für die Herstellung von Agar-Platten wurden 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Alle Medien wurden für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mit Hilfe eines Spritzenvorsatz-Filters (Sartorius, Göttingen) mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert. Glukose wurde erst nach dem Autoklavieren aus einer sterilen 40 %igen Lösung

zugegeben.

Nicht gekennzeichnete Standard-Chemikalien wurden von Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Der Reinheitsgrad war „zur Analyse“ oder „reinst“.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Medien

Medium	Zusammensetzungen
MRS-Medium	Pepton aus Casein 10,0 g Hefeextrakt 4,0 g Tween 80 1,0 g Natriumacetat x 3H <sub>2</sub> O 5,0 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,2 g Fleischextrakt 10,0 g Glukose 20,0 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,0 g Ammoniumcitrat 2,0 g MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O 0,05 g Add. 1L DDW, pH 6,2 ± 0,2
MRS mod.	MRS Medium ohne Glukose
M17-Medium	Phyton Pepton 5,0 g Polypepton 5,0 g Hefeextrakt 2,5 g Fleischextrakt 5,0 g Ascorbinsäure 0,5 g Na-β-Glycerophosphat 19 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 0,25 g Add. 1L DDW, pH 7,1 ± 0,1
GM17	M17 + 0,5 % Glukose
SGM17	M17 + 0.5 M Saccharose
SGM17MC	SGM17+ 20 mM MgCl <sub>2</sub> + 2 mM CaCl <sub>2</sub>
LB Medium	Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl 5 g Add. 1L DDW, pH 7.0
RM Medium	10 x M9 Salz 10 % Casamino Acids 2 % Glukose 0.2 %

	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	getrennt autoklavieren	
	10 x M9	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	60 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
	NaCl	5 g
	NH <sub>4</sub> Cl	10 g
	Add. 1L DDW, pH auf 7.4 mit 10 M NaOH einstellen	
	1 ml 1 M Thiamin (sterilfiltriert) in 1 L 1 X M9 Salz zugeben	
SOB-Medium	Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Add. 1L DDW	
	Mg-Salze getrennt autoklavieren	
Caso-Bouillon	Pepton aus Casein	17 g
	Pepton aus Soja	3 g
	NaCl	5 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
	Glukose x H <sub>2</sub> O	2,5 g
	Add. 1L DDW pH 7,3 ± 0,2	
Müller-Hinton	Rindfleischextrakt	300 g
	Maisstärke	1,5 g
	Pepton aus Casein	17,5 g
	Add. 1L DDW pH 7,4 ± 0,2	

Tabelle 4: Eingesetzte Antibiotika und verwendete Konzentrationen  
(steril filtrieren)

Stamm	Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Stammlösung
<i>E. coli</i>	Kanamycin	34 µg/ml	34 mg/ml in DDW
	Ampicillin	100 µg/ml	100 mg/ml in DDW
	Chloramphenicol	30 µg/ml	30 mg/ml in 98% EtOH
<i>L. lactis</i>	Chloramphenicol	10 µg/ml	30 mg/ml in 98% EtOH

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und Stammhaltung

Zur Anzucht wurden alle Stämme aus Glycerinkultur oder aus einer Vorkultur 1 %ig in die passenden Medien mit entsprechenden Antibiotika (Tabelle 4) gegeben. *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium bei 37 °C über Nacht bei 130 rpm geschüttelt. Die Kultivierung von Laktokokken erfolgte in GM17-Bouillon über Nacht bei 30 °C und von Laktobazillen in MRS-Bouillon über Nacht bei 40 °C. Für die Stammhaltung wurden 0,8 ml Flüssigkultur mit 1 ml Glycerol (87 %ig) versetzt und in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2 Zuckerfermentationstest

Um die Stämme 92059 und 92202 nach einer 16S rDNA Sequenzanalyse weiter zu differenzieren, wurde ein Zuckerfermentationstest durchgeführt. Dazu wurden die Stämme in MRS mod. ohne Glukose angezogen und bei 40 °C über 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 24 h in dem gleichen Medium, dem die unterschiedlichen, zu testenden Zucker als Kohlenstoffquelle 20 %ig zugesetzt wurden. Das Wachstum wurde über die Zeit mittels OD<sub>620</sub> Messung verfolgt. Bei steigenden OD<sub>620</sub> Werten im Vergleich zum Medium ohne Zucker wurde das Wachstum mit der alternativen C-Quelle als positiv bewertet.

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Gram-positiven Bakterien

Die Isolierung der genomischen DNA (gDNA) aus Gram-positiven Bakterien erfolgte durch enzymatische Lyse der Bakterienzellen und anschließende Abtrennung durch Phenol-Chloroform-Extraktion bzw. Fällung der DNA. Hierzu wurden 10-20 ml Übernachtskultur (gewachsen in Gegenwart von 40 mM DL-Threonin) sedimentiert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl DDW gewaschen und in 500 µl Lysispuffer resuspendiert. Dem Ansatz wurden 50 µl Lysozym (20 mg/ml) und 5 µl Mutanolysin (2500 U/ml) zugesetzt und der Ansatz für 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Danach folgte eine Inkubation für 10 min bei 37 °C. Anschließend wurden 60 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt und durch Invertieren gut gemischt. Zur Lyse der Zellen wurden 25 µl 3,5 mM Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben. Der Ansatz wurde durch Invertieren gemischt und bei 60 °C für 60 min inkubiert. Dadurch konnte die Zellwand

aufgeschlossen und die in den Zellen lokalisierte DNA und Proteine freigesetzt werden. Sobald eine klare Lösung entstand, folgte eine zweimalige Extraktion mit Phenol-Chloroform. Zur Durchführung wurden je 250 µl DDW, 250 µl Phenol und 250 µl Chloroform zu den Lysaten gegeben, gründlich gemischt und für die Phasentrennung bei 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige, DNA enthaltende Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Gegebenenfalls wurde mit dieser Lösung eine erneute Phenol-Chloroform-Extraktion, wie oben beschrieben, durchgeführt. Zur Entfernung vorhandener Phenolreste wurde auf den abgenommenen Überstand die äquivalente Menge Chloroform gegeben, gemischt und bei 14000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Fällung der gDNA wurde 0,8 Volumen Isopropanol zugegeben, durchgemischt und bei -20 °C für mindestens eine Stunde inkubiert. Durch Zentrifugation (14000 rpm, 30 min bei 4 °C) wurde die DNA pelletiert. Anschließend wurde das Sediment mit 200 µl 70 % Ethanol zur Entfernung von Salzen gewaschen. Danach wurde das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Zuletzt wurden 5 µl RNase (10 mg/ml) zur Entfernung von RNA zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die gDNA bei -20 °C gelagert.

### 3.3.2 Isolierung Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem Kit „NucleoSpin Plasmid QuickPure“ von Macherey und Nagel (Düren) entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Eine schnelle Plasmid-Präparation *Colony cracking* aus *E. coli* wurde durchgeführt, um potentiell positiven Transformanten nach einer Transformation schnell zu finden. Aus der auf Agarplatte gewachsenen Kolonie wurde Zellmaterial mit einer sterilen Spitze entnommen und in 25 µl 10 mM EDTA (pH 8) resuspendiert. Dem Ansatz wurde mit 25 µl Cracking-Puffer zugesetzt und anschließend bei 70 °C für 5 min inkubiert und für 10 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 3-5 µl Cracking-Farbe wurde der Ansatz zentrifugiert (14000 rpm für 5 min) und von dem Überstand wurde mindestens 15 µl auf Agarosegel zur Auftrennung auftragen. Durch Vergleich mit einem leeren Vektor auf dem Agarosegel wurden die positiven Transformanten erkannt.

Tabelle 5: Für das *Colony Cracking* verwendete Puffer und Färbelösung

Puffer	Komponente	Konzentration
Cracking Puffer	NaOH	200 mM
	SDS	0,5 %
	Saccharose	20 %
Cracking Farbe	KCL	4 M
	Bromphenolblau	0,4 %

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *Lactococcus* wurde nach einer modifizierten Version des Kits „NucleoSpin Plasmid“ der Firma Macherey-Nagel gearbeitet. Dazu wurden 10 ml Übernachtskultur bei 10000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl der Lösung A1 resuspendiert. Danach wurden 25 µl Lysozym (20 mg/ml) und 10 µl Mutanolysin (2500 U/ml) zugegeben und der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 250 µl der Lösung A2 hinzugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung A3 wurde die Reaktionsmischung 5 min auf Eis gehalten und dann bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C waren die Proteine abgebaut. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform Extraktion. Dazu wurden je 400 µl Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zu den Lysaten gegeben und durch Invertieren gut gemischt. Nach der Phasentrennung (14000 rpm, 5 min) wurde die obere wässrige Phase mit einer Pipette auf eine NucleoSpin Plasmid Säule überführt und 5 min zur Bindung der Plasmid-DNA an das Säulenmaterial bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (1 min bei 14000 rpm) wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 700 µl Waschlösung A4 gewaschen. Die beladene Säule wurde wieder für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend erfolgte durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 2 min die Trocknung der Säule. Zur Elution wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 50 µl DDW und Zentrifugation für eine Minute bei 14000 rpm eluiert. Um die Ausbeute zu verbessern, wurde die Säule vor der Zentrifugation für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 - 1,2 % gewählt. Die jeweiligen Mengen an Agarose wurden in 1x TAE-Puffer

gegeben, bis zur vollständigen Lösung erhitzt und nach Abkühlen in einen Gelträger gegossen. Zur analytischen Agarosegelelektrophorese wurden 10 µl Probe mit 2 µl 6-fachen Probenpuffer (DNA Loading Dye, Fermentas) versetzt und zur präparativen Agarosegelelektrophorese 30 µl Probe mit 6 µl 6-fachen Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Nach Befüllen der Taschen erfolgte die Elektrophorese mit TAE-Puffer bei 100 V für ca. 40 min. Danach wurde das Gel ca. 10 min mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und mit DDW entfärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Bestrahlung mit dem Geldoc-System der Firma BioRad (München).

Tabelle 6: Für die Agarose-Gelelektrophorese verwendete Puffer und Färbelösung

Puffer	Komponente	Konzentration
1 x TAE	Tris	40,0 mM
	Essigsäure	40,0 mM
	EDTA	0,1 mM
Färbelösung	Ethidiumbromid	0,1 %

### 3.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde nach Auftrennung der DNA auf einem Agarosegel durch Vergleich der Bandenintensität einer Probe mit einer auf ähnlicher Höhe liegender Bande des DNA-Größenstandards bestimmt.

### 3.3.5 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA Fragmenten eingesetzt. Für die PCR in der Arbeit wurde die *Phusion* High Fidelity Hot Start-Polymerase (Thermoscientific, Schwerte Deutschland) verwendet.

Die Tabelle 7 zeigt das Pipettierschema für einen PCR Ansatz.

Tabelle 7: Pipettierschema der PCR

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
dNTPs (je 10 mM)	0,5	0,2 mM
<i>Phusion</i> PCR Puffer (5x)	5	1 x
Forward-Primer (10 µM)	1,25	0,5 µM
Reverse-Primer (10 µM)	1,25	0,5 µM
Template DNA	1	-

Phusion Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	0,25	0,02 U/ $\mu$ l
DDW	Add. 25	-

Die PCR erfolgte je nach dem zu amplifizierenden Fragment und den eingesetzten Primern unter entsprechenden Bedingungen (Tabelle 8) in dem Bio-Rad Cycler (München). Für individuelle Fälle wurden die Primer-Anlagerungstemperaturen durch eine Gradienten-PCR ermittelt.

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der PCR

Step	Bedingungen
1. Initial-Denaturierung	98 °C, 3 min
2. Denaturierung	98 °C, 10 s
3. Primer-Anlagerung	65-72 °C, 30 s
4. Extension	72 °C, 30 s/kb
Zyklenzahl (Schritt 2-4)	30
5. Abschließende Extension	72 °C, 2 min
6. Lagerung	4 °C

### 3.3.6 Sequenzierung

Die in dieser Arbeit zu sequenzierenden Proben wurden an die Firma Eurofins MWG (Ebersberg) gegeben. Die Sequenzierprimer wurden beigefügt oder direkt aus der Standard-Primer-Liste der Firma ausgewählt. Die DNA wurde vorher mit dem Nucleo Spin Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) gereinigt. Dafür wurden ca. 15-50 ng/ $\mu$ l DNA und 10 pmol/ $\mu$ l Primer verwendet. Die Auswertung erfolgte durch das Programm Snapgen (Version 2.2.2).

### 3.3.7 Erstellung des phylogenetischen Stammbaums anhand von 16S rDNA-Sequenzen

Mit dem Programm ARB (<http://www.arb-silva.de/download/arb-files/>) FastAligner (V. 5.5; 64-bit; Ribocon, Bremen) wurden die durch Sequenzierung ermittelten 16S rDNA Sequenzen bearbeitet (Ludwig *et al.* 2004). Die Stammbaum-Erstellung erfolgte in ARB mittels *neighbour joining*, *maximum parsimony* und *maximum likelihood* (Stamatakis 2006). Zur Gewährleistung der Verlässlichkeit wurde mit einer bootstrap Analyse mit 1000 Wiederholungen gearbeitet. Folgende Datenbank wurde verwendet: SSURef\_111\_SILVA\_NR\_04\_08\_12\_opt.arb.



### 3.3.8 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde zum Schneiden des PCR-Produkts und des Vektors eingesetzt, um diese anschließend miteinander zu ligieren. Des Weiteren diente der Verdau auch zur Kontrolle der Klonierung.

Die Restriktionsansätze wurden mindestens für drei Stunden bei 37 °C mit konventionellen Enzymen oder für 15 min mit FastDigest Enzymen inkubiert und danach 20 min bei entsprechender Inaktivierungstemperatur des Enzyms durch Hitze inaktiviert. In Tabelle 9 ist beispielhaft ein Ansatz zur Restriktion eines Fragments aufgeführt.

Tabelle 9: Restriktionsansatz

Komponente	Volumen (µl)
Fragment	25
Puffer (10 x)	3
Restriktionsenzym	0,5 - 1
DDW	Add. 30

### 3.3.9 Southern Blot

Das Southern Blot Verfahren wurde im Jahr 1975 von dem britischen Molekularbiologen Edwin Southern entwickelt (Southern 1975). Beim Southern Blot handelt es sich um eine molekularbiologische Methode für den Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen innerhalb der Erbsubstanz. Damit können Fragestellungen, wie beispielweise, ob und wie oft ein Gen im Genom vorkommt ohne Ermittlung der Sequenzen geklärt werden.

Der Nachweis erfolgte direkt an genomischer DNA, die nach einem Restriktionsverdau zusammen mit einem Digoxigenin (DIG) markierten Marker in einem 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt wurde. Das Gel wurde vor dem Blotting mit 250 mM HCl für 5 Min unter leichtem Schütteln depuriniert, mit DDW abgespült und in Denaturierungslösung 2 x 15 min geschwenkt. Nach erneutem Waschen mit DDW wurde das Gel 2 x 15 min in Neutralisierungspuffer neutralisiert und zum Schluss mit 20 x SSC Puffer equilibriert. Für den Transfer wurde ein Blot entsprechend der nachstehenden Zeichnung aufgebaut. Dabei wurde die Kapillarkraft genutzt, die von dem 20 x SSC Puffer ausgehend von unten durch das Gel, weiter durch die Membran, zu einem Stapel saugfähigen Papiertüchern läuft. Dadurch wurde die DNA mit Hilfe des Flüssigkeitsstroms aus dem Gel auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran

übertragen. Der Blot erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die DNA durch eine Hitzebehandlung bei 120 °C für 30 min auf der Membran fixiert.

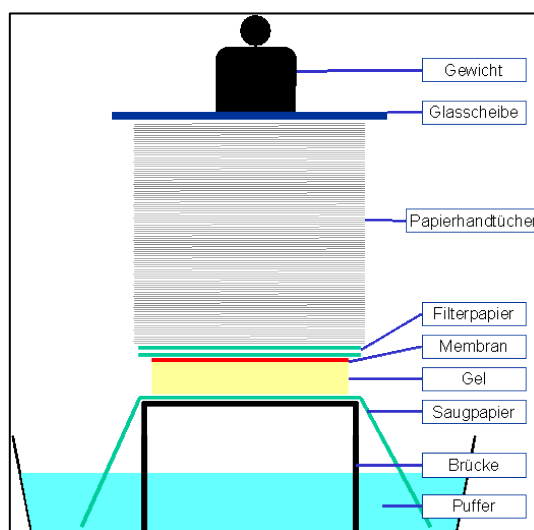


Abbildung 4: Aufbau des Kapillar-Blot-Moduls

Die Darstellung wurde von (Marker *et al.* 2016) <http://home.arcor.de/alexander.marker/referate/blotting/blotting.htm> übernommen.

Bei der Sonde handelte es sich um ein PCR Produkt, welches mit Digoxigenin (DIG) markierte Nukleotide enthält und durch PCR synthetisiert und mit Anti-DIG-Antikörpern in einer Licht-Reaktion sichtbar gemacht wurde. Die Hybridisierung wurde mit dem DIG-System von der Firma Roche (Roche Diagnostics Cooperation, 1995) durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte eine Prähybridisierung, indem die Membran mit 20 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer (42 °C) in einem Hybridisierungsröhrchen für 2 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen inkubiert wurde. Die Sonde wurde vor der Hybridisierung bei 95 °C für 5 min erhitzt, sofort auf Eis abgekühlt und mit Hybridisierungslösung angesetzt, sodass ca. 50 ng Sonde per ml Hybridisierungslösung enthalten war. Die angesetzte Lösung wurde durch ein 0,45 µm Filter filtriert und anschließend mit der prähybridisierten Membran in ein neues Hybridisierungsröhrchen überführt und über Nacht bei 42 °C im Hybridisierungsofen unter ständigem Drehen inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zunächst bei 25 °C 2 x 5 min mit *low stringency buffer* und anschließend 2 x 15 min mit vorgewärmten *high stringency buffer* bei 65 °C unter Drehen in Hybridisierungsröhrchen gewaschen. Danach wurde die Membran in Waschpuffer für 1 - 2 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem die Membran mit 100 ml frisch angesetzter Blockinglösung für 1 h blockiert wurde, erfolgte eine Inkubation mit Antikörperlösung für 30 min bei Raumtemperatur. Die Membran

wurde danach 2 x 15 min mit 500 ml Waschpuffer gewaschen und 3 min in Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran mit 1 ml CSPD-Lösung in einer Hybridisierungsfolie für 5 min inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde aus der Folie durch Herausstreichen entfernt bevor die Membran eingeschweißt wurde. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation bei 37 °C im Dunkeln erfolgte die Detektion durch Auflegen mehrerer - meistens 3 - Röntgenfilme (X-Ray Film, Fuji, Düsseldorf) auf die Nylonmembran. Nach Entwicklung und anschließender Fixierung bzw. Trocknung konnte das Bandenmuster anhand des geschwärzten Filmes ausgewertet werden.

Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen für Southern Blot

Puffer	Zusammensetzungen
Depurinierungslösung	250 mM HCL
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl; 1,5 M NaCl, pH 7,5
20 x SSC	3 M NaCl; 300 mM NaCitrat, pH 7,0
2 x SSC	20 x SSC mit DDW 1:10 verdünnen
Hybridisierungspuffer	DIG Easy Hyb Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>low stringency buffer</i>	2 x SSC; 0,1 % SDS
<i>high stringency buffer</i>	0,1 x SSC; 0,1 % SDS
Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3 % Tween, pH 7,5
Blockinglösung	10 % Blocking Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in Waschpuffer ansetzen
Antikörperlösung	Anti-DIG-Antikörper (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 1:10 000 in Blockinglösung frisch ansetzen
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, pH 9,5
CSPD-Lösung	CSPD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 1:100 mit Detektionspuffer ansetzen

### 3.3.10 Aufreinigung von DNA

Zur Abtrennung von Enzymen, Primern oder sonstigen unerwünschten Kontaminationen wurden PCR-Produkte ebenso wie Restriktionsansätze aufgereinigt. Dazu wurde das Nucleo Spin Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die Reinigung basiert auf der in Anwesenheit chaotroper Salze entstehenden Bindung von Nukleinsäuren an die Silikamembran der Zentrifugationssäule. Die an die Membran gebundene DNA wurde durch einen Puffer mit geringer Ionenstärke und leicht alkalischem pH-Wert eluiert. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller angegeben.

Zunächst wurde das PCR-Produkt oder der Restriktionsansatz mit sterilem Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 200 µl des NT-Puffers versetzt. Wenn die DNA aus einem Agarosegel isoliert wurde, wurde der Gelblock in ein Eppendorfgefäß überführt und NT-Puffer dazu pipettiert, wobei auf 100 mg Gel 200 µl Puffer kam. Das Lösen des Gels erfolgte bei 60 °C für 10 min. Anschließend wurde dieser Ansatz auf eine Nucleo-Spin-Extract-Säule in einem 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde die beladene Säule für eine Minute bei 12800 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurde die Membran mit 700 µl Waschpuffer (NT3) gewaschen und somit Proteinverunreinigungen und Salze entfernt. Die beladene Säule wurde für eine Minute bei 12800 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und anschließend bei 12800 rpm für zwei Minuten getrocknet. Zur Elution wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die gereinigte DNA durch Zugabe von 25 µl Elutionpuffer (NE) oder DDW und Zentrifugation für eine Minute bei 12800 rpm eluiert.

#### 3.3.11 Ligation

Der Ligationsansatz wurde nach Herstellerangaben in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf-Gefäß zusammen pipettiert und für eine Stunde bei 22 °C mit T4-DNA-Ligase oder 5 min mit Quick-Ligase inkubiert. In der Regel wurden Vektor und Fragment-DNA-Moleküle in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt.

#### 3.3.12 Dialyse

Zur Entsalzung von DNA für die Elektroporation wurde DNA-Lösung über eine Dialysemembran (Millipore, Porengröße: 0,025 µm) für 20 min gegen DDW dialysiert.

#### 3.3.13 *In vitro* Amplifikation von zirkulärer DNA

Die Methode ermöglichte eine *in vitro* Amplifikation von zirkulärer DNA durch Einsatz einer thermoresistenten Ligase in einem PCR Ansatz. Nachdem die sequenzspezifischen Primer an die Templates gebunden und der neue Strang vollständig synthetisiert wurde, schließt die Ligase die Lücke, um eine zirkuläre DNA herzustellen. Diese dient in den nächsten PCR Zyklen als Template DNA. Dadurch wird die zirkuläre DNA durch PCR exponentiell amplifiziert. Die Prozedur wird als „*ligation during amplification*“ (LDA) bezeichnet und unter anderem für gerichtete Mutagenese und Detektion einer Mutation in zirkulärer DNA eingesetzt (Chen & Ruffner 1998). In dieser Arbeit wurde die LDA für das Korrigieren einer Mutationsstelle verwendet.

Zu einem normalen PCR Ansatz (Tabelle 7) wurden zusätzlich die *Pfu* DNA Ligase (Agilent Technologies, Waldbronn) und ATP zugegeben. Informationen zum Ansatz und Programm finden sich in den nachfolgenden Tabellen.

Tabelle 11: Ansatz der LDA

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]	Endkonzentration
dNTPs (je 10 mM)	0,5	0,2 mM
<i>Phuion</i> PCR Puffer (5x)	5	1 x
Ligase Puffer	5	1 x
Forward-Primer (10 $\mu$ M)	1,25	0,5 $\mu$ M
Reverse-Primer (10 $\mu$ M)	1,25	0,5 $\mu$ M
ATP (5mM)	0,5	0,1 $\mu$ M
Template DNA	1	-
<i>Phusion</i> Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	0,25	0,02 U/ $\mu$ l
<i>Pfu</i> Ligase (4 U/ $\mu$ l)	0,5	0,08 U $\mu$ l
DDW	Add. 25	-

Tabelle 12: Programm einer LDA

Step	Bedingungen
1. Initial-Denaturierung	94 °C, 5 min
2. Primer-Anlagerung	62 °C, 30 s
2. Extention	72 °C, 5 min
3. Denaturierung	95 °C, 30 s
4. Primer-Anlagerung/Extension/Ligation	72 °C, 5 min
Zyklenzahl (Schritt 3-4)	30
5. Abschließende Extension	72 °C, 2 min
6. Lagerung	4 °C

Zur Prüfung der Effizienz der LDA wurde die amplifizierte Plasmid DNA in kompetente Bakterienzellen transformiert, nachdem der Amplifikationsansatz mit DpnI verdaut wurde. DpnI spaltet ausschließlich methylierte DNA: also nur die eingesetzte Template DNA und nicht die neu synthetisierte.

### 3.3.14 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation in *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 5 ml Vorkultur mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm aus Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde in 100 ml SOB-Medium überimpft und bei 18 °C bis zu einer OD<sub>620</sub> von 0,6-1,0 inkubiert. Dann wurde die Kultur in sterile Zentrifugenbecher gefüllt und 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei 5500 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen erneut bei 5500 rpm und 4 °C sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und anschließend wurden 0,75 ml DMSO langsam zugegeben. Das Gemisch wurde in Aliquots von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit Hilfe eines Hitzeschocks transformiert. Hierzu wurden vorbereitete kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. In einem Transformationsansatz wurden 2-5 µl Ligationsansatz mit 100 µl kompetenten Zellen versetzt und für 30 min auf Eis gelagert. Die Zellen wurden anschließend für 90 s im Wasserbad bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Sofort nach Ende der Inkubation wurden 900 µl eiskaltes SOC-Medium zugegeben und die Zellen dann für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Regeneration der Zellen bei 37 °C auf dem Schüttler für 30 - 60 min. Verschiedene Mengen (10 µl und 50 µl) der Zellsuspensionen wurden auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 13: Puffer für Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Puffer	Komponente	Konzentration
TB-Puffer	Pipes	10 mM
	KCl	250 mM
	MnCl <sub>2</sub>	55 mM
	CaCl <sub>2</sub>	15 mM
	Lösungsmittel: DDW pH-Wert auf 6,7 mit KOH einstellen (löst sich erst, wenn pH-Wert eingestellt wird) Mn-Salz getrennt autoklavieren	

### 3.3.15 Herstellung elektrokompetenter *L. lactis* Zellen und Elektroporation in *L. lactis*

Zur Herstellung elektrokompetenter *L. lactis* Zellen wurde eine Vorkultur über Nacht in 10 ml GM17-Bouillon bei 30 °C inkubiert. Die Kultur wurde in 100 ml SGM17-Bouillon mit 1% Glycin überimpft und bei 30 °C bis zu einer OD<sub>620</sub> von 0.6 inkubiert. Dann wurden die Zellen bei 4416 rpm und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die sedimentierten Zellen zweimal mit Elektroporationspuffer gewaschen (3200 x g, 15 min, 4 °C) und das gewaschene Sediment in 2 ml Elektroporationspuffer resuspendiert. Zuletzt wurden die Zellsuspensionen als 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Elektroporation wurden 50 ng dialysierte oder gereinigte DNA mit 100 µl auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Zellen versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und sofort mit einem Elektroporator 2510 (Eppendorf, Hamburg) mit der Einstellung von 2050 V elektroporiert. Danach wurde 1 ml vorgewärmtes SGM17MC-Medium auf den Elektroporationsansatz gegeben und die Zellen 2 h in einem Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 1 min bei 11000 rpm abzentrifugiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgenommen. Die Bakterien wurden im Restmedium resuspendiert und auf Agarplatten, die Antibiotika zur Selektion transformationspositiver Klone enthielten, ausgebracht. Die Platten wurden bei 30 °C für 2 Tage inkubiert.

Tabelle 14: Elektroporationspuffer für die Herstellung kompetenter Laktokokken Zellen

Puffer	Komponente	Konzentration
Elektroporationspuffer	Saccharose	0,5 M
	Glycerol	10,0 % (v/v)

### 3.3.16 Konstruktion von Plasmiden

#### 3.3.16.1 Klonierung in Vektor pSmart

Durch die Klonierung der *prtB*-Gen tragenden Fragmente in den Vektor pSmart wurden 8 Plasmide hergestellt.

Tabelle 15: Übersicht der Plasmide aus der Klonierung mit Vektor pSmart

Bezeichnung	Plasmid	Insert-kodierender Bereich der Protease	Ziel
pBL1	pSmartprtB202	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B-, „H <sup>c</sup> - und W-Domäne des PrtB202	Sequenzieren des Primer-bindenden Bereiches
pBL2	pSmartprtB59	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B-, „H <sup>c</sup> - und W-Domäne des PrtB59	
pBL3	pSmartprtBPro+B59	Pro-, Kat-, A- und B-Domäne	Co-Klonierung zur Herstellung der entsprechenden Schnittstellen
pBL4	pSmartprtBPro-B59	Kat, A- und B-Domäne	
pBL5	pSmartprtBPro+B202	Pro-, Kat-, A- und B-Domäne	
pBL6	pSmartprtBPro-B202	Kat-, A- und B-Domäne	
pBL11	pSmartprtBPräH59	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B- und „H <sup>c</sup> -Domäne	
pBL12	pSmartprtBPräH202	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B- und „H <sup>c</sup> -Domäne	

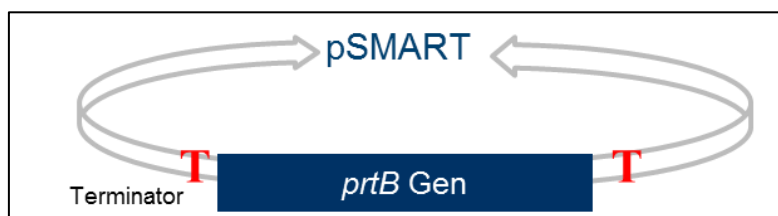


Abbildung 5: Aufbau eines Plasmids aus pSmart-Klonierungen mit dem Insert

In den jeweiligen Plasmiden kodiert das Insert ein individuelles Proteaserivat (Info über das Insert siehe Tabelle 15). T: Terminator vom Vektor pSmart. Das Insert in pBL1/2 *prtB*202/059 entspricht dem intakten Protease-kodierenden Bereich der Protease aus 92202/92059. Das PrtB setzt sich aus Prä-, Pro-, Kat, A-, B-, „H<sup>c</sup>- und W-Domäne.

a) pBL1 und pBL2

Das Plasmid pSmart wurde mit dem Enzym EcoRV geschnitten. Mit den Primern prtB-For und prtB-Rev wurde das *prtB*-Gen aus chromosomaler DNA von Isolat 92059 (für pBL2) bzw. 92202 (für pBL1) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit dem Plasmid pSmart ligiert und in kompetente Zellen *E. coli* DH5a transformiert.

b) pBL3, pBL4, pBL5, pBL6, pBL11, und pBL12

Das Plasmid pSmart wurde mit dem Enzym EcoRV geschnitten. Mit den Primern F NcoI-prtB59/202-Pro+ und R-prtB59/202-XbaI-B wurde das Gen *prtB*Pro+B59/202 mit Pro-Domäne-kodierenden Bereich bis zur B-Domäne aus chromosomaler DNA amplifiziert. Das amplifizierte Gen *prtB*Pro+B59 entsprach die Nukleotidsequenzen 158 bis 4743 aus dem *prtB*92059, das Gen *prtB*Pro+202 die Nukleotidsequenzen 157 bis 4740 von dem *prtB*92202. Zur Herstellung der Konstrukte pBL3 und pBL5 wurden die PCR-Produkte mit dem Plasmid pSmart ligiert und in *E. coli* DH 5a transformiert.



Für die Konstruktion von pBL4 und pBL6 wurden die Primer F NcoI-prtB-Pro- und R prtB-XbaI-B analog wie bei pBL3 und pBL4 eingesetzt. Das amplifizierte Gen *prtB*Pro-B59 enthielte die Nukleotidsequenzen 631-4743 aus dem Proteasegen *prtB*92059 und das Gen *prtB*Pro-B202 die Nukleotidsequenzen 631-4740 aus dem *prtB*92202.

Für die Plasmide pBL11 und pBL12 wurden die Primer F NcoI-prtB-Prä und R prtB-XbaI-H verwendet. Daraus wurden das Gen *prtB*PräH59 mit der Nukleotidsequenzen 55 bis 5069 vom Proteasegen *prtB*92059 und das *prtB*PräH202 mit der Nukleotidsequenzen 55 bis 5447 vom *prtB*92202 amplifiziert

### 3.3.16.2 Klonierung in Vektor pBad -pBL7, pBL8, pBL9, pBL10 und pBL14

Das Plasmid pBad wurde zuvor mit NcoI und XbaI geschnitten, wodurch der Bereich zwischen den Schnittstellen entfernt wurde. Parallel wurde das zu klonierende Fragment aus den entsprechenden pSmart-Plasmiden (pBL3, pBL4, pBL5, pBL6 und pBL11) durch Restriktionsverdau mit NcoI und XbaI herausgeschnitten, anschließend mit dem pBad Vektor ligiert und in *E. coli* LMG194 transformiert.

Tabelle 16: Übersicht der Plasmide aus der Klonierung mit Vektor pBad

Bezeichnung	Plasmid	Insert-kodierender Bereich der Protease	Ziel
pBL7	pBad <i>prtB</i> Pro+B59	Pro-, Kat-, A- und B-Domäne	Expression des Protease-Derivats PrtB117
pBL8	pBad <i>prtB</i> Pro-B59	Kat-, A- und B-Domäne	Expression des Protease-Derivats PrtB116
pBL9	pBad <i>prtB</i> Pro+B202	Pro-, Kat-, A- und B-Domäne	Expression des Protease-Derivats PrtB122
pBL10	pBad <i>prtB</i> Pro-B202	Kat-, A- und B-Domäne	Expression des Protease-Derivats PrtB123
pBL14	pBad <i>prtB</i> PräH59	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B- und „H“-Domäne	Fusion MycHis-tag aus pBad mit dem Insert <i>prtB</i> PräH59

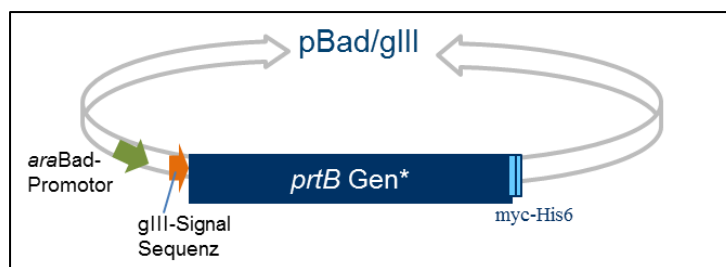


Abbildung 6: Aufbau eines Plasmids aus pBad-Klonierungen mit dem Insert  
 Das Insert kodiert das zu exprimierende Protease-Derivate (Info über das Insert siehe Tabelle 16).

### 3.3.16.3 Klonierung in Vektor pNZ8048 bzw. pNZssp

#### a) pBL15 und pBL16

Die Plasmide pNZ8048 und pNZssp wurden jeweils mit NcoI und Eco35kI geschnitten und dadurch wurde der Bereich zwischen den Schnittstellen entfernt. Mit den Restriktionsenzymen NcoI und PmeI wurde das Plasmid pBL14 verdaut und dadurch das *prtB*PräH59-Gen und Myc- bzw. His-Tag herausgeschnitten. Anschließend wurde das Fragment mit dem vorverdauten pNZ8048 und pNZssp ligiert und in *L. lactis* NZ9000 transformiert. Dadurch wurden die Plasmide pBL15 und pBL16 konstruiert.

#### 3.3.16.4 b) pBL17, pBL18 und pBL19

Das Insert *prtB*PräH202 mit den Schnittstellen NcoI und XbaI in pBL12 wurde gegen das Insert *prtB*PräH59 in pBL15 ausgetauscht und somit das Plasmid pBL17 konstruiert. Zur Herstellung der Konstrukte pBL18 und pBL19 wurde das Insert *prtB*PräH59 in pBL16 durch die Fragmente *prtB*Pro+59 vom pBL7 und *prtB*Pro+202NX<sub>2</sub> vom pBL13 ersetzt.

Tabelle 17: Übersicht der Plasmide aus der Klonierung mit Vektoren pNZ8048 und pNZssp

Bezeichnung	Plasmid	Insert-kodierender Bereich der Protease	Ziel
pBL15	pNZ8048 <i>prtB</i> PräH59His	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B- und „H <sup>c</sup> -Domäne	Einfügen des MycHis-tag in den Vektor pNZ8048 bzw. Expression des Protease-Derivats PrtBb
pBL16	pNZssp <i>prtB</i> PräH59His	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B- und „H <sup>c</sup> -Domäne	Einfügen des MycHis-tag in den Vektor pNZssp
pBL17	pNZ8048 <i>prtB</i> PräH202His	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B- und „H <sup>c</sup> -Domäne	Expression des Protease-Derivats PrtB7
pBL18	pNZssp <i>prtB</i> Pro+B59His	Pro-, Kat-, A- und B-Domäne	Expression des Protease-Derivats PrtB2
pBL19	pNZssp <i>prtB</i> Pro+B202NX <sub>3</sub> His	Pro-, Kat-, A- und B-Domäne	Expression des Protease-Derivats PrtB1

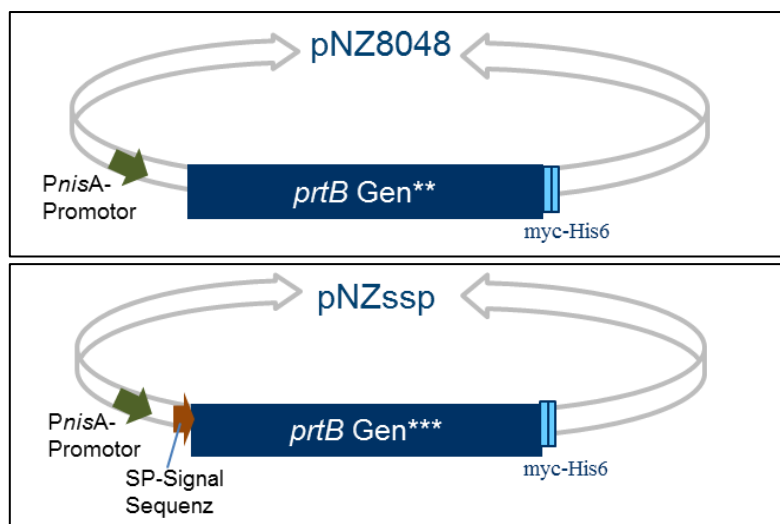


Abbildung 7: Aufbau eines Plasmids aus pNZ8048(oben) und pNZssp(unten)-Klonierungen

Das Insert kodiert das zu exprimierende Proteasederivat (Info über das Insert siehe Tabelle 17).

### 3.4 Biochemische Methoden

#### 3.4.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

##### 3.4.1.1 Expressionssystem in *E. coli* mit pBad Vektor

Die Expression des Ziel-Proteins erfolgte zuerst in *E. coli* LMG194 mit dem pBad Vektor.

Der Vektor pBad/GIIIA (Life Technologies, Darmstadt) enthält einen Polylinker, der unter der Kontrolle des *araBAD* Promotors steht. Der *araBAD* Promotor wird durch den Transkriptionsregulator AraC reguliert (Abbildung 8). Im nicht induzierten Zustand bindet das AraC Dimer an die regulatorischen Elemente  $O_2$  und  $I_1$  des *araBAD* Operons, sodass eine Loop Struktur gebildet wird und keine Transkription stattfinden kann. Die Expression des rekombinanten Proteins wird durch Zugabe von L-Arabinose eingeleitet. Dabei verlässt die an die  $O_2$ -Stelle des Operons gebundene C-terminale DNA Bindungsdomäne des AraC-Dimers ihre Position und bindet an die  $I_2$ -Stelle des Operons. Dadurch wird die Loop Struktur freigesetzt und die Transkription ermöglicht (Soisson *et al.* 1997). Die basale Expression kann durch die Zugabe von Glucose ins Medium reprimiert werden, weil Glucose zur Reduktion des cAMP Levels und somit zur Katabolitrepression der Expression des pBad-Promotors führt. Dieses System wird vor allem zur Expression wachstum-inhibierender Proteine eingesetzt (Hirsh & Schleif 1977). Über das GIII Signal ist es möglich das produzierte Protein in den periplasmatischen Raum zu sekretieren.

Das exprimierte Genprodukt trägt einen His<sub>6</sub>-Tag am C-Terminus, der zur Aufreinigung und spezifischen Detektion des Enzyms verwendet wird. Außerdem besitzt der Vektor pBad/GIII eine Ampicillin-Resistenz, die als Selektionsmarker dient.

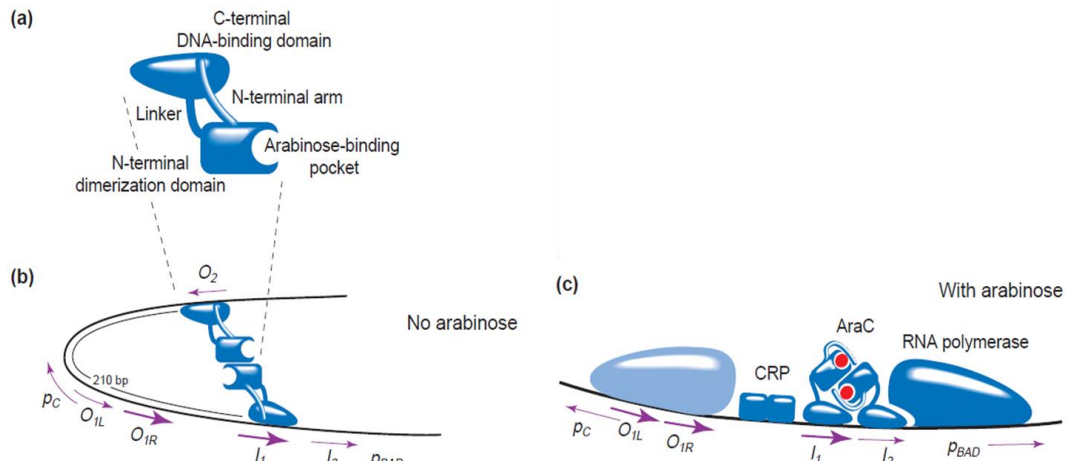


Abbildung 8: Mechanismus der Regulation von L-Arabinose Operon durch Arabinose

Dargestellt sind die Domänenstrukturen einer Dimer-bildenden AraC-Einheit (a) und der pBAD regulatorischen Region in Abwesenheit (b) und Anwesenheit (c) von Arabinose (Schleif 2000).

In Abwesenheit von Arabinose binden beide C-terminale Bindungsdomänen des AraC Dimers an O<sub>2</sub>- und I<sub>1</sub>-Stelle des *araBAD* Operons. Dadurch kann die RNA Polymerase nicht an den Promotor binden, sodass keine Transkription stattfindet. In der Anwesenheit von Arabinose ist die Konformation des AraC Dimers so verändert, dass es an die I<sub>1</sub>- und I<sub>2</sub>-Stellen des *araBAD* Operons bindet und so die Loop-Struktur auflöst. Dadurch ist der Promotorbereich für die RNA Polymerase und das cAMP Regulator Protein (CRP) zugänglich und die Transkription wird ermöglicht.

### 3.4.1.2 Induktion *E. coli* pBad System

Für die Expression wurde das Plasmid in den Stamm *E. coli* LMG194 transformiert. Mit einer einzelnen Kolonie des rekombinanten Stammes wurde RM-Medium (20 ml in 100 ml Schikanekolben) mit entsprechendem Selektionsmarker beimpft und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Die Hauptkultur (750 ml in einem 2-L Schikanekolben) wurde mit 5 ml der Vorkultur beimpft und bei 37 °C mit einer Drehzahl von 100 rpm bis zu einer OD<sub>620</sub> von 0,5 angezogen. Die Induktion erfolgte bei einem OD<sub>620</sub>-Wert von 0,5 mit 7,5 ml 20 %iger L-Arabinose Lösung. Die Zellen wurden weiter bei 25 °C kultiviert und 17 bis 20 h nach der Induktion geerntet. Dazu wurde die Kultur für 30 min bei 7000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.4.1.3 Zellaufschluss der *E. coli* Zellen

Zur Gewinnung der intrazellulären Produkte aus *E. coli* wurde eine 40 %ige

Zellsuspension hergestellt, indem 1 g der gefrorenen Zellen in 1,5 ml Äquilibrierungspuffer für His-Tag Aufreinigung resuspendiert und auf Eis gelagert wurde. Jeweils 1,5 ml der Resuspension wurde zu 900 mg Glasperlen ( $\varnothing$  0,11 mm, B. Braun) in ein 2 ml-Schraubdeckelgefäß gegeben. Nach vollständiger Resuspension wurde die Zellsuspension in der Zelmühle (FastPrep FP120, Thermo Savant) 10 mal für 30 sec bei 6.0 m/s gemahlen. Zwischendurch wurde die Probe jeweils 30 sec auf Eis gekühlt. Die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (13.000 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand mit einer Pipette abgenommen, durch einen 0,45  $\mu$ m Cellulose-Acetatfilter (Sartorius, Göttingen) filtriert und als Rohextrakt für die Aufreinigung eingesetzt. Ein Aliquot des Rohextraktes und des Pellets wurden für SDS-PAGE und Western Blot Analysen bei -20 °C eingefroren.

### 3.4.2 Expression rekombinanter Proteine in *L. lactis*

#### 3.4.2.1 Nisin-Controlled Gene Expression (NICE) System

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche genetische Werkzeuge für MSB entwickelt. Dazu gehören die Entwicklung der Transformation, die Isolierung und Charakterisierung Plasmid-freier Stämme, Klonierungsvektoren, effiziente Promotoren und die funktionelle Analyse vieler Gene und deren Genprodukte, die die Eigenschaften fermentierender Milchprodukte verbessern können (Kuipers *et al.* 1997; Gasson 1983). Verschiedene Expressionssysteme mit stabilem, breitem Wirtsbereich, Vektoren und konstitutive Promotoren wurden bisher für MSB beschrieben. Die Expression wurde dabei durch verschiedene physikalische und chemische Signale induziert: durch pH-Wert-Änderung, durch Temperatur-Änderung, durch Zugabe von Salz, Zuckern, Fettsäuren oder Peptiden. Ein induzierbares und dicht kontrollierbares Expressionssystem, das *Nisin Controlled Gene Expression* (NICE) System, wurde im Jahre 1995 vorgestellt und für die regulierte Genexpression in MSB verwendet (Kuipers *et al.* 1995; Kuipers *et al.* 1998). Es basiert auf der Autoregulation der Synthese von Nisin in *L. lactis*. Nisin ist ein post-translational modifiziertes antimikrobielles Peptid, das als Konservierungsstoff für Lebensmittel in vielen EU Länder zugelassen ist. Es wird von einigen *L. lactis* Stämmen produziert, und seine Synthese ist durch ein Gencluster mit den 11 Genen *nisABTCIPRKFE*G kodiert (Abbildung 9), wobei *nisA* das Strukturgen für Nisin ist. Die anderen Gene sind an der Modifizierung (*nisB* und *nisC*), Translokation (*nisT*), Prozessierung (*nisP*) und Immunität gegen Nisin (*nisI*, *nisF*, *nisE* und *nisG*) beteiligt. Die Regulation der Expression wird durch *nisR* und *nisK* kodiert (Mierau & Kleerebezem 2005; Kuipers *et al.*

1995). Bei der Regulierung der Expression handelt es sich um ein Zwei-Komponenten-Signal-Transduktionssystem. Dies besteht aus einer Histidin-Protein-Kinase (NisK) und einem Response-Regulator (NisR) (Mierau & Kleerebezem 2005).

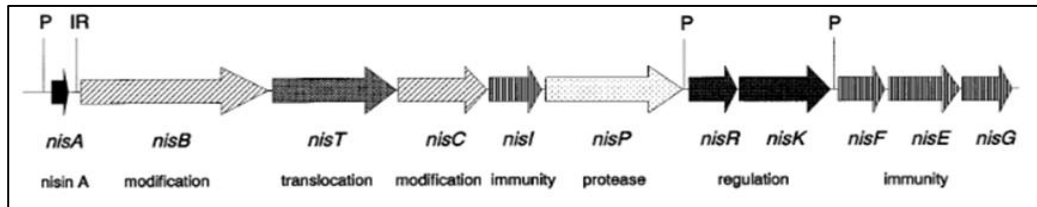


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Nisin-Gen-Clusters

P steht für Promoter; IR steht für Intervall-Region; P<sub>nisA</sub> und P<sub>nisF</sub> werden durch Nisin induziert (Kuipers *et al.* 1995).

Die Transkription des Gen-Clusters wird durch Nisin induziert, welches an NisK bindet. Dabei wird NisK autophosphoryliert und die Phosphatgruppe auf NisR übertragen. Dadurch ist NisR aktiviert und die Transkriptionen der Promotoren NisA und F wurden induziert. Der P<sub>nisA</sub>-Promotor wurde bereits in verschiedenen Expressionsvektoren (pNZ8048 und pNZ8037) kloniert und die regulatorische Einheit, nisK/nisR, wurde auf einem Plasmid (pNZ9520/pNZ9530) bereitgestellt oder in das Chromosom von *L. lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 (Nisin-negativ) integriert. Die Expression eines Gens konnte durch Zugabe von subtoxischen Mengen an Nisin (0,1-14 ng/ml) induziert und dosisabhängig reguliert werden, wenn das Gen stromabwärts des P<sub>nisA</sub> kloniert und das Konstrukt in den Stamm transformiert wurde, der *nisRK* enthielt (de Ruyter *et al.* 1996). In Abhängigkeit von einer Signalsequenz wurde das Produkt entweder in der Zelle akkumuliert oder in das Medium sekretiert (Mierau & Kleerebezem 2005).

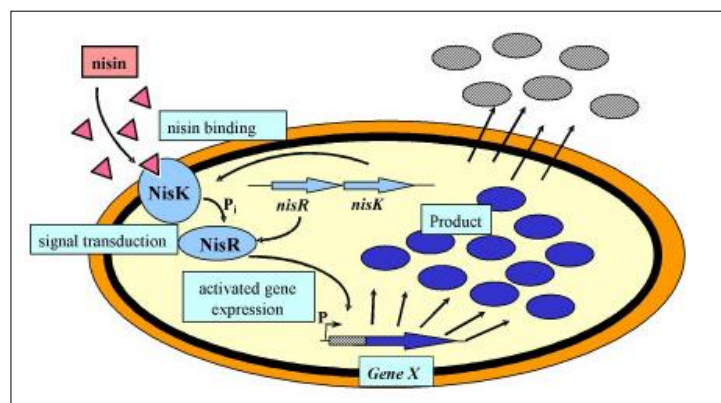


Abbildung 10: Schematische Darstellung des NICE-Systems in der Zelle

Dargestellt ist die Bindung von Nisin an NisK, die Signaltransduktion über NisK und NisR, die aktivierte Genexpression vom Promotor P<sub>nisA</sub> und die Produktion von Protein intrazellulär bzw. sekretiert (Mierau

& Kleerebezem 2005).

Das NICE System wurde bereits für Expressionen unterschiedlicher Genprodukte eingesetzt, wie homologe und heterogene bakterielle Proteine, Membranproteine, sekretierte Proteine und toxische Genprodukte. Das produzierte Protein konnte dabei bis zu 60 % des gesamten intrazellulären Proteins ausmachen (Kleerebezem *et al.* 1997).

#### 3.4.2.2 Induktion der Expression in *L. lactis*

Die Plasmid-tragenden Stämme wurden 1 %ig in GM17-Medium mit den benötigten Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Hauptkultur wurde 2,5 %ig mit Vorkultur angezogen und bei einer OD<sub>620</sub> von ca. 0,8 mit einer Nisin-Konzentration von 10 ng/ml induziert. Anschließend wurde sie für weitere 3 h bzw. über Nacht inkubiert und danach der Kulturüberstand durch Zentrifugation (8200 x g, 20 min, 4 °C) gewonnen. Der pH-Wert des Überstands wurde gemessen und mit 3 N NaOH auf 7 eingestellt, bevor das rekombinante Protein mittels Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure (Ni<sup>2+</sup>-NTA) Agarose Säulenchromatographie gereinigt wurde.

#### 3.4.3 His-Tag Aufreinigung

Das PrtB mit C-terminalem His-Tag wurde über Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose Säulen (Novagen, Darmstadt) isoliert. Die Säulen wurden mit 5-fachem Säulenvolumen an Äquilibriumspuffer äquilibriert. Danach wurden bei Expression in *L. lactis* 2 ml Säulenmaterial pro 100 ml Kultur-Überstand unter leichtem Schwenken für 30 min bis 1 h inkubiert und dann auf Säule gegeben, während bei *E. coli* bis zu 6 ml Rohreextrakt zu 2 ml Säulenmaterial gegeben und 30 min inkubiert wurde. Nachdem die Probe durch die Säule durchgeflossen war, wurde die Säule mit 5-fachem Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen und zum Ende mit 2- bis 3-fachem Säulenvolumen Elutionspuffer eluiert. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert. Für denaturierte Aufreinigung wurde Harnstoff (8M) in den Puffern zugesetzt und Renaturierung erfolgt durch einen Umpuffer-Schritt in den „Zymogram Renaturing Buffer“ (ThermoFischer).

Tabelle 18: Puffer für die His-tag Aufreinigung

Puffer	Komponente	Konzentration
Äquilibriumspuffer (pH 8,0)	HEPES	50 mM
	NaCl	300 mM
Waschpuffer	HEPES	50 mM

(pH 8,0)	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
Elutionspuffer (pH 8,0)	HEPES	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM

#### 3.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem NanoDrop (Thermoscientific) und dem Modul *Protein A280* ermittelt. Dafür wurde 1 µl Probe auf die untere Messoberfläche des Geräts pipettiert und mit dem Lösungsmittel, das als Blank gemessen wurde, abglichen.

#### 3.4.5 Konzentrierung von Proteinen

Die Konzentrierung der gereinigten Protease-Derivate wurde mit Hilfe von Ultra-Zentrifugationsfilter mit einer Durchlässigkeit (*molecular weight cut-off*) von 30 kDa durchgeführt (Amicon Ultra-0,5 ml, Millipore, Darmstadt). Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C und 5000 rpm bis das erwartete Volumen erreicht war.

Das gesamte Protein aus dem Kulturüberstand des Expressionsstammes *L. lactis* wurde mittels Acetonfällung konzentriert. Der Überstand wurde 1:1 mit eiskaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte einen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14 000 rpm für 30 min. Das Pellet wurde mit DDW im gewünschten Volumen aufgenommen.

#### 3.4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung der Proteine unter reduzierenden Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewichtes. Durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) in den "Loading Dye" werden die Disulfidbrücken im Protein reduziert. Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) überdeckt anschließend die Eigenladungen von Proteinen. Pro 1 g Protein binden ungefähr 1,4 g SDS, sodass die Proteine eine konstante negative Überschussladung aufweisen. Die mit SDS beladenden Proteine werden im elektrischen Feld über ihre Größe getrennt.

Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 19 beschrieben. Die Proben wurden mit 6-fach konzentriertem SDS Loading Dye versetzt und nach einer Erhitzung für 10 min bei 95 °C in die Geltaschen eingebracht. Von den Proben wurden jeweils 35 µl



aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurden 5 µl eines Größenmarkers (Protein Marker VI prestained, Appllichem, Darmstadt) auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 200 V für 60-90 min bei Raumtemperatur. Zur Auswertung wurden die Gele nach Abschluss der Elektrophorese mit der Färbelösung InstantBlue (Expedeon, Deutschland) gefärbt bzw. geblottet.

Tabelle 19: Puffer für SDS-PAGE

Puffer/Lösung	Komponente	Konzentration	
10 x SDS Laufpuffer	Tris-HCl	250 mM	
	Glycin	1,9 M	
	SDS	0,5%(W/V)	
	Lösungsmittel: DDW		
6 x SDS Loading Dye	Tris-HCl pH 6,8	50 mM	
	Glycerol (87%)	1,2 %	
	DTT	100 mM	
	SDS	2 %	
	Bromphenolblau	0,1 %	
	Lösungsmittel: DDW		
Trenngel (für 2 Gele)		15 %	6 %
	DDW	7,1ml	11,6 ml
	Acrylamid-Mix (40 %)	7,5 ml	3 ml
	Tris (1,5 M, pH 8,8)	5 ml	5 ml
	10% SDS (µl)	200 µl	200 µl
	10% APS (µl)	200 µl	200 µl
	TEMED	20 µl	20 µl
Sammelgel (5 % für 2 Gele)	DDW	2,185 ml	
	Acrylamid-Mix (40 %)	375µl	
	Tris (1,5 M, pH 6,8)	380 µl	
	10% SDS	30 µl	
	10% APS	30 µl	
	TEMED	3 µl	

### 3.4.7 Western Blot

Das mit Hilfe einer SDS-PAGE in einer Proteinlösung aufgetrennte Zielprotein kann durch den Einsatz eines Immuno-Blots identifiziert werden. Das Semidry-Blot-System ist ein schnelles Verfahren, um Proteine elektrophoretisch auf eine Membran zu

übertragen. Die auf der Membran immobilisierten Proteine können spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen werden. Die Antikörper sind häufig mit einem Enzym konjugiert, welches den Umsatz eines Substrats katalysiert, der zu einem irreversiblen Farbniederschlag führt.

Mit dem Semidry-Blot-Modul wurden die Proteine ausgehend von einem ungefärbten Gel auf eine PVDF-Membran (Porablot PVDF-Membran, Porenweite 0,2  $\mu\text{m}$ , Macherey Nagel, Düren) durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel übertragen. Dafür wurde die PVDF-Membran erst in 98 %iges (v/v) EtOH gelegt und dann kurz in Friendly-Towbin Puffer äquilibriert. Genauso wurden das SDS-Gel und das Filter-Papier in Friendly-Towbin Puffer äquilibriert. Die Blottingeinheit wurde wie in Abbildung 11 aufgebaut und das Blotten erfolgte für 30 min bei 10 V.

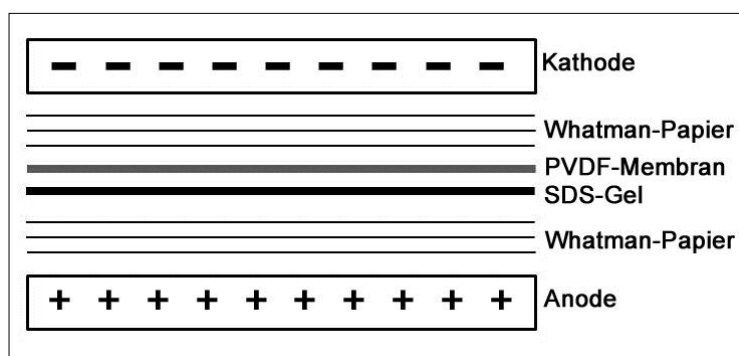


Abbildung 11: Aufbau eines Semidry-Blots

Zum Nachweis des Zielproteins wurde in dieser Arbeit ein mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Anti-His6-Antikörper (Roche, Penzberg) verwendet, der spezifisch für sechs aufeinanderfolgende Histidine war. Das hinzugefügte BM Peroxidase (POD) Blue Substrat (Roche, Penzberg) wurde enzymatisch durch die Peroxidase zu einem bräunlichen Farbstoff umgesetzt. Nach abgeschlossenem Transfer wurde die Membran 1 h bis über Nacht unter leichtem Schwenken mit Blockinglösung inkubiert, um die freien Bindungsstellen zu blockieren. Nachfolgend wurde die Membran unter Schütteln für 1-2 h in Blockingpuffer mit Anti-His6-Peroxidase Antikörper (Roche, Penzberg) inkubiert. Durch dreimaliges, fünfminütiges Waschen mit PBS-Tween wurden anschließend unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Der Nachweis erfolgte durch Zugabe von 1 ml BM POD Blue Substrat. Nach einer deutlichen Braunfärbung wurde die Reaktion durch DDW gestoppt.

Tabelle 20: Puffer und Lösungen für Western Blot

Puffer/Lösung	Komponente	Konzentration
Friendly-Towbin-Puffer	Tris-HCl pH 8,5	25,0 mM
	Glycin	192,0 mM
	2-Propanol	5,0 % (v/v)
	Lösungsmittel: DDW	
10 x PBS (pH 7,3)	NaCl	1,4 M
	KCl	27 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
	Lösungsmittel: DDW	
PBS-Tween-20	1 x PBS	
	Tween 20	0,1 %
	Lösungsmittel: DDW	
Blockinglösung	Milchpulver	3 %
	Lösungsmittel: PBS-Tween	
Waschlösung	Milchpulver	0,5 %
	Lösungsmittel: PBS-Tween	

### 3.4.8 Untersuchung der proteolytischen Aktivität

#### 3.4.8.1 Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Test

Zum Überprüfen der proteolytischen Aktivität der gereinigten Protease-Derivate wurde FITC-markiertes Casein (Sigma-Aldrich) als Substrat eingesetzt. Proteolytische Aktivität führt zur Spaltung des FITC-markierten Caseins in kleine Peptide. Diese sind unter sauren Bedingungen löslich, während das ungespaltene Casein durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) ausfällt. Die Probenansätze sind in Tabelle 21 dargestellt. Eine weitere Inkubation für 30 Min bei 37 °C schloss sich an die Zugabe von TCA (150 µl) an. Nach einer Zentrifugation bei 4 °C und 14000rpm für 30 Min wurde der Überstand abgenommen und mit Tris-HCl pH 8,5 1:20 verdünnt (1:200 für den 100%-Wert) und gleichzeitig neutralisiert. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte bei einer Anregung von 490 nm und bei einer Emission von 530 nm. Dabei stieg die Fluoreszenzintensität proportional zur proteolytischen Aktivität der Protease an. Für jede Messung wurde parallel zur Probe ein Leerwert mitgemessen, dessen Wert bei der Berechnung von der Fluoreszenz der Probe abgezogen wurde. Zusätzlich wurde ein 100%-Wert angesetzt, der einer vollständigen Umsetzung des Caseins entsprach und für

die Berechnung des Umsatzes der Probe herangezogen wurde.

Tabelle 21 : Ansatz und Ablauf des FITC-Tests

Komponente	Leerwert	100%-Wert	Probe
Tris-Calcium (TC) Puffer	20 µl	30 µl	20 µl
FITC Casein (5 mg/ml)	20 µl	20 µl	20 µl
DDW	10 µl	-	-
Probe	-	-	10 µl
Inkubation bei 37 °C, 3 h oder über Nacht unter Lichtabschluss			
TCA	150 µl	-	150 µl
DDW		150 µl	
30 min bei 37 °C weiter inkubieren, Zentrifugation bei 4 °C, 14000 rpm für 30 min, Überstand abnehmen und mit Tris-HCl Puffer pH8,5 1:20 verdünnen (100%-Wert 1:200 verdünnen) und messen			

#### 3.4.8.2 Untersuchung der Caseinhydrolyse mittels SDS-PAGE

Die Hydrolyse von Casein mit dem gereinigten Enzym konnte neben dem FITC-Test auch mittels SDS-PAGE beurteilt werden. Die Hydrolyse setzte sich wie bei dem FITC-Test aus 20 µl Casein (5 mg/ml in DDW), 20 µl TC Puffer und 10 µl Enzym zusammen und fand bei 37 °C über einen Zeitraum von 20 Stunden statt. Ein Mastermix für die Probe zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde angesetzt und in 50 µl aliquotiert. Zum Vergleich wurde eine Kontrolle ohne Enzyme für die Zeitpunkte Null bzw. 20 h angesetzt und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach der individuellen Inkubation wurde die entsprechende Probe bis zur Analyse eingefroren. Zur Prüfung des Hydrolysats wurde ein SDS-Gel mit 5 %igem Sammelgel und 15 %igem Trenngel verwendet. 15 µl der Probe wurden mit 3 µl SDS Loading Dye (6-fach) versetzt, bei 95 °C für 10 min gekocht und anschließend auf das SDS-Gel aufgetragen. Zum Abschätzen der Molekulargewichte der Banden auf dem SDS-Gel wurde eine Tasche mit 5 µl Protein Marker VI beladen. Die Elektrophorese erfolgte unter 200 V und 30 mA in denaturiertem SDS-Laufpuffer. Nach der Elektrophorese erfolgte eine Färbung unter leichten Schwenken in der Färbelösung bis die Banden sichtbar waren.

### 3.5 Chemisch analytische Methoden

#### 3.5.1 Charakterisierung des Caseinhydrolysats mittels HPLC

Die durch enzymatische Hydrolyse des Caseins gespaltenen Peptide wurden mittels Reversed-Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) analysiert. Der Hydrolyseansatz mit 80 ml Casein nach Hammarsten (2,5 mg/ml in TC-Puffer) und 20 ml gereinigtem Enzym wurde über 20 bis 24 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das Hydrolysat durch einen Filter (0,45 µm) filtriert bevor es mit HPLC analysiert wurde. Die Peptide wurden durch eine 250 mm RP-18-Säule (Merck Millipore, Schwalbach) mit einem Innendurchmesser von 4 mm und einer Partikelgröße von 4 µm bei 40 °C getrennt und bei 214 nm detektiert. Als mobile Phase wurden DDW mit 0,1% (v/v) einer 90 %igen Trifluoressigsäure (TFA) sowie 100 %iges Acetonitril (ACN), dem ebenfalls 0,1% (v/v) TFA zugesetzt wurde, eingesetzt. Zur Trennung wurde zunächst DDW für 5 min und anschließend ein linearer Gradient mit zunehmenden ACN Konzentration von 0 bis 35 % für 40 min mit einem Fluss von 1 ml/min eingesetzt. Im weiteren Verlauf wurde die Säule unter isokratischen Bedingungen mit 90%igen ACN für 3 min eluiert und mindestens für 5 min mit den Anfangsbedingungen reäquilibriert. Die Methode ist in Tabelle 22 zusammengefasst. Die Daten wurden mit der HPLC System Software (D-7000 HSM) aufgezeichnet und ausgewertet.

Tabelle 22: Methode der chromatographischen Trennung der Peptide an HPLC

Zeit (min)	ACN-Anteil (%)	DDW-Anteil (%)
0	0	100
5	0	100
40	35	65
50	35	65
50,1	90	10
53	90	10
53,1	0	100
60	0	100

#### 3.5.2 Trennung und Identifizierung der Peptide mittels HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>

Im Anschluss an die HPLC-Untersuchung wurde das Hydrolysat zur Identifizierung der Peptide mittels Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert. Die Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Clawin-Rädecker. Die Analyse wurde von Dr. Wutkowski und Dr. Clawin-Rädecker

durchgeführt und ausgewertet. Als Analysesystem wurde eine nHPLC (Ultimate-3000 RSLCnano System) online an einen Massenspektrometer LTQ XL (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA) gekoppelt. Die Trennung der Peptide erfolgte durch Direktinjektion über eine Reversed-Phase-Säule (PepSwift, 200µm x 25 cm, Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA) mit entsprechender Vorsäule (PepSwift Monolithic Trap, 200µm x 5 mm, Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA). Als Laufmittel wurden 0.1 % (v/v) Ameisensäure in Reinstwasser (LM A) und 0.1 % (v/v) Ameisensäure in 80% (v/v) Acetonitril (LM B) eingesetzt. Die Trennung der Peptide erfolgte mit Hilfe eines linearen Gradienten von 2 - 60% LM B in 40 min mit einem Fluss von 1 µl/min. Danach wurde die Säule für 5 min mit 90% LM B eluiert und mindestens für 15 min mit den Anfangsbedingungen reäquilibriert.

Die Massenspektren wurden im positiven Ionisierungsmodus im Bereich von 220-2000 m/z generiert. In einem Daten-abhängigen Scanmodus wurden die 3 intensivsten Ionen fragmentiert und die MS2-Spektren mit folgenden Geräteeinstellungen aufgezeichnet (activation type = CID, normalized collision energy = 35.0 eV, isolation width of 2, NSI spray voltage 2.0 kV, heated capillary temperature 200 °C). Die Datenaufzeichnung und Auswertung erfolgte mit Xcalibur version 2.2 SP1.48 (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA). Die Identifizierung der Peptidsequenzen erfolgte durch eine Datenbanksuche mit Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA) mithilfe der Suchalgorithmen SEQUEST and MASCOT. Als Datenbank wurde UniProtKB vom Oktober 2012 eingesetzt (<http://uniprot.org>) unter Beschränkung auf *Bos taurus*, jedoch erweitert auf die genetischen Varianten von β-Casein.

Die durch SPE aufgereinigten Hydrolysate (ca. 2mg/ml) wurden 1:100 mit 2% (v/v) Acetonitril mit 0.2% (v/v) Ameisensäure verdünnt und über 0,22 µm Membranfilter (Millex-GV, Syringe Driven Filter Unit,) filtriert. Es wurden jeweils 1 µl der aufgereinigten Hydrolysate mit einer Konzentration von ca. 0,02 mg/ml injiziert. Die 3-fach analysierten Proben wurden sowohl mit dem Algorithmus Sequest als auch mit Mascot ausgewertet.

### 3.5.3 Festphasenextraktion (SPE) zur Aufreinigung des Caseinhydrolysats

Für weitere Untersuchungen der aus Casein freigesetzten Peptide, wurden diese anschließend durch eine Festphasenextraktion mit einer Strata-X Chromatographie-Säule

(Phenomenex) gereinigt. Dazu wurde die Säule (Bettmasse 500 mg; Volumen 6 ml) mit 5 ml Methanol konditioniert und mit 5 ml DDW gewaschen. Anschließend wurde sie mit 50 ml Hydrolysat mit Hilfe einer Vakuumpumpe beladen. Ein Waschschrift mit 5 ml DDW schloss sich daran an. Die Durchflüsse vom Beladen und Waschen wurden gesammelt und auf Durchbruch des Peptids mittels HPLC geprüft. Die an die Säule bindenden Peptide wurden durch 70 %iges ACN mit 0,1 %igen TFA eluiert. Das ACN im Eluat wurde mit Hilfe einer Dampf-Anlage mit Stickstoffflux unter leichter Hitze von bis zu 50 °C entfernt. Der pH-Wert des Eluates wurde mit 3 N NaOH auf 7 eingestellt und danach für weitere Analysen bei 4 °C gelagert bzw. gefriergetrocknet.

#### 3.5.4 Gefriertrocknung des Caseinhydrolysats

Die Gefriertrocknung des Hydrolysats diente einerseits zur Konzentrierung und andererseits zur langen Haltbarkeit der Peptide. Dazu wurde die Peptidlösung mit einem Volumen von 1,5-2 ml in Rollrandgläschen (RRG) aliquotiert und auf eine Stellplatte gestellt. Die Stellplatte mit den RRG wurde in den Halter der Stellplatte eingebaut und über Nacht bei -60 °C eingefroren. Die Trocknung konnte gestartet werden, wenn eine Vorkühlung des Kondensators auf -80 °C erreicht war. Der Halter wurde aus der -60 °C Truhe geholt und in die Anlage verbracht. Anschließend wurden die Sonden angeschlossen und die Trocknung mit einer Haupttrocknung (Stellfläche-Temperatur -20 °C, Druck 0,1 mbar) begonnen. Nach 20 Stunden schloss sich eine Nachtrocknung an, indem die Stellflächentemperatur auf 30 °C und der Druck auf 0,01 mbar umgestellt wurden. Die Peptide wurden über mindestens weitere 20 h getrocknet und bei -20 °C gelagert. In Abbildung 12 ist der Verlauf der Gefriertrocknung aufgezeichnet.

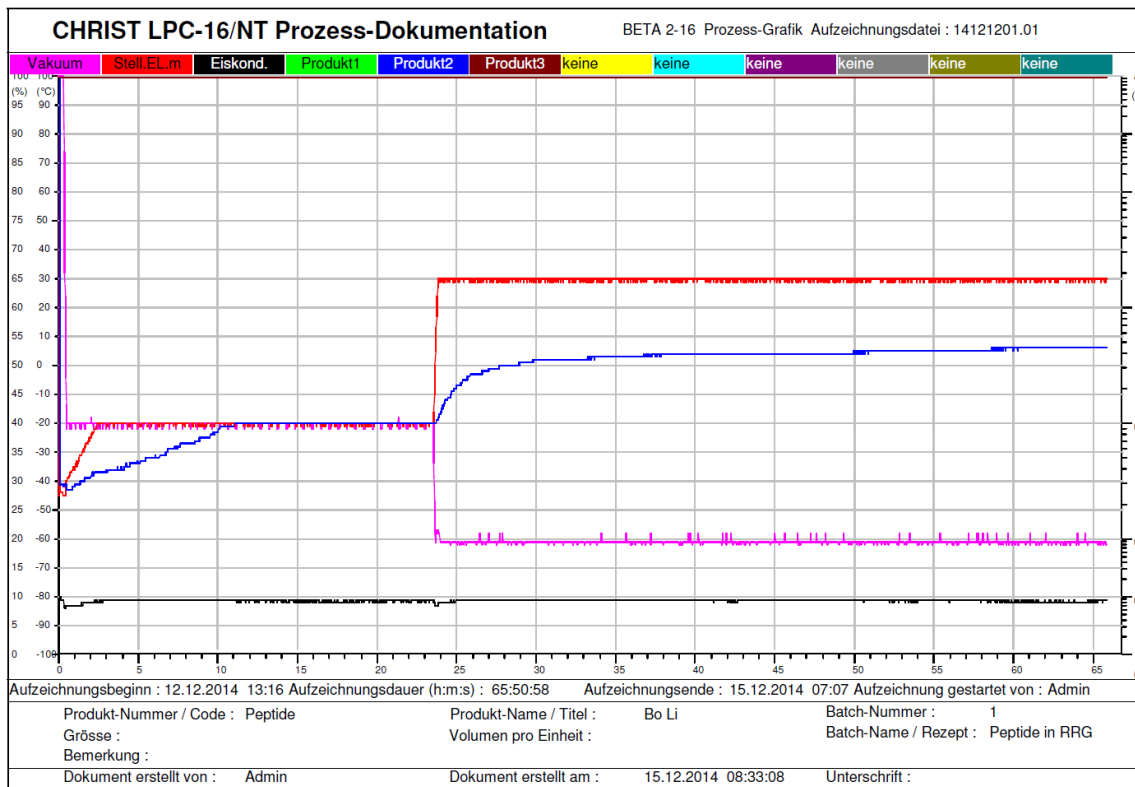


Abbildung 12: Aufzeichnung des Verlaufs einer Gefriertrocknung

Die wichtigen Parameter während der Gefriertrocknung wurden verfolgt und in der Aufzeichnung erfasst. Temperatur der Stellfläche (rot); Temperatur des zu trocknenden Produkts (blau); Temperatur des Kondensators (schwarz); Druck (pink).

### 3.5.5 Untersuchung des Caseinhydrolysats auf Bioaktivität

#### 3.5.5.1 ACE-Hemmung

Die ACE (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) katalysiert die Umsetzung von Angiotensin I zu Angiotensin II und gleichzeitig die Spaltung des Substrats FAPGG in ein Aminosäurederivat und ein Dipeptid. Die Kinetik dieser Abspaltung wird durch die Messung der Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm erfasst. Durch Zugabe von ACE-inhibitorischen Substanzen, nimmt der Abbau des Substrats aufgrund der Enzymhemmung ab.

Der Test auf ACE-inhibierende Aktivität des Peptids erfolgte mit einem Test-Kit von Bühlmann (Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz). Neben der zu untersuchenden Probe mit unterschiedlichen Peptid-Konzentrationen wurde der Inhibitor Enalapril zum Prüfen des Testsystems eingesetzt. Es folgte eine Vorinkubation der Probe bzw. des Inhibitors mit



ACE bei 37 °C für 5 min. Dazu wurden 10 µl der Probe bzw. des Inhibitors zu 40 µl des vorher hergestellten ACE-Mastermixes (10 µl ACE (0,5 U/ml) und 30 µl ACE Puffer) pipettiert. Der pH-Wert des Gemischs sollte zwischen 8,1-8,3 liegen. Aus der Vorinkubation wurden 20 µl des Analyts in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl Substrat gestartet. Die erste Messung erfolgte nach 5 min Inkubation bei 37 °C; dieser Wert wurde als Zeitpunkt Null für die Berechnung des Umsatzes eingesetzt. Nach weiterer Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Absorption nochmal gemessen. Die Differenz aus den beiden Messungen entsprach dem Substratumsatz. Die ACE-inhibierende Aktivität wurde anhand des Substratumsatzes im Vergleich zu dem Ansatz ohne Inhibitor berechnet.

Tabelle 23: verwendete Puffer und Lösung in dem ACE-Inhibition Test

Puffer und Lösungen	Komponente	Konzentration
ACE-Puffer (pH 8,2)	HEPES	25 mM
	NaCl	300 mM
Inhibitor	Enalapril	0,028 µM

### 3.5.5.2 Anti-inflammatorische Aktivität

Für die Untersuchung des anti-inflammatorischen Potentials des Caseinhydrolysats wurde ein Testsystem mit immortalisierten, semi-adhären, humanen embryonalen Nierenzellen (HEK<sup>nfκB-RE</sup>) verwendet. Die HEK<sup>nfκB-RE</sup>-Zellen waren mit dem Plasmid pGLD32.4[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] (Promega, Heidelberg, Germany) transfiziert, welches als Reporter gen das Luziferasegen *luc2P* trug. Die Expression der Luziferase steht in diesem Plasmid unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors NF-κB, der als kritisch für die Entstehung von Entzündungen gilt. Die Luziferase Expression konnte durch den TNF-α, in Abhängigkeit von der Konzentration, über den NFκB Signaltransduktionsweg induziert werden.

Die verwendeten Zellen wurden von Dr. M. Klempt (Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, MRI in Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in *Dulbeccos modified eagle-medium* (PAA, Pasching, Österreich), kurz DMEM mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich) in einer T75 Kulturflasche bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 5 % kultiviert. Nach Erreichen einer 90 %igen Konfluenz wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 25000 Zellen pro 100 µl und Well in eine 96-Well Platte umgesetzt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation

wurden die Zellen mit TNF- $\alpha$  bzw. Hydrolysat behandelt. Das Hydrolysat wurde zuvor in einer Konzentration von 5 bzw. 10 mg/ml in DMEM Medium gelöst und steril filtriert. Durch Zugabe von 50  $\mu$ l Hydrolysat und 50  $\mu$ l Medium, welches TNF- $\alpha$  enthielt (0,1 ng/ml), wurden die Zellen stimuliert. Als Kontrolle dienten 50  $\mu$ l Hydrolysat und 50  $\mu$ l Medium ohne TNF- $\alpha$ . Zu Vergleichszwecken wurde eine negative Kontrolle mit Medium anstatt des Hydrolysats mitgeführt. Eine positive Kontrolle mit BayII-7082 (20  $\mu$ M) (InvivoGene, USA), ein Inhibitor der TNF- $\alpha$  induzierten NF $\kappa$ B Aktivierung durch Inaktivierung der Phosphorylierung des I $\kappa$ B- $\alpha$  bei der Signaltransduktion, wurde parallel zu den übrigen Proben eingesetzt. Nach der Stimulation erfolgte eine weitere Inkubation für 24 h bei den oben genannten Bedingungen. Das Medium wurde nach der Inkubation entfernt und die Zellen wurden 2-mal mit 100  $\mu$ l PBS-Puffer gewaschen. Durch Einfrieren bei -80 °C und Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurden 45  $\mu$ l Substratlösung Beetle Lysis-Juice (PJK, Kleinblittersdorf) pro Well zugesetzt. Nach 10 min Inkubation wurden je 40  $\mu$ l Lösung in eine weiße 96-Well Platte überführt und in einem Plattenreader (Fa. Hidex, Turku, Finnland) wurde die Lumineszenz detektiert.

Zur Ermittlung einer passenden TNF- $\alpha$  Konzentration für die Induktion wurde ein Vorversuch mit einer Konzentrationsreihe von 0,0075 ng/ml bis 10 ng/ml TNF- $\alpha$  durchgeführt und eine Standardkurve der TNF- $\alpha$  induzierten Expression der Luziferase erstellt.

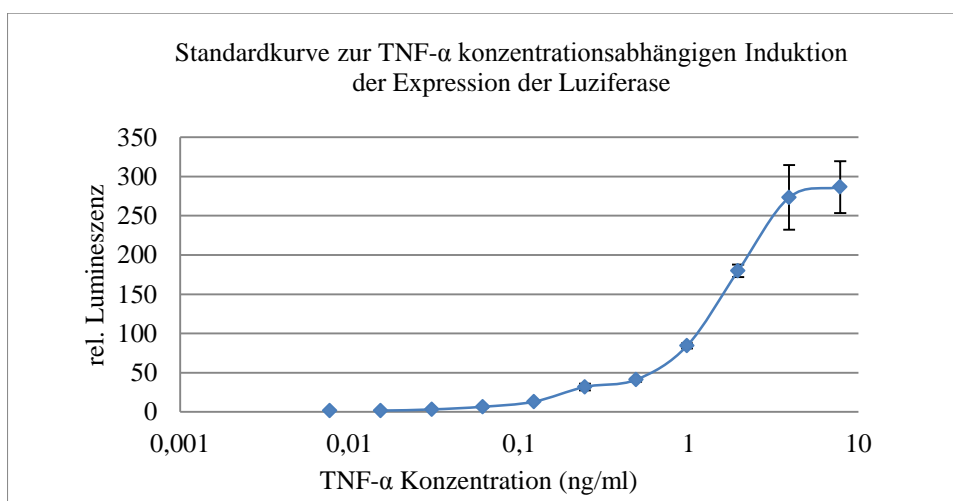


Abbildung 13: Standardkurve zur TNF- $\alpha$  konzentrationsabhängigen Induktion der Expression der Luziferase (n=3)

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Lumineszenz im Vergleich zur Kontrolle (ohne TNF- $\alpha$ ) einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten (n=3).

### 3.5.5.3 Antimikrobielle Aktivität

Die antimikrobielle Aktivität des Caseinhydrolysats wurde mit drei Stämmen: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Cronobacter sakazaki* DSMZ 4485 und *E. coli* K14 IBC 4004 untersucht. Die verwendeten Stämme wurden aus Stammsammlung von der Arbeitsgruppe Dr. Hammer angeimpft und in einem Stanzlochtest eingesetzt. Zur Durchführung wurden die zu testenden Stämme am Versuchstag in Caso-Bouillon bei 37 °C bis zu OD<sub>620</sub> von 0,1 gezogen. Anschließend wurden je 100 µl der Kultur auf einer Müller-Hinton-Agar Platte ausplattiert. Mit Hilfe einer Pipettenspitze (10 µl) wurde ein Loch in die Agar Platte gestanzt. Das Hydrolysat wurde zuvor mit Puffer (0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in einer Konzentration von 250 mg/ml gelöst und steril filtriert. Danach wurden 20 µl des Hydrolysats in ein Loch gegeben und die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle diente Puffer (0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Anhand des Wachstums der Stämme wurde die antimikrobielle Eigenschaft des Caseinhydrolysats beurteilt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Spezies Identifikation (16S rDNA Sequenzierung und physiologische Untersuchungen)

Aus dem Screening auf proteolytisch aktive MSB sind die beiden *Lactobacillus* Stämme 92059 und 92202 hervorgegangen (Dissertation Kliche, 2013). Zur weiteren Charakterisierung wurde ihre Spezies- bzw. Subspezies Zuordnung anhand der 16S rDNA-Sequenzen untersucht. Dies erfolgte durch Ermittlung der 16S rDNA-Sequenzen und eine darauf folgende Sequenzanalyse. Die 16S rDNA-Sequenzen der untersuchten Stämme und der Referenzstämme wurden mit dem Programm ARB nach der Maximum-Likelihood-Methode mit 1000 Wiederholungen berechnet und daraus der Stammbaum erstellt (Abbildung 14). Die 16S rDNA- Sequenzanalyse zeigte die größte Verwandtschaft mit Subspezies der Spezies von *Lb. delbrueckii*. Bei dem Isolat 92059 handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Bei 92202 war die Zuordnung nicht eindeutig, die 16S rDNA-Sequenz wies hohe Homologie zu den Subspezies *delbrueckii* und *lactis* auf, ohne eine weitere Differenzierung zuzulassen.

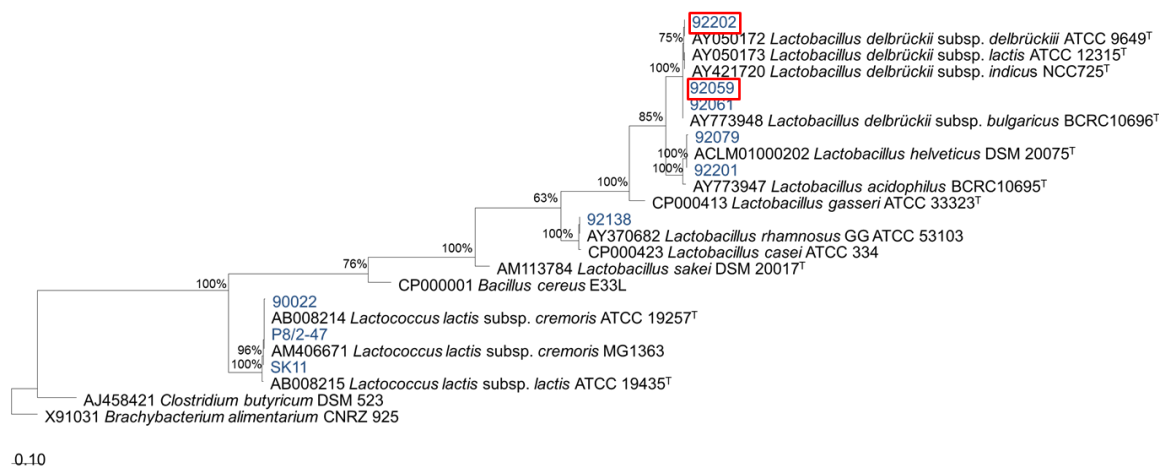


Abbildung 14: Spezies-Bestimmung mittels 16S rDNA-Sequenzierung nach der Maximum Likelihood Methode mit 1000 Wiederholungen

Der Balken repräsentiert 10% Sequenz-Divergenz. Die beiden Stämme 92202 und 92059 sind rot eingrahmt.

Für die weitere Differenzierung der Stämme 92059 und 92202 wurde ein Kohlenhydrat-Fermentationstest durchgeführt. Dazu wurden die Stämme in modifiziertem MRS Medium, dem unterschiedliche zu testende Zucker anstatt Glukose

als Kohlenstoffe Quelle zugesetzt waren, angezogen. Aus Tabelle 24 ist zu erkennen, dass die Isolate 92202 und 92059 gleiche Zuckerfermentationseigenschaften wie *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* bzw. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aufwiesen.

Tabelle 24: Identifizierung der Stämme 92202 und 92059 durch Fermentation unterschiedlicher Kohlenhydratquellen

Stamm	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Salicin	Sucrose
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> *	-	-	+/-	-	+	-	+
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> *	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> *	+/-	+	+	-	+	+	+
92202	+	+	+	-	+	+	+
92059	-	+	-	-	-	-	-

\*(Hammes & Hertel 2006)

#### 4.2 Prüfung der Anwesenheit eines Proteasegens in den Genomen der Isolate 92059 und 92202

Ein Southern Blot wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob ein Proteasegen in den beiden proteolytisch aktiven Stämmen vorhanden ist. Die für den Southern Blot verwendete Sonde umfasste die konservierte Region innerhalb der katalytischen Domäne (Asn196 bis Ser433 von PrtP von *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11) der Proteasen aus MSB. Die Agarose-Gelelektrophorese zeigte bei allen Amplifikationen ein Produkt bei ca. 750 bp. Dieses Produkt wurde als Sonde für den nachfolgenden Southern Blot eingesetzt.

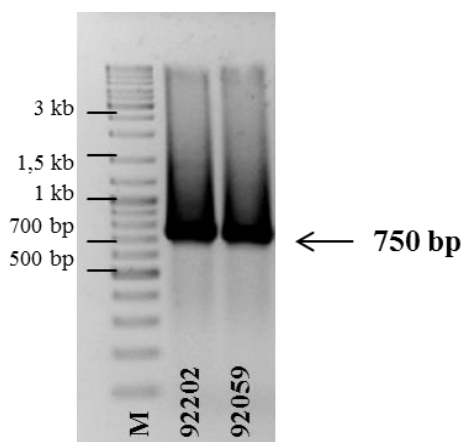


Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR zur Amplifikation der konservierten Region der Protease

Dabei wurde genomische DNA aus 92202 und 92059 als Template und die Primer JP1/JP2 (Pederson *et al.*, 1999) eingesetzt. M: GeneRuler DNA Ladder Mix.

Nach der Hybridisierung der Sonde mit der gDNA aus 92202 bzw. 92059 waren Signale auf dem Röntgenfilm erkennbar, anhand derer festgestellt werden konnte, dass die beiden Stämme 92059 und 92202 die konservierte Region des Proteasegens enthielten. Es wurde daher davon ausgegangen, dass das Proteasegen in den Genomen der Stämme 92202 und 92059 vorkommt.

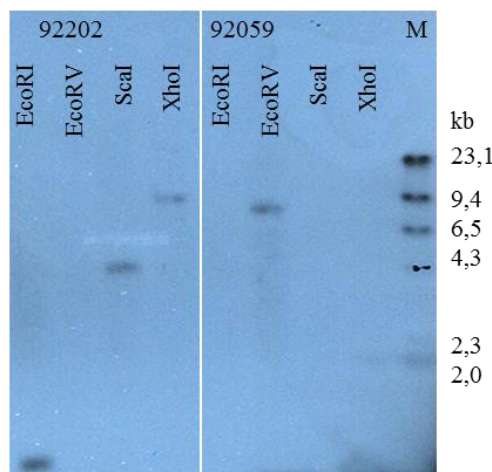


Abbildung 16: Southern-Hybridisierung der gDNA aus 92202 und 92059

M: DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled. Die gDNA wurde jeweils mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV, ScaI und XhoI verdaut.

### 4.3 Expression der Protease

Der erste Schritt der heterologen Expression der Protease PrtB war die Isolierung des *prtB*-Gens aus der gDNA der Stämme *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und subsp. *lactis*. Anschließend wurden die durch eine PCR generierten Produkte in den Vektor pSmart kloniert (in diesem Vektor kommt es nicht zur Expression), um die Sequenzierung der kompletten klonierten DNA-Abschnitte zu ermöglichen. Für die Expression der Gene in unterschiedlichen Expressionssystemen *E. coli* und *L. lactis* wurden nur die für die Aktivität essentiellen Domänen in die Expressionsvektoren kloniert. Auf die für die Aktivität nicht essentiellen Domänen, wie für die Verankerung an die Zellwand, wurde verzichtet.

#### 4.3.1 Gezielte Amplifikation der *prtB* Gene

Anhand der Referenzsequenzen der bekannten Proteasegene von *Lactobacillus delbrueckii* wurden aus konservierten Bereichen, die das Proteasegen flankieren, Primer für eine gezielte Amplifikation abgeleitet. Mittels PCR wurde das Fragment *prtB*-Gen amplifiziert (Abbildung 17). Die Signale auf dem Agarosegel entsprachen den erwarteten

Größen der *prtB*-Gene aus *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (5496 bp) (Gilbert *et al.* 1996) und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (5829 bp) (Acc. No AJ512946).

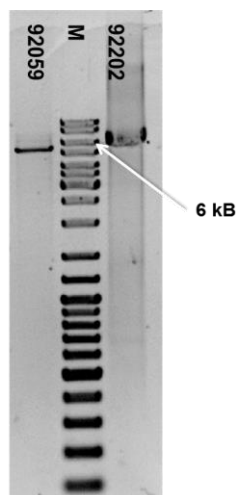


Abbildung 17: Gezielte Amplifikation der Proteasegene aus den Stämmen 92059 und 92202

5  $\mu$ l der PCR-Amplifikate wurden mit 1  $\mu$ l Probenpuffer (6 $\times$ Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Trennung erfolgte konstant bei 100 V für 60 min und anschließender 10 minütiger Färbung in Ethidiumbromid-Lösung. Die PCR wurde mit der High Fidelity Polymerase Phusion und den Primern *PrtB*-For und *PrtB*-Rev in einem Master Cycler Gradient der Firma Biorad durchgeführt. M: GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Rot); Bahn 92059 und 92202: PCR-Amplifikate aus den jeweiligen gDNAs.

#### 4.3.2 Klonierung in Vector pSMART

Es erfolgte zunächst eine Klonierung in den Vektor pSmart, um eine Expression der Proteasen auszuschließen. Die durch eine PCR amplifizierten Produkte der *prtB*-Gene besaßen glatte Enden und konnten in die Polylinker-Region des Vektors pSmart ligiert werden. Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch „Colony cracking“ und anschließender Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die Abbildung18 zeigt die Kontrolle der Klonierung nach der Plasmidpräparation.

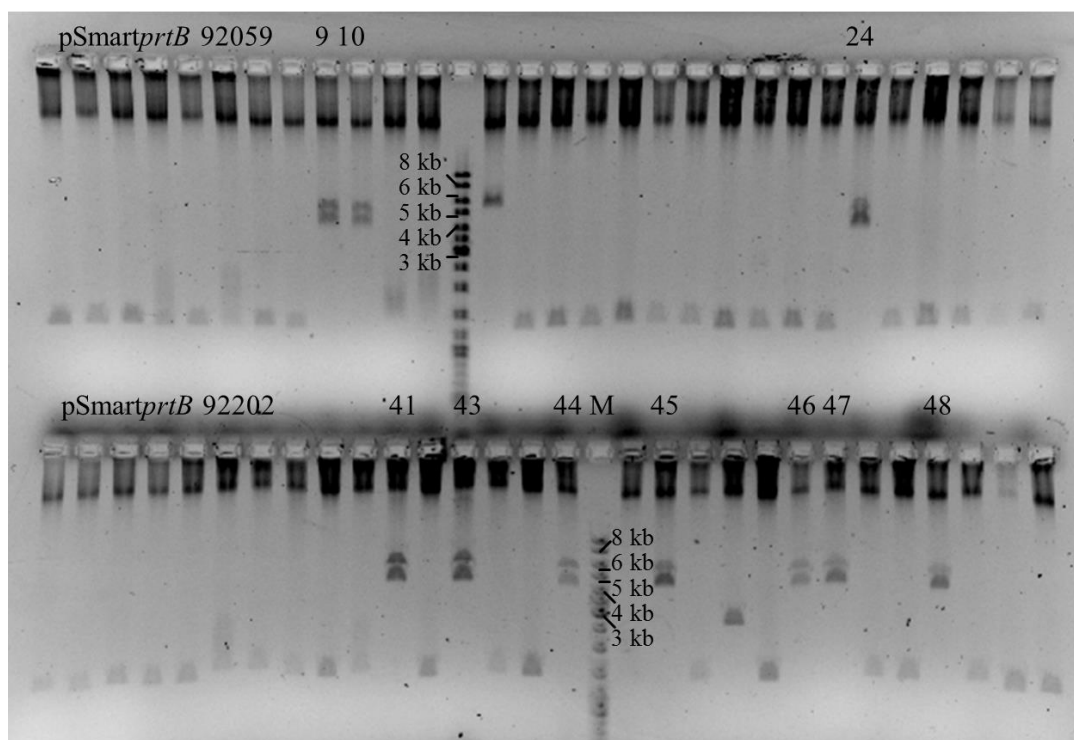


Abbildung 18: Agarose-Gelelektrophorese der Plasmid-DNAs zur Kontrolle der Klonierung von *prtB* 92059 und *prtB* 92202 in den Vektor pSmart

Je 15 µl der aus den Kolonien isolierten pDNAs wurden mittels eines 0,8%igen Agarosegels getrennt. Die Trennung fand konstant bei 100V für 40 min statt. Die Färbung in Ethidiumbromid-Lösung erfolgte für 10 min. M: GeneRulerDNA Ladder Mix(Fermentas, St. Leon-Rot). Die oberen Taschen sind mit dem Konstrukt pSmart-*prtB*92059 geladen und die unteren mit pSmart-*prtB*92202.

In Abbildung 18 sind in den Spuren 9, 10 und 24 mit dem Konstrukt pSmart-*prtB*92059 und in den Spuren 41, 43, 44, 45, 46, 47 und 48 mit dem Konstrukt pSmart-*prtB*92202 jeweils doppelte Banden bei ca. 4-6 kb sichtbar. Diese entsprechen der zirkulären pDNA mit einer Größe von 7,5 kb (pSmart-*prtB*92059) bzw. 7,9 kb (pSmart-*prtB*92202) und deuten auf erfolgreiche Klonierungen der Zielgene hin.

Danach wurden die Plasmid-DNAs ausgehend von den Sequenzierungsprimern für pSmart durch Primerwalking Schritt für Schritt sequenziert. Beide Sequenzen sind im European Nucleotide Archive (ENA) hinterlegt: *prtB*92059 (Acc. No. LN875491) und *prtB*92202 (Acc. No. LN875490).

Die Sequenzierungsergebnisse zeigten, dass es sich bei den sequenzierten Fragmenten um Proteasegene handelte und das klonierte Fragment jeweils das gesamte *prtB*-Gen umfasste. Die DNA Sequenzen beider Gene sind im Anhang (11.3) dargestellt. Das *prtB*92202 zeigt 99 % Identität der Nukleinsäuresequenz zum *prtB*-Gen aus *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (Acc. No. AJ512946) und *prtB*92059 99 % zum *prtB*



Peptidasegen aus *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC BAA-365 (Acc. No.CP000412). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen ist in Abbildung 19 dargestellt, wobei gegen die Aminosäuresequenz des Stammes 92059 verglichen wurde.

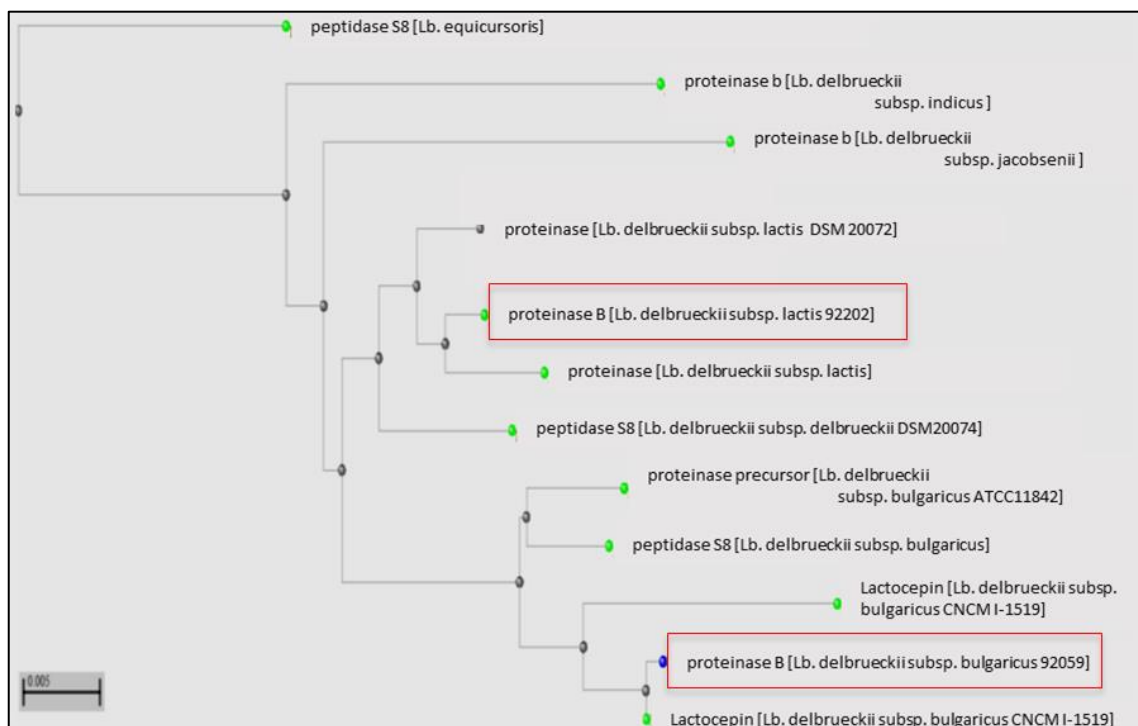


Abbildung 19: Vergleich der Aminosäuresequenz des *PrtB*-Gens 92059 mit repräsentativen Sequenzen aus Datenbanken

Der Balken repräsentiert 0,5 % Sequenz-Divergenz. Die beiden Stämme 92202 und 92059 sind rot eingerahmt.

### 4.3.3 Expression der Protease-Derivate in *E. coli*

#### 4.3.3.1 Konstruktion des Expressionsvektors in *E. coli*

Zur heterologen Expression der aus den beiden Stämmen isolierten Proteasegene wurde der pBad Vector mit dem Expressionsstamm *E. coli* LMG194 eingesetzt. Der Vektor pBad besitzt einen *araBad* Promotor, wodurch die Expression des rekombinanten Proteins durch L-Arabinose induziert und sehr stringent reguliert werden kann. Bei der Klonierung der Gene in den Expressionsvektor pBad sollte auf die DNA-Abschnitte verzichtet werden, die für die Aktivität nicht-essentielle Domänen kodieren, wie z.B. die Prä-Domäne (notwendig für die Sekretion), die Pro-Domäne (notwendig zur Regulation der Aktivität) und die Anker-Domäne (notwendig für die Verankerung auf der Außenseite der Zelloberfläche). Daraus entstanden die Konstrukte pBL9 (pBad *prtB*Pro+B202) und pBL7 (pBad *prtB*Pro+B59), die jeweils noch eine intakte Pro-Domäne, eine katalytische Domäne, A- und B-Domäne enthielten. Weiterhin wurden

die Konstrukte pBL10 (pBad *prtB*Pro-B202) und pBL8 (pBad *prtB*Pro-B59), denen die Pro-Domänen fehlten, mit der Erwartung hergestellt, dass die Protease nach der Sekretion ihre Aktivität direkt und ohne weitere Aktivierung ausüben konnte. In Tabelle 25 wurde die Information über die Protease-Derivate, die in *E.coli* LMG194 exprimiert wurden, dargestellt.

Tabelle 25: Übersicht der Protease-Derivate, die in *E.coli* LMG194 exprimiert wurden.

Protease-Derivate aus <i>E. coli</i>	Plasmid	Eigenschaft
PrtB116	pBL8 pBad <i>prtB</i> Pro-B59	Kat-, A-, B-Domäne; Molekulargewicht 152,6 kDa; His <sub>6</sub> -Tag, myc-Tag
PrtB117	pBL7 pBad <i>prtB</i> Pro+B59	Pro-, Kat-, A-, B-Domäne; Molekulargewicht 170,4 kDa; His <sub>6</sub> -Tag, myc-Tag
PrtB122	pBL9 pBad <i>prtB</i> Pro+B202	Pro-, Kat-, A-, B-Domäne Molekulargewicht 169 kDa; His <sub>6</sub> -Tag, myc-Tag
PrtB123	pBL10 pBad <i>prtB</i> Pro-B202	Kat-, A-, B-Domäne Molekulargewicht 152,7 kDa; His <sub>6</sub> -Tag, myc-Tag

#### 4.3.3.2 Expression und Aufreinigung in *E. coli*

Im Anschluss an die Induktion durch Zugabe von 0,2 %iger L-Arabinose wurde die Kultur für weitere 16 h bei 25 °C inkubiert. Je Liter Kultur wurden durchschnittlich 4,5 g Zellen, die die Zielproteine exprimierten, gewonnen. Die Aufreinigung der Zielproteine aus dem Zelllysat erfolgte unter nativen Bedingungen über den His<sub>6</sub>-Tag mit Hilfe einer Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot charakterisiert, indem alle Fraktionen der Aufreinigung (Zelllysat, Durchlauf, Waschschrift und Elution) aufgetragen wurden. In Abbildung 20 sind das SDS-Gel und der Western-Blot nach der Aufreinigung der PrtB117 dargestellt. Im Zelllysat, Durchlauf und Eluat waren mehrere Banden über die ganze Spur des SDS-Gels verteilt. Im Western Blot konnten ebenso mehre His-getaggte Proteine in allen Spuren detektiert werden. Auf der erwarteten Höhe bei 170 kDa waren mehrere Banden im SDS-Gel sichtbar, die ebenso im Western Blot detektiert wurden. Viele His-getaggte Proteine sind im niedermolekularen Bereich des Western Blots zu erkennen. Nach einer Aufreinigung

konnte kein sauberes Protein im Eluat isoliert werden.

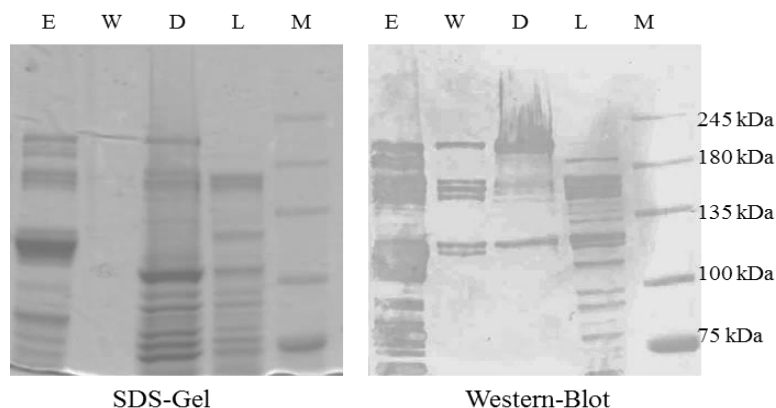


Abbildung 20: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel und Western-Blot der Fraktionen einer Aufreinigung des Protease-Derivats PrtB117 mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in *E. coli* LMG194 pBL7 (pBadprtBPro+B59)

M: Marker; L: Lysat; D: Durchfluss; W: Waschschrift; E: Eluat

Da das Aufreinigen des Proteins unter nativen Bedingungen erfolglos war, wurde eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mit Harnstoff im Aufreinigungspuffer durchgeführt, um eine mögliche Autoproteolyse des Proteins zu verhindern. Dadurch konnte eine deutliche Überexpression eines Proteins - sichtbar anhand der starken Bande im Lysat zwischen 180 kDa und 245 kDa im SDS-Gel und im Western Blot - nachgewiesen werden (Abbildung 21). Dieses Protein konnte im Eluat (E1 und E2) wiedergefunden werden. Im Durchlauf konnte kein entsprechendes, deutliches Signal detektiert werden. Im Waschschrift waren Proteine mit ähnlichen Größen wie im Lysat im SDS-Gel zu sehen, die aber nicht durch Anti-His Antikörper erkannt wurden. Drei Proteine im Bereich zwischen 75 kDa bis 100 kDa waren in Lysat, Durchlauf, Waschschrift und Eluat - dort aber in reduzierten Mengen - vorhanden. Da sie nur im SDS-Gel zu erkennen waren, handelt es sich wahrscheinlich nicht um spezifische Genprodukte.

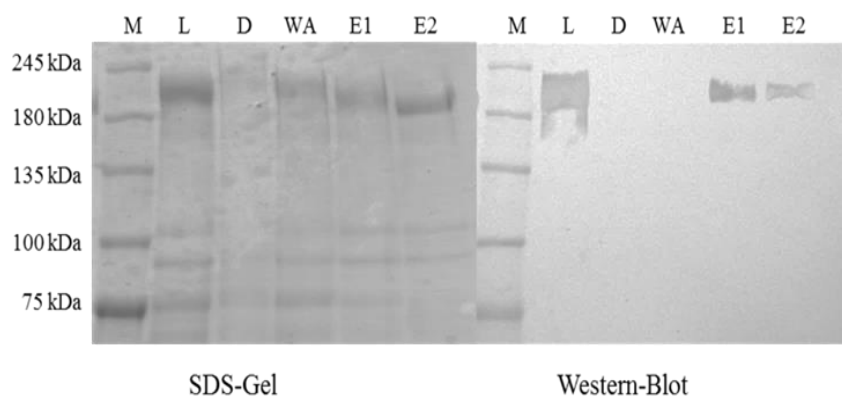


Abbildung 21: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel und Western-Blot der Fraktionen einer denaturierten Aufreinigung des Protease-Derivats PrtB117 mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in *E. coli* LMG194 pBL7 (pBadprtBPro+B59)

M: Marker; L: Lysat; D: Durchfluss; WA: Waschschrift; E1: erstes aufgefangenes Eluat (5 ml); E2: restliches Eluat.

#### 4.3.3.3 Proteolytische Aktivität

In dem Eluat nach der Aufreinigung von PrtB117 aus *E. coli* LMG 194 konnte keine proteolytische Aktivität zum Abbau des Caseins festgestellt werden, obwohl proteolytische Aktivität im Ausgangslysat vorhanden war. Die anderen drei Varianten der Protease-Derivate (PrtB116, PrtB122 und PrtB123) lieferten ähnliche Ergebnisse für die Expression hinsichtlich der Aufreinigung bzw. der Aktivität in *E. coli* LMG194 (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.4 Expression der Protease in *L. lactis*

##### 4.3.4.1 Konstruktion des Expressionsvektors

Zur weiteren Optimierung der Expression der Proteasen wurde das NICE-System in *Lactococcus lactis* verwendet. Die eingesetzten Vektoren pNZ8048 bzw. pNZssp besitzen den PnisA-Promotor, der die Expression des rekombinanten Proteins durch Nisin induzieren und regulieren kann. Über ein Signalpeptid am N-Terminus des Proteins sollte das exprimierte Produkt ins Medium sekretiert werden. Es wurde entweder die native Signalsequenz bei der Isolierung des *prtB*-Gens aus den beiden Stämmen 92059 und 92202 mit amplifiziert oder das Signalpeptid des Vektors pNZssp genutzt. Das in den Vektor pNZ8048 zu klonierende Proteasegen *prtB*PräH enthielt die eigene Signalsequenz sowie die Domänen Pro-, Katalytisch-, A-, B-, und H. Dem Gen *prtB*Pro+B fehlten die Prä- und H-Domäne. Es wurde mit dem Signalpeptid des Vektors pNZssp fusioniert. Aus der Kombination der Gene beider Stämme mit den passenden Vektoren wurden insgesamt vier Varianten konstruiert: pBL15 (pNZ8048prtBPräH059)

und pBL17 (pNZ8048 $prtB$ PräH202), sowie pBL18 (pNZssp $prtB$ Pro+B59) und pBL19 (pNZssp  $prtB$ Pro+B202) (Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht der Protease-Derivate, die in *L. lactis* NZ9000 exprimiert wurden.

Protease-Derivate aus <i>L. lactis</i>	Plasmid	Eigenschaft
PrtBb	pBL15 pNZ8048 $prtB$ PräH59His	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B-, „H“-Domäne Molekulargewicht 183,1 kDa; His <sub>6</sub> -Tag, myc-Tag
PrtB2	pBL18 pNZssp $prtB$ Pro+B59His	Pro-, Kat-, A-, B-Domäne Molekulargewicht 171,9 kDa; His <sub>6</sub> -Tag, myc-Tag
PrtB7	pBL17 pNZ8048 $prtB$ PräH202His	Prä-, Pro-, Kat-, A-, B-, „H“-Domäne Molekulargewicht 197,4 kDa; His <sub>6</sub> -Tag, myc-Tag
PrtB1	pBL19 pNZssp $prtB$ Pro+B202NX <sub>3</sub> His	Pro-, Kat-, A-, B-Domäne Molekulargewicht 171,8 kDa; His <sub>6</sub> -Tag, myc-Tag

#### 4.3.4.2 Überexpression in *L. lactis* NZ9000

Die Expression der Protease im NICE System wurde durch die Zugabe von Nisin induziert. Unterschiedliche Konzentrationen von Nisin wurden für die Induktion der Expression bei OD<sub>620</sub> von 0.8 getestet, um eine passende Nisin-Konzentration zu finden. Die Abbildung 22 zeigt das SDS-Gel von Kulturüberständen, welche das mittels unterschiedlicher Nisin-Konzentrationen induzierte Proteasederivat PrtBb enthielten. PrtBb beinhaltet die Prä-Domäne bis zum Ende der H-Domäne mit einem Molekulargewicht von 183,1 kDa. Auf dem SDS-Gel ist bei allen Nisin-Konzentrationen auf der Höhe von 180 kDa eine deutlich stärkere Bande im Vergleich zur negativen Kontrolle ohne Nisin zu sehen, was auf die Überexpression des Zielprodukts PrtBb hindeutete. Anhand des SDS-Gels wurde bei einer Nisin-Konzentration von 10 ng/ml bzw. 20 ng/ml ein ähnlich intensives Signal beobachtet.

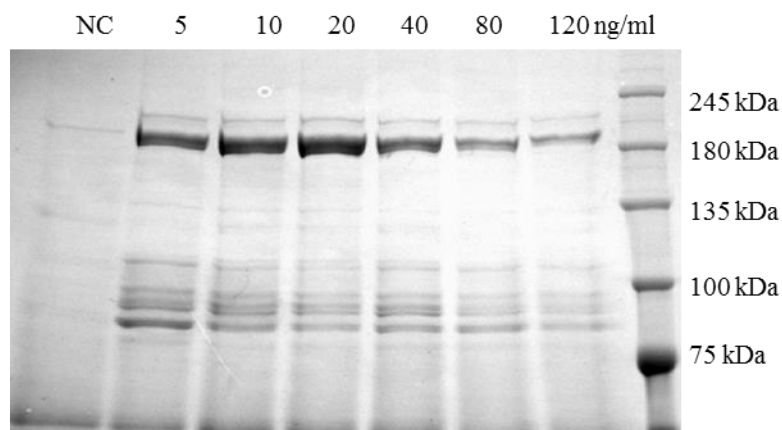


Abbildung 22: SDS-PAGE des Protease-Derivats PrtBb in *L. lactis* mit NICE System zur Optimierung der Induktionsbedingungen

Jeweils 1 ml Kulturüberstand wurde für Aceton-Fällung eingesetzt um die Proteine zu konzentrieren. Die Proteine wurden in 70  $\mu$ l DDW aufgenommen und je 30  $\mu$ l pro Taschen aufgetragen. Die Nisin-Konzentration betrug: 5, 10, 20, 40, 80, 120 ng/ml. NC steht für negative Kontrolle, bei der kein Nisin zur Induktion zugegeben wurde.

#### 4.3.4.3 Aufreinigung über His-Tag

Das Zielprotein wurde durch eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Säule gereinigt. Die Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot charakterisiert.

Nach der Aufreinigung wurden von allen Fraktionen (Kulturüberstand, Durchfluss, Waschschrift und Eluat) Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. In der nachfolgenden Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Aufreinigung des Protease-Derivats PrtBb als Beispiel dargestellt, für die anderen Derivate PrtB2 aus dem Stamm 92059 und PrtB1 und PrtB7 aus Stamm 92202 wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

Im Überstand ist die Überexpression eines Proteins von ca. 180 kDa zu erkennen, das auch im Western Blot spezifisch detektiert werden konnte. Unterhalb dieser Bande sind im Überstand außerdem einige schwache Banden sichtbar. Die anderen, nicht His-getaggten Proteine, die der Überstand enthielt, wurden durch Aufreinigung entfernt und fanden sich im Durchfluss wieder: Sie ließen sich nur im SDS-Gel, nicht aber im Western Blot detektieren. Durch einen Waschschrift wurden die weniger stark an die Säule gebundenen Proteine nahezu vollständig entfernt. Im Eluat (E1) erkennt man, dass ein Protein mit einer Größe von ca. 180 kDa aufgereinigt wurde und im Western Blot spezifisch nachgewiesen werden konnte. Im Eluat E2 ist nach einer Konzentrierung eine zweite Bande, mit ähnlicher Molekulargröße auf dem SDS-Gel bzw. im Western Blot zu erkennen.

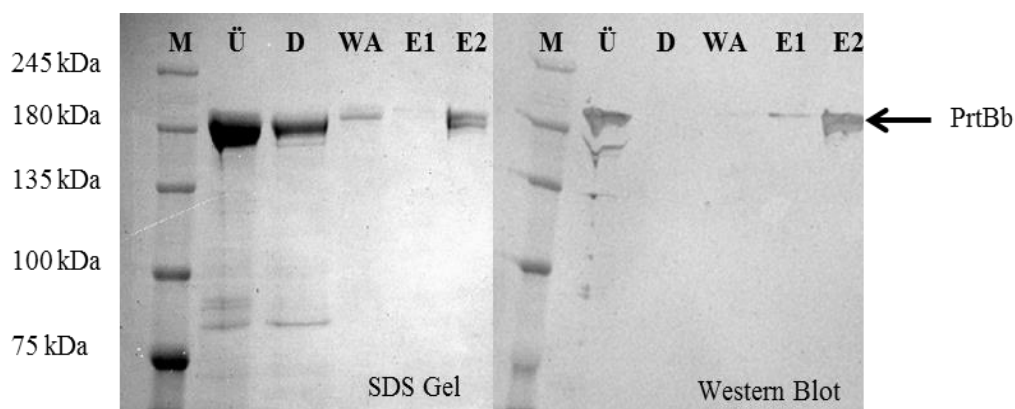


Abbildung 23: SDS-Gel und Western-Blot zur Aufreinigung des Protease-Derivats PrtBb mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in *L. lactis* NZ9000 pBL15 (pNZ8048prtBPräH059).

Das theoretische Molekulargewicht des reifen PrtBbs nach der Sekretion bzw. Aktivierung durch Abspalten der Prä- bzw. Pro-Domäne ist 162 kDa. M: Marker; Ü: Kulturüberstand (0,5 ml) nach Aceton-Fällung; D: Durchfluss (0,5 ml) nach Aceton-Fällung; WA: Waschfraktion (20-fach konzentriert); E1: Eluat; E2: Eluat (20-fach konzentriert). Das aufgetragene Volumen war 30 µl pro Bahn.

#### 4.3.4.4 Nachweis proteolytischer Aktivität mittels FITC-Assay

Nach der Aufreinigung wurde von allen Fraktionen der Aufreinigung die Proteinkonzentration bestimmt und proteolytische Aktivität getestet.

Tabelle 27: Aufreinigungstabelle der His-Tag Aufreinigung der Protease-Derivate PrtBb, PrtB2, PrtB7 und PrtB1 in *L. lactis* NZ9000

(Daten aus 3 unabhängigen Versuchen).

Fraktion	Protease-Derivate	Volumen	Proteinkonzentration	Proteinmenge
Überstand	PrtBb	50	21,88	1094
	PrtB2	50	20,58	1029
	PrtB7	50	20,8	1040
	PrtB1	50	21,29	1064,5
Durchfluss	PrtBb	50	20,77	1038,5
	PrtB2	50	18,196	909,8
	PrtB7	50	19,8	990
	PrtB1	50	19,529	976,45
Waschfraktion	PrtBb	10	6,37	63,7
	PrtB2	10	4,89	48,9
	PrtB7	10	5,45	54,5
	PrtB1	10	8,89	88,9
Eluat	PrtBb	2,5	0,23	0,575
	PrtB2	2,5	0,204	0,51
	PrtB7	2,5	0,015	0,038
	PrtB1	2,5	0,01	0,025

Aus der Aufreinigungstabelle kann man entnehmen, dass durch die Aufreinigung nach 3-facher Wiederholung durchschnittlich 0,58 mg PrtBb, 0,51 mg PrtB2, 0,04 mg PrtB7 und 0,03 mg PrtB1 aus jeweils 50 ml Kultur gewonnen werden konnte.

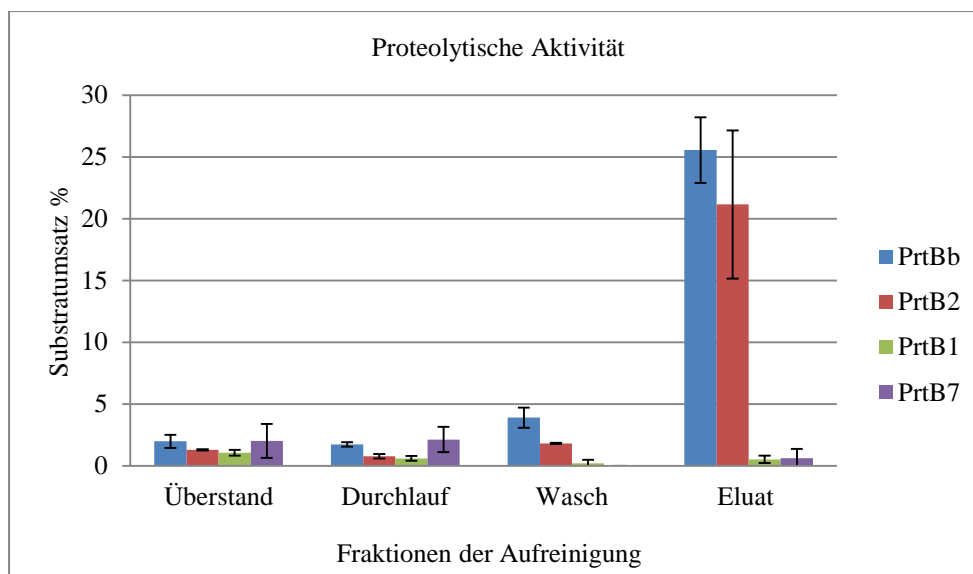


Abbildung 24: Darstellung der durch FITA-Assay gemessenen proteolytischen Aktivitäten der PrtBb und PrtB2 von allen Fraktionen der Aufreinigung

Die Überstände der Kulturen, die die vier Derivate produzierten, zeigten ähnliche Proteinkonzentrationen und Aktivitäten, während bei dem Negativ-Kontroll-Ansatz *L. lactis* NZ9000 ohne Vektor, keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abbildung 24). Nach der Aufreinigung wurde für beide Protease-Derivate aus dem Stamm 92059 (PrtBb und PrtB2) eine jeweils 10-fach erhöhte proteolytische Aktivität des Eluats im Vergleich zum Kulturüberstand beobachtet. Bei den Derivaten PrtB7 und PrtB1 aus dem Isolat 92202 *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* konnte nach der Aufreinigung nur eine geringe Proteinkonzentration bzw. niedrige Aktivität im Eluat nachgewiesen werden.

#### 4.3.4.5 Nachweis proteolytischer Aktivität mittels SDS-PAGE

Die proteolytische Aktivität der exprimierten bzw. gereinigten Protease-Derivate konnte durch Abbau von Casein mittels SDS-PAGE dargestellt werden. Die Kulturüberstände von vier Derivaten wurden zum Caseinabbau eingesetzt. Zum Vergleich diente die Negativ-Kontrolle, wobei der Expressionsstamm kein Plasmid trug und daher kein Abbau des Caseins stattfinden sollte. Das Proteinbandenmuster blieb wie erwartet über 20 Stunden unverändert. Bei den vier zu untersuchenden Protease-Derivaten wurde ein Abbau des Caseins im Verlauf der Zeit durch Verschwinden der Caseinbande bzw. Erscheinen einiger neuen Abbauprodukten im niedrigeren Molekulargößbereich nachgewiesen. Nach 9 h bei PrtB2 bzw. 20 h bei PrtB1 und PrtB7 waren die Caseine ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\kappa$ ) vollständig abgebaut und auf dem SDS-Gel sind keine Casein-Banden mehr zu



erkennen. Nur bei PrtBb wurde am Ende der Inkubation noch ein geringer Rest von  $\kappa$ -Casein nachgewiesen (Abbildung 25).

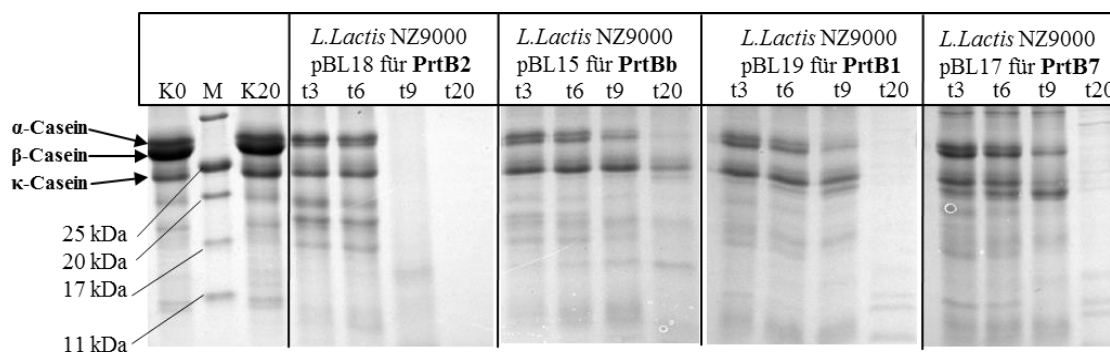


Abbildung 25: SDS-PAGE von Casein nach Hammersten (6 mg/ml) sowie dessen Hydrolyseprodukte mit unverdünnten Kulturüberständen (jeweils gewachsen bis OD<sub>620</sub> 1,2) von *L. lactis* NZ9000 mit jeweiligem Plasmid

PrtB2 mit pBL18 und PrtBb mit pBL15 aus Stamm 92059; PrtB1 mit pBL19 und PrtB7 mit pBL17 aus Stamm 92202.

M:Marker; K0:Kontrolleansatz *L. lactis* NZ9000 ohne Vektor zum Zeitpunkt 0; K20: Kontrolle nach 20 h; t3: Hydrolyse nach 3 h; t6: Hydrolyse nach 6 h; t9: Hydrolyse nach 9 h; t20: Hydrolyse nach 20 h.

In der Abbildung 26 sind die Kinetiken der Hydrolyse des Caseins jeweils mit den gereinigten Protease-Derivaten PrtB2/PrtBb aus 92059 und PrtB1/PrtB7 aus 92202 vom Zeitpunkt Null bis 20 Stunden dargestellt. Durch PrtBb und PrtB2 wurde das  $\beta$ -Casein im gesamten Zeitraum deutlich hydrolysiert. Weniger stark wurde das  $\alpha$ -Casein gespalten, während das  $\kappa$ -Casein nur leicht abgebaut wurde. Beide Derivate aus 92059 lieferten ähnliche Proteinbandenmuster. Mit den zwei Derivaten aus 92202 PrtB1 und PrtB7 konnte kein signifikanter Abbau der drei Caseinproteine beobachtet werden.

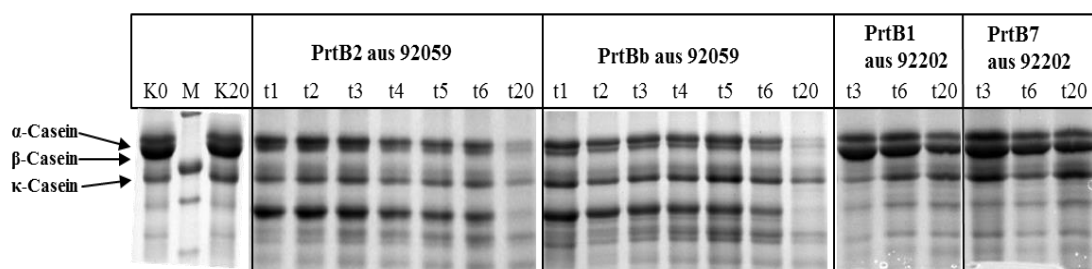


Abbildung 26: SDS-PAGE von Casein nach Hammersten (6 mg/ml) sowie dessen Hydrolyseprodukte mit den gereinigten Protease-Derivaten

PrtB2 und Prtbb stammt aus 92059 mit einer Konzentration von 0,25 mg/ml bzw. PrtB1 und PrtB7 aus 92202 mit einer Konzentration von 0,025 mg/ml.

M:Marker; K0:Kontrolle ohne Enzym zum Zeitpunkt 0; K20: Kontrolle nach 20 h; t1: Hydrolyse nach 1 h; t20: Hydrolyse nach 20 h

## 4.3.5 Charakterisierung der gereinigten Protease-Derivate aus Stamm 92059

## 4.3.5.1 Substratspezifität

Um die Spezifität der proteolytisch aktiven Protease-Derivate PrtB2 und PrtBb näher zu untersuchen wurden das  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein separat als Substrat für die Hydrolyse eingesetzt. Nach drei Stunden konnte bei  $\alpha$ -, und  $\beta$ -Casein ein deutlicher Abbau im Vergleich zur negativen Kontrolle beobachtet werden. Es entstanden mehrere Produkte im Bereich von 11-20 kDa. Nach 20 Stunden wurde das  $\alpha$ -Casein nahezu vollständig abgebaut und von  $\beta$ -Casein konnten nur geringe Mengen auf dem SDS-Gel nachgewiesen werden. Hingegen wurde das  $\kappa$ -Casein nach der Inkubation lediglich leicht hydrolysiert. Die beiden Derivate zeigten somit die gleiche Substratspezifität. Sie konnten das  $\alpha$ -, und  $\beta$ -Casein deutlich besser hydrolysieren als das  $\kappa$ -Casein (Abbildung 27).

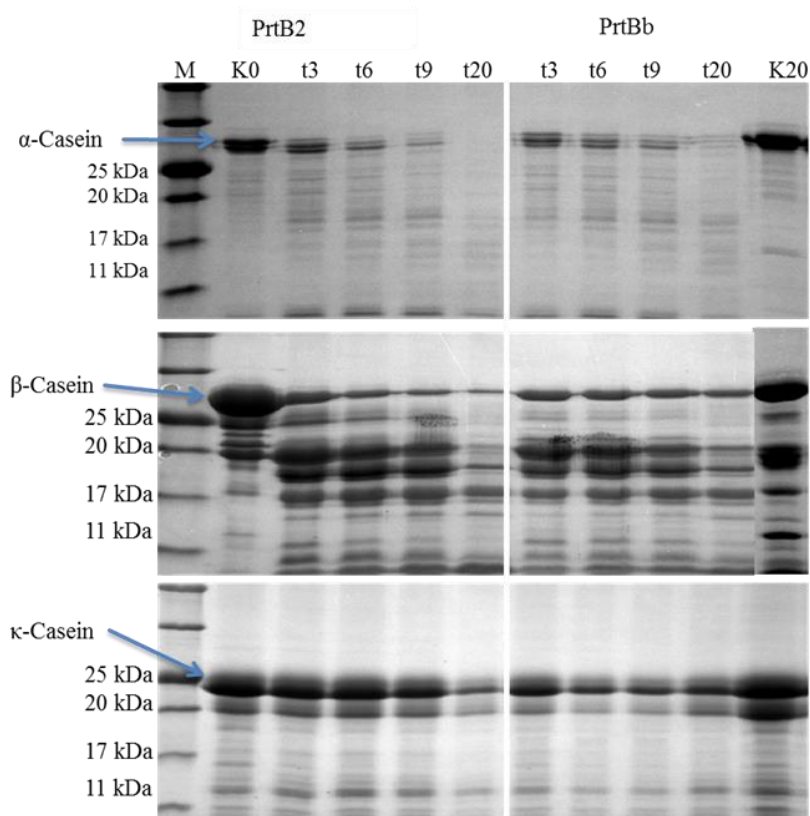


Abbildung 27: SDS-PAGE von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein sowie deren Hydrolyseprodukte zur Bestimmung der Casein-Spezifität von den Protease-Derivaten PrtB2 und PrtBb

M: Marker; K0:Kontrolle zum Zeitpunkt 0; K20: Kontrolle nach 20 h; tx: Hydrolyse nach x h.

## 4.3.5.2 Temperatur- bzw. pH-Wert-Optimierung

Das Derivat PrtBb zeigte die höchste Aktivität bei 37-40 °C. Bei einer

Temperaturerhöhung auf 45 °C reduzierte sich die Aktivität auf 60 % des Temperaturoptimums. Für das PrtB2 konnte ebenfalls ein Temperaturoptimum von 40 °C ermittelt werden, wobei eine Erhöhung auf 45 °C die Aktivität auf 55 % reduziert (Abbildung 28).

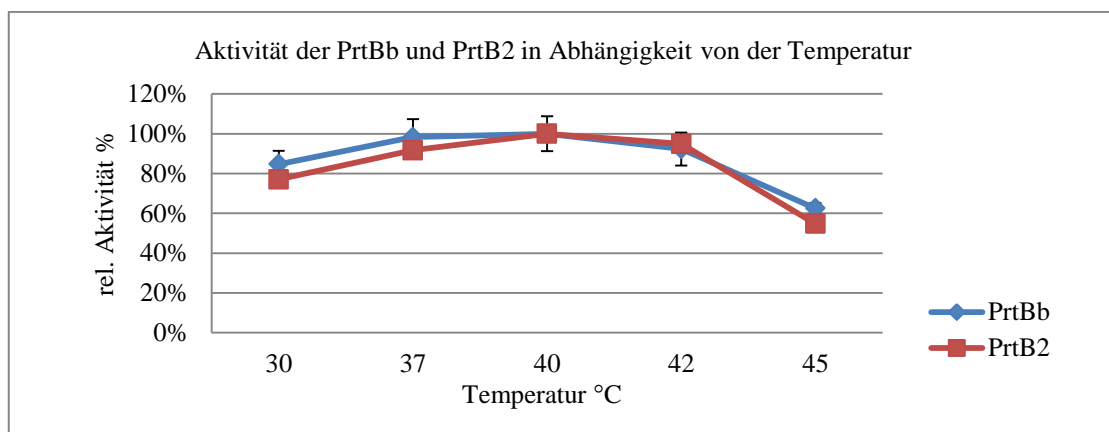


Abbildung 28: Abhängigkeit der Aktivität der Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 aus 92059 von der Temperatur

Die höchste Aktivität aus den untersuchten Temperaturen (bei 40 °C) wurde als 100%-Wert verwendet.

Die beiden Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 zeigten ähnliche Eigenschaften in der pH-Optimierung (Abbildung 29). Sie waren in einem relativ breiten pH-Bereich von pH 4,2 bis pH 8,2 aktiv. Die höchste Aktivität wurde bei pH 6,2-7,2 festgestellt. Bei pH 8,2 konnten noch 55-60 % der optimalen Aktivität detektiert werden, während es bei pH 3,2 bzw. pH 2,8 zu keinem nennenswerten Substratabbau kam.

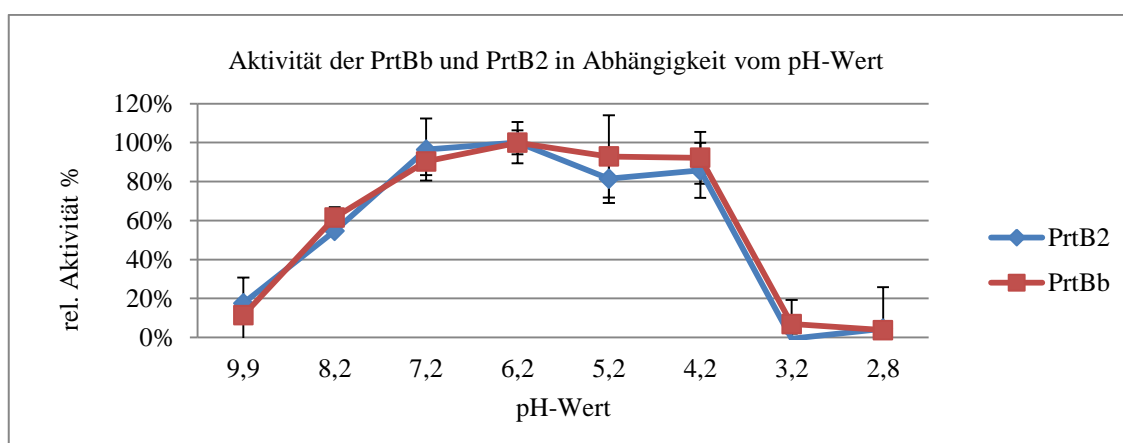


Abbildung 29: Abhängigkeit der Aktivität der Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 vom pH-Wert

Die höchste Aktivität aus dem untersuchten pH-Bereich (bei pH 6,2) wurde als 100%-Wert verwendet.

#### 4.4 Chemische Analyse des Caseinhydrolysats

##### 4.4.1 HPLC-Untersuchung des Caseinhydrolysats

Zur Analyse der Peptid-Muster des durch die Protease-Derivate hergestellten Caseinhydrolysats, wurden diese durch Festphasenextraktion angereichert und die Peptide wurden mittels HPLC getrennt.

Die unterschiedlichen Fraktionen der Aufreinigung des Hydrolysats durch PrtBb Verdau wurden in die HPLC-Anlage injiziert. Anhand des Chromatogramms ist zu erkennen, dass vor der Aufreinigung die Peptide in relativ niedrigen Konzentrationen vorlagen. Im Durchfluss und Waschschrift wurden einige Peptide detektiert, die nicht an die Säule banden bzw. nur schwach banden. Durch die Wirkung von ACN wurden alle mit der Säule interagierenden Peptide eluiert. Die im Eluat detektierten Signale waren deutlich stärker im Vergleich zu denen des Hydrolysats vor der Konzentrierung (Abbildung 30).

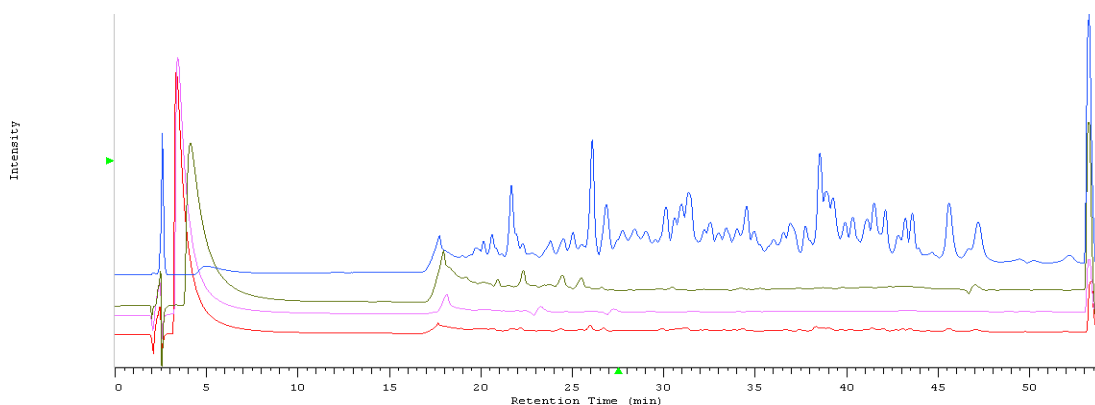


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm des durch PrtBb hergestellten Hydrolysats nach Festphasenextraktion

Dazu wurden das Hydrolysat (rot), der Durchfluss (pink), der Waschschrift (grün) und das Eluat (blau) der Aufreinigung mittels HPLC analysiert

Die von PrtBb und PrtB2 produzierten Hydrolysate wurden nach der Aufreinigung mittels HPLC verglichen. Anhand der HPLC-Chromatogramme (Abbildung 31) kann man sehen, dass in beiden Hydrolysaten von PrtBb und PrtB2 ein komplexes Peptidgemisch im Retentionsbereich zwischen 20 und 48 min vorlag. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Proben zu erkennen. Durch die Hydrolyse mit den Protease-Derivaten PrtBb und PrtB2 wurden nahezu identische Peptidmuster erzeugt.

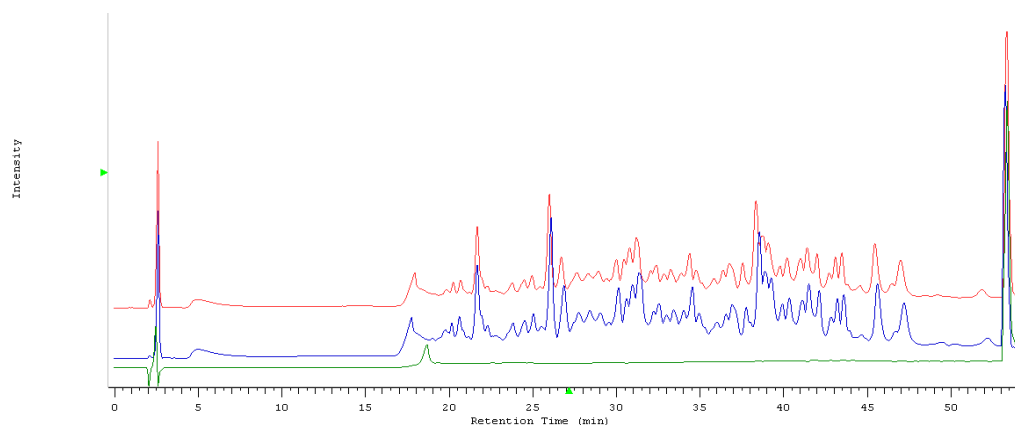


Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm der durch PrtBb (blau) und PrtB2 (rot) produzierten Caseinhydrolysate nach der Aufreinigung

Eine Kontrolle mit dem Casein in grün wurde zum Vergleich mitgemessen.

#### 4.4.2 MS-LC-Untersuchung des Caseinhydrolysats

Die beiden durch PrtBb und PrtB2 erzeugten Hydrolysate wurden durch MS-LC untersucht (Abbildung 32), um die detektierten Peptide zu identifizieren. In beiden Hydrolysaten wurden jeweils 30 Peptide innerhalb der Retentionszeit von 22 min bis 48 min identifiziert. Hierbei wurde ein Teil der Peptide mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit von beiden Suchalgorithmen bestätigt, einige Peptide jedoch nur mit geringerer Wahrscheinlichkeit zugeordnet. Es wurde damit bestätigt, dass die beiden Protease-Derivate identische Peptide lieferten. Von den freigesetzten Peptiden entstammten 24 Peptide aus dem  $\beta$ -Casein, vier Peptide aus dem  $\alpha_{S1}$ -Casein und zwei Peptid aus  $\alpha_{S2}$ -Casein.

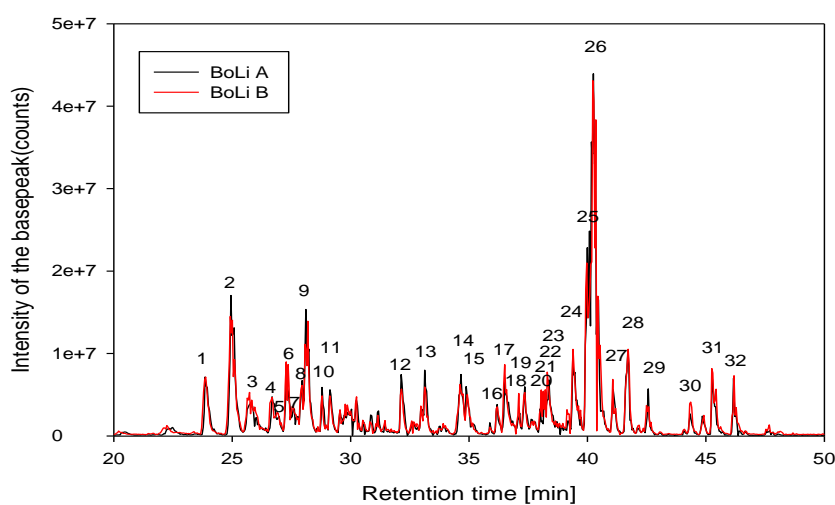


Abbildung 32: Basepeak-Chromatogramm der durch PrtBb (BoLiA) und PrtB2 (BoLiB) hergestellten Caseinhydrolysate

Durch Vergleich der ermittelten Peptidsequenzen mit der  $\beta$ -Casein Sequenz wurde

festgestellt, dass durch die enzymatische Abspaltung durch die beiden Protease-Derivate hauptsächlich Peptide des C-terminalen Endes bzw. der Mitte des  $\beta$ -Caseins identifiziert wurden (Abbildung 33). Aus  $\alpha_{S1}$ - Casein wurden die Peptide GLPQEVL f(10-16), FVAPFPEVF f(24-32), LEIVPN f(109-114) und NSEKTTMPLW f(190-199), und aus  $\alpha_{S2}$ - Casein die Peptide AVPITPT f(131-137) und TKVIPY f(211-218) nachgewiesen. Die freigesetzten Peptide setzten sich aus 6 bis 18 Aminosäuren zusammen.

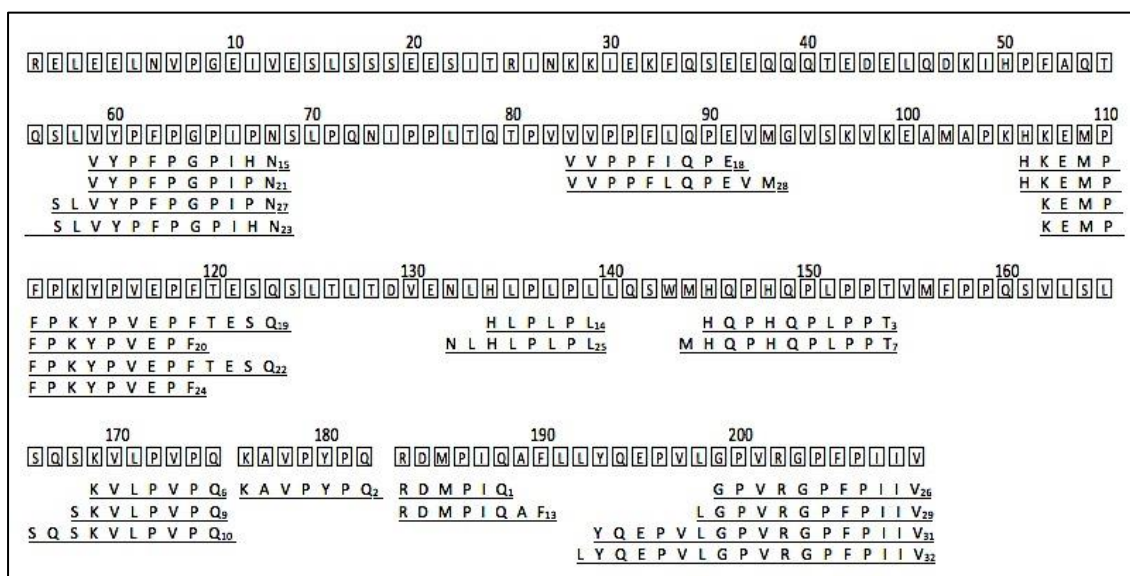


Abbildung 33: Darstellung der Schnittstellen bzw. der ermittelten Peptid-Sequenzen aus  $\beta$ -Casein nach der Hydrolyse durch die gereinigten Protease-Derivate PrtBb und Prtb2 aus 92059

## 4.5 Untersuchung des Caseinhydrolysats auf Bioaktivität

### 4.5.1 Anti-inflammatorische Aktivität und Zytotoxische Aktivität

Zur Untersuchung der anti-inflammatorischen Aktivität des Hydrolysats wurden transfizierte HEK<sup>nfkB-RE</sup>-Zellen eingesetzt, die das Reporterplasmid pGLD32.4[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] (Promega, Heidelberg, Germany) enthielten. Die Zellen wurden durch TNF- $\alpha$  stimuliert, um die Luziferase zu überexprimieren. Anhand der gemessenen Luziferaseaktivität konnte das Ausmaß der Stimulation errechnet werden. Durch eine TNF- $\alpha$  Induktion (0,06 ng/ml) wurde die Luziferaseaktivität um das 3-fache erhöht. Diese Erhöhung wurde bei der positiven Kontrolle mit BayII-7082, die einen Inhibitor des NfkB Signaltransduktionswegs enthielt, auf 50 % reduziert. Durch die Behandlung der TNF- $\alpha$  induzierten Zellen mit Hydrolysat aus PrtBb-Hydrolyse mit den Konzentrationen von 5 mg/ml bzw. 2,5 mg/ml war eine Reduktion der Luziferaseaktivität auf 58 % bzw. 75 % zu detektieren, die auf eine anti-inflammatorische

Wirkung des Peptidgemisches hindeutete. Durch Zugabe des Hydrolysats in denselben Konzentrationen blieb die Luziferaseaktivität in Abwesenheit von TNF- $\alpha$  praktisch unverändert (Abbildung 34). Dies bedeutet, dass das Peptid keine zytotoxische Wirkung auf die HEK-Zellen hatte.

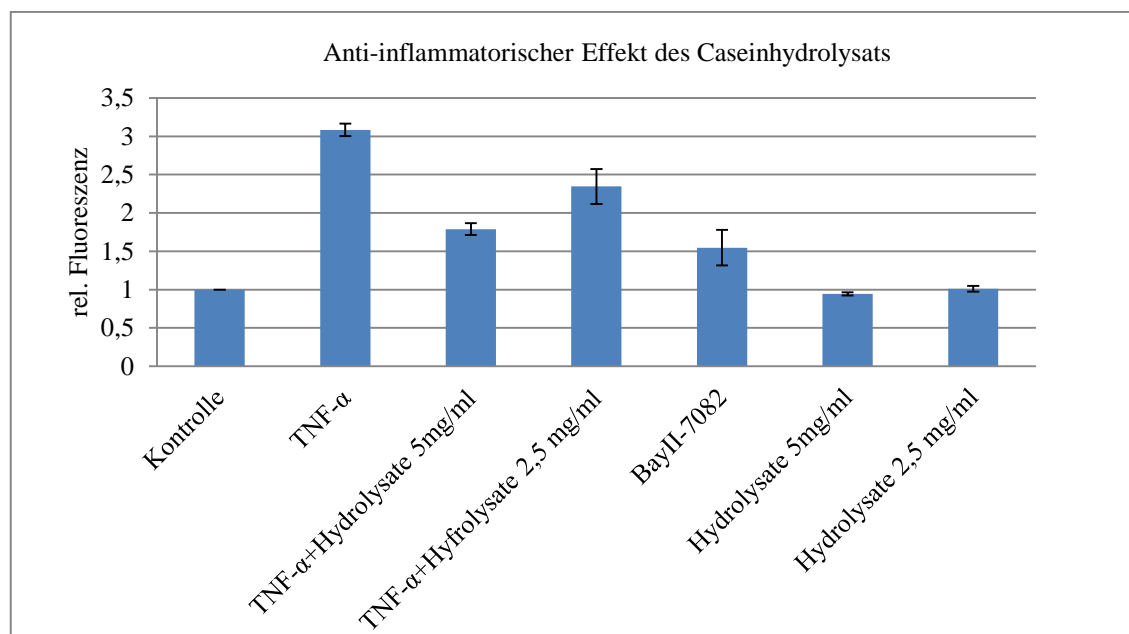


Abbildung 34: Anti-inflammatorischer Effekt des Caseinhydrolysats auf die Luziferaseaktivität von HEK-Zellen, die das Reporterplasmid pGLD32.4[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] (Promega, Heidelberg, Germany) enthielten.

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Lumineszenz im Vergleich zur Kontrolle einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ). Die TNF- $\alpha$  Konzentration betrug 0,06 ng/ml und die Konzentration der positiven Kontrolle BayII-7082 war 20  $\mu$ M.

#### 4.5.2 ACE-inhibitorische Aktivität

Für die Untersuchung der ACE-inhibitorischen Aktivität des mit PrtBb hergestellten Caseinhydrolysats wurde letzteres nach der SPE-Aufreinigung bzw. Gefriertrocknung in unterschiedlichen Konzentrationen (0,045; 0,09; 0,18; 0,9; 1,8; 4,5 mg/ml) angesetzt und getestet. In Abbildung 35a ist zu erkennen, dass die ACE-inhibitorische Aktivität des Hydrolysats mit zunehmenden Konzentrationen logarithmisch bis auf 70 % Inhibierung stieg. Im weiteren Verlauf nahm die Hemmung weiter zu, so dass mit einer Konzentration von 4,5 mg/ml des Hydrolysats eine ACE-Inhibierung von 97 % erreicht wurde. Der IC50-Wert lag in diesem Fall bei einer Konzentration von ca. 0,6 mg/ml. Im niedrigen Konzentrationsbereich (von 0,04 bis 0,14 mg/ml) war ein linearer Anstieg der ACE-inhibierenden Aktivität mit steigenden Konzentrationen zu beobachten (Abbildung 35b).

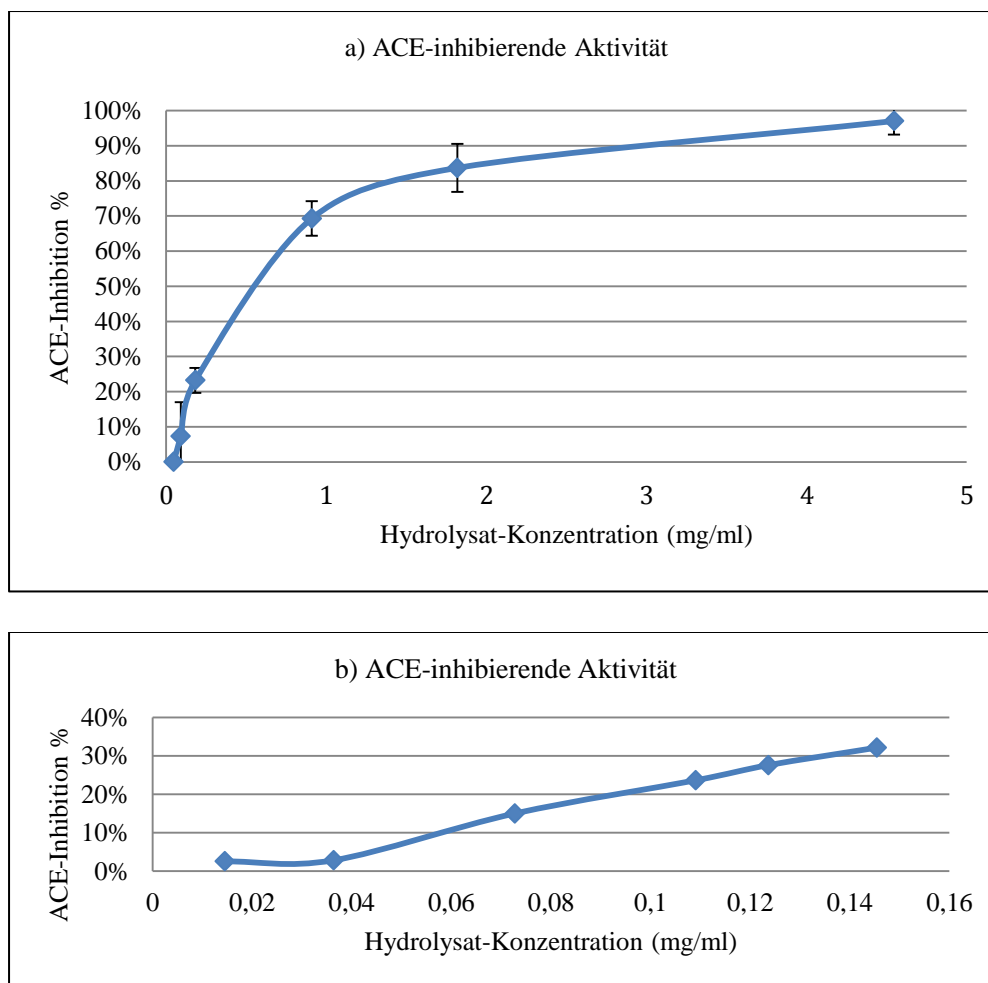


Abbildung 35: Nachweis der ACE-inhibierenden Aktivität des mittels Protease-Derivate PrtBb hergestellten Caseinhydrolysats

a): mit den Hydrolysat-Konzentrationen 0,045; 0,09; 0,18; 0,9; 1,8; 4,5 mg/ml;

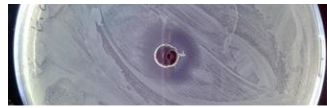
b): mit den Hydrolysat-Konzentrationen 0,015; 0,036; 0,072; 0,109; 0,124; 0,145 mg/ml.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmung mit Standardabweichungen ( $n=2$ ) als Fehlerbalken.

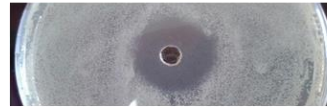
#### 4.5.3 Antimikrobielle Aktivität

Eine mögliche antimikrobielle Wirkung des Caseinhydrolysats wurde bei *E. coli* K14 IBC 4004 und *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nachgewiesen. Nach einer über-Nacht-Inkubation des Peptids mit den auf Agar-Platten ausplattierten Stämmen war bei *E. coli* K14 IBC 4004 ein Hemmhof mit einem Durchmesser von 1,7 cm und bei *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ein solcher von 2,5 cm zu erkennen. Bei *Cronobacter sakazaki* DSMZ 4485 war keine eindeutige Hemmung auszumachen.

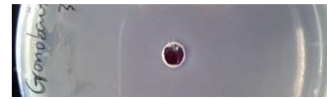




*E. coli*  
K14 IBC 4004



*Staphylococcus aureus*  
ATCC 25923



*Cronobacter sakazaki*  
DSMZ 4485

Abbildung 36: Hemmhof des Wachstums von den testenden Stämmen auf Müller-Hinton Agar nach über Nacht Inkubation bei 37 °C

## 5 Diskussion

### 5.1 Expression der Proteasegene

Die Proteasegene aus den beiden proteolytisch aktiven Wirtsstämmen: 92059 und 92202 wurden durch gezielte Amplifikationen isoliert und nach Klonierung in den Vektor pSmart sequenziert. Anhand der Sequenzierungsergebnisse konnte festgestellt werden, dass es sich um Proteasegene aus *Lb. delbrückii* handelte. Die Vergleiche der Nuklein- und Aminosäuresequenzen bestätigten die zuvor durchgeführte Spezies und Subspeziesbestimmung mittels 16S rDNA Sequenzierung. Danach ist der Stamm 92022 zur Subspezies *lactis* und der Stamm 92059 zur Subspezies *bulgaricus* zuzuordnen.

#### **Expression der Proteasen in *E. coli***

Versuche zur Expression fanden zuerst in *E. coli* LMG194 mit dem pBad Vektor statt, bei dem das exprimierte Genprodukt aus dem Stamm 92059 mit einem His-Tag versehen wurde. Das His-getaggte Protease-Derivat PrtB117 hatte ein Molekulargewicht von 170,4 kDa. Nach einer Aufreinigung unter nativen Bedingungen über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule waren viele Proteine mit niedrigeren Molekulargewichten im Eluat vorhanden (Abbildung 20). Die Aufreinigung war demnach nicht erfolgreich. Da der His-Tag am C-Terminus des Zielproteins lokalisiert war, wurde vermutet, dass die im Western Blot detektierten Signale durch Autoproteolyse des Zielproteins am N-Terminus entstanden. Im Eluat konnte nach der Aufreinigung keine proteolytische Aktivität detektiert werden. Dieses deutet wieder auf einen proteolytischen Abbau des Zielproteins hin. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das in *E. coli* exprimierte Zielprotein empfindlich für eine Autoproteolyse war. Aus diesem Grund wurde eine denaturierende Aufreinigung durch Zugabe von Harnstoff in den Aufreinigungspuffer durchgeführt, um die Proteine zu denaturieren und gleichzeitig vor proteolytischem Abbau zu schützen. Danach sollte die Protease durch eine Renaturierung wieder aktiviert werden. Eine erfolgreiche Überexpression bzw. Aufreinigung des Zielproteins konnte anhand der Signale im Lysat und im Eluat nachgewiesen werden (Abbildung 21). Allerdings war die detektierte Größe des Zielproteins größer als die berechnete Größe (170,4 kDa), was möglicherweise auf ein unnormales Laufverhalten des Proteins zurückgeführt werden kann. Aufgrund der relativ hohen Anzahl basischer Aminosäuren im Protease-Derivat (13,8 % der gesamten Aminosäuren; pI 5,12 (im Vergleich zu pI 8,4 der nativen, nicht prozessierten Protease), bindet SDS möglicherweise schlechter an das Protein; die verringerte Menge an angelagertem SDS könnte zu einer geringeren negativen

Überschussladung, und in der Folge dazu führen, dass das Protein langsamer durch die Gelmatrix wandert (Matagne *et al.* 1991). Bei drei weiteren Proteinen zwischen 75 kDa und 100 kDa, die in Lysat, Durchfluss, Waschschrift und Eluat auf dem SDS-Gel sichtbar waren, handelte es sich wahrscheinlich um kontaminierende Proteine, die nur schwach mit der Säule interagieren konnten. Da sie über alle Fraktionen verteilt waren, mit Anti-His Antikörper im Western Blot aber keine Reaktion zeigten und somit keinen His-Tag trugen, könnte es sein, dass es sich um proteolytische Abbauprodukte der Protease handelte. Die im Lysat detektierte proteolytische Aktivität könnte durch intrazelluläre Proteasen aus *E. coli* -Zellen verursacht worden sein, da in einem Kontroll-Ansatz, in welchem der Expressionsstamm keinen Vektor enthielt, ebenfalls proteolytische Aktivität detektiert wurde.

### **Expression der Proteasen in *L. lactis***

Die Überexpression der Protease-Derivate in *L. lactis* mit dem NICE-System wurde durch Nisin induziert. Als optimierte Induktionsbedingungen wurden die Kulturen bei einer OD<sub>620</sub> 0,8 durch 10 ng/ml Nisin induziert und für weitere 20 h bei 30 °C inkubiert. Obwohl mit den Nisin-Konzentrationen von 10 ng/ml bzw. 20 ng/ml ähnliche Effekte beobachtet wurden (Abbildung 22), wurde die Konzentration von 10 ng/ml gewählt, da dadurch die *minimal inhibitory concentration* (MIC) von Nisin von 14 ng/ml nicht überschritten wurde (de Ruyter *et al.* 1996).

Anhand des Signals auf der Höhe von ca. 180 kDa, das sowohl auf dem SDS-Gel als auch im Western Blot auftrat (Abbildung 23), konnte geschlossen werden, dass das Zielprotein (PrtBb) mit His-Tag exprimiert und durch die Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule gereinigt wurde. Die theoretische Größe des reifen Protease-Derivats nach Sekretion und Aktivierung sollte bei 162 kDa liegen. Dieser Unterschied kann -wie bereits erwähnt- auf ein leicht verändertes Laufverhalten durch einen hohen Anteil basischer Aminosäuren (14,5 % der gesamten Aminosäuren) zurückgeführt werden (Matagne *et al.* 1991). Bei dem im Durchfluss auf der Höhe der Protease nur im SDS-Gel detektierten Proteins könnte es sich um ein kontaminierendes Protein handeln oder um die vom C-terminalen His-Tag abgespaltene Protease, die bei den folgenden Schritten -Waschen und Eluieren- sukzessive von der Säule gewaschen wurde. Im E2 lagen zwei Banden nahe beieinander, die beide beim Western Blot detektiert wurden. Es konnte nicht zugeordnet werden, welches das Zielprotein war. Wenn die untere Bande dem reifen Enzym entsprechen

würde, wäre es möglich, dass die obere Bande ein Protein darstellt, bei dem die Pro-Domäne (17,5 kDa) unvollständig abgespalten wurde. Wenn die obere Bande dem Zielprotein entsprechen würde, wäre eine Erklärung für die kleinere Bande eine N-terminale Prozessierung des Proteins. Eine Möglichkeit zur Identifizierung der korrekten Bande wäre es, die Proteine mittels nativer SDS-Gelelektrophorese zu trennen, bei der das Gel mit Casein als Protease-Substrat versetzt ist. An der Stelle, an der das aktive Enzym liegt, sollte eine klare Zone durch Abbau des Caseins gebildet werden. Der Versuch wurde durchgeführt, es konnte aber kein Abbau des Caseins beobachtet werden. Das könnte entweder an der niedrigen Aktivität oder Menge des eingesetzten Enzyms oder an einer erfolglosen Renaturierung des Enzyms nach der Trennung durch das SDS-Gel gelegen haben.

Die proteolytischen Aktivitäten der Kulturüberstände bzw. der gereinigten Protease-Derivate wurden mittels FITC-Assay und SDS-PAGE untersucht. Im FITC-Assay (Abbildung 24) konnte eine Erhöhung der proteolytischen Aktivität der Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 im Eluat im Vergleich zum Überstand nachgewiesen werden. Dieses läßt auf eine erfolgreiche Aufreinigung schließen. Zwischen den Aktivitäten im Eluat der beiden Derivate PrtBb und PrtB2 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden: Die Abweichungen der Messwerte überlappten sich und die Proteinkonzentrationen lagen im gleichen Bereich. Die relativ niedrigen Konzentrationen im Eluat könnten durch Verlust des Zielproteins verursacht worden sein, wie z.B. durch ineffektive Interaktion des His-Tags mit den Säulenmaterialien oder durch Abspalten des His-Tags. Dieser Verlust des Zielproteins wurde bereits im SDS-Gel und Western Blot beim Durchfluss bzw. beim Waschschrift nachgewiesen und konnte anhand der steigenden Aktivität im Waschschrift nochmals bestätigt werden. Bei den anderen zwei Derivaten PrtB1 und PrtB7 konnte keine erfolgreiche Aufreinigung erzielt werden. Im Überstand zeigten sie vergleichbare Proteinkonzentrationen und proteolytische Aktivitäten wie PrtB und PrtB2, während nach der Aufreinigung der größte Anteil der His-getaggten aktiven Proteine verloren gegangen war. Dieser Verlust konnte durch die im Durchfluss detektierte Aktivität bestätigt werden. Möglicherweise hat ein partielles Abspalten des C-terminalen His-Tags stattgefunden, da im Western Blot keine Elution des His-getaggten Proteins beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität

(Abbildung 25) zeigten, dass die zu untersuchenden Proben identische proteolytische Eigenschaft besaßen. Die Kulturüberstände aller vier Derivate waren in der Lage, das Casein zu hydrolysieren. Im Verlauf der Inkubation wurden die drei Caseinderivate  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\kappa$  unterschiedlich stark abgebaut. Nach Aufreinigung der Protease-Derivate konnte ein eindeutiger Abbau des Caseins nur mit den Derivaten PrtB2 und PrtBb festgestellt werden, nicht aber mit den Derivaten PrtB1 und Prtb7 (Abbildung 26). Dies könnte wieder auf eine erfolglose Aufreinigung der Derivate PrtB7 und PrtB1 zurückgeführt werden, die durch schwache beziehungsweise fehlende Affinität zur Säulenmatrix hervorgerufen oder durch fehlende Zugänglichkeit oder Verlust des His-Tags, verursacht worden war.

### **Substratspezifität der Protease-Derivate**

Im Vergleich zu den natürlichen Proteasen der Wirtsstämme *Lb. bulgaricus* 92059 und *Lb. lactis* 92202 wurden für die modifizierten Protease-Derivate (PrtBb und PrtB2 aus 92059 und PrtB7 und PrtB1 aus 92202) breitere Substratspezifitäten festgestellt. Die natürliche Protease aus den beiden Stämmen 92059 und 92202 waren nur in der Lage,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein nicht aber  $\kappa$ -Casein zu hydrolysieren (Kliche 2013), während die entsprechenden Derivate in Kulturüberstand nicht nur  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein, sondern auch noch  $\kappa$ -Casein leicht abbauen konnten (Abbildung 25). Durch Freisetzen des Protease-Derivats aus den Zellen könnte eine verbesserte Zugänglichkeit des Substrats verursacht werden. Die natürlichen Proteasen sind an die Zellwand gebunden. Dadurch wird möglicherweise die räumliche Zugänglichkeit des Substrats im Vergleich zur löslichen Protease beschränkt. Das Substrat, das in dieser Orientierung nicht in das katalytische Zentrum gelangen würde, könnte dann nicht verwertet werden. Durch die Sekretion des Protease-Derivats ins Medium könnte eine bessere Zugänglichkeit des Substrats erfolgen und entsprechend eine breitere Substratspezifität erwartet werden. In der Abbildung 25 und 27 kann man erkennen, dass der Abbau von  $\kappa$ -Casein nur stattfand, wenn  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein bereits hydrolysiert waren oder wenn  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein nicht anwesend waren. In der Abbildung 26 war die Hydrolyse von  $\kappa$ -Casein sehr schwach. Dieses könnte an dem noch nicht vollständig abgebauten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein liegen. In Konkurrenz werden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein offensichtlich bevorzugt gegenüber  $\kappa$ -Casein verdaut. Darüber hinaus können die Eigenschaften des Substrats einen Einfluss ausüben. Im Vergleich zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -Caseinen ist  $\kappa$ -Casein hydrophiler. Dies könnte dazu führen, dass das  $\kappa$ -Casein sich nicht optimal in das katalytische Zentrum der Proteinase-Derivate

einlagern kann.

## 5.2 Bioaktivität des Caseinhydrolysats

### **Chemische Analyse des Caseinhydrolysats**

Das Caseinhydrolysat wurde nach Hydrolyse durch die Protease-Derivate PrtB2 und PrtBb mittels einer Festphasenextraktion angereichert und mit HPLC auf ihre Peptid-Muster untersucht. Die beiden durch PrtBb und PrtB2 produzierten Hydrolysate lieferten identische Peptidmuster (Abbildung 31), was darauf hindeutete, dass beide Protease-Derivate identische Substratspezifität besitzen. Anhand der steigenden Konzentrationen der Peptide im Eluat und der Wiederfindung aller Peptide (Abbildung 30), lässt sich schließen, dass durch Festphasenextraktion eine erfolgreiche Anreicherung erreicht wurde.

Die aufgetrennten Peptide in den beiden durch die Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 gebildeten Hydrolysaten wurden durch MS-LC identifiziert. Es wurden in beiden Proben die identischen Peptide nachgewiesen (Abbildung 32). Dadurch wurde noch einmal bestätigt, dass die beiden Derivate PrtBb und PrtB2 exakt die gleiche Substratspezifität aufwiesen, obwohl PrtBb eine längere C-terminale Helix-Struktur als PrtB2 besaß. Daraus kann man schließen, dass C-terminale Änderungen nach der B-Domäne der PrtB die Substratspezifität nicht beeinflussen. Dies wurde bereits bei PrtP in *L. lactis* nachgewiesen (Bruinenberg *et al.* 2000). Die durch die Protease-Derivate freigesetzten Peptide wiesen im Vergleich zu den durch die native Protease aus demselben Wirtstamm freigesetzten Peptide (Kliche 2013) kürzere Sequenzen auf, was auf eine effektivere Hydrolyse des Substrats hindeutet. Wie bereits diskutiert, könnte dies durch die Löslichkeit der Protease-Derivate und die dadurch bedingte bessere Zugänglichkeit für das Substrat und entsprechend breitere Substratspezifität verursacht sein. Die Sequenzen der identifizierten Peptide entsprachen überwiegend solchen aus dem C-Terminus bzw. aus der Mitte des  $\beta$ -Caseins. Bei der Hydrolyse des Caseins spielt die Eigenschaft des Substrats Casein neben der Substratspezifität des Enzyms eine Rolle. Strukturanalysen zeigten, dass  $\beta$ -Casein 12%  $\alpha$ -Helix-Strukturen beinhaltet (Swaisgood 1993) und die Region 21-38 potentiell eine  $\alpha$ -Helix bilden kann, die in der Nähe von Phosphorylierungsstellen liegt (Kunji *et al.* 1996). Diese Region am N-Terminus kann offensichtlich nicht von der Protease abgebaut werden (Kunji *et al.* 1996).

### **Anti-inflammatorische Aktivität bzw. zytotoxische Wirkung**

Transfizierte HEK-Zellen, die das Plasmid pGLD32.4 enthielten, wurden zur Untersuchung der anti-inflammatorischen Aktivität des Peptids verwendet. In den Zellen wurde die Expression der Luziferase dosisabhängig durch TNF- $\alpha$  induziert. Eine 3-fache Erhöhung der gemessenen Luziferaseaktivität im Vergleich zum basalen Zustand konnte durch TNF- $\alpha$  mit einer Konzentration von 0,06 ng/ml erreicht werden. Da diese Induktion um 50 % durch eine Behandlung mit dem BayII-7082, welches ein irreversibler Inaktivator der NF $\kappa$ B-Transduktion ist (Pierce *et al.* 1997), zurückgesetzt wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass die durch TNF- $\alpha$  induzierte Expression der Luziferase ein Maß für die Induktion pro-inflammatorischer Aktivität ist (Ghosh & Hayden 2012). Die durch TNF- $\alpha$  induzierte Überexpression der Luziferase wurde nach der Behandlung mit durch PrtBb hergestellten Caseinhydrolysaten in den zwei Konzentrationen 5 mg/ml und 2,5 mg/ml um 42 % bzw. 25 % reduziert (Abbildung 34). Der gezeigte Wert ist mit dem des Peptids IRW vergleichbar, welches aus Ei isoliert wurde und eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -induzierten Überexpression von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) auf 62,6 % bzw. 87,3 % mit Konzentrationen von 5 bzw. 50  $\mu$ mol/l bewirkte (Huang *et al.* 2010). Ein Peptid (DMPIQAFLLYQEPVLPVR) aus einer tryptischen Hydrolyse von  $\beta$ -Casein f(184-202) wurde von Malinowski und Kollegen identifiziert und als anti-inflammatorisch nachgewiesen (Malinowski *et al.* 2014). Da in den angereicherten Peptiden nach der Hydrolyse mit dem Protease-Derivat aus der entsprechenden  $\beta$ -Casein Region Peptide detektiert werden konnten, können diese möglicherweise für die anti-inflammatorische Aktivität verantwortlich sein. Die durch TNF- $\alpha$  induzierte Inflammation erfolgt durch die Aktivierung der I $\kappa$ B Kinase (IKK) und nachfolgende Phosphorylierung der I $\kappa$ B bzw. Freisetzung von NF $\kappa$ B. Daher konnte die detektierte anti-inflammatorische Wirkung nicht durch ACE-inhibierende Peptide verursacht werden, da die dazu benötigten Angiotensinogen- und Angiotensin II A1- Rezeptoren in HEK-Zellen nicht exprimiert wurden (Malinowski *et al.* 2014).

Das für die Hydrolyse verwendete Substrat Hammersten-Casein wurde bei der Untersuchung nicht auf die anti-inflammatorische Aktivität geprüft, weil das Hydrolysat nach der Proteolyse durch Festphasenextraktion angereichert wurde. Bei der Festphasenextraktion sollten nur kurze Peptide erhalten und anschließend eluiert werden. Das nicht gespaltene Casein sollte in diesem Fall nicht im Eluat vorhanden sein. Daher

kann man davon ausgehen, dass die anti-inflammatorische Wirkung des Peptidgemisches nicht auf ungespaltenes Casein zurückzuführen ist. Außerdem konnte für nicht hydrolysiertes  $\beta$ -Casein keine anti-inflammatorische Wirkung nachgewiesen werden (Malinowski *et al.* 2014).

Durch Zugabe des Peptid-Hydrolysats in den Konzentrationen 2,5 und 5 mg/ml in die Kontrollansätze, die kein TNF- $\alpha$  enthielten und dadurch nicht induziert waren, war keine auffällige Änderung der gemessenen Luziferaseaktivität nachweisbar (Abbildung 34). Dies zeigt, dass das Peptid-Hydrolysat keine zytotoxische Wirkung auf die HEK-Zellen hatte.

### **ACE-inhibitorische Aktivität**

Die ACE-inhibitorische Aktivität des Hydrolysats wurde nach der Hydrolyse mit den gereinigten Protease-Derivaten und anschließender Anreicherung untersucht. Das Hydrolysat wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt. Eine maximale ACE-Inhibition von 97% konnte mit der Hydrolysatkonzentraion 4,5 mg/ml beobachtet werden (Abbildung 35a). Im Vergleich dazu zeigte das Hydrolysat, welches durch die native, an die Bakterienzellwand gebundene Protease hergestellt wurde, eine 87 %-ige ACE-Inhibierung mit derselben Hydrolysatkonzentration (4,5 mg/ml) (Kliche 2013). Bei einer Verdopplung der Konzentration auf 9,1 mg/ml wurde eine Inhibierung von 89 % erzielt (Kliche 2013). In dem Konzentrationsbereich 4,5 bis 0,9 mg/ml war also mit dem durch das Protease-Derivat produzierten Hydrolysat eine stärkere Hemmung der ACE zu sehen (Abbildung 35a). Bei 0,18 mg/ml erzielten die beiden Hydrolysate einen ähnlichen Hemmwert von ca. 20 %. Die beiden Hydrolysate zeigten unterschiedliche IC-50 Werte. Das mit dem Derivat PrtBb hergestellte Hydrolysat besaß einen deutlich kleineren IC-50 Wert von 0,6 mg/ml im Vergleich zu dem des mit der nativen Protease hergestellten Hydrolysat, welches einen IC-50 Wert von ca. 1,2 mg/ml zeigte (Kliche 2013). Dies bedeutet, dass das durch PrtBb hergestellte Hydrolysat eine stärkere ACE-Inhibierungsaktivität, als das mit dem nativen Enzym produzierte Hydrolysat aufwies. Es könnte sein, dass das lösliche PrtBb, durch seine bereits oben diskutierte bessere Zugänglichkeit für das Substrat, zu einer effizienteren Hydrolyse befähigt ist. Dadurch könnten bereits freigesetzte Peptide weiter hydrolysiert und neue ACE-hemmende Peptide produziert werden (Minervini *et al.* 2003).

Aus der Literatur wurde entnommen, dass der IC-50 Wert des fraktionierten



Milchhydrolysats, das durch Fermentation mit *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SSI und *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4 hergestellt wurde, im Bereich von 0,008 bis 0,0112 mg/ml lag (Gobbetti *et al.* 2000). Demgegenüber war der IC-50 Wert von 0,6 mg/ml des mittels PrtBb produzierten Hydrolysatgemisches vergleichsweise hoch. Dies könnte auf die in dem Gemisch vorhandenen freien Aminosäuren liegen, die zu einer Überschätzung des Wertes führen können (Minervini *et al.* 2003). Die ACE-Inhibierungsaktivität einzelner Fraktionen bzw. einzelner Peptide wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Viele bekannte Inhibitor-Peptide besitzen strukturelle Ähnlichkeit. Für die Bindung an ACE scheinen die letzten drei C-terminalen Aminosäurereste wichtig zu sein. Substrate oder kompetitive Inhibitoren, die hydrophobe Aminosäuren in diesen Positionen aufweisen, sind besonders aktiv (Meisel 2004).

Ein Peptid  $\beta$ -Casein f(58-76), das nach enzymatischer Hydrolyse mit der Protease aus *Lb. helveticus* PR4 in mehreren Fraktionen zu finden war, wies eine hohe ACE-inhibierende Aktivität auf (Minervini *et al.* 2003). Wie die anderen ACE-inhibierenden Peptide besaß es einen hohen Anteil an hydrophoben oder unpolaren Aminosäuren und die letzten drei Aminosäuren am C-Terminus waren hydrophob (Minervini *et al.* 2003). Das vollständige Peptid war nach der Hydrolyse mit PrtBb nicht zu detektieren, interne Fragmente wie  $\beta$ -Casein f(57-68) und  $\beta$ -Casein f(59-68) waren in dem Hydrolysat nachweisbar. Ein Peptid, das  $\beta$ -Casomorphin-7  $\beta$ -Casein f(60-66) aus der Region mit ACE-inhibierender Wirkung, wurde bereits aus Käse isoliert (Gobbetti *et al.* 2002). Die letzten drei Aminosäuren der Region  $\beta$ -Casein f(58-76) repräsentieren das sehr bekannte ACE-inhibierende Tripeptid (IPP), welches in dem japanischen Milchprodukt Calpis identifiziert wurde (Nakamura *et al.* 1995; Hata *et al.* 1996). Diese Region  $\beta$ -Casein f(58-76) wies außer ACE-inhibierender Aktivität weitere Bioaktivitäten, z. B. antihypertensive, opioide und immunmodulierende Aktivität, auf. Sie ist stabil gegen weiteren Abbau und wurde als eine multifunktionale "Strategic Zone" bezeichnet (Gobbetti *et al.* 2002).

Weitere Peptide aus dem Hydrolysat wie z.B. die Peptide 2, 31 und 32 beinhalten dieselbe ACE-hemmende Peptidsequenz wie Casokinin-7 (AVPYPQR  $\beta$ -Casein f(177-183)) und Casokinin-10 (YQEPVLGPVR  $\beta$ -Casein f(193-202)) (Meisel 2004; Meisel & Schlimme 1994). In  $\alpha_{S1}$ -Casein konnte das Peptid FVAPFPEVF  $\alpha_{S1}$ -Casein

f(24-32) gefunden werden. Einige Peptide wie  $\alpha_{S1}$ -Casein f(23-34),  $\alpha_{S1}$ -Casein f(23-37),  $\alpha_{S1}$ -Casein f(24-27) und  $\alpha_{S1}$ -Casein f(25-27) wurden aus der Region enzymatisch freigesetzt und ihre Brandykinin-wirkenden Aktivitäten wurden nachgewiesen (FitzGerald & Meisel 2000; Dziuba *et al.* 1999; Maruyama *et al.* 1987).

### **Antimikrobielle Aktivität**

Die antimikrobielle Aktivität des durch PrtBb produzierten und anschließend angereicherten Caseinhydrolysats wurde gegen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Cronobacter sakazaki* DSMZ 4485 und *E. coli* K14 IBC 4004 im Agardiffusionstest untersucht. Eine Hemmung wurde bei *S. aureus* und bei *E. coli* beobachtet (Abbildung 36). Eine antimikrobielle Aktivität des Hydrolysats durch osmotische Effekte z. B. angereicherte Lactose wurde ausgeschlossen (Kliche 2013). Von Minervini *et al.* (2003) wurde ein antimikrobielles Peptid mit der primären Struktur  $\beta$ -Casein f(184-210) beschrieben, welches aus humanem Casein durch *Lb. helveticus* PR4 hergestellt wurde und welches gegen eine Reihe Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien wirkte. Das Peptid zeigte ähnliche strukturelle Eigenschaften wie einige bekannte antimikrobielle Fragmente aus Milchprotein, wie Isracidin ( $\alpha_{S1}$ -Casein f(16-38)) und Lactoferricin (Yamauchi *et al.* 1993; Lahov & Regelson 1996). So wies es z.B. eine ähnliche Länge mit 26 Aminosäuren auf und eine leicht positive Ladung, die für die Interaktion mit anionischen Phospholipiden der Zellwand zuständig ist und dadurch zu Störungen der Zellmembranpermeabilität führt (Meisel 2004; Korhonen & Pihlanto 2006). Weiterhin zeigte es ebenso einen relativ hohen Gehalt an unpolaren hydrophoben Aminosäurenresten, und schließlich einige Proline am C-terminalen Ende des Peptids, die es vor weiterer Degradation schützen können (Walker *et al.* 2001). In dem Hydrolysat-Gemisch nach Hydrolyse mit dem Protease-Derivat PrtBb wurden einige Peptide aus diesem Bereich  $\beta$ -Casein f(184-210) nachgewiesen, die wahrscheinlich ähnliche Eigenschaften besitzen und vermutlich für eine antimikrobielle Wirkung in Frage kommen. Weitere antimikrobielle Peptide aus  $\alpha_{S1/2}$ -Casein wurden beschrieben. Drei Peptide aus  $\alpha_{S1}$ -Casein Hydrolysaten, die durch *Lb. acidophilus* Fermentation hergestellt wurden, wiesen eine Aktivität gegen pathogene Stämme von *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868 und *Escherichia coli* DPC5063 auf (Hayes *et al.* 2006). Das Peptid Casocidin-I, bestehend aus 39 Aminosäuren aus  $\alpha_{S2}$ -Casein f(165-203) wurde als antibakterielles Peptid beschrieben (Zucht, Raida, Adermann, Magert, & Forssmann, 1995). Im durch PrtBb gebildeten Hydrolysat wurden Fragmente aus  $\alpha_{S1/2}$ -Casein

nachgewiesen. Das Hydrolysat wurde nicht fraktioniert und somit nicht auf antimikrobielle Aktivität individueller Fraktionen hin untersucht. Daher konnte nicht festgestellt werden, welches/welche einzelne Peptid/Peptide die Wirkung ausgeübt hat/haben. Diese Aktivität konnte möglicherweise durch ein oder mehrere Peptide aus dem Peptidgemisch hervorgerufen werden. Eine Spaltung von  $\alpha$ -Casein wurde nachgewiesen: Die erwarteten aus  $\alpha_{S1/2}$ -Casein stammenden, bekannten antimikrobiellen Peptide konnten nicht detektiert werden. Eine Erklärung könnte sein, dass die Peptide in dem Gemisch nicht dominant vorhanden waren und aufgrund ihrer niedrigen Konzentrationen bei der MS-Analysen nicht detektiert wurden.

## 6 Zusammenfassung

Bioaktive Peptide kommen sehr oft in Milchprotein vor und sind innerhalb der Milchproteinsequenz inaktiv. Die Freisetzung bioaktiver Peptide aus Milchprotein kann durch Proteolyse von proteolytisch aktiven Bakterien erfolgen. Aus den beiden proteolytisch aktiven Stämmen: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 92059 und *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* 92202 konnte jeweils ein Proteasegen isoliert und kloniert werden. Die Sequenzen der amplifizierten Proteasegene zeigten hohe Homologien zu Proteasen derselben Spezies. Die klonierten Proteasegene wurden im Bereich der C-terminalen Zellwand-Ankerdomäne modifiziert, um die Expression als lösliches Protein zu ermöglichen. Dabei wurden die für die proteolytische Aktivität essentiellen Domänen nicht beeinträchtigt. Aus den Proteasegenen der beiden Stämme wurden jeweils zwei unterschiedliche Varianten für die Expression in *Escherichia coli* hergestellt. Für die Expression in *Lactococcus lactis* mit Hilfe des NICE-Systems wurden pro Protease zwei weitere N-terminale Varianten konstruiert. In *E. coli* konnte für keines der exprimierten Protease-Derivate proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. In *L. lactis* konnten für beide Proteasen insgesamt vier aktive Derivate in löslicher Form exprimiert werden. Mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule konnten die Derivate PrtBb und PrtB2 der Protease aus dem Stamm 92059, die einen His-Tag enthielten, gereinigt werden. Im Gegensatz dazu waren die gereinigten Protease-Derivate PrtB7 und PrtB1 aus dem Stamm 92202 proteolytisch nicht aktiv.

Die gereinigten Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 besaßen Molekulargewichte von 183,1 kDa bzw. 171,9 kDa. Der isoelektronische Punkt des PrtBb lag bei 5,19 und der des PrtB2 bei 5,12. Beide Enzymderivate arbeiteten optimal bei 37-40°C und bei pH 6,2-7,2. Sie waren in der Lage Casein zu hydrolysieren. In den Caseinhydrolysaten, die durch die beiden Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 hergestellt wurden, wurden jeweils 32 Peptide mit einer Länge von 4-18 Aminosäuren detektiert und mittels Massenspektrometrie identifiziert. Beide Hydrolysate enthielten exakt die identischen Peptide. Für die Caseinhydrolysate konnten Bioaktivitäten wie Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibierung, anti-inflammatorische und antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden.

## 7 Summary

Certain Lactic acid bacteria (LAB) strains have been shown to produce bioactive peptides from milk protein. Bioactive peptides are encrypted within the sequence of major milk proteins, requiring enzymatic proteolysis for release and activation. From the proteolytically active *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 92059 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 92202, respectively, the genes (*prtB*) encoding cell-envelope proteinases (CEP) were amplified via PCR and then cloned into pSMART vector for sequencing. The sequence showed high homology with CEPs in the same species. For expression as a soluble protein, the C-terminal cell wall anchor domain (AN-domain) and the AN- plus the H-domain, respectively, were removed. Two protease derivatives of each strain were expressed in *Escherichia coli* and none of them showed any proteolytic activity. Two further variants of the protease derivatives of each of the two strain were constructed in *Lactococcus lactis* applying the nisin controlled expression system (NICE). Four soluble, active protease derivatives with C-terminal His-tags could be expressed in *L. lactis*. Purification with the aid of Ni<sup>2+</sup>-NTA columns yielded active protease derivatives PrtBb and PrtB2 from strain 92059, whereas the purified derivatives PrtB7 and PrtB1 from strain 92202 showed no activity.

The purified protease derivatives PrtBb and PrtB2 have molecular weights of 183.1 kDa and 171.9 kDa, respectively. The isoelectric point of PrtBb was 5.19 and that of PrtB2 was 5.12. Both enzyme derivatives worked optimally at 37-40 ° C and at pH-values between 6.2 and 7.2. The purified enzymes could be used to degrade milk protein for release of bioactive peptides. In caseinhydrolysates obtained with both protease derivatives prtBb und PrtB2, 32 peptides with 4-18 aminosacids were identified and the two hydrolysates showed the identical peptides. Bioactivity such as angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibition, anti-inflammatory and antimicrobial activity was identified in both hydrolysates.

## 8 Literaturverzeichnis

Ariyoshi Y. (1993) Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitors Derived from Food Proteins. Trends in Food Science & Technology 4 (5):139-144

Arnold R. R., Brewer M., Gauthier J. J. (1980) Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. Infect Immun 28 (3):893-898

Ashar M. N., Chang R. (2004) Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. Milchwissenschaft-Milk Science International 59 (7-8):363-366

Axelsson L. (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker

Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. (1992) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. J Appl Bacteriol 73 (6):472-479

Berrocal R., Chanton S., Juillerat M. A., Pavillard B., Scherz J. C., Jost R. (1989) Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. The Journal of dairy research 56 (3):335-341

Brody E. P. (2000) Biological activities of bovine glycomacropeptide. The British journal of nutrition 84 Suppl 1:S39-46

Bruinenberg P. G., De Vos W. M., Siezen R. J. (2000) Deletion of various carboxy-terminal domains of *Lactococcus lactis* SK11 proteinase: effects on activity, specificity, and stability of the truncated enzyme. Appl Environ Microbiol 66 (7):2859-2865

Chatterton D. E., Nguyen D. N., Bering S. B., Sangild P. T. (2013) Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. The international journal of biochemistry & cell biology 45 (8):1730-1747

Chen Z., Ruffner D. E. (1998) Amplification of closed circular DNA *in vitro*. Nucleic acids research 26 (23):1126-1127

Chiba H., Tani F., Yoshikawa M. (1989) Opioid antagonist peptides derived from kappa-casein. The Journal of dairy research 56 (3):363-366

Christensen J. E., Dudley E. G., Pederson J. A., Steele J. L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 76 (1-4):217-246

de Ruyter P. G., Kuipers O. P., Beerthuyzen M. M., van Alen-Boerrigter I., de Vos W. M. (1996) Functional analysis of promoters in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis*. Journal of Bacteriology 178 (12):3434-3439

den Hengst C. D., Curley P., Larsen R., Buist G., Nauta A., van Sinderen D., Kuipers O. P., Kok J. (2005b) Probing direct interactions between CodY and the *oppD* promoter of *Lactococcus lactis*. Journal of Bacteriology 187 (2):512-521

- Detmers F. J., Kunji E. R., Lanfermeijer F. C., Poolman B., Konings W. N. (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* 37 (47):16671-16679
- Diamant G., Dikstein R. (2013) Transcriptional control by NF-kappaB: elongation in focus. *Biochimica et biophysica acta* 1829 (9):937-945
- Dziuba J., Minkiewicz P., Nalecz D., Iwaniak A. (1999) Database of biologically active peptide sequences. *Die Nahrung* 43 (3):190-195
- Fernandez-Espla M. D., Garault P., Monnet V., Rul F. (2000) *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* 66 (11):4772-4778
- FitzGerald R. J., Meisel H. (1999) Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides. *Die Nahrung* 43 (3):165-167
- FitzGerald R. J., Meisel H. (2000) Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *The British journal of nutrition* 84 Suppl 1:S33-37
- Foltz M., van Buren L., Klaffke W., Duchateau G. S. (2009) Modeling of the relationship between dipeptide structure and dipeptide stability, permeability, and ACE inhibitory activity. *Journal of Food science* 74 (7):H243-251
- Frees D., Varmanen P., Ingmer H. (2001) Inactivation of a gene that is highly conserved in Gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*. *Molecular microbiology* 41 (1):93-103
- Gagnaire V., Molle D., Herrouin M., Leonil J. (2001) Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. *Journal of agricultural and food chemistry* 49 (9):4402-4413
- Gasson M. J. (1983) Plasmid Complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and Other Lactic Streptococci after Protoplast-Induced Curing. *Journal of bacteriology* 154 (1):1-9
- Germond J. E., Delley M., Gilbert C., Atlan D. (2003) Determination of the domain of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell surface proteinase PrtB involved in attachment to the cell wall after heterologous expression of the prtB gene in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 69 (6):3377-3384
- Ghosh S., Hayden M. S. (2012) Celebrating 25 years of NF-kappaB research. *Immunological reviews* 246 (1):5-13
- Gilbert C., Atlan D., Blanc B., Portalier R., Germond J. E., Lapierre L., Mollet B. (1996) A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J Bacteriol* 178:7
- Gitton C., Meyrand M., Wang J., Caron C., Trubuil A., Guillot A., Mistou M. Y. (2005) Proteomic signature of *Lactococcus lactis* NCDO763 cultivated in milk. *Appl Environ Microbiol* 71 (11):7152-7163

- Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F., Addeo F. (2000) Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl Environ Microbiol* 66 (9):3898-3904
- Gobbetti M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R. (2002) Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical reviews in food science and nutrition* 42 (3):223-239
- Gottesman S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* 30:465-506
- Guedon E., Renault P., Ehrlich S. D., Delorme C. (2001a) Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *Journal of Bacteriology* 183 (12):3614-3622
- Guedon E., Serror P., Ehrlich S. D., Renault P., Delorme C. (2001b) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Molecular microbiology* 40 (5):1227-1239
- Haandrikman A. J., Kok J., Laan H., Soemitro S., Ledebouer A. M., Konings W. N., Venema G. (1989) Identification of a gene required for maturation of an extracellular lactococcal serine proteinase. *Journal of Bacteriology* 171 (5):2789-2794
- Haandrikman A. J., Kok J., Venema G. (1991) Lactococcal proteinase maturation protein PrtM is a lipoprotein. *Journal of bacteriology* 173 (14):4517-4525
- Hammes W. P., Hertel C. (2006) The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, vol 4. *The Prokaryotes; Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, 3 edn. Springer
- Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y., Takano T. (1996) A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition* 64 (5):767-771
- Hayes M., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Hill C., Stanton C. (2006) Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Appl Environ Microbiol* 72 (3):2260-2264
- Hebert E. M., Raya R. R., De Giori G. S. (2000) Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl Environ Microbiol* 66 (12):5316-5321
- Hirsh J., Schleif R. (1977) The *araC* promoter: transcription, mapping and interaction with the *araBAD* promoter. *Cell* 11 (3):545-550
- Holck A., Naes H. (1992) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151. *J Gen Microbiol* 138:12
- Huang W., Chakrabarti S., Majumder K., Jiang Y., Davidge S. T., Wu J. (2010) Egg-derived peptide IRW inhibits TNF-alpha-induced inflammatory response and



oxidative stress in endothelial cells. *Journal of Agricultural and food chemistry* 58 (20):10840-10846

Jacobs M., Andersen J. B., Kontinen V., Sarvas M. (1993) *Bacillus subtilis* PrsA is required *in vivo* as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences. *Molecular microbiology* 8 (5):957-966

Juillard V., Laan H., Kunji E. R., Jeronimus-Stratingh C. M., Bruins A. P., Konings W. N. (1995) The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of bacteriology* 177 (12):3472-3478

Kayser H., Meisel H. (1996) Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS letters* 383 (1-2):18-20

Kitts D. D., Weiler K. (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design* 9 (16):1309-1323

Kleerebezem M., Beerthuyzen M. M., Vaughan E. E., de Vos W. M., Kuipers O. P. (1997) Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 63 (11):4581-4584

Kliche T. (2013) Freisetzung bioaktiver Peptide aus Milchproteinen durch proteolytische Enzyme von Milchsäurebakterien. Dissertation, Christian-Albrechts Universität zu Kiel

Kok J. (1990) Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews* 7 (1-2):15-42

Kok J., Leenhouts K. J., Haandrikman A. J., Ledebøer A. M., Venema G. (1988) Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol* 54 (1):231-238

Korhonen H., Pihlanto A. (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16 (9):945-960

Kuipers O. P., Beerthuyzen M. M., de Ruyter P. G., Luesink E. J., de Vos W. M. (1995) Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *The Journal of Biological chemistry* 270 (45):27299-27304

Kuipers O. P., de Ruyter P. G., Kleerebezem M., de Vos W. M. (1997) Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends in biotechnology* 15 (4):135-140

Kuipers O. P., de Ruyter P. G. G. A., Kleerebezem M., de Vos W. M. (1998) Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 64 (1):15-21

Kunji E. R. S., Hagting A., De Vries C. J., Juillard V., Haandrikman A. J., Poolman B., Konings W. N. (1995) Transport of beta-casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *The*

Journal of Biological chemistry 270 (4):1569-1574

Kunji E. R. S., Mierau I., Hagfing A., Poolman B., Konings W. N. (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:187-221

Lahov E., Regelson W. (1996) Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food chem Toxicol* 34 (1):131-145

Law B. A., Kolstad J. (1983) Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:225-245

Lee Y. S., Park G., Naito H. (1992) Supplemental Effect of Casein Phosphopeptides (CPP) on the Calcium Balance of Growing Rats. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi* 45 (4):333-338

Loukas S., Varoucha D., Zioudrou C., Streaty R. A., Klee W. A. (1983) Opioid activities and structures of alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry* 22 (19):4567-4573

Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Forster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A. W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lussmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., Schleifer K. H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic acids research* 32 (4):1363-1371

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. (2001) *Brock Mikrobiologie*, vol 9. Auflage. Brock Mikrobiologie. Spektrum

Malinowski J., Klempt M., Clawin-Radecker I., Lorenzen P. C., Meisel H. (2014) Identification of a NFkappaB inhibitory peptide from tryptic beta-casein hydrolysate. *Food chemistry* 165:129-133

Malkoski M., Dashper S. G., O'Brien-Simpson N. M., Talbo G. H., Macris M., Cross K. J., Reynolds E. C. (2001) Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45 (8):2309-2315

Marker A., Laber N., Laber A. Blotting: Kapillarblotting  
<http://home.arcor.de/alexander.marker/referate/blotting/blotting.htm> 2016

Marugg J. D., Meijer W., van Kranenburg R., Laverman P., Bruinenberg P. G., de Vos W. M. (1995) Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. *Journal of Bacteriology* 177 (11):2982-2989

Maruyama S., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N., Suzuki H. (1987) Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein. *Agricultural and Biological Chemistry* 51 (6):1581-1586

Matagne A., Joris B., Frere J. M. (1991) Anomalous behaviour of a protein during SDS/PAGE corrected by chemical modification of carboxylic groups. *The Biochemical journal* 280 ( Pt 2):553-556

- Matar C., LeBlanc J. G., Martin L., Perdigon G. (2003) Biologically active peptides released in fermented milk: Role and functions. Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceuticals series. CRC Press
- Meisel, Schlimme (1994) Inhibitors of angiotensin-converting-enzyme derived from bovine casein (casokinins)  $\beta$ -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. Weinheim: VCH
- Meisel H. (1986) Chemical characterization and opioid activity of an exorphin isolated from *in vivo* digests of casein. FEBS letters 196 (2):223-227
- Meisel H. (2004) Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. BioFactors 21 (1-4):55-61
- Meisel H. (2005) Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. Current medicinal chemistry 12 (16):1905-1919
- Meisel H., FitzGerald R. J. (2003) Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Current pharmaceutical design 9 (16):1289-1295
- Meyer J., Butikofer U., Walther B., Wechsler D., Sieber R. (2009) Hot topic: Changes in angiotensin-converting enzyme inhibition and concentrations of the tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro during ripening of different Swiss cheese varieties. Journal of dairy science 92 (3):826-836
- Mierau I., Kleerebezem M. (2005) 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Applied microbiology and biotechnology 68 (6):705-717
- Mierau I., Kunji E. R., Leenhouts K. J., Hellendoorn M. A., Haandrikman A. J., Poolman B., Konings W. N., Venema G., Kok J. (1996) Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk. Journal of bacteriology 178 (10):2794-2803
- Migliore-Samour D., Floch F., Jolles P. (1989) Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. The Journal of dairy research 56 (3):357-362
- Migliore-Samour D., Jolles P. (1988) Casein, a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? Experientia 44 (3):188-193
- Minervini F., Algaron F., Rizzello C. G., Fox P. F., Monnet V., Gobbetti M. (2003) Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. Appl Environ Microbiol 69 (9):5297-5305
- Morel F., Lamarque M., Bissardon I., Atlan D., Galinier A. (2001) Autoregulation of the biosynthesis of the CcpA-like protein, PepR1, in *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*. Journal of molecular microbiology and biotechnology 3 (1):63-66
- Nagpal R., Behare P., Rana R., Kumar A., Kumar M., Arora S., Morotta F., Jain S., Yadav H. (2011) Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. Food & Function 2 (1):18-27

- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T. (1995) Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of dairy science* 78 (4):777-783
- Navarre W. W., Schneewind O. (1994) Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Molecular microbiology* 14 (1):115-121
- Paegelow I., Werner H. (1986) Immunomodulation by Some Oligopeptides. *Method Find Exp Clin* 8 (2):91-95
- Parker F., Migliore-Samour D., Floc'h F., Zerial A., Werner G. H., Jolles J., Casaretto M., Zahn H., Jolles P. (1984) Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties. *European journal of biochemistry / FEBS* 145 (3):677-682
- Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., van Kranenburg R., Kleerebezem M., Topisirovic L., Jovanovic G. (2003) Identification and Genetic Characterization of a Novel Proteinase, PrtR, from the Human Isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (10):5802-5811
- Pederson J. A., Mileski G. J., Weimer B. C., Steele J. L. (1999) Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of bacteriology* 181 (15):4592-4597
- Petranovic D., Guedon E., Sperandio B., Delorme C., Ehrlich D., Renault P. (2004) Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Molecular microbiology* 53 (2):613-621
- Pierce J. W., Schoenleber R., Jesmok G., Best J., Moore S. A., Collins T., Gerritsen M. E. (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects *in vivo*. *The Journal of biological chemistry* 272 (34):21096-21103
- Pihlanto-Leppälä A. (2000) Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology* 11 (9-10):347-356
- Pihlanto-Leppälä A., Antila P., Mäntsälä P., Hellman J. (1994) Opioid peptides produced by *in-vitro* proteolysis of bovine caseins. *International Dairy Journal* 4 (4):291-301
- Pritchard G. G., Coolbear T. (1993) The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews* 12 (1-3):179-206
- Quirion R., Weiss A. S. (1983) Peptide E and other proenkephalin-derived peptides are potent kappa opiate receptor agonists. *Peptides* 4 (4):445-449
- Raikos V., Dassios T. (2014) Health-promoting properties of bioactive peptides derived from milk proteins in infant food: a review. *Dairy science & technology* 94:91-101
- Rokka T., Syväoja E. L., Tuominen J., Korhonen H. (1997) Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus GG* fermented UHT milk. *Milchwissenschaft*

52:675-677

Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Suzuki Y., Ruperez M., Egido J. (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Current opinion in nephrology and hypertension* 10 (3):321-329

Sato R., Noguchi T., Naito H. (1986) Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *Journal of nutritional science and vitaminology* 32 (1):67-76

Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology* 71 (4):394-406

Schick J., Weber B., Klein J. R., Henrich B. (1999) PepR1, a CcpA-like transcription regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Microbiology (Reading, England)* 145 ( Pt 11):3147-3154

Schleif R. (2000) Regulation of the l-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends in Genetics* 16 (12):559-565

Sen R., Baltimore D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46 (5):705-716

Sharma S., Singh R., Rana S. (2011) Bioactive Peptides: A Review. *International Journal BIOAUTOMATION* 15 (4):28

Singh H., Sen R., Baltimore D., Sharp P. A. (1986) A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319 (6049):154-158

Soisson S. M., MacDougall-Shackleton B., Schleif R., Wolberger C. (1997) Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science (New York, NY)* 276 (5311):421-425

Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* 98 (3):503-517

Stamatakis A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics (Oxford, England)* 22 (21):2688-2690

Stefanitsi D., Sakellaris G., Garel J. (1995) The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *FEMS Microbiol Lett* 123:5

Stucky K., Schick J., Klein J. R., Henrich B., Plapp R. (1996) Characterization of *pepR1*, a gene coding for a potential transcriptional regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290. *FEMS Microbiol Lett* 136 (1):63-69

Swaigood H. E. (1993) Review and update of casein chemistry. *Journal of dairy science* 76 (10):3054-3061

Tan P. S., Poolman B., Konings W. N. (1993) Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *The Journal of dairy research* 60 (2):269-286

- Teschemacher H., Koch G., Brantl V. (1997) Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopolymers* 43 (2):99-117
- Teuber, Geis (1981) The family Streptococaceae (non-medical aspects) *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer-Verlag
- Varmanen P., Ingmer H., Vogensen F. K. (2000a) *ctsR* of *Lactococcus lactis* encodes a negative regulator of *clp* gene expression. *Microbiology (Reading, England)* 146 ( Pt 6):1447-1455
- Varmanen P., Savijoki K., Avall S., Palva A., Tynkkynen S. (2000b) X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene (*pepX*) is part of the *glnRA* operon in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of bacteriology* 182 (1):146-154
- Vermeulen N., Pavlovic M., Ehrmann M. A., Ganzle M. G., Vogel R. F. (2005) Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T during growth in sourdough. *Appl Environ Microbiol* 71 (10):6260-6266
- Vos P., Simons G., Siezen R. J., de Vos W. M. (1989) Primary structure and organization of the gene for a procaryotic, cell envelope-located serine proteinase. *The Journal of biological chemistry* 264 (23):13579-13585
- Vos W. D., Siezen R. (1994) Engineering pivotal proteins for lactococcal proteolysis. *Biochemistry of Milk Products*. Woodhead Publishing Ltd
- Walker J. R., Roth J. R., Altman E. (2001) An *in vivo* study of novel bioactive peptides that inhibit the growth of *Escherichia coli*. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 58 (5):380-388
- Walther B. Wirkung der ACE-hemmenden Peptide 2006
- Yamamoto N., Takano T. (1999) Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung-Food* 43 (3):159-164
- Yamauchi K., Tomita M., Giehl T. J., Ellison R. T., 3rd (1993) Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* 61 (2):719-728
- Zucht H. D., Raida M., Adermann K., Magert H. J., Forssmann W. G. (1995) Casocidin-I: a casein- $\alpha$  s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS letters* 372 (2-3):185-188

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blutdruckregulation durch bioaktive Peptide über das Angiotensin- und Bradykinin-System .....	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung des proteolytischen Systems in <i>L. lactis</i> .....	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des PrtP aus <i>L. lactis</i> und PrtB aus <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .....	20
Abbildung 4: Aufbau des Kapillar-Blot-Moduls .....	34
Abbildung 5: Aufbau eines Plasmids aus pSmart-Klonierungen mit dem Insert .....	40
Abbildung 6: Aufbau eines Plasmids aus pBad-Klonierungen mit dem Insert .....	42
Abbildung 7: Aufbau eines Plasmids aus pNZ8048(oben) und pNZssp(unten)-Klonierungen .....	43
Abbildung 8: Mechanismus der Regulation von L-Arabinose Operon durch Arabinose .....	44
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Nisin-Gen-Clusters .....	46
Abbildung 10: Schematische Darstellung des NICE-Systems in der Zelle .....	46
Abbildung 11: Aufbau eines Semidry-Blots .....	50
Abbildung 12: Aufzeichnung des Verlaufs einer Gefriertrocknung .....	56
Abbildung 13: Standardkurve zur TNF- $\alpha$ konzentrationsabhängigen Induktion der Expression der Luziferase (n=3) .....	58
Abbildung 14: Spezies-Bestimmung mittels 16S rDNA-Sequenzierung nach der Maximum Likelihood Methode mit 1000 Wiederholungen .....	60
Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR zur Amplifikation der konservierten Region der Protease .....	61
Abbildung 16: Southern-Hybridisierung der gDNA aus 92202 und 92059 .....	62
Abbildung 17: Gezielte Amplifikation der Proteasegene aus den Stämmen 92059 und 92202 .....	63
Abbildung 18: Agarose-Gelelektrophorese der Plasmid-DNAs zur Kontrolle der Klonierung von <i>prtB</i> 92059 und <i>prtB</i> 92202 in den Vektor pSmart .....	64
Abbildung 19: Vergleich der Aminosäuresequenz des <i>PrtB</i> -Gens 92059 mit repräsentativen Sequenzen aus Datenbanken .....	65
Abbildung 20: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel und Western-Blot der Fraktionen einer Aufreinigung des Protease-Derivats PrtB117 mit C-terminalem His <sub>6</sub> -Tag in <i>E. coli</i> LMG194 pBL7 (pBad <i>prtB</i> Pro+B59) .....	67
Abbildung 21: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel und Western-Blot der Fraktionen einer denaturierten Aufreinigung des Protease-Derivats PrtB117 mit C-terminalem His <sub>6</sub> -Tag in <i>E. coli</i> LMG194 pBL7 (pBad <i>prtB</i> Pro+B59) .....	68
Abbildung 22: SDS-PAGE des Protease-Derivats PrtBb in <i>L. lactis</i> mit NICE System zur Optimierung der Induktionsbedingungen .....	70
Abbildung 23: SDS-Gel und Western-Blot zur Aufreinigung des Protease-Derivats PrtBb mit C-terminalem His <sub>6</sub> -Tag in <i>L. lactis</i> NZ9000 pBL15 (pNZ8048 <i>prtB</i> PräH059) .....	71
Abbildung 24: Darstellung der durch FITA-Assay gemessenen proteolytischen Aktivitäten der PrtBb und PrtB2 von allen Fraktionen der Aufreinigung .....	72
Abbildung 25: SDS-PAGE von Casein nach Hammersten (6 mg/ml) sowie dessen Hydrolyseprodukte mit unverdünnten Kulturüberständen (jeweils gewachsen bis OD <sub>620</sub> 1,2) von <i>L. lactis</i> NZ9000 mit jeweiligem Plasmid .....	73
Abbildung 26: SDS-PAGE von Casein nach Hammersten (6 mg/ml) sowie dessen Hydrolyseprodukte mit den gereinigten Protease-Derivaten .....	73
Abbildung 27: SDS-PAGE von $\alpha$ -, $\beta$ - und $\kappa$ -Casein sowie deren Hydrolyseprodukte zur Bestimmung der Casein-Spezifität von den Protease-Derivaten PrtB2 und PrtBb .....	74
Abbildung 28: Abhängigkeit der Aktivität der Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 aus	

---

92059 von der Temperatur .....	75
Abbildung 29: Abhängigkeit der Aktivität der Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 vom pH-Wert.....	75
Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm des durch PrtBb hergestellten Hydrolysats nach Festphasenextraktion .....	76
Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm der durch PrtBb (blau) und PrtB2 (rot) produzierten Caseinhydrolysate nach der Aufreinigung.....	77
Abbildung 32: Basepeak-Chromatogramm der durch PrtBb (BoLiA) und PrtB2 (BoLiB) hergestellten Caseinhydrolysate.....	77
Abbildung 33: Darstellung der Schnittstellen bzw. der ermittelten Peptid-Sequenzen aus $\beta$ -Casein nach der Hydrolyse durch die gereinigten Protease-Derivate PrtBb und PrtB2 aus 92059 .....	78
Abbildung 34: Anti-inflammatorischer Effekt des Caseinhydrolysats auf die Luziferaseaktivität von HEK-Zellen, die das Reporterplasmid pGLD32.4[luc2P/NF- $\kappa$ B-RE/Hygro] (Promega, Heidelberg, Germany) enthielten. ....	79
Abbildung 35: Nachweis der ACE-inhibierenden Aktivität des mittels Protease-Derivate PrtBb hergestellten Caseinhydrolysats .....	80
Abbildung 36: Hemmhof des Wachstums von den testenden Stämmen auf Müller-Hinton Agar nach über Nacht Inkubation bei 37 °C.....	81
Abbildung 37: Standards für die gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren und Proteinen .....	106



**10 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Liste der verwendeten Stämme, Teil I.....	23
Tabelle 2: Liste der verwendeten Plasmide .....	24
Tabelle 3: Liste der verwendeten Medien .....	26
Tabelle 4: Eingesetzte Antibiotika und verwendete Konzentrationen .....	27
Tabelle 5: Für das <i>Colony Cracking</i> verwendete Puffer und Färbelösung .....	30
Tabelle 6: Für die Agarose-Gelelektrophorese verwendete Puffer und Färbelösung .....	31
Tabelle 7: Pitettierschema der PCR .....	31
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der PCR .....	32
Tabelle 9: Restriktionsansatz .....	33
Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen für Southern Blot .....	35
Tabelle 11: Ansatz der LDA.....	37
Tabelle 12: Programm einer LDA.....	37
Tabelle 13: Puffer für Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	38
Tabelle 14: Elektroporationspuffer für die Herstellung kompetenter Laktokokken Zellen .....	39
Tabelle 15: Übersicht der Plasmide aus der Klonierung mit Vektor pSmart .....	40
Tabelle 16: Übersicht der Plasmide aus der Klonierung mit Vektor pBad .....	41
Tabelle 17: Übersicht der Plasmide aus der Klonierung mit Vektoren pNZ8048 und pNZssp .....	42
Tabelle 18: Puffer für die <i>His-tag</i> Aufreinigung.....	47
Tabelle 19: Puffer für SDS-PAGE .....	49
Tabelle 20: Puffer und Lösungen für Western Blot .....	51
Tabelle 21 : Ansatz und Ablauf des FITC-Tests.....	52
Tabelle 22: Methode der chromatographischen Trennung der Peptide an HPLC .....	53
Tabelle 23: verwendete Puffer und Lösung in dem ACE-Inhibition Test.....	57
Tabelle 24: Identifizierung der Stämme 92202 und 92059 durch Fermentation unterschiedlicher Kohlenhydratquellen .....	61
Tabelle 25: Übersicht der Protease-Derivate, die in <i>E.coli</i> LMG194 exprimiert wurden. ....	66
Tabelle 26: Übersicht der Protease-Derivate, die in <i>L. lactis</i> NZ9000 exprimiert wurden. ....	69
Tabelle 27: Aufreinigungstabelle der <i>His-Tag</i> Aufreinigung der Protease-Derivaten PrtBb, PrtB2, PrtB7 und PrtB1 in <i>L. lactis</i> NZ9000 .....	71
Tabelle 28: Übersicht der verwendeten PCR-Primer.....	106

## 11 Anhang

### 11.1 Standards für die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen

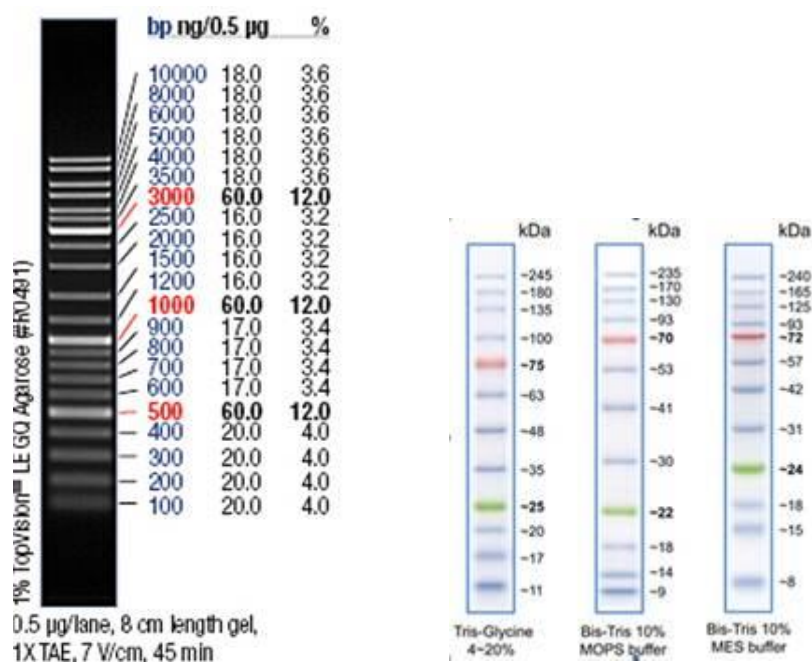


Abbildung 37: Standards für die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen

Links: Generuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, Schwerte.

Rechts: Protein Marker VI, Applichem, Darmstadt

### 11.2 Übersicht der verwendeten PCR-Primer

Tabelle 28: Übersicht der verwendeten PCR-Primer

Primer	Sequen (5' → 3')	Beschreibung
Jp1	GTTATCTCTGCTGGGAAC	Sonde für Southern Blot
Jp2	GTGAAGCCATTGAAGTCC	
prtB-For	CGTGTGATGAAAGGCTTG	gezielte Amplifikation prtB aus <i>Lb. delbrueckii</i>
prtB-Rev	GACCGTCTCCCTCTAA	
F NcoI-prtB59-Pro+	AGACCATGGCTTTTGTCCAAGCTGCCAGTC	Anfügen NcoI-Schnittstelle an PrtB59 Pro+
F NcoI-prtB202-Pro+	AGACCATGGAGACTTTTGTCCAA GCTACCAGTC	Anfügen NcoI-Schnittstelle an PrtB202 Pro+
F NcoI-prtB-Pro-	ACCACCATGGATGAGAGTGCTGATCAAATGGC	Anfügen NcoI-Schnittstelle an PrtB59/202 Pro-
R prtB-XbaI-B	AGATCTAGATTCTGGGCAGCGAC TTCCTTGAC	Anfügen XbaI-Schnittstelle an PrtB59/202 B
F NcoI-prtB-Prä	AGAAGACCATGGAGAAGAAAA ATCCGCAC	Anfügen NcoI-Schnittstelle an PrtB59/202 Prä

R prtB-XbaI-H	TGTTGTTCTAGACTTCTTCGCGCT ACT	Anfügen XbaI-Schnittstelle an PrtB59/202 H
R prtB-XbaI-H <sub>2</sub>	ATGGTATCTAGATGGGCAGCGAC TTC	Anfügen XbaI-Schnittstelle an PrtB202 B2
LDA F H	GAAGTCTGCAGAACAAAACTC	Korrektur der Mutationsstelle
LDA F B	CAGTCTGCAGAACAAAACTC	Korrektur der Mutationsstelle
27F-16S	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Amplifizieren des 16s rDNA-Bereiches
1492R-16S	GGTTACCTTGTTACGACTT	

### 11.3 DNA-Sequenzen der Proteinase Gene aus 92202 und 92059

>*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*\_92202\_prtB (5871 bp)

```

1  ATGAAAGGCT TGCTAATAAA AATATTTATT TGTCTAAAGG AGTTACGGAA ACAGATGCAG
61  AAGAAAAAAT CCGCACGCCA TTTGAACAAA GTGGCTGAAC TAGCGGCAGC ACTGCTCCTA
121 TCAGCGAGTC CACTGGCGGG AACTTTCCAG TCAGCCACTT TTGTCCAAGC TACCAGTCAA
181 GAAACGGTTA GTCCACGGTC GGCTAGCCGG GCAGCATTGA CTAAGTACTT GCAGCAAAG
241 CAGCGCTATA ACGCTAAGAA GAGTTACAGC AAGTTCCAAG AGGCTGCTAA AGAGCAAAGA
301 CAGGCTTCTG GCCAAGCTGT CAGCAAGAAG AATGAGTCCT CGGTCCGGGT GATTGTCAGT
361 CTGAACAAGT CAGCGGCATT TGATCACACC AGTAAGCCGA CTGGATCAGC TGCCTCAGTG
421 AAAAAGATTG AGCAGGCAAG TGACCAAGTC AAGGATGGTC AAGAAAAGGT TATCAAGCAG
481 GTAGAAGAAA TCACCGGCAA CAAGGTCCGC CGGCAGTTCG GCTACTTGGT CAATGCTTTT
541 TCAATCGATA TGGATTTAGA CGATATCGAC AAGGTTAAGG ATATGCCCCA GGTTAAGAAC
601 GTTACGCCTG TCAAGGTTTA TCACCCAACC GATGAGAGTG CTGATCAAAT GGCCCAAGTG
661 CAGGACGTTT GGCAAGAACA AAAGCTCAAG GGTGAAGGTA TGGTCATTTT GATCATTGAT
721 ACCGGGATCG ACTCCAGCCA CCAGGACTTG AAGTTGGACA GTGGCGTCAG CACCGCGTTG
781 AGTAAGAGTG AGGTTGAAA GACAAGAGT AAGCTAGGTC ATGGGAAGTA TTACACGGAG
841 AAGGTTCTTC ACGGCTATAA CTACGCTGAT AAGAACGACC AAATCGTGGA CAATGGGCTC
901 GCGGAAATGC ACGGCCAGCA CGTGGCCGGG ATTGCCGGGG CCAATGGCCA AGTCAAAGGT
961 GTTGTCTCTG ATGCCAGCT TTTGGCAATG AAGGCTTCTT CCAACAATGC CAAGAATTC
1021 GGAGCCTATG ATGACGACAT CATTTCCCGG ATCGAAGATT CAGTTAAGCT GGGGGCCAAC
1081 GTTATCAACA TGAGTTTGGG CTCATTTTCA TCAGATGTCG ATCCAAGTGA TCCAGAGCAA
1141 CAAGCCGTAG CAAAGGCATC AGAGGCTGGC GTCATTAATG TTATCTCTGC TGGGAACTCC
1201 GGTGTTGCCG GGTGACTGTC GGATGGTAAT CCGGTCAATA ATACCGGGAC AAGTGAAGTC
1261 AGTACTGTTG GCGCTCCAGG GGTTACGCCA GATGCTCTGA CGGTTGCCTC TGCTGAAAAC
1321 AGCAAAGTGA CCACCGACAC GGTAAAGAC GAACTCGGTG GGGTCACCTT TAGCGCAAAT
1381 TCCGAATTGA AGGGTGCTGC ACAAGTAACA ACCCAGCTTG AAAGCAACTA TTCCTTTTAA
1441 ACCAAGAAGC TTAAGCTTGT TGACATGGGC TTGGGCGGTG CAGATGACTA TACTGCTGAA
1501 AAGAAGGCTG AGGTTAAGGG ACAACTTGCA GTTGTAAAC GGGGATCTTA TACCTTCTCA
1561 GAGAAAGTTG CCAATGCCAA GGCAGCTGGC GCGGCAGGGA TCGTCATTTA CAATAACAAT
1621 GATAACGGCT TACTTTCAAT GGCCTGGAC GACAAGACTT TCCCAACCTT AGGGATGAGT
1681 AAGGCTGATG GGAAGTTCT GGCTCAAGCA GCAAAAGATG GTAAGAGCAT CAAGCTGAAA
1741 TTCGGTACTG CTTTAATCGA TAACTCCAGT GCGGGAAGA TGAGCGACTT TACCAGCTGG
1801 GGACCAACGC CGGAACTCGA CTTCAAGCCA GAAATTACTG CTCCAGGCGG GAAGATCTAC
1861 TCGCTGGCCT ACGACAACAA GTACCAGCAA ATGAGTGGGA CTTCAATGGC TTCACCATTT
1921 GTCGACAGTT CCGAAGCATT AATTTGCAA GGTATCAAGA AACAAGGTTT GAACCTGTCC
1981 GGGGAAGAAT TAGTACAATT TGCTAAGAAT TCAGCCATGA ACACTTCGCA CCCCTTCTAT
2041 GACACTGAGC ATACCAAGGA AATTATTTCT CCCC GCCCGG AAGGAAGTGG CGAAATCAAT
2101 GTTAAAGATG CCAATCAACAA TACGTTGAG GTTAAGGCAG CCAACGGCAA CGGGGCAGCA
2161 GCCTTGAAAG AAATTGGCCG GCAGACGACC TTTAAGGTTA CCTTGACCAA TCATGGCAAAG
2221 AAGGCCCAGA CCTATGCAGT TGATAATTAT GCGGTTCCAT ACACCCAGGC AACCGAAGCG
2281 AAGAGTGGCG AAATCTATGA CACAAAGATT GTTAAGGGAC AGCTGACGAC GGAGACGCCA
2341 AAGGTAAGTG TCCAGCCTGG CGAAAGCGTG GATGTAAGCT TTACCTTGAC CCTGCCATAC
2401 AGTTTCCAGC GGCAAATTT TGTTGAAGGC TATGTTGGCT TTGAAGCAGA AGACCGGGCA
2461 ACACCAAACC TGTTCTTCC ATACATGGGC TTTTTCGGCA GCTACAGTCA AGCGAGTGTC
2521 AGCGCACCAA TGCTTTATGA AAGTGGCAAT TCAAATCTAA TCAACACAAT TCACTCCCTG
2581 GTTGGCGTCA TGCTTCTTAA CAACAATGAT ATTCTCGGTC AACTTGGCTA TGAGGGTGAT
2641 GATTACAGCA AGTATACTGA TCCTGATCTG ATCGCGATTT CACCAAATGG CGATGGTAGC

```

```

2701  CGGGACTACG CATATCCTGT TCTCTTCTTT GACCGGAACT ACAAGGAATA CACGGAAACG
2761  ATTACTGATG CTCAAGGAAA CAAAGTTAAG AGCTTGGGCG TTGGTAAAAA GGGAACTAAA
2821  GATTACTACA GTTCTTCAAG AGGCAAGTGG ACAACCCACT CACTGGACAA GTGGGATGGC
2881  ACTGACGCTG ACGGCCAAGT CGTCAAGGAT GGGCAATACA TCTACAAGT TGAATTTACC
2941  CCAGCAACTG GCGGCAGCAA GCAGGAATTG AACATCCCTG TCAAGGTTGA TACCCAAGCG
3001  CCAGAAGTGA GTGACTTGCA AGTTACCAA GATGGCAAGC TCCGTTTGAA GGCTAAGGAT
3061  TCCGGCAGCG GTCTTGACAT GACAATGTTT GTTGCGGCAG TAAACGGTGA AAAGCAGAAG
3121  CTGGCGCTGG CTCCGGTTAA GGGAGAAAGT GATGTTTACG AGTCAACGAC TGCCTTGACT
3181  GGACTTAAGG ACGGCAAGAA CCAAGTAGAA ACTGTTGTGG CTGACTATGC CGGCAATGTT
3241  GGCTATGCTG CAACTTTCTC CAGTCAAAAT AACGATGCTG ATAACAAGCT TCTTCTCTTT
3301  AACTTAGCTG ACGGTCAAAA GATCACTAGT CAAAGCCCGG CTACGATCA AGAGAAAGAA
3361  ACTTACTACTG TAACTGGTAC TTACAAGAAG AATGCCAAGC TTAAGTTTAA TGATGTCGAG
3421  GCAGAAAGCG ATGAAGATGG ATACTTTGAA GTTAAGCTGC CAGTCAAGGA TGGACAAAAC
3481  CAGCTTTTGA TCAAGGATGG GGACCAAACC CTTGAAGCAG TCAACTTCAC TGTTAAGGCT
3541  GAAGGACCAA AAGTCAGCGT TGACGAAAGAA AGCTCAGGCC GCATTTTGGC TAAGGATGAT
3601  TCCTATACTT TATCCGGGAC GGTATCTGGT CTTGGCGAAA GCGGCAAACT GGAACGACA
3661  AACTTGCTCG ACAAGAGTAA GACTAAGTTA ACGGTTGACC AGGACGGCAA GTTCTCACAA
3721  AAGGTTGACT TGAACACGG TGATAATCCT TTTGAACTGA CAGCAACTGA TCGCGATGGC
3781  AATGTTACAA AGAAGGACGT AACGATTTTC ACCGCTAGAA GTTACACTTA CATCAAGGAT
3841  ATGCTGACTT TTGACAATAT CGCCAGCGAT CTGACGGTTA TTGGCAAGAC GACGCCGGGT
3901  TACGATGAGA AGGACCACAG CTTACAGTA ACGGGTAAAC TCGCGTACCC AGTCGCCCGC
3961  TTCCAGTTAA ACGGGGATGA CGTTAAGTAC GACCCAGATA CATTGAAGTT CAGCTACACG
4021  ATCAAAGACT TAAAGAACGG CAACCATTCA TTGACTGCTC TGGTGAAGA TCCACGGCTT
4081  AATGACGGCA AGCCAGTCGT CGAATGGGGC TACAAGCTCT GGTTGACTT AGCAGCGCCA
4141  AGTCTGCAAT TGGAAAGGGAT GTCCTTAGGT GAGGATGGCC AGTTGGCTGT CTACACCAAC
4201  AAGGATGTTT ACGATCTTAA GGCAACGATC AATGACAAC TGAAGCGATA CAGCCTGCAA
4261  GTTGGCAGCG ATACAGCCTA CCAAGACAAG ACTTACGAGG TGTTTAACGA AGACTTCTTT
4321  AAGAATAGGG ATGCAGTCAA GTCAGCTAC CCGATCAAG CTGAGAAAGA CCGATCCCGG
4381  AAGGTCAAGG TCACTTTGAC TGATGAAAGT GACAACAAGA CTGAACAAGA CTTTACCCTG
4441  TACAACCACC AGGCAGATCT TGAGGCACCG GAGGTTTCCG CTTCAGAAAG CAAGAAGACC
4501  AACCAAGCTG TTCAGCTGAA GGTGAAAAT CTGTCCGATG TACAAAAGTC TGCTGGCAAG
4561  TTTAAGGCGG CTGATCTCTA CTACTCAGTT GACGGCAAGA CTTGGACCAA GCTGGACAAG
4621  GATACTGTAC AGGTAGCCGA AAACGGAAAG GTTGAGTTCA AGTACCAAGA CGTTTACGGC
4681  AATGAGTCAA AGGTTACGAC TTATGAAGTC AAGAATATCG TCAAGGAAGT CGCTGCCAG
4741  CCGGAATTGA AGCTGACTCC GGATGGAGAA GGCAAGGTCA AGGCTGAGCT TGCTTTTGAC
4801  AAGAAGGATG TTGACAAGGA CTTCAACCAC ATCAAGTACA GCCTTGATGG TGGCAAGACC
4861  TGGACTGACT ACAAGGATGC CTTTACGCTG ACTCACAACG AACTGTGGA ATTCAGAGC
4921  TATGACGACG CTGGCAATGA GAGCCAAGTC TATACCAGCG TGGTCAAGGT AGAACGGAAG
4981  CTGCCCCTC CAGATTTGAC TGGCACGGTT GAAGCTGATA AGAGTATTGA GGTAAAGGCT
5041  GGCAACGTTG AACAGGCTGA AAAGGATGCT GACGGAAAAG TAACTTTGCT TTACTCAACT
5101  GATGGCAAGG ATTGGTCAA GGTGACGGC GAAGTTAAGC TGACTGACAG AGACCGGGCT
5161  ATGTTCAAGT ATCGCGACGG GGACGACAAC GAATCTGCTG TTGTCGTTTA CGAAGTCAAG
5221  AAGGTTGTTG AAGAAAAGAC TGCCGAGTCT AAGCCGGAAA ACAAGACGA TAGCAAGTCA
5281  GACAGTAAAC CTGACACTAA GAGCGACTCC AAGTCAGACA ACAAGAGCAA CACTAAGAGT
5341  GATGTCAAAT CGGACGGCAA TGGCGAAGCT AAGTCCGATA ACAAGTCATC TGCCAAGGAT
5401  GATAAGAAGA CTGACAGCAA GACGACTTCA AAGAGTAGCG CGAAGAAGAC TAGTGCTAAG
5461  AAGAACAAAA AGGCTTCTAA GAAGGCAAGC AAGAAGACAG TTAAGAAGAC TAAGACTTAC
5521  AAGTTGACTA AGCTTACAAA AGTCTACAAT AAGAAGGGCA AGGTAGTTGG CAAGCTTAAAG
5581  AAGAAGACTA GCGTCAAGCT ATTAAGCAAG AAGCAAAAGC TTCATGGCAA GTACTACTAC
5641  CGGGTTGGCA AGAACAGATA TATTCTGGCA AGCAGCCTGC CGAAAAAGAC TAAGAAGGTT
5701  AAGCAAGTTC GCGCAAGGAA GAATGCCAAG GTATATAACA AGAAAGGGAA GGTAGTTGGC
5761  CATCTGAAAA AGAAGCAGAA GGTAAAGCTC TTAAGCAAGA AACAGAAGCT TCATGGCAAG
5821  TACTACTACC GAATTGGCAA GAACAGATAT GTTAAGGCAA GTGTGCTGTA A

```

Die in dieser Arbeit klonierten Proteasegene *prtB*PräH202, *prtB*Pro+B202 und *prtB*Pro-B202 enthielten die Nukleotidsequenzen 55 bis 5447 (*prtB*PräH202) bzw. die Nukleotidsequenzen 157 bis 4740 (*prtB*Pro+B202) und 631-4740 (*prtB*Pro-B202) aus dem *prtB*-Gen 92202.

>*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*\_92059\_prtB(5496 bp)

1 ATGAAAGGCT TGCTAATAAA AATATTTATT TGTCTAAAGG AGTTAAGGAA ACAGATGCAG  
61 AAGAAAAAAT CCGCACGCCA TTTGAACAAA GTGGCTGAAC TAGCCGCAGC ACTGCTCCTA  
121 TCAGCGAGTC CACTGGCGGG AACTTTCCAG CCAGCTGCTT TTGTCCAAGC TGCCAGTCAA  
181 GAAAAGGTTA GTCCACGGTC GGCTAGCCGG GCAGCATTGA CTAAGTACTT GCAGCAAGAG  
241 CAGCGCTATA ACGCTAAGAA GAGTTACAGC AAGTTCCAAG AGGCTGCTAA AGAGCAAAGA  
301 CAGACTTCTG GCCAAGCTGT CAGCAAGAAG AATGAGTCCT CGGTCCGGGT GATTGTCTAGT  
361 TTGAACAAGT CAGCGGCATT TGATCACACC AGTAAGCCGA CTGGATCAGC TGCCCTCGGTG  
421 AAAAAGATTG AGCAGGCAAG TGACCAAGTC AAGGATGGTC AAGAAAAGGT TATCAAGCAG  
481 GTAGAAGAAA TCACCGGCAA CAAGGTCCGC CGGCAGTTCG GCTACTTGGT CAATGCTTTT  
541 TCAATCGATA TGGATTTAGA CGATATCGAC AAGGTTAAGG ATCTGCCCCA GGTTAAGAAC  
601 GTTACGCCTG TCAAGGTTTA CCACCCAACC GATGAGAGTG CTGATCAAAT GGCCCAAGTG  
661 CAGGACGTTT GGCAAGAACA AAAGCTCAAG GGTGAAGGTA TGGTCATTTT GATCATTGAT  
721 ACAGGGATCG ACTCCAGCCA CCAGGACTTG AAGTTGGACA GTGGCGTCAG CACCGCGTTG  
781 AATAAGAGT AGGTTGAAAG CGACAAGAGT AAGCTAGGTC ATGGGAAGTA TTACACGGAG  
841 AAGGTTCTTT ACGGCTATAA CTACGCTGAT AAGAACGACC AAATCGTGGA CAATGGGTGT  
901 GCGGAAATGC ACGGCCAGCA CGTGGCCGGG ATTGCCGGGG CCAATGGCCA AGTCAAAGGT  
961 GTTGTCTCTG ATGCCAGCT TTTGGCAATG AAGGTCCTTCT CCAACAATGC CAAGAATTTCT  
1021 GGAGCCTATG ATGACGACAT CATTTCCGCG ATCGAAGATT CAGTTAAGCT GGGGGCCGAC  
1081 GTTATCAACA TGAGTTTGGG CTCAGTTTCA TCAGATGTCG ATCCAAGTGA TCCACAGCAA  
1141 CAAGCCGTAG CAAAGGCATC AGAGGCTGGC GTCATTAATG TTATCTCTGC TGGGAACCTC  
1201 GGTGTTGCCG GGTGACTGTC GGATGGCAAT CCAGTCAACA ATACCGGGAC AAGTGAACCTC  
1261 AGTACTGTTG GCACGCCAGG GGTACACCCG GATGCTCTGA CGGTTGCCTC TGCTGAAAAC  
1321 AGCAAAGTGA CCACCGACAC AGTTAAAGAC GAACCTCGGTG GGGTCACCTT TAGCTCAAAT  
1381 TCAGAATTGA AGGGTGCTGC ACAAGTAACA ACCCAGCTGG AAAGCAACTA TTCGGTTTTA  
1441 ACCAAGAAGC TTAAGCTTGT TGACATGGGC TTGGGCGGTG CAGATGACTA TACTGCTGAA  
1501 AAGAAGGCTG AGGTTAAGGG ACAACTTGCA GTTGTAAAC GGGGAGCTTA TACCTTCTCA  
1561 GCGAAAGTTG CCAATGCCAA GGCAGCTGGC GCGGCAGGGA TCGTCAATTA CAATAGCGAG  
1621 GATGACGGCT TACTTTCAAT GTCACTGGAC GACAAGACTT TCCCAACCTT GGGGATGAGT  
1681 AAGGCTGATG GGGAAAGTTCT GGCTAAAGCA GCAAAGAAG GTAAGAGCAT CAAGTAAAAA  
1741 TTCGGTACTG CTTAATCGA TAACTCCAGC GCGGGAAGA TGAGTGACTT TACCAGCTGG  
1801 GGACCAACTC CTGAATTAGA CTTCAAGCCA GAAATCACTG CTCCAGGCGG GAAGATCTAC  
1861 TCGCTGGCCA ACGACAACA GTACCAGCAA ATGAGTGGGA CTTCAATGGC TTCACCATTT  
1921 GTCGCAGGTT CCGAAGCATT AATTTGCAA GGTATCAAGA AACAAAGGTTT GAACCTGTCC  
1981 GGGGAAGAAT TAGTACAATT TGCTAAGAAT TCAGCCATGA ACACTTCGCA CCCCGTCTAT  
2041 GACTGAGC ATACCAAGGA AATTATTTCT CCCCAGCCGGC AAGGGAGTGG CGAAATCAAT  
2101 GTTAAAGATG CCATCAACAA TACGTTGAG GTTAAGGCAG CCAACGGCAA CGGGCGAGCA  
2161 GCCCTGAAAG AAATTGGCCG GCAGACGACT TTTAAGGTTA CCTTGACCAA TCATGGTAAG  
2221 AAGACCCAGA CCTATGCAGT TGATAATTAT GGCGGTCCAT ACACCCAGGC AACCGAAGCG  
2281 AAGAGTGGCG AAATCTATGA CACAAAGATT GTTAAGGGAC AGCTGACGAC GGAGACGCCA  
2341 AAGGTAAGT TCCAGCCTGG CGAAAGCGTG GATGTAAGCT TTACCTTGAC CTTGCCATAC  
2401 AGTTTCCAGC GGCAAATTT TGTTGAAGGC TATGTTGGCT TTGAAGCAGA AGACCAGGCA  
2461 ACACCAAACC TGGTTCTTCC ATACATGGGC TTTTTCGGCA GTACAGTCA AGCGAGTGTC  
2521 AGCGCACCAA TGCTTTATGA AGGTGGCAAT TCAAATCTAA TCAACACAAT TCACTCCCTG  
2581 GTTGGCGTCA TGTTTTCTAA CAACAATGAT ATTCTCGGTC ACACTGGCTA TGAGGGTGAT  
2641 GATTACAGCA AGTATACTGA TCCTGATCTG ATCGCGATTT CACCAAATGG CGATGGTAGC  
2701 CGGGACTACG CATATCCTGT TCTCTCTTT GACCGGAAT ACAAGGAATA CACGGAAACG  
2761 ATTACTGATG CTCAAGGAAA CAAAGTTAAG AGCTTGGGCG TTGGCAAAGA GGGAACTAAA  
2821 GATTACTACA GTTCTTCAAG CCGTGAGTGG ACAACCCACT CACTGGACAA GTGGGATGGC  
2881 ACTGACGCTG ACGGCCAAGT CGTCAAGGAT GGGCAATACA TCTACAAGGT TGAATTTACC  
2941 CCAGCAATTG GCGGACGAA GCAGGAATTG AACATCCCTG TCAAGGTTGA TACCCAAGCG  
3001 CCAGAAGTGA GTGACTTGCA GGTTACCAA GATGGCAAGC TCCGTTTGAA GGCTAAGGAT  
3061 TCCGGCAGCG GTCTTGACAT GACAAATGTTT GTTGGCGCAG TAAACGGTGA AGAGCATAAG  
3121 CTGGCGCTGG CTCCGGTTAA GGGAGAAAGT AATGTTTACG AGTCAACGTC TGCCCTGACT  
3181 GGACTTAAAG ACGGCAAGAA CCAAGTAGAA ACTGTTTTGG CTGACTATGC CGGCAATGTT  
3241 GGCTATGCTG CAACTTTCTC CAGTCAAAT AACGATGCTG ATAACAAGCT TCTTCTCTTT  
3301 AACTTAGCCG ACGGTCAAAA GATCACTAGT CAAAGCCCGG CTTACGATCA AGAGAAAGAA  
3361 ACTTACTACTG TAACTGGTAC TTACAAGAAG AATGCCAAGC TTAAGTTTAA TGATGTCGAG  
3421 GCAGAAAGCG ATAAAAATGG CTACTTTGAA GTTAAGCTGC CAGTCAAGGA TGGACAAAAC  
3481 CAGCTTTTGA TCAAGGATGG GGATCAAATC CTTGAAGCAG TCAACTTAC TGTTAAGGCT

```

3541 GAAGGCCCGA AAGTCAGCGT TGACAAAGAA AGCTCAGGCC GCATTTTGGC TAAGGATGAT
3601 TCCTATACTT TATCCGGGAC GGTATCTGGT CTTGGCGAAA GCGGCAAAC TGAAGTACAG
3661 AACTTGTCTG ACAAGAGCAA GACTAATGAG TTAACGGTTG ACCAGGACGG CAAGTTCTCA
3721 CAAAAGGTTG ACTTGAAC TA CGGTGACAAT CCTTTTGAAC TGACGGCAAC TGATGCGGAT
3781 GGCAATGTTA CAAAGAAGGA CGTAACGATT TTCACCGCTA GAAGTTACAC TTACAACAAG
3841 GATATGCTGA CTTTTGACAA TATCGCCAGC GATCTGACGG TTATTGGCAA GACGACGCCG
3901 GGTTACGATG AGAAGGACCA CAGCTTCACA GTAACGGGTA AACTCGCGTA CCCAGTCGCC
3961 CGCTTCCAGT TAAACGGGGA TGACGTTAAG TACGACCCAG ATACATTGAA GTTCAGCTAC
4021 ACGATCAAAG ACTTAAAGAA CCGCAACCAT TCATTGACTG CTTTGGTGCA AGATCCACGG
4081 CTTAATGACG GCAAGCCAGT CGTCGAATGG GGCTACAAGC TCTGGGTTGA CTTAGCAGCG
4141 CCAAGCCTGC AATTGGAAGG GATGTCCTTA GGTGAGGATG GCCAGTTGGC TGTCTACACC
4201 AACAAAGGATG TTTACGATCT TAAGGCAACG ATCAATGACA ACTTGAGCGG ATACAGCCTG
4261 CAAGTTGGCA GCGATACAGC CTACCAAGAC AAGACTTACA AGGTGTTTTAA CGAAGACTTC
4321 TTTAAGAATA GGGATGCAGT CAAGGTCAGC TACCCGATCA AGGCTGAGAA AGACGGATTTC
4381 CGGAAGGTCA AGGTCAC TTT GACTGATGGT AGTGACAACA AACTGAACA AGACTTTATC
4441 CTGTACAACC ACCAGGCAGA TCTTGAGGCA CCGGAGGTTT CCGCTTCAGA AAGCAAGAAG
4501 ACCAACCAAG CTGTTTCAGCT GAAGGTCGGA AATCTGTCCG ATGTACAAAA GTCTGCTGGC
4561 AAGTTTAAAG CGGCTGATCT CTACTACTCA GTTGACGGCA AGACTTGGAC CAAGCTGGAC
4621 AAGGATACTG TACAGGTAGC CGAAAACGGA AAGGTTGAGT TCAAGTACCA AGACGTTTAC
4681 GGCAATGAGT CAAAGGTTAC GACTTATGAA GTCAAGAATA TCGTCAAGGA AGTCGCTGCC
4741 CAGCCGGAAT TGAAGCTGAC TCCGATGGA GAAGGCAAGG TCAAGGCTGT GCTTGCTTTT
4801 GACAAGAAGG ATGTTGACAA GGACTTCAAC CACATCAAGT ACAGCCTTGA TGGTGGCAAG
4861 TCCTGGACTG ACTACAAGGA TGCCTTTACG CTGACCCACA ACGGAAC TGT GGAATTCAAG
4921 AGCTATGACG ACGCTGGCAA TGAGAGCCAA GTCTACACCA GTGTGGTCAA GGTAGAACGG
4981 AAGCTGCCCG CTCCAGATTT GACTGGCAGC GTTGAAGCTG ATAAGAGTGT TGAGGTTAAG
5041 GCTGGCAACA GTAGCGCGAA GAAGACTAGT GCTAAGAAGA ACAAGAAGGC TTCTAAGAAG
5101 GCAAGCAAGA AGACAGTTAA GAAGACTAAG ACTTACAAGA AGGTCAAGTT GACTAAGCTG
5161 ACAAAGTCT ACAATAAGAA GGGCAAGGTA GTTGGCAAGC TTAAGAAGAA GACTAGCATC
5221 AAGCTATTAA GCAAGAAGCA AAAGCTTCAT GGCAAGTACT ACTACCGGGT TGGCAAGAAC
5281 AGATATATTC TGGCAAGCAA CCTGCCGAAA AAGACTAAGA AGGTTAAGCA AGTTCGCGCA
5341 AGGAAGAATG CTAAGGTCTA TAACAAGAAA GGAAGGTTAG TTGGCCATCT GAAAAGAAG
5401 CAGAAGGTTA AGTTATTAAG CAAGAAACAG AAGCTTCATG GCAAGTACTA CTACCGAATT
5461 GGCAAGAACA GGTATGTTAA TGCAAATGTG CTGTAA

```

Die in dieser Arbeit klonierten Proteasegene *prtB*PräH59, *prtB*Pro+B59 und *prtB*Pro-B59 enthielten die Nukleotidsequenzen 55 bis 5069 (*prtB*PräH59) bzw. die Nukleotidsequenzen 158 bis 4743 (*prtB*Pro+B59) und 631-4743 (*prtB*Pro-B59) aus dem *prtB*-Gen 92059.

## 12 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. Knut J. Heller für die Vergabe des Themas, für die Betreuung und für die stete Unterstützung bei der Arbeit.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Schönheit.

Bei Dr. Charles M.A.P Franz und Dr. Wilhelm Bockelmann möchte ich mich für die freundliche Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Ganz besonders danke ich Dr. Diana Meske für die fachliche Beratung, die wertvollen Ratschläge und viele interessante Diskussionen.

Bei allen Kollegen des Instituts möchte ich mich für die unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei Michaela Steinke, Dr. Jan Kabisch, Petra Horn, Regina Miller, Frauke Reppning, Dr. Derab Ghadimi, Gisela Paasch für die nette Zusammenarbeit bedanken und außerdem bei Torben Kliche, Sabrina Koberg, Natalia Wagner, Erik Brinks, Gregor Fiedler für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die gemeinsamen Doktoranden-Abende.

Bei Herrn Heinz Braun möchte ich mich für die tolle Hilfe bei der Methodenentwicklung der HPLC bedanken. Dr. Martin Klempt danke ich für die Betreuung bei den *in vitro* Tests. Ich danke Dr. Ingrid Clawin-Rädecker und Dr. Adam Wutkowski für die Unterstützungen der massenspektrometrischen Untersuchungen. Für die Bereitstellung der pathogenen Mikroorganismen danke ich Dr. Philipp Hammer und Frau Beate Bonnicksen.

Ein besonderer Dank gilt Britta Kaminski und Traute Jessen für die administrative Unterstützung.

Insbesondere danke ich meinen Eltern und meinem Freund, die mich während der gesamten Zeit liebevoll unterstützt haben.

### **13 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation selbständig verfasst wurde und in Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Es wurden, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine Betreuer, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Die Arbeit entstand unter Einhaltung guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Die Arbeit wurde keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Dies ist mein erstes Promotionsverfahren.

Ort, Datum

Unterschrift