

Charakterisierung neuartiger insektenassoziierter Peptidasen für die Lebensmittelbiotechnologie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lebensmittelchemikerin

Nicole Jeanette Mika

geboren am 29. Juli 1984 in Bad Homburg v.d.H.

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Czermak

Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie
Technische Hochschule Mittelhessen

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, Dezember 2015

Nicole Mika

Danksagung

Die Anfertigung der Doktorarbeit wäre ohne die zahlreiche Unterstützung innerhalb und außerhalb der Uni gar nicht möglich. Nun möchte ich auf diesem Wege ganz herzlich Danke sagen und hoffe, dass ich niemanden vergesse...

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Zorn für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, seine wissenschaftliche Betreuung und sein Vertrauen in mich. Die letzten Jahre waren eine anstrengende, aber auch sehr lehrreiche Zeit, in welcher ich mich stets sehr gut betreut und gefördert gefühlt habe. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Czermak für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie Herrn Prof. Dr. Peter Friedhoff und Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Ganz besonders danken möchte ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. Martin Rühl für seine vielen Ratschläge, Tipps und Ideen und das stets gute Verhältnis während der gesamten Promotion. Ein herzlicher und riesengroßer Dank gilt ebenfalls Dr. Astrid Spielmeyer für ihr stets offenes Ohr, Rechenstunden mit Blackout, kulinarische Reisen und die gemeinsame Vorliebe für vorlaute Beuteltiere. Danke!

Ich danke dem Land Hessen für die finanzielle Förderung des Themas im Rahmen des LOEWE-Schwerpunkts Insektenbiotechnologie.

Herrn PD Dr. habil. Thomas Degenkolb danke ich für die Bereitstellung der Getreideschädlinge sowie die Tipps zur Insektenzucht. Ebenfalls danke ich Herrn PD Dr. Jochen Wiesner, André Baumann, Dr. Annika Beckert und Dr. Anne Pöppel des Fraunhofer-Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME für die Unterstützung bei der heterologen Expression der RdoT3.

An der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in Freising danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Köhler, Dr. Theresa Walter und Dr. Katharina Scherf für die hilfreiche Einführung in die Arbeit mit zöliakierelevanten Peptiden.

Ein großer Dank geht ebenfalls an meine gesamte Arbeitsgruppe, insbesondere den MvB Maria Förstner, Martina Zajul, Nadja Kreuter, Madeleine Petri sowie Michael Goldmann, Marcus Schulze, Marco Binsch und Ilya Galperin für eine sehr schöne gemeinsame Zeit mit viel guter Laune innerhalb und außerhalb des Labors.

Meinem Freund Tobias Behr danke ich aus ganzem Herzen für seinen ständigen Optimismus, seine Geduld und seinem unglaublichen Mitfiebern während der gesamten Promotion.

Mein größter und herzlichster Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Eltern Barbara und Heinrich Mika. Mit Eurer stetigen Motivation, Unterstützung, Liebe und vor allem auch Eurem Humor seid Ihr mir ein wichtiger Rückhalt in allen Lebenslagen. Ich danke Euch so sehr!

Für meine Eltern

Veröffentlichungen

Mika N, Zorn H, Rühl M (2013) Insect derived enzymes – a treasure for white biotechnology and food biotechnology. In: Vilcinskas A (Ed.) Yellow Biotechnology II. Adv Biochem Eng Biot; Springer, Heidelberg; pp 1-17

Mika N, Gorshkov V, Spengler B, Zorn H, Rühl M (2015) Characterization of novel insect associated peptidases for hydrolysis of food proteins. Eur Food Res Technol 240 (2):431-439

Cierpka K, Mika N, Lange MC, Zorn H, Czermak P, Salzig D (2014) Cell detachment by prolyl-specific endopeptidase from *Wolfiporia cocos*. American J Biochem Biotechnol 10:14-21.

Schindler T, Mika N, Zorn H, Rühl M (2013) Characterization of insect associated ligninolytic enzymes for the industrial biotechnology. Mitt Dtsch Ges allg angew Ent 19:31-35

Cierpka K, Salzig D, Mika N, Zorn H, Czermak P (2012) Optimierung der Zellablösung von hMSC im Expansionsprozess. Chem Ing Tech 84:1200

Mika N, Zorn H, Rühl M (2015) Prolyl specific peptidases for applications in food protein hydrolysis. Appl Microbiol Biotechnol, 99 (19):7837-7846

Tagungsbeiträge

Vorträge:

Mika N, Rühl M, Zorn H (2014) Hydrolyse von Pflanzenproteinen mittels insektenassoziierter Peptidasen. 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Gießen, Deutschland

Mika N, Rühl M, Zorn H (2014) Characterisation of insect derived peptidases for the Food Biotechnology. 107th Annual Meeting of the German Zoological Society, Göttingen, Deutschland

Mika N, Rühl M, Zorn H (2014) Abbau von Gluten mittels insektenassoziierter Peptidasen. Dahlemer Kolloquium, Berlin-Dahlem, Deutschland

Mika N, Rühl M, Zorn H (2013) Characterisation of insect derived peptidases for the Food Biotechnology. GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung " Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie" Bad Wildungen, Deutschland

Mika N, Rühl M, Zorn H (2013) Charakterisierung von neuartigen insektenassozierten Peptidasen für die Lebensmittelbiotechnologie. Regionalverbandstagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Karlsruhe, Deutschland

Mika N, Rühl M, Zorn H (2012) Characterisation of novel peptidases for the Food Biotechnology. Lodz-Giessen Chemistry Workshop, Lodz, Polen

Poster:

Mika N, Rühl M, Zorn H (2013) Charakterisierung von neuartigen insektenassoziierten Peptidasen für die Lebensmittelbiotechnologie. 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, Deutschland

Mika N, Prell F, Schilberg V, Zorn H (2015) Möglichkeiten der Insektenbiotechnologie. Regionalverbandstagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Geisenheim, Deutschland

Zusammenfassung

Mit mehr als 1 Million verschiedener Spezies verfügen Insekten über die weltweit größte Artenvielfalt. Durch ihre Anpassungsfähigkeit kommen sie in nahezu jeder ökologischen Nische vor und können zudem fast jedes organische Substrat als Nahrungsquelle nutzen. Hierfür nutzen sie spezielle enzymatische Systeme, über die sie entweder selbst verfügen oder welche durch mikrobielle Symbionten bereitgestellt werden. Im Bereich der Lebensmittelbiotechnologie könnte dieses biochemische Potential für den peptidolytischen Abbau diverser Pflanzenproteine, wie z.B. von Gluten oder Reisprotein, verwendet werden.

Die insektenassoziierten Pilze *Candida pseudorhagii*, *Mucor fragilis*, *Penicillium commune*, *Penicillium echinولاتum*, *Amylostereum areolatum*, *Amylostereum chailletii* sowie *Stereum sanguinolentum* wurden anhand photometrischer Assays hinsichtlich ihrer Peptidaseaktivität getestet. Darüber hinaus wurde das Potential der pilzlichen Peptidasen zur Hydrolyse von diversen lebensmittelbiotechnologisch relevanten Proteinen überprüft. Im photometrischen Assay zeigten die Pilze eine eher geringe Peptidaseaktivität. Eine schwache peptidolytische Aktivität gegenüber den Substraten Gluten, Casein und Reisprotein zeigten nur die Pilze *A. areolatum* und *A. chailletii*.

Im weiteren Verlauf wurde die Peptidaseaktivität der Getreideschädlinge *Tenebrio molitor* (Mehlkäfer), *Rhizopertha dominica* (Getreidekapuziner), *Oryzaephilus surinamensis* (Getreideplattkäfer), *Sitophilus granarius* (Kornkäfer), *Alphitobius diaperinus* (Getreideschimmelkäfer) und *Tribolium castaneum* (rotbrauner Reismehlkäfer) überprüft. Peptidasen der Käfer *R. dominica* und *O. surinamensis* zeigten eine effiziente Hydrolyse aller eingesetzten Substrate. Ein Vergleich von kompletten und entdarms Käfern belegte, dass die Peptidasen im Gastrointestinaltrakt der Käfer lokalisiert sind.

Aus dem Käferextrakt von *R. dominica* wurde eine Serin-Peptidase mittels FPLC gereinigt. Die Charakterisierung dieser Peptidase erfolgte auf molekularer Ebene anhand gewonnener Transkriptomdaten aus *R. dominica*. Nach heterologer Expression zeigte die Serin-Peptidase in zymographischen Applikationstests einen Abbau von Gluten und zeichnete sich zusätzlich durch eine hohe thermische Stabilität aus. Mittels HPLC wurde die Hydrolyse allergierelevanter Gliadin-Epitope nachgewiesen. Bevorzugte Hydrolysestellen wurden hierbei nach Prolin (P) und Glutamin (Q) ermittelt.

Abstract

With more than 1 million different species, insects are the evolutionary most successful organisms in the world. Due to their adaptability, insects can be found in almost every ecological niche. Furthermore, they are capable to use almost every organic substrate as a food source due to special enzymatic systems, which are possessed either by themselves or by associated microorganisms like bacteria or fungi. The high biodiversity of insect associated enzymes might be used in the field of food biotechnology. In this work, peptidases which are urgently required for a specific and efficient hydrolysis of vegetable pomace and food proteins like casein and gluten were identified.

The insect associated fungi *Candida pseudorhagii*, *Mucor fragilis*, *Penicillium commune*, *Penicillium echinolatum*, *Amylostereum areolatum*, *Amylostereum chailletii* and *Stereum sanguinolentum* were screened for their peptidolytic activity against various food proteins. In semi native zymograms, the fungi *A. areolatum* and *A. chailletii* showed a low peptidolytic activity against the substrates gluten, casein, and rice protein. However, all fungi showed limited peptidase activities only.

The grain pests *Tenebrio molitor* (yellow mealworm), *Rhizopertha dominica* (lesser grain borer), *Oryzaephilus surinamensis* (sawtoothed grain beetle), *Sitophilus granarius* (wheat weevil), *Alphitobius diaperinus* (black fungus beetle) and *Tribolium castaneum* (red flour beetle) were tested for their peptidase and peptidolytic activities. The beetles *R. dominica* and *O. surinamensis* showed a highly efficient hydrolysis of all tested food proteins. A comparison of devedined and complete beetles localized the target peptidases in the gastro intestinal system of the beetles.

A serine peptidase was purified from *R. dominica* by FPLC. The characterization of this peptidase was performed on a molecular level by use of *R. dominica* transcriptome data. After heterologous expression, the peptidase showed peptidolytic activity against gluten and a high thermostability. A hydrolysis of allergy relevant gliadin-epitopes was shown by HPLC analyses. Preferred hydrolysis positions were detected after proline (P) and glutamine (Q).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis..... I

Abkürzungsverzeichnis V

1 Einleitung..... 1

- 1.1 Hintergrund..... 1
- 1.2 Herausforderungen für die Lebensmittelindustrie..... 2
- 1.3 Zöliakie 4
- 1.4 Peptidasen 6
- 1.5 Zielsetzung 7

2 Material und Methoden..... 8

- 2.1 Chemikalien 8
- 2.2 Geräte 11
- 2.3 Puffer 13
- 2.4 Verwendete Mikroorganismen und Insekten..... 14
 - 2.4.1 Insektenassoziierte Pilze 14
 - 2.4.2 Insekten..... 15
 - 2.4.3 Mikroorganismen für die heterologe Expression 17
- 2.5 Kultivierung der Pilze 17
 - 2.5.1 Nährmedien und Lösungen..... 17
 - 2.5.2 Stammhaltung..... 20
 - 2.5.3 Vorkultur 20
 - 2.5.4 Hauptkultur 21
- 2.6 Zucht der Insekten 21
 - 2.6.1 Kultivierungsbedingungen 21
 - 2.6.2 Stammhaltung..... 22
 - 2.6.3 Probenaufarbeitung der Insekten..... 22
- 2.7 Elektrophoretische Methoden..... 22
 - 2.7.1 Verwendete Puffer für die Gelelektrophorese 23
 - 2.7.2 SDS-PAGE 25
 - 2.7.3 Zymogramme 26

2.7.4	Western-Blots	27
2.7.5	Isoelektrische Fokussierung	27
2.8	Verwendete Assays.....	28
2.8.1	Bestimmung der Peptidase-Aktivität mittels Azocasein	28
2.8.2	Bestimmung der Prolyl-spezifischen Peptidaseaktivität.....	29
2.8.3	Bestimmung der Arginin-spezifischen Peptidaseaktivität	29
2.8.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	30
2.8.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	31
2.9	Bestimmung des Peptidase-Typs mittels Inhibierungsversuchen	32
2.10	Enzymreinigung mittels FPLC.....	32
2.10.1	Verwendete Puffer für die FPLC.....	35
2.11	Erfassung des Peptidabbaus mittels HPLC.....	36
2.12	Sequenzierung der Peptid-Fragmente nach Hydrolyse der Peptide P1 und P2 durch Enzymextrakte	37
2.13	Sequenzierung von Proteinbanden einer denaturierenden SDS-PAGE.....	38
2.14	Abbau von Pflanzenproteinen	39
2.14.1	Nachweis mittels SDS-PAGE.....	39
2.14.2	Verbesserung der Löslichkeit von Reisprotein.....	39
2.15	Heterologe Expression der rekombinanten RdoT3 in <i>E. coli</i>	40
2.15.1	Verwendete Medien und Puffer für die heterologe Expression.....	40
2.15.2	Transformation und Expression	41
2.15.3	Reinigung der Serin-Endopeptidase RdoT3 mittels FPLC.....	42
2.15.4	Rückfaltung	43
2.15.5	Aktivierung der Serin-Endopeptidase RdoT3 durch Faktor Xa	44
2.16	Optimierungsversuche.....	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Ergebnisse zum Screening der insektenassoziierten Pilze.....	45
3.1.1	Kulturführung der insektenassoziierten Pilze	45
3.1.2	Ergebnisse des Screenings auf Agarplatten	47
3.1.3	Photometrisch ermittelte Peptidaseaktivität	48
3.1.4	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford.....	51
3.1.5	Gelelektrophoretische Untersuchung der Kulturüberstände der insektenassoziierten Pilze	55
3.1.6	Peptidabbau mit Pilzkulturüberständen	57

3.1.7	Zusammenfassung zum Screening der insektenassoziierten Pilze	62
3.2	Ergebnisse zum Screening der Getreideschädlinge	63
3.2.1	Photometrisch ermittelte Peptidaseaktivität	63
3.2.2	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford	64
3.2.3	Gelelektrophoretische Untersuchungen von Extrakten aus Getreideschädlingen	66
3.2.4	Peptidabbau mit Extrakten aus Getreideschädlingen	67
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Screening der Getreideschädlinge	68
3.3	Inhibierungsversuche	69
3.4	Lokalisierung der Peptidaseaktivität	70
3.5	Enzymreinigung	72
3.5.1	Reinigung des Käferextraktes von <i>R. dominica</i>	72
3.5.2	Reinigung des Käferextraktes von <i>O. surinamensis</i>	80
3.6	Transkriptomanalyse	82
3.7	Sequenzierung	83
3.7.1	Peptidsequenzen nach Peptidhydrolyse	83
3.7.2	Sequenzierung der Proteinbanden	84
3.8	Charakterisierung der insektenassoziierten Peptidase RdoT3	85
3.8.1	Heterologe Expression der insektenassoziierten Peptidase	85
3.8.2	Isoelektrische Fokussierung der RdoT3	87
3.8.3	Aktivierung der RdoT3	87
3.8.4	Peptidaseaktivität und –spezifität der RdoT3	89
3.8.5	Stabilität der RdoT3	89
3.8.6	Applikationstest RdoT3	92
4	Diskussion	99
4.1	Vergleich der insektenassoziierten Pilze und Getreideschädlinge	100
4.1.1	Peptidaseaktivität der insektenassoziierten Pilze	100
4.1.2	Kultivierung der Getreideschädlinge	102
4.1.3	Peptidaseaktivität der Getreideschädlinge	103
4.1.4	Vergleich der peptidolytischen Aktivitäten	105
4.1.5	Abbau der zöliakierelevanten Peptide aus Weizen und Gerste	106
4.2	Lokalisierung der Peptidaseaktivität	107
4.3	Peptidasen aus Getreideschädlingen	108
4.3.1	Isolierung einer Serin-Endopeptidase aus <i>R. dominica</i>	110

4.3.2	Sequenzierung und Homologievergleich	111
4.3.3	Heterologe Expression der RdoT3.....	112
4.4	Charakterisierung der RdoT3.....	114
4.4.1	Charakterisierung anhand von gelelektrophoretischen Methoden	114
4.4.2	Charakterisierung anhand photometrischer Assays	115
4.4.3	Beeinflussung der RdoT3-Aktivität durch Peptidase-Inhibitoren	116
4.4.4	Peptidabbau mittels RdoT3.....	116
4.5	Applikationsmöglichkeiten der RdoT3.....	118
4.5.1	Einsatzgebiet Zöliakie.....	118
4.5.2	Einsatzgebiet Lebensmittelindustrie.....	119
5	Literatur.....	122
6	Anhang	133
6.1	Peptidabbau Fraktionen A – D.....	133

Abkürzungsverzeichnis

AAR	<i>Amylostereum areolatum</i>
ACH	<i>Amylostereum chailletii</i>
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Arbitrary unit
BA _p NA	N- α -Benzoyl-DL-arginin 4-nitroanilid hydrochlorid
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E-64	<i>trans</i> -Epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESI	Elektrosprayionisation
FPLC	Fast protein liquid chromatography
<i>g</i>	Newtonsche Gravitationskonstante
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IST	Interner Standard
LC	Flüssigchromatographie
kDa	Kilodalton
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P1	Peptid 1
P2	Peptid 2
p.a.	<i>pro analysi</i> (für analytische Zwecke)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PsP	Prolyl-spezifische Peptidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSA	<i>Stereum sanguinolentum</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TLCK	N- α -Tosyl-L-Lysin-Chlormethylketon-Hydrochlorid
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanin-Chlormethylketon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol
U	Unit
UV	Ultraviolettstrahlung
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Z-Gly-Pro-pNa	Benzyloxycarbonyl-glycyl-L-prolin-p-nitroanilid

Die Abkürzungen der verwendeten Nährmedien sind Abschnitt 2.5.1 zu entnehmen.

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Enzyme finden in der Industrie bereits vielfältige Verwendungsmöglichkeiten. Sie können durch ihre katalytischen Fähigkeiten Prozessschritte übernehmen bzw. vereinfachen, für welche sonst große Mengen an Energie und der Einsatz von Chemikalien erforderlich wären. So ersetzen Cellulasen und Xylanasen bereits effektiv Chemikalien wie Hypochlorid, welche zur Bleichung in der Textil- oder Papierindustrie eingesetzt wurden (Poshina *et al.* 2015, Thomas *et al.* 2015). Ein Multienzym-System, bestehend aus einer Peroxidase, einer Glucoseoxidase und einer Lactase, erwies sich als erfolgreich zur Bleichung von carotinoidgefärbter Molke und kann somit die chemische Bleichung mittels Wasserstoffperoxid ersetzen (Szweda *et al.* 2013). Auch in weiteren technologischen Anwendungen, wie im Bereich der Waschmittel oder der Herstellung von weichem Leder, finden Enzyme Verwendung. In Futtermitteln werden z.B. Phytasen eingesetzt, um eine Zufütterung von Phosphaten an die Nutztiere unnötig zu machen. Ein weiteres Anwendungsgebiet für Enzyme ist die Herstellung biologischer Kraftstoffe ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen.

Die bislang in der Lebensmittelindustrie eingesetzten Enzyme werden hauptsächlich aus Bakterien (Stressler *et al.* 2013) oder Pilzen (Rizzello *et al.* 2007) gewonnen, aber auch Pflanzen (Schwalb *et al.* 2012) dienen als vielversprechende Organismen. Insektenassoziierte Enzyme stellen für die Lebensmittelindustrie hingegen ein bislang nur wenig erforschtes Gebiet dar, jedoch wächst die Nachfrage stetig. Insekten verfügen über die weltweit höchste Artenvielfalt. Sie kommen in fast jeder ökologischen Nische vor und sind auch in extremen Lebensräumen vorhanden. Aus diesem Grund verfügen sie über ein weites Spektrum an biologischen und chemischen Systemen, wie z.B. die Produktion von Abwehrmolekülen (Gross *et al.* 2008), die Resistenz gegenüber Phosphangas aufgrund metabolischer Enzyme (Schlipalius *et al.* 2012) oder die Ausbildung von Stabilitätsproteinen (Bale *et al.* 2002). Doch nicht nur Insekten selbst, sondern auch symbiotische Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien oder Pilze, können in der Lage sein, für die Lebensmittelbiotechnologie relevante Enzyme zu produzieren. Die symbiotischen Beziehungen zwischen Ameisen, Pilzen und Bakterien wurden in diesem Zusammenhang bereits detailliert beschrieben (Currie *et al.* 2001). Ein

weiteres Beispiel liefert der asiatische Laubholzbockkäfer *Anoplophora glabripennis*. Scully *et al.* (2012) identifizierten den Pilz *Fusarium solani* in Larven dieses Käfers, welcher ebenfalls durch sein enzymatisches System in der Lage ist, Lignocellulose oder Polysaccharide aus Zellwänden enzymatisch abzubauen. Die Suche nach Enzymen mit neuartigen biochemischen Eigenschaften für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie in Insekten bietet daher ein Forschungsgebiet mit enormem Potential.

1.2 Herausforderungen für die Lebensmittelindustrie

Besonders in der Lebensmittelproduktion nehmen Enzyme oftmals eine Schlüsselrolle ein. Die Herstellung von Bier, Käse oder Wein wäre ohne die Verwendung von Enzymen nicht denkbar. Auch für die Herstellung von Lebensmittelzusatzstoffen, Vitaminen oder Aromastoffen ist der Einsatz von Enzymen unerlässlich. Durch ständige Fortschritte und Neuerungen bei der Lebensmittelherstellung, den wachsenden Markt an Fertigprodukten und auch durch sich ändernde Klimabedingungen bedarf es einer stetigen Entwicklung von neuen Enzymen, um den neuen Anforderungen gerecht zu werden.

Eine weitere Herausforderung liefert die steigende Anzahl an Menschen mit Nahrungsmittelunverträglichkeiten oder Allergien. Als klassisches Beispiel dient hierfür die Lactase, welche lactoseintoleranten Patienten die Aufnahme von Milchprodukten ermöglicht. Derzeit werden diverse Lebensmittelunverträglichkeiten vermehrt in den Medien thematisiert, wodurch die Bevölkerung auf die jeweiligen Symptome sensibilisiert wird. So glauben beispielsweise 9% der Bevölkerung, an einer Glutenintoleranz zu leiden; der geschätzte Wert liegt jedoch lediglich bei 0,4% (Abb. 1.1). Ähnlich verhält es sich bei der Histaminintoleranz, wo etwa 11% Betroffene nach Selbsteinschätzung 3% tatsächlichen Patienten gegenüberstehen. Einzig bei der Unverträglichkeit gegen Fructose liegt die Zahl der tatsächlichen Erkrankungen weit oberhalb der Selbsteinschätzung der Patienten.

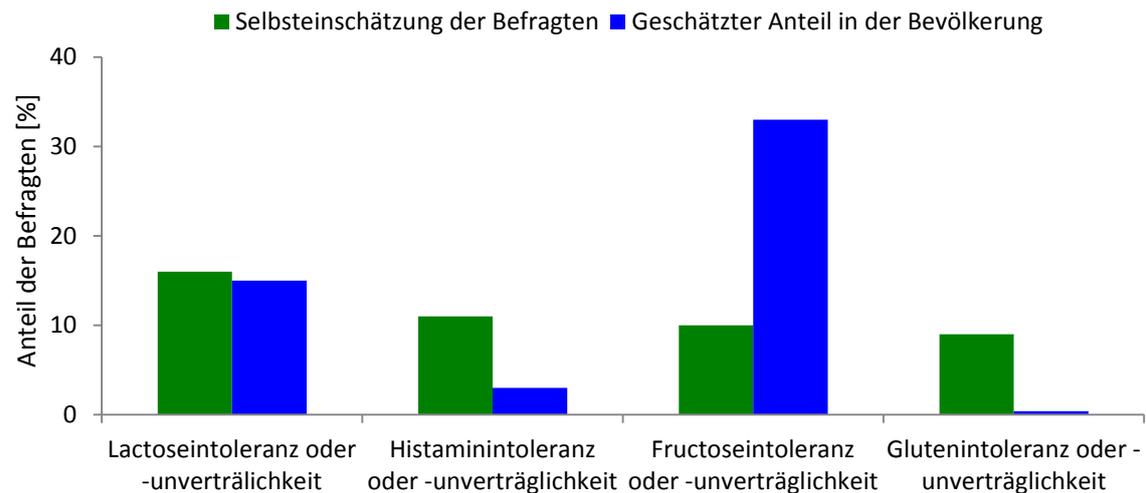


Abb. 1.1: Einschätzung der Häufigkeit von Lebensmittelunverträglichkeiten in der Bevölkerung in Deutschland im Jahr 2014. 2.450 Befragte, 18 - 65 Jahre (Focus 2014)

Die größte Aufmerksamkeit wird dabei Gluten zuteil. Ein Vergleich der Jahre 2004 und 2014 zeigt, dass das Interesse vor allem in Europa und Südamerika stark anstieg (Abb. 1.2).

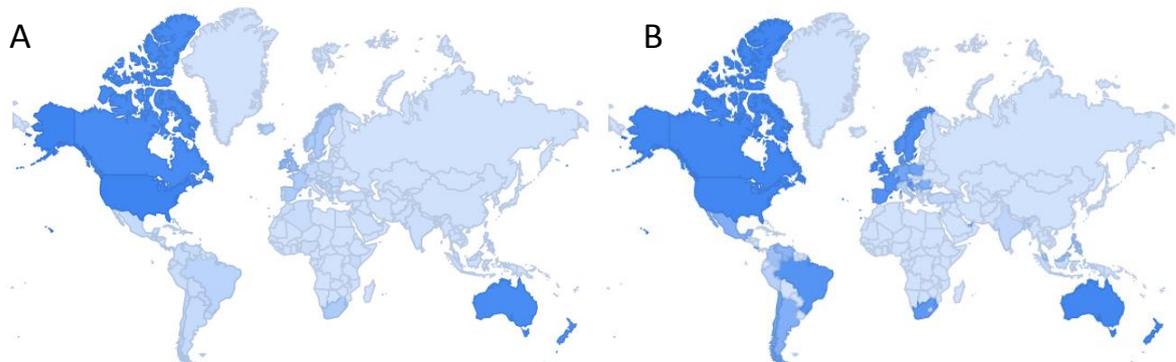


Abb. 1.2: Weltweites Interesse am Thema Gluten Anfang 2004 (A) und Ende 2014 (B), Regionen mit hohem Interesse sind blau markiert (<http://www.google.com/trends/explore#q=gluten&cmpt=q>)

Die Auswirkung dieser Einschätzung spiegelt sich ebenfalls im Verbraucherverhalten wider. Während 2010 der Umsatz mit glutenfreien Lebensmitteln 39 Millionen Euro betrug, stieg der Umsatz im Jahr 2012 bereits auf 54,2 Millionen Euro. Hierbei stieg vor allem der Umsatz an glutenfreier Tiefkühlkost, Gebäck, Brot und Snacks um bis zu 34% (Nielsen, 2012).

Die Glutenunverträglichkeit, auch Zöliakie genannt, lässt sich bislang nur durch eine strikte Diät behandeln, welche sich für Patienten oftmals eintönig und teuer gestaltet. Anders als bei der Lactoseunverträglichkeit lässt sich die Zöliakie bislang nicht durch die Einnahme eines

Enzympräparats behandeln. Für die Lösung dieses Problems wird dieser Thematik in mehreren Projekten nachgegangen, erste Forschungsansätze hierzu gibt es ebenfalls bereits aus dem Bereich der Insektenbiotechnologie (Elpidina *et al.* 2007, Konarev *et al.* 2011).

1.3 Zöliakie

Die Zöliakie beschreibt das Krankheitsbild der Glutenunverträglichkeit. Etwa 1% der Weltbevölkerung ist von dieser Unverträglichkeit betroffen, oftmals bleibt sie jedoch undiagnostiziert. Durch die derzeit wachsende Aufmerksamkeit in den Medien ist davon auszugehen, dass die Anzahl der Patienten steigt. Die Krankheit betrifft Menschen jeden Alters, Frauen sind etwa 2-3 Mal häufiger betroffen als Männer (Green *et al.* 2007).

Auslöser der Zöliakie ist das Getreideprotein Gluten, welches in z.B. Weizen, Gerste und Roggen vorkommt. Gluten ist reich an den Aminosäuren Prolin und Glutamin und daher nahezu resistent gegenüber einem proteolytischen Abbau im Gastrointestinaltrakt. Gliadin- und Glutenin-Epitope des Glutens gelangen durch die Darmschleimhaut und lösen bei Patienten eine unkontrollierte Immunantwort der T-Zellen aus (Abb. 1.3). Die Intensität der Immunantwort ist hierbei von der Anzahl der toxischen Epitope abhängig (Vader *et al.* 2003). Es resultieren beispielsweise eine gastrointestinale Fehlfunktion sowie ein Darmzottenschwund. Als Folgeerscheinung für die Patienten werden Symptome wie Mangelernährung, Durchfall und Wachstumsstörungen hervorgerufen.

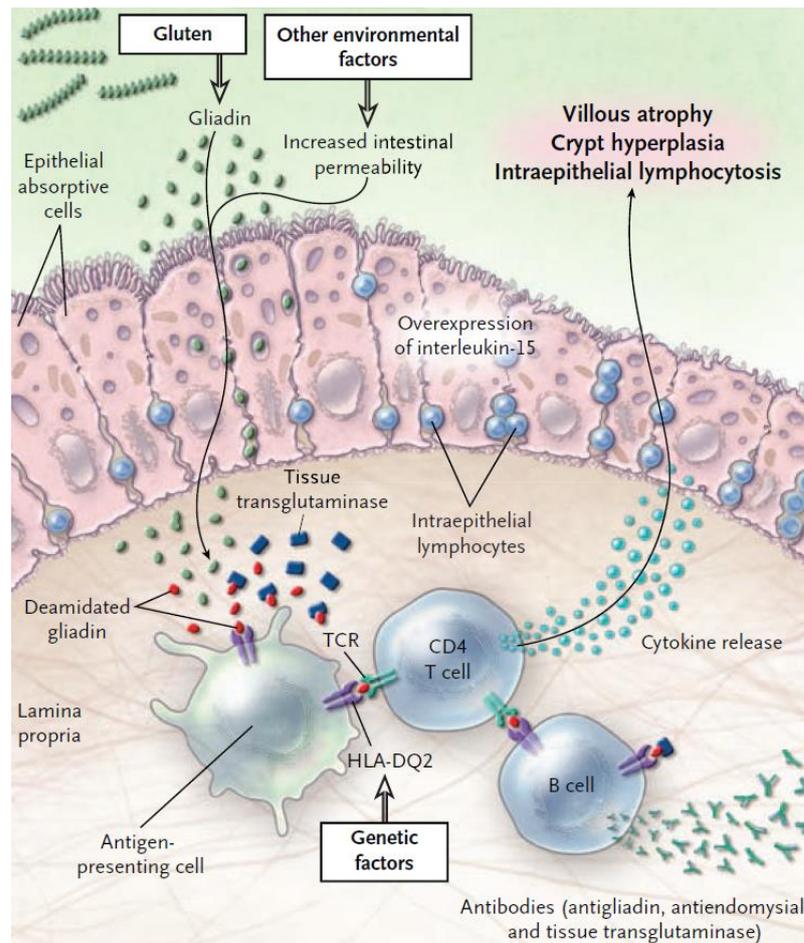


Abb. 1.3: Reaktionen im Darm beim Krankheitsbild Zöliakie (nach Green *et al.* (2007))

Übernommen mit Erlaubnis des New England Journal of Medicine, Copyright Massachusetts Medical Society

Zum jetzigen Zeitpunkt beschränken sich die Therapiemöglichkeiten zur Behandlung der Zöliakie auf eine strikt glutenfreie Diät. Diese gestaltet sich jedoch aufgrund der geringen Produktpalette als eintönig und kostenintensiv und beeinflusst somit die Lebensqualität der Patienten. Eine weitere Problematik stellt die Gefahr der Kontamination der glutenfreien Lebensmittel dar. Studien belegten, dass bereits 100 mg Gluten ausreichend sind, um bei den Patienten starke Beschwerden auszulösen (Catassi *et al.* 1993). Diese Menge ist etwa äquivalent zu einem hundertstel einer Brotscheibe (Schwalb *et al.* 2011). Die Glutenzufuhr sollte demnach nicht über einem festgelegten Wert von 20 mg kg^{-1} liegen. Mit Hilfe von spezifischen Peptidasen, die zöliakierelevante Getreideproteine zu hydrolysieren vermögen, könnte eine für Patienten risikofreie Produktpalette hergestellt werden oder auch das Krankheitsbild der Zöliakie enzymatisch behandelt werden.

1.4 Peptidasen

Peptidasen umfassen etwa 2% aller existierenden Proteine und decken mit 60% den größten Teil der industriell eingesetzten Enzyme ab (Polgár 2005). Hierbei finden sie, meist in Kombination von mehreren Peptidasen, Applikationen in der Lebensmittelherstellung, z.B. bei der Herstellung von Würze und Aromen, zur Konsistenzverbesserung oder zur Verbesserung von Backeigenschaften. In Waschmitteln oder in medizinischen und pharmazeutischen Applikationen finden Peptidasen ebenfalls große Einsatzgebiete.

Auch in der Insektenbiotechnologie erfährt die Suche nach Peptidasen große Aufmerksamkeit. Aufgrund seiner Größe, Verfügbarkeit und seines Status als Modellorganismus lag der Käfer *Tenebrio molitor* bei den Untersuchungen bislang im Fokus und es wurden bereits diverse Peptidasen in verschiedenen Regionen des Gastrointestinaltrakts des Käfers nachgewiesen. Goptar *et al.* (2012) isolierten beispielsweise Cystein-Peptidasen aus dem Darm des Mehlkäfers *T. molitor*, welche spezifisch nach Glutamin hydrolysieren. Ähnliche Peptidasen wurden in den *Tribolium*-Spezies *Tribolium castaneum* und *Tribolium confusum* nachgewiesen (Vinokurov *et al.* 2009). Die vorherrschenden Peptidasen zeigten hierbei Homologien von etwa 97% zu den in *T. molitor* identifizierten Peptidasen. In Getreideschädlingen, hierbei speziell in Larven, wurden insbesondere Cystein-Peptidasen identifiziert. Als möglichen Grund hierfür wird das natürliche Vorkommen von Serin-Peptidase-Inhibitoren in Getreide angesehen (Terra *et al.* 1996). Insekten lassen sich demnach stark durch das ihnen zur Verfügung stehende Nahrungsangebot hinsichtlich der Produktion diverser Peptidasen beeinflussen. Sie liefern somit eine gute Quelle für die Identifizierung neuartiger Peptidasen.

Peptidasen hydrolysieren nach Einlagerung eines Wassermoleküls Peptidbindungen und zählen somit zur Gruppe der Hydrolasen. Entsprechend ihres charakteristischen Zentrums unterteilt man sie in sechs Untergruppen: Aspartat-, Cystein-, Glutamat-, Metallo-, Serin- und Threonin-Peptidasen (López-Otín *et al.* 2008), wobei Serin-Peptidasen mit rund einem Drittel den größten Anteil ausmachen (Hedstorm, 2002). Die durch die Peptidasen erzeugte Hydrolyse von Peptidbindungen erfolgt unabhängig von der Spezifität der Peptidase nach dem gleichen Mechanismus. Die Polarisierung der Amidbindung durch Säure oder Base sowie die Aktivierung einer nukleophilen Gruppe führen zu einem Angriff an der

Carbonylgruppe und somit zur Hydrolyse der Peptidbindung. Es entstehen folglich aus Proteinen und Peptiden, je nach Spezifität der eingesetzten Peptidase, freie Aminosäuren oder kürzere Peptidketten. Peptidasen verfügen dabei über ein weites Wirkspektrum, welches sich bis hin zur Verdauung von Nährstoffen erstreckt.

1.5 Zielsetzung

Während bislang überwiegend nach Enzymen aus Bakterien, Pflanzen und Pilzen gesucht wurde, war das Ziel dieser Arbeit, neuartige Peptidasen aus insektenassoziierten Pilzen oder direkt aus Insekten zu charakterisieren und für technologische Verfahren der Lebensmittelindustrie zugänglich zu machen. Der Fokus der Arbeit lag dabei auf der Hydrolyse von Gluten, doch auch die Hydrolyse anderer lebensmitteltechnologisch relevanter Proteine, wie Reisprotein oder Casein durch insektenassoziierte Peptidasen sollte in einem Screening überprüft werden.

Das Screening sollte zunächst insektenassoziierte Pilze umfassen, welche zum einen aus dem Darm des asiatischen Laubholzbockkäfers (*A. glabripennis*) und zum anderen aus den Bohrlöchern der Holzwespe (*Urocerus gigas*) isoliert wurden. Diese Pilze sollten hinsichtlich ihrer Peptidaseaktivität untersucht werden. Die Aktivitätsbestimmung sollte anhand photometrischer Assays sowie durch gelelektrophoretische Methoden erfolgen. Analog dazu sollte ein weiteres Screening mit Insekten, im Speziellen mit Getreideschädlingen, durchgeführt werden. Peptidasen von vielversprechenden Kandidaten sollten nach Aufreinigung mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) isoliert und anschließend mittels LC-ESI-MS/MS ansequenziert werden. Durch heterologe Expression in einem geeigneten System sollten die Peptidasen hergestellt und für Applikationen in der Lebensmittelbiotechnologie getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Acetonitril	HPLC <i>gradient grade</i>	VWR, Darmstadt
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 40)	40% in Wasser; 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar Kobe I	reinst	Applichem, Darmstadt
Albumin Fraktion V	> 98%	Roth
Aluminiumsulfat	kristallin	Roth
Ammoniumnitrat	> 99%, p. a.	Applichem
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	100% für die Molekularbiologie	Applichem
Ampicillin, Natriumsalz	99%	Roth
Anhydrotetracyclin	analytischer Standard	Sigma, St. Louis, USA
Azocasein	100%	Sigma
L-Asparagin Monohydrat	> 99%, reinst	Applichem
Bradford-Reagenz, Roti-Nanoquant	5x Konzentrat	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	für die Gelelektrophorese	Roth
Casein	≥ 95%, alkalilöslich	Roth
Caseinhydrolysat	100%, für die Mikrobiologie	Roth
Citronensäure	> 99,5%, Ph. Eur.	Roth
Coomassie Brilliantblau G 250	reinst	Applichem
Coomassie Brilliantblau R 250	reinst	Applichem
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	> 99,5%, p.a.	Applichem
Dithiothreitol (DTT)	100% für die Molekularbiologie	Applichem

Dimethylsulfoxid	≥99,8%, p.a.	Roth
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	100% p.a.	Appllichem
Essigsäure	100% p.a.	Roth
Ethanol	HPLC <i>gradient grade</i>	Merck, Darmstadt
Ethanol	> 99,8%, m. MEK vergällt	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	> 99%, p.a.	Appllichem
Faktor Xa	-	Biolabs, Frankfurt
D-(+)-Glucose Monohydrat	für die Mikrobiologie	Roth
Gluten	80% Protein	Roth
Gluten, Beneo Pro VWG 75	-	Beneo, Tienen, Belgien
Glycerol	99%	Roth
Glycin	reinst	AppliChem
Guanidinhydrochlorid	≥99,7%, p.a.	Roth
Harnstoff	99,5% p.a.	Roth
Hefeextrakt	gepulvert, neutral	Fisher Scientific, Schwerte
Imidazol	Pufferqualität für die Biochemie	Neolab, Heidelberg
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p.a.	Roth
Kartoffel-Extrakt	für die Mikrobiologie	Sigma-Aldrich
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	100%	Appllichem
Lumi-Light Western Blot Substrat	-	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnesiumsulfat	≥ 99%, getrocknet, reinst	Roth
Malzextrakt	für die Mikrobiologie	Sigma-Aldrich
Mangan(II)-sulfat Monohydrat	100%	Appllichem
β-Mercaptoethanol	99%, p.a.	Roth
Methanol	ROTISOLV® HPLC	Roth

N α -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid	≥98%	Sigma
Natriumchlorid	100%, p.a.	Roth
Trinatriumcitrat Dihydrat	99%, p.a.	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	99%, p.a.	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ph. Eur.	Merck
Natriumhydroxid (fest)	100%	Merck
PageRuler Plus <i>Prestained Protein Ladder</i>	10 – 250 kDa	Thermo Scientific, Rockford, USA
PageRuler Plus <i>Unstained Protein Ladder</i>	10 – 200 kDa	Thermo Scientific
pASK-IBA33plus Vektor	-	IBA, Göttingen
Pepton aus Soja	für die Mikrobiologie	Roth
Penta-His HRP <i>Conjugate Kit</i>	-	Qiagen, Hilden
Phosphorsäure, 85%	reinst	Roth
Reisprotein RemyPro N80+	-	Beneo-Remy, Leuven-Wijgmaal
Roti [®] -Nanoquant	5x Konzentrat	Roth
Saccharin	≥99%	-
Salzsäure, rauchend, 37%	p.a.	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	≥99%, BC	AppliChem
Trichloressigsäure	10%	Roth
Trinatriumcitrat Dihydrat	≥ 99%, p.a., ACS	Roth
Tris Pufferan [®]	≥ 99,3%	Roth
Triton X 100	reinst	Roth
TWEEN [®]	Ph.Eur.	Roth
Zink(II)-sulfat Heptahydrat	100%	AppliChem
Z-Gly-Pro-4-nitroanilid	≥ 99.0%	Sigma Aldrich

2.2 Geräte

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Laboklav 25 B	SHP Steriltechnik, Magdeburg
Autoklav	Laboklav 150 MSL	SHP Steriltechnik
Membranfilter	Nanosep Centrifugal Devices 10K Omega	Pall, Dreieich
Dialyseschlauch	ZelluTrans Roth Dialyse Zubehör-Kit	Roth, Karlsruhe
Eismaschine	AF 80	Scotsman® Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophorese-Kammer	Mini Protean Tetra System	Bio-Rad, Hercules, USA
Gasbrenner	Gasprofi 1 micro	WLD-TEC, Göttingen
Gelkammer	Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Heizbad	Typ 2031	Köttermann, Uetzel/Hänigsen
IEF-Elektrophoresekammer	Multiphor II	GE Healthcare, München
Inkubationsschrank	Loading-Modell 100-800	Memmert, Schwabach
Inkubationsschüttler	Mulitron	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Homogenisator	M-110P	Microfluidics, Westwood, USA

Magnetrührer	VMS-C4 2 - 20 µL	VWR, Darmstadt
Pipetten	20-200 µL 100-1000 µL	Peqlab, Erlangen
Präzisionswaage	BP 211 D	Sartorius, Göttingen
Inkubationsschüttler	Orbitron	Infors HAT
Orbitalschüttler	Gyro-Rocker SSL3	Stuart, Staffordshire, England
Roti [®] -Store-Cryoröhrchen	steril	Roth
Spannungsquelle	EV262 Electrophoresis Power Supply	Peqlab
Spannungsquelle	EV231 Electrophoresis Power Supply	Peqlab
Sterilbank	Hera Safe	Thermo Scientific
Talon [®] Superflow	Cobalt-IMAC	GE Healthcare, Uppsala
Trockenschrank	Dry-Line	VWR
Turrax-Stab	T 25 digital Ultra-Turrax	IKA [®] , Staufen
UV/VIS- Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena AG, Jena
Vortex	Mixer UZUSIO VTX-3000L	LMS Co, Ltd., Tokio
Wasserbad	WB 5 mT	Labortechnik Medingen, Arnsdorf
Waage	Atilon	Acculab, Göttingen
Zentrifuge	Microfuge 22 R Centrifuge	Beckman Coulter TM , Krefeld
Zentrifuge	Mikro 220R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, kleiner Rotor, großer Rotor	Avanti J-26 XP, JA-25.50, JA-10	Beckman Coulter, Brea, USA

2.3 Puffer

Tabelle 2.3: Zusammensetzung Lysis-Puffer

Substanz	Masse / Volumen
5 M NaCl	4,0 mL
1 M Tris, pH 7,6	2,0 mL
EDTA	74,5 mg
0,01% Tween 80	10,0 μ L
VE-Wasser	ad 0,10 L

Tabelle 2.4: Zusammensetzung Citratpuffer

Substanz	Konzentration
Citronensäure	3,84 g L ⁻¹
Natriumcitrat-Dihydrat	8,82 g L ⁻¹
Der pH-Wert wurde mit 1 M Essigsäure auf 4,0 eingestellt.	

Tabelle 2.5: Zusammensetzung PBS-Puffer

Substanz	Konzentration
NaCl	8,00 g L ⁻¹
KCl	0,20 g L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	1,24 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,27 g L ⁻¹

2.4 Verwendete Mikroorganismen und Insekten

2.4.1 Insektenassoziierte Pilze

Im Rahmen des LOEWE-Schwerpunkts „Insektenbiotechnologie“ wurden einige Pilze in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (IME) isoliert. Die Ascomyceten *Candida pseudorhagii*, *Mucor fragilis*, *Penicillium commune* und *Penicillium echinolatum* wurden vom IME aus dem Darm des asiatischen Laubholzbockkäfers (*A. glabripennis*) isoliert. Die Basidiomyceten *Amylostereum areolatum*, *Amylostereum chailletii* und *Stereum sanguinolentum* sind in den Bohrlöchern der Holzwespe (*Urocerus gigas*) zu finden und wurden von der Friedrich Schiller-Universität (FSU) in Jena und dem Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (Niederlande) bezogen (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Verwendete insektenassoziierte Pilze

Stamm	Abkürzung	Herkunft
<i>Candida pseudorhagii</i>	CPS	LOEWE
<i>Mucor fragilis</i>	MFR	LOEWE
<i>Penicillium commune</i>	PCOM	LOEWE
<i>Penicillium echinolatum</i>	PEC	LOEWE
<i>Amylostereum areolatum</i>	AAR	FSU
<i>Amylostereum chailletii</i>	ACH	CBS
<i>Stereum sanguinolentum</i>	SSA	FSU

2.4.2 Insekten

Ein Teil der verwendeten Insekten (Abb. 2.1) wurde im Rahmen des LOEWE-Schwerpunkts „Insektenbiotechnologie“ zur Verfügung gestellt. Der Getreideschimmelkäfer (*Alphitobius diaperinus*), der Kornkäfer (*Sitophilus granarius*) sowie der Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*) stammen aus der Zucht des Instituts für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die weiteren Insekten stammten aus der Zucht des Julius Kühn-Instituts, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz (JKI) in Berlin (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Verwendete Insekten

Stamm	Trivialname	Herkunft
<i>Alphitobius diaperinus</i>	Getreideschimmelkäfer	LOEWE
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Getreideplattkäfer	JKI
<i>Rhizopertha dominica</i>	Getreidekapuziner	JKI
<i>Sitophilus granarius</i>	Kornkäfer	LOEWE
<i>Tenebrio molitor</i>	Mehlkäfer	LOEWE
<i>Tribolium castaneum</i>	Rotbrauner Reismehlkäfer	JKI



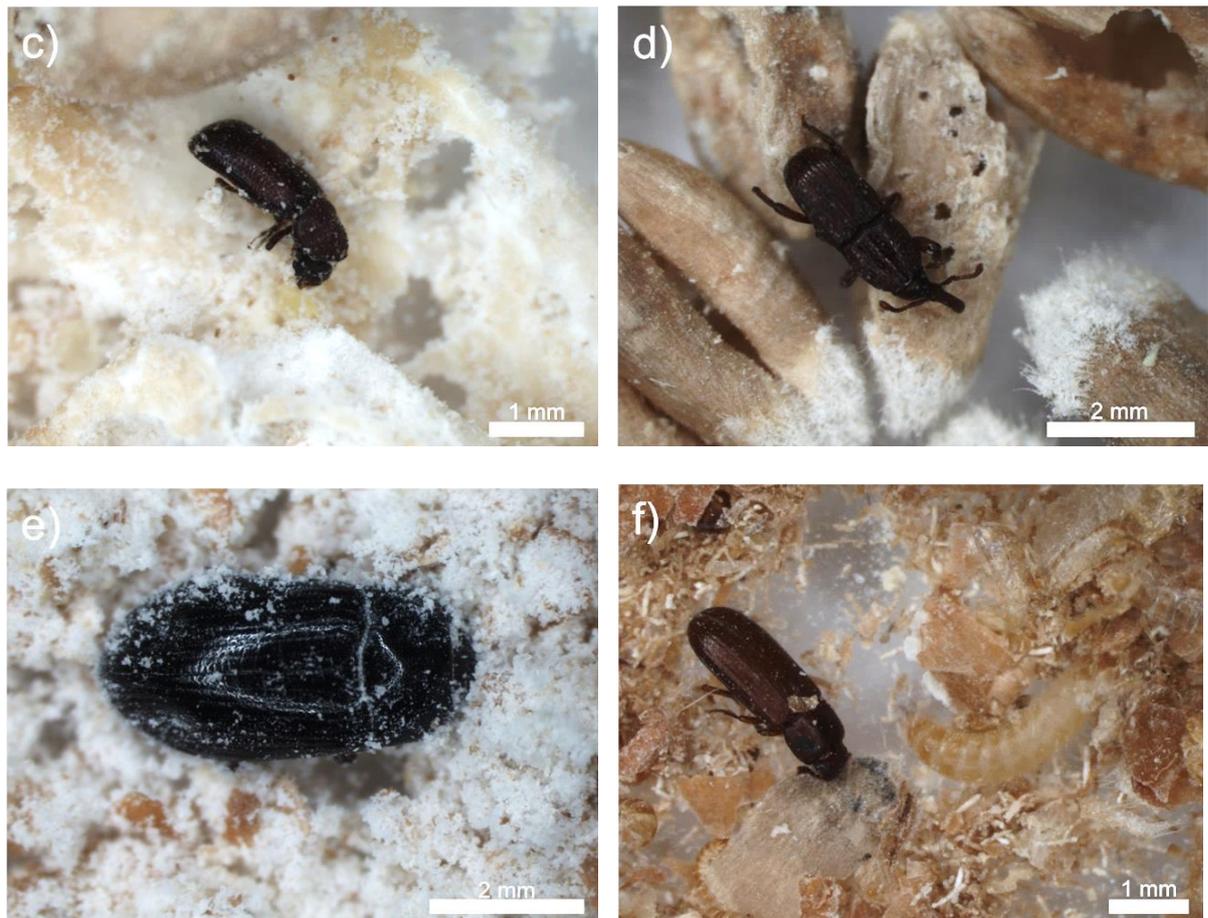


Abb. 2.1: a) Larve, Puppe und adulter Käfer von *T. molitor*, b) adulter Käfer *O. surinamensis*, c) adulter Käfer *R. dominica*, d) adulter Käfer *S. granarius*, e) adulter Käfer *A. diaperinus*, f) Larve und adulter Käfer *T. castaneum*

Übernommen aus Mika *et al.* (2015), Copyright © 2014, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Die Insektenzucht erfolgte auf verschiedenen Getreiden (Tabelle 2.8). Verwendet wurden hierfür kommerziell erhältliche Bio-Produkte.

Tabelle 2.8: Verwendete Substrate für die Insektenzucht

Getreide	Hersteller
Bio-Weizenkörner	NaturWert, Leer
Bio-Weizenmehl	Warenhandel GmbH & Co. KG, Neckarsulm
Maisgrieß	Theodor Kattus GmbH, Maisach
Haferflocken	Peter Kölln KGaA, Elmshorn

2.4.3 Mikroorganismen für die heterologe Expression

Die heterologe Expression der rekombinant hergestellten RdoT3 erfolgte in *Escherichia coli* BL DE3-Zellen. Als Leerwert für die jeweiligen Bestimmungen wurden *E. coli* pUC 19-Zellen verwendet (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Verwendete Mikroorganismen für die heterologe Expression

Stamm	Herkunft
<i>E. coli</i> BL DE3	Merck Millipore, Darmstadt
<i>E. coli</i> pUC 19	Merck Millipore

2.5 Kultivierung der Pilze

Die Kultivierung der insektenassoziierten Pilze erfolgte in verschiedenen Nährmedien. Die nachstehenden Medien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Für die Herstellung der entsprechenden Agar-Medien wurde zusätzlich Agar-Agar in einer Konzentration von 15 g L⁻¹ hinzugefügt.

2.5.1 Nährmedien und Lösungen

Tabelle 2.10: Zusammensetzung Spurenelementlösung

Substanz	Konzentration
FeCl ₂ · 6 H ₂ O	0,080 g L ⁻¹
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,090 g L ⁻¹
MnSO ₄ · H ₂ O	0,030 g L ⁻¹
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,005 g L ⁻¹
EDTA	0,400 g L ⁻¹

Tabelle 2.11: Zusammensetzung Minimalmedium (MM)

Substanz	Konzentration
Ammoniumnitrat	1,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung Standardnährlösung (SNL)

Substanz	Konzentration
Glucose · H ₂ O	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin · H ₂ O	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung Malzextraktmedium (MPE)

Substrat	Konzentration
Malzextrakt	30,0 g L ⁻¹
Sojapepton	3,0 g L ⁻¹

Tabelle 2.14: Zusammensetzung Hefe-Pepton-Dextrose-Nährmedium (YPE)

Substrat	Konzentration
Glucose · H ₂ O	20,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	10,0 g L ⁻¹
Sojapepton	20,0 g L ⁻¹
Caseinhydrolysat	5,0 g L ⁻¹

Der pH-Wert des Mediums betrug 6,8.

Tabelle 2.15: Zusammensetzung Hefe-Casein-Medium

Substrat	Konzentration
Glucose · H ₂ O	20,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	2,0 g L ⁻¹
Caseinhydrolysat	5,0 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung Kartoffel-Dextrose-Medium (PDE)

Substrat	Konzentration
Glucose · H ₂ O	20,0 g L ⁻¹
Kartoffelextrakt	4,0 g L ⁻¹

Der pH-Wert des Mediums betrug 6,8.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung einfacher Magermilchagar

Substrat	Konzentration
Milchpulver	50,0 g L ⁻¹
Agar Agar	10,0 g L ⁻¹

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 M NaOH auf 7,2 eingestellt.

Tabelle 2.18: Zusammensetzung komplexer Magermilchagar

Substrat	Konzentration
Glucose · H ₂ O	1,0 g L ⁻¹
Caseinhydrolysat	5,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	2,5 g L ⁻¹
Milchpulver	1,0 g L ⁻¹
Agar Agar	15,0 g L ⁻¹

Der pH-Wert des Mediums wurde mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt.

2.5.2 Stammhaltung

Die insektenassoziierten Pilze wurden auf Malzextrakt-Agarplatten (vgl. Tabelle 2.13) kultiviert. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen mittig auf die Agar-Platten jeweils ein etwa 1 cm² großes mit Myzel bewachsenes Agarstück der Stammkultur positioniert, die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und anschließend bei 24 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Platten zu etwa dreiviertel mit Myzel bewachsen waren, wurden sie bei 4 °C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden neue Agarplatten zur Stammhaltung nach demselben Prinzip angelegt.

2.5.3 Vorkultur

Für die Kultivierung in Submerskultur wurde unter sterilen Bedingungen ein 1 cm² großes mit Myzel bewachsenes Agarstück (vgl. 2.5.2) in einen mit 100 mL Nährmedium befüllten 250 mL Erlenmeyerkolben überführt und mit einem Ultraturrax-Homogenisator homogenisiert (15 s, 9.800 rpm). Die Vorkulturen wurden bei 24 °C unter Lichtausschluss für 14 - 21 Tage im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 rpm, Auslenkung 25 mm) inkubiert.

2.5.4 Hauptkultur

Für die Anzucht der Hauptkulturen wurde die Vorkultur (vgl. 2.5.3) unter sterilen Bedingungen mit einem Ultraturrax-Homogenisator homogenisiert (30 s, 9.800 rpm). 20 mL dieser Suspension wurden zu 200 mL frischem Nährmedium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C unter Lichtausschluss für 28 Tage im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 rpm, Auslenkung 25 mm).

2.6 Zucht der Insekten

2.6.1 Kultivierungsbedingungen

Die Zucht der Getreideschädlinge erfolgte nach ihrer Art getrennt in Frischhalteboxen, welche zu etwa einem Viertel mit Getreide befüllt waren. Die Deckel waren für die Belüftung mit einem Loch versehen, welches mit einer feinmaschigen Edelstahl-Drahtgaze (Maschenweite 0,1 mm, Drahtstärke 0,066 mm) verschlossen war. Gelagert wurden die Insekten bei 24 °C in einer Klimakammer unter Lichtausschluss. Die Auswahl des Getreides erfolgte für jede Art separat (Tabelle 2.19).

Tabelle 2.19: Verwendete Getreidemischungen für die jeweiligen Insektenzuchten

Käfer	Substratmischung
<i>R. dominica</i>	Weizenkörner (40%) , Weizenmehl (55%), Maisgrieß (5%)
<i>O. surinamensis</i>	Haferflocken (100%)
<i>T. castaneum</i>	Weizenschrot (70%), Weizenmehl (20%), Hefe (10%)
<i>T. molitor</i>	Weizenmehl (100%), frisches Brot oder Knäckebrötchen (1 Scheibe)
<i>S. granarius</i>	Weizenkörner (100%)
<i>A. diaperinus</i>	Weizenmehl (70%), Weizenkörner (15%), Haferflocken (15%)

2.6.2 Stammhaltung

Für den Erhalt der Zucht wurden die Käfer in regelmäßigen Abständen von etwa 8 - 12 Wochen umgesetzt. Hierfür wurden Larven und Puppen in ein neues Behältnis samt frischem Substrat überführt und erneut wie unter 2.6.1 beschrieben gelagert. Die Behälter mit den alten Käfern wurden aufbewahrt und nach dem jeweils darauffolgenden Umsetzen entsorgt.

2.6.3 Probenaufarbeitung der Insekten

Für die Durchführung der unter den Punkten 2.7 bis 2.11 beschriebenen Experimente wurden die Getreideschädlinge unter flüssigem Stickstoff gemörsert und das entstandene Pulver anschließend in einem Lysis-Puffer (Tabelle 2.3) aufgenommen. Dabei wurden 1 g Käfer in 5 mL Lysis-Puffer suspendiert, bei Abweichungen der Einwaage wurde die Puffermenge entsprechend angepasst. Der Käferextrakt wurde anschließend für 30 min bei 4 °C und 18.600 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

2.7 Elektrophoretische Methoden

Das Screening nach peptidolytischer Aktivität erfolgte anhand von halbnativen Zymogrammen, in welche vier verschiedene, lebensmitteltechnologisch relevante Proteine eingearbeitet wurden: Rinderserumalbumin (BSA), Gluten, Casein und Reisprotein. Des Weiteren wurden die Pilzüberstände und Käferextrakte mittels denaturierender SDS-PAGE charakterisiert.

2.7.1 Verwendete Puffer für die Gelelektrophorese

Tabelle 2.20: Zusammensetzung Probenauftragspuffer, denaturierend

Substanz	Masse / Volumen
1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 mL
SDS-Lösung, 20%-ig	2,0 mL
Bromphenolblau	20,0 mg
Glycerol	2,3 mL
VE-Wasser	ad 8,0 mL

Für die Herstellung des halbnativen Probenauftragspuffers wurde die SDS-Menge halbiert.

Tabelle 2.21: Zusammensetzung Laufpuffer, denaturierend, 10fach konzentriert

Substanz	Konzentration
Tris	30,2 g L ⁻¹
Glycin	144,2 g L ⁻¹
SDS	10,0 g L ⁻¹

Der Laufpuffer wurde vor der Verwendung 1:10 mit VE-Wasser verdünnt. Für die Herstellung des halbnativen Laufpuffers wurde die SDS-Menge halbiert.

Tabelle 2.22: Zusammensetzung *Upper Tris*, denaturierend

Substanz	Konzentration
Tris	60,5 g L ⁻¹
SDS	4,0 g L ⁻¹

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 6,8 eingestellt. Für die Herstellung des halbnativen *Upper Tris* wurde die SDS-Menge halbiert.

Tabelle 2.23: Zusammensetzung *Lower Tris*

Substanz	Konzentration
Tris	181,7 g L ⁻¹
SDS	4,0 g L ⁻¹

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 8,8 eingestellt. Für die Herstellung des halbnativen *Lower Tris* wurde die SDS-Menge halbiert.

Tabelle 2.24: Zusammensetzung 50 mM Natriumphosphatpuffer

Substanz	Konzentration
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	6,9 g L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	8,9 g L ⁻¹

Tabelle 2.25: Zusammensetzung Coomassie-Färbelösung

Substanz	Konzentration
Coomassie CBB G250	5,0 g L ⁻¹
Aluminiumsulfat	250,0 g L ⁻¹
Ethanol (96%ig)	500,0 mL L ⁻¹
Phosphorsäure (85%ig)	117,5 mL L ⁻¹

Tabelle 2.26: Zusammensetzung Coomassie-Entfärbelösung

Substanz	Konzentration
Ethanol (96%ig)	100,0 mL L ⁻¹
Ortho-Phosphorsäure (100%)	20,0 mL L ⁻¹

Tabelle 2.27: Zusammensetzung SDS-Transferpuffer

Substanz	Konzentration
Tris	5,82 g L ⁻¹
Glycin	2,93 g L ⁻¹
SDS-Lösung (10%-ig)	3,75 mL L ⁻¹

Tabelle 2.28: Zusammensetzung TBS-Puffer

Substanz	Konzentration
Tris-HCl	6,05 g L ⁻¹
NaCl	8,76 g L ⁻¹
Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,4 eingestellt.	

2.7.2 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte gemäß Laemmli *et al.* (1970). Die Konzentration an Acrylamid betrug im Sammelgel 6%, das Trenngel enthielt 12% (Tabelle 2.29). Für die Elektrophorese wurde die Gelkammer mit so viel 1:10-verdünntem Laufpuffer (Tabelle 2.21) versetzt, dass die Geltaschen bedeckt waren. Anschließend wurden die Geltaschen mit den jeweiligen Proben beladen. Für die Probenaufarbeitung wurden 15 µL der jeweiligen Extrakte zunächst mit 10 µL Probenauftragspuffer (Tabelle 2.20) versetzt und für 10 min bei 100 °C gekocht. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proben mit 3 µL einer 1 M DTT-Lösung versetzt und in die Geltaschen überführt. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes wurden 5 µL eines Proteinstandards (*PageRuler unstained protein ladder*, Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt.

Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Stromstärke von 10 mA pro Gel angelegt. Nach dem Übergang der Proben in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront der Proben aus dem Gel hinauslief. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst mit lauwarmem Reinstwasser gewaschen und anschließend mit Coomassie-Färbelösung (Tabelle 2.25) für 2 - 3 h gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit Entfärber (Tabelle 2.26) entfernt. Für die Dokumentation wurde das Gel anschließend mit Hilfe eines Scanners (Bio-5000, Microtek) aufgenommen.

Tabelle 2.29: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Elektrophorese

Chemikalie	Sammelgel	Trenngel
Reinstwasser	1,8 mL	2,7 mL
Upper Tris (Tabelle 2.22, pH = 6,8)	750 µL	-
Lower Tris (Tabelle 2.23, pH = 8,8)	-	1,5 mL
Rotiphorese [®] Gel 40	450 µL	1,8 µL
APS	10 µL	15 µL
TEMED	4 µL	7,5 µL

2.7.3 Zymogramme

Die Zymographie mit den jeweils enthaltenen Proteinen erfolgte unter halbnativen Bedingungen. Hierfür wurde die SDS-Menge der eingesetzten Laufpuffer halbiert. Die Gele (Tabelle 2.29) enthielten jeweils vier verschiedene Lebensmittelproteine in einer Konzentration von jeweils 0,1%. Während die Substrate BSA und Casein in Reinstwasser gelöst wurden, mussten die Substrate Gluten und Reisprotein zunächst mit wenigen µL einer 1 M NaOH sowie wenigen Tropfen Ethanol (HPLC gradient grade) gelöst werden. Die Lösung wurde anschließend mit 1 M HCl neutralisiert. Für die Probenvorbereitung wurden 15 µL der jeweiligen Proben mit 10 µL halbnativem Probenauftragspuffer (Tabelle 2.20) versetzt und anschließend in die Geltaschen überführt. Die Bedingungen der Elektrophorese entsprachen den unter 2.7.2 beschriebenen Parametern.

Die Behandlung der Gele nach der Elektrophorese erfolgte nach Pereira *et al.* (2009). Die Gele wurden hierfür zunächst für eine Stunde in 1%-iger Triton X-100-Lösung gelagert und anschließend über Nacht bei 37 °C in einem 50 mM Natriumphosphatpuffer (Tabelle 2.24) aufbewahrt. Anschließend wurde das Gel mit Reinstwasser gewaschen und gemäß 2.7.2 mit Coomassie gefärbt. Anschließend wurde das Gel (falls nötig) mit Entfärberlösung entfärbt und für die Dokumentation eingescannt.

2.7.4 Western-Blots

Für die Überprüfung der heterologen Expression der rekombinanten RdoT3 wurde ein nach Towbin *et al.* (1979) modifizierter Western-Blot durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst mittels SDS-PAGE (vgl. 2.7.2) getrennt. Eine PVDF-Membran wurde durch Waschen mit Methanol und SDS-Transferpuffer (Tabelle 2.27) zunächst aktiviert, das Elektrophoresegel wurde ebenfalls zunächst in SDS-Transferpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte der Proteintransfer auf die PVDF-Membran mit Hilfe eines Bio-Rad Trans-Blot Turbo-Systems für 30 min bei 25 V und 1 mA. Für die anschließende Immundetektion wurde die Membran zunächst 10 min in TBS-Puffer (Tabelle 2.28) gewaschen und anschließend über Nacht mit einer *Blocking*-Lösung (5% Casein in TBS-Puffer) inkubiert. Der primäre Antikörper (Anti-His Meerrettich-Peroxidase, Qiagen) wurde mit TBS-Puffer verdünnt (1:15.000) und nach Entfernen der *Blocking*-Lösung für 2 h auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran 3 Mal mit TBS-Puffer gewaschen und für 1 h mit der sekundären Antikörperlösung (anti-Maus IgG mit konjugierter Meerrettichperoxidase, Qiagen, verdünnt 1:1.000 mit TBS-Puffer) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS-Puffer wurde die Membran mit einem kolorimetrischen Färbereagenz der Firma Bio-Rad, bestehend aus 4-Chlor-1-naphthol, versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Membran dokumentiert und ausgewertet.

2.7.5 Isoelektrische Fokussierung

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF). Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des Systems ServaGel™ IEF 3 – 10 Gel (Serva Electrophoresis). Als Puffer wurden Serva IEF *anode buffer* sowie Serva *cathode buffer* verwendet und entsprechend der Herstellerangabe in Reinstwasser gelöst. 10 µL der jeweiligen Proben sowie 5 µL des IEF-Markers 3-10 (Serva Electrophoresis) wurden auf das IEF-Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde in den ersten 60 min eine Spannung von 50 V angelegt, gefolgt von weiteren 60 min bei 200 V und abschließend 30 min bei 500 V. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Coomassie-Färbelösung (Tabelle 2.25).

2.8 Verwendete Assays

2.8.1 Bestimmung der Peptidase-Aktivität mittels Azocasein

Die Bestimmung der Peptidaseaktivität erfolgte mittels eines Azocasein-Assays nach Kilcawley *et al.* (2002). Zu 80 μL Kulturüberstand wurden 320 μL Azocasein-Reagenzlösung (vorgewärmt auf 37 °C) hinzugegeben. Die Azocasein-Reagenzlösung bestand aus 240 μL 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 6,0 und 80 μL einer 0,5%-igen wässrigen Azocasein-Lösung. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und das nicht umgesetzte Azocasein durch Zugabe von 600 μL 3%-iger TCA gefällt. Die Reaktionsgefäße wurden direkt im Anschluss für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde für 10 min bei 4 °C und bei 14.000 rpm (14.565 g) zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden photometrisch bei 366 nm vermessen.

Analog erfolgte die Bestimmung eines Blindwertes. Hierfür wurde die Peptidaseaktivität des Kulturüberstandes zuvor durch 15 minütiges Kochen in einem Wasserbad inaktiviert.

Die Peptidaseaktivität wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{AU} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{\Delta E_{366\text{nm}} \cdot 60\text{min}}{V_{\text{Kulturüberstand}} \cdot 15\text{min} \cdot 0,01}$$

Wobei:

- AU = Arbitrary unit
- $\Delta E_{366\text{ nm}}$ = Extinktion Probe – Extinktion Blindwert
- $V_{\text{Kulturüberstand}}$ = 0,08 mL
- 1 U = Enzymmenge, welche eine Extinktionsdifferenz von 0,01 innerhalb einer Stunde hervorruft

2.8.2 Bestimmung der Prolyl-spezifischen Peptidaseaktivität

Die Bestimmung der Prolyl-spezifischen Peptidaseaktivität (PsP-Aktivität) erfolgte gemäß Swajcer-Dey *et al.* (1992) mit Hilfe des Substrats Benzyloxycarbonyl-Glycyl-L-Prolin-*p*-Nitroanilid (Z-Gly-Pro-*p*NA). Das Prinzip der Messung beruht auf der Zunahme der Absorption bei 410 nm und 37 °C durch die Bildung von *p*-Nitroanilid ($\epsilon_{410 \text{ nm}}$: 10.000 M⁻¹ cm⁻¹, Lottenberg *et al.* 1983).

Zu 890 µL 0,05 M Citratpuffer (Tabelle 2.4, pH 4,0) wurden bei 37 °C 100 µL Kulturüberstand gegeben. Nach Zugabe von 10 µL Substrat (8 mM in Methanol) wurde der Anstieg der Extinktion bei 410 nm in Abhängigkeit von der Zeit (Messdauer: 15 min) gemessen. Die PsP-Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Z-Gly-Pro-*p*NA pro Minute hydrolysiert. Die PsP-Aktivität berechnet sich anhand folgender Formel:

$$U \cdot L^{-1} = \frac{V \cdot F \cdot \Delta E}{v \cdot \epsilon \cdot d} \cdot 10^6$$

Wobei:

- V = Volumen in der Küvette
- F = Verdünnungsfaktor
- ΔE = Zunahme der Extinktion
- v = Volumen der Probe
- ε = Extinktionskoeffizient von *p*-Nitroanilin (10.000 M⁻¹cm⁻¹)
- d = Schichtdicke der Küvette
- 10⁶ = Umrechnungsfaktor 1 U = 1 µmol·min⁻¹

2.8.3 Bestimmung der Arginin-spezifischen Peptidaseaktivität

Die Arginin-spezifische Peptidaseaktivität wurde mit dem Substrat N-α-Benzoyl-L-arginin *p*-nitroanilid (BApNA) bestimmt. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Zhu *et al.* (1999). Das Substrat wurde zunächst in DMSO gelöst und anschließend mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) auf eine Konzentration von 0,5 mg mL⁻¹ eingestellt. 95 µL dieser Lösung wurden in

eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 5 μL Enzymlösung versetzt. Anschließend wurde die Kinetik bei 410 nm und 37 °C für 15 min aufgenommen. Die einzelnen Messpunkte hatten einen zeitlichen Abstand von 31 s. Die Messung sowie die Berechnung der Enzymaktivität erfolgten gemäß 2.8.2.

2.8.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einem von Bradford (1976) entwickelten photometrischen Assay und basiert auf der Färbung der Proteine mittels des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue-G250. Durchgeführt wurde die Bestimmung der Proteinkonzentration in Mikrotiterplatten am Plattenleser. Pro Ansatz wurden 50 μL Probelösung mit 200 μL Roti[®]-Nanoquant Arbeitslösung (1:5 Verdünnung des Roti[®]-Nanoquant 5x Konzentrats mit Reinstwasser) versetzt. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurden die Extinktionen der Proben bei 450 und 590 nm bestimmt. Parallel angesetzt und analog behandelt wurden jeweils Kalibrierlösungen mit bekannten BSA-Konzentrationen (0 – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurde der aus den Extinktionen bei 590 und 450 nm berechnete Quotient gegen die Proteinkonzentrationen der BSA-Kalibrierlösungen aufgetragen (Abb. 2.2). Nach Ermittlung einer Regressionsgeraden ließ sich die Proteinkonzentration der Proben ermitteln.

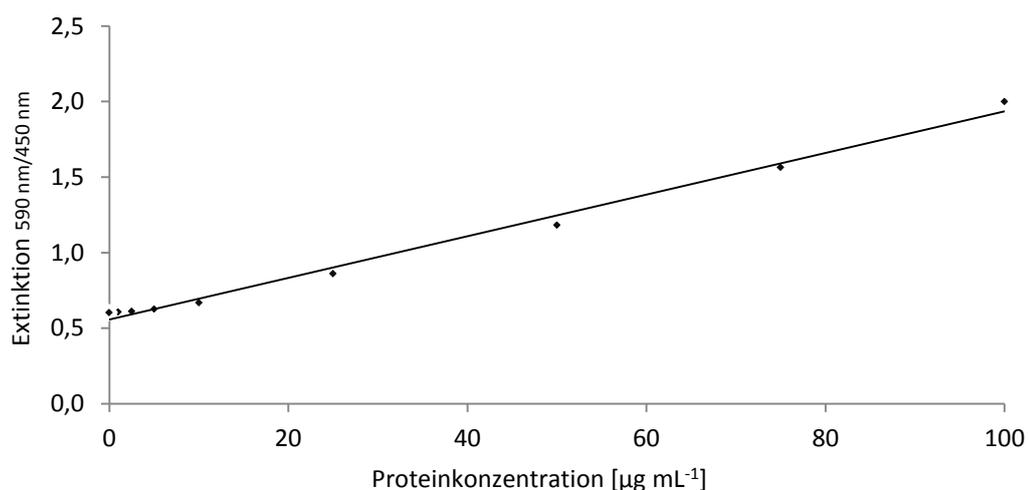


Abb. 2.2: Kalibriergerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.

$$\text{Gleichung der Regressionsgeraden } y = 0,035x + 0,5583, R^2 = 0,9928$$

2.8.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Neben der Proteinbestimmung nach Bradford wurde ein modifizierter Lowry-Assay unter Verwendung des DCTM (*detergent compatible*)-Protein-Assay Kits von Bio-Rad verwendet (Lowry *et al.* 1951). Zu 5 μL der Proben- bzw. Standardlösungen wurden je 25 μL einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und anschließend 200 μL Folin-Reagenz hinzugefügt. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Extinktionen bei 720 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte analog zu 2.8.4 mittels einer mit BSA erstellten Kalibriergeraden (Abb. 2.3).

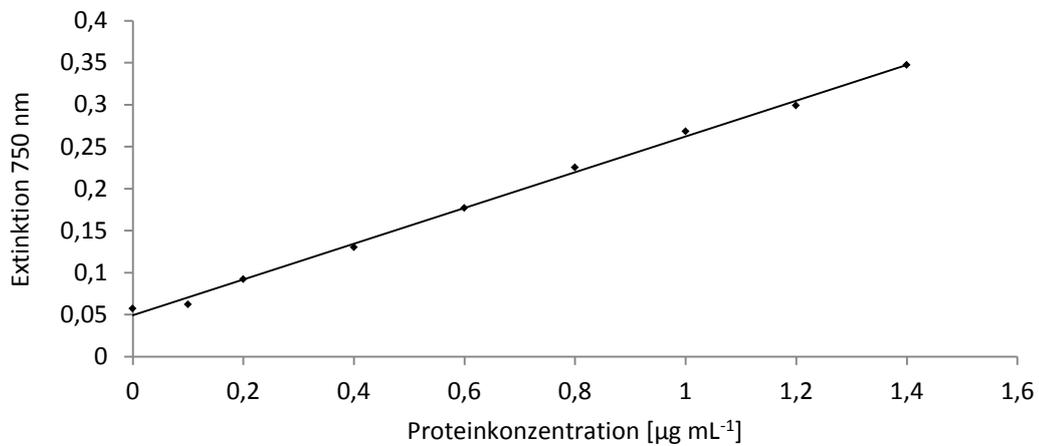


Abb. 2.3: Kalibriergerade zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry. Gleichung der Regressionsgeraden $y = 0,213x + 0,0492$, $R^2 = 0,9973$

Anhand der ermittelten Peptidaseaktivität und des Proteingehaltes wurde die spezifische Aktivität nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{spezifische Aktivität [AU } \mu\text{g}^{-1} \text{ Protein]} = \frac{\text{Peptidaseaktivität [AU} \cdot \text{mL}^{-1}]}{\text{Proteingehalt [} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}]}$$

2.9 Bestimmung des Peptidase-Typs mittels Inhibierungsversuchen

Die Bestimmung des Peptidase-Typs erfolgte anhand verschiedener Inhibitoren in Kombination mit dem Azocasein-Assay. Mittels verschiedener Inhibitoren (Tabelle 2.30) wurden die Käferextrakte von *R. dominica* und *O. surinamensis* auf die Anwesenheit von Serin-, Cystein-, und Metallo-Peptidasen untersucht.

Tabelle 2.30: Eingesetzte Inhibitoren zur Bestimmung des Peptidase-Typs

Inhibitor	Eingesetzte Konzentration	Inhibierung von
AEBSF	0,50 mM	Serin-Peptidasen
	0,05 mM	
E-64	10,00 μ M	Cystein-Peptidasen
	5,00 μ M	
EDTA	2,00 mM	Metallo-Peptidasen
	0,50 mM	

50 μ L der Käferextrakte wurden mit 50 μ L der jeweiligen Inhibitorlösungen versetzt und für 16 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Peptidaseaktivität dieser Lösungen mittels Azocasein gemäß 2.8.1 gemessen. Als Vergleichswerte wurden 50 μ L der Käferextrakte mit 50 μ L Wasser gemischt und ebenfalls für 16 h bei RT inkubiert. Analog zu den jeweiligen Messungen wurden Blindwerte angefertigt, für welche der Käferextrakt für 10 min bei 100 °C inaktiviert wurde.

2.10 Enzymreinigung mittels FPLC

Die Käferextrakte von *R. dominica* und *O. surinamensis* wurden mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) gereinigt. Bei der verwendeten FPLC handelte es sich um das FPLC-System BioLogic DuoFlow. Die Proteine wurden bei 280 nm detektiert, Fraktionen wurden mittels BioLogic BioFrac *fraction collector* gesammelt. Zunächst wurden Optimierungsversuche mit drei verschiedenen Ionenaustauschersäulen durchgeführt. Eingesetzt wurden ein schwacher (HiTrap DEAE FF, Säulenmaterial: $-N^+(C_2H_5)_2H$) sowie ein

starker (HiTrap Q FF, Säulenmaterial: $-N^+(CH_3)_3$) Anionenaustauscher und ein schwacher Kationenaustauscher (HiTrap SP FF, Säulenmaterial: $-CH_2CH_2CH_2SO_3^-O$). Des Weiteren wurden die mit den Ionenaustauschern gewonnenen Fraktionen mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) gereinigt. Verwendet wurden hierbei eine hochsubstituierte Sepharose-Matrix, welche jeweils mit Butyl-, Phenyl- und Octyl-Liganden versetzt war. Die Säulen stammten von GE Healthcare, das Volumen dieser Säulen betrug jeweils 1 mL. Die zugehörigen Methoden sind den Tabellen 2.31 bis 2.33 zu entnehmen. Während der jeweiligen Läufe wurden Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 1 mL gesammelt.

Tabelle 2.31: FPLC-Gradient schwacher Anionenaustauscher für die Reinigung des Extraktes von *R. dominica*. Puffer A = 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,0 (Tabelle 2.34), Puffer B = 50 mM Natriumacetat-Puffer mit 1 M NaCl, pH 6,0 (Tabelle 2.35)

Volumen [mL]	Beschreibung	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Fluss [mL min ⁻¹]
0,0	Isokratischer Fluss	100	0	1,00
2,0	Injektion Probe	100	0	1,00
4,0	Isokratischer Fluss	100	0	1,00
14,0	Linearer Gradient	100→90	0→10	0,75
15,0	Isokratischer Fluss	90	10	0,75
22,0	Linearer Gradient	90→80	10→20	1,00
23,0	Isokratischer Fluss	80	20	2,00
26,0	Linearer Gradient	80→70	20→30	1,00
27,0	Isokratischer Fluss	70	30	2,00
29,0	Linearer Gradient	70→60	30→40	1,00
30,0	Isokratischer Fluss	60	40	2,00
32,0	Linearer Gradient	60→0	40→100	1,00
35,0	Isokratischer Fluss	0	100	1,00
37,0	Isokratischer Fluss	100	0	1,00

Tabelle 2.32: FPLC-Gradient starker Anionenaustauscher für die Reinigung des Extraktes von *O. surinamensis*. Puffer A = 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,0 (Tabelle 2.34), Puffer B = 50 mM Natriumacetat-Puffer mit 1 M NaCl, pH 6,0 (Tabelle 2.35)

Volumen [mL]	Beschreibung	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Flussrate [mL min ⁻¹]
0,0	Isokratischer Fluss	100	0	1,0
1,0	Injektion Probe			0,5
2,0	Isokratischer Fluss	100	0	0,5
4,0	Linearer Gradient	100 → 60	0 → 40	0,5
6,0	Isokratischer Fluss	60	40	0,5
10,0	Linearer Gradient	60 → 20	40 → 80	0,5
11,0	Isokratischer Fluss	20	80	0,5
12,0	Linearer Gradient	20 → 0	80 → 100	0,5
13,0	Isokratischer Fluss	0	100	0,5
15,0	Linearer Gradient	100	0	0,5

Tabelle 2.33: FPLC-Gradient zur hydrophoben Interaktionschromatografie. Puffer A = 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 (Tabelle 2.36), Puffer B = 50 mM Natriumphosphatpuffer mit 1 M Ammoniumsulfat pH 7,0 (Tabelle 2.37)

Volumen [mL]	Beschreibung	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Flussrate [mL min ⁻¹]
0,0	Isokratischer Fluss	0	100	1,0
1,0	Injektion Probe			0,5
2,0	Linearer Gradient	0 → 40	100 → 60	0,5
4,0	Isokratischer Fluss	60	40	0,5
6,0	Linearer Gradient	40 → 80	60 → 20	0,5
10,0	Isokratischer Fluss	80	20	0,5
11,0	Linearer Gradient	80 → 100	20 → 0	0,5
12,0	Isokratischer Fluss	100	0	0,5
13,0	Isokratischer Fluss	0	100	0,5

2.10.1 Verwendete Puffer für die FPLC

Für die Reinigung mittels FPLC wurden in Abhängigkeit der eingesetzten Säule verschiedene Pufferlösungen hergestellt.

Tabelle 2.34: Zusammensetzung 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,0

Substanz	Volumen
50 mM Essigsäure	200 mL
50 mM Natriumacetat	800 mL
Der pH-Wert wurde mit 0,1 M NaOH auf 6,0 eingestellt.	

Tabelle 2.35: Zusammensetzung 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6,0 mit 1 M Natriumchlorid

Substanz	Masse / Volumen
50 mM Essigsäure	200 mL
50 mM Natriumacetat	800 mL
Natriumchlorid	58,47 g
Der pH-Wert wurde mit 0,1 M NaOH auf 6,0 eingestellt.	

Tabelle 2.36: Zusammensetzung 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0

Substanz	Volumen
50 M Natriumdihydrogenphosphat	423 mL
50 M Dinatriumhydrogenphosphat	577 mL
Der pH-Wert wurde mit 0,1 M NaOH auf 7,0 eingestellt.	

Tabelle 2.37: Zusammensetzung 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 7,0 mit 1 M Ammoniumsulfat

Substanz	Masse / Volumen
50 mM Essigsäure	423 mL
50 mM Natriumacetat	577 mL
Ammoniumsulfat	132,14 g
Der pH-Wert wurde mit 0,1 M NaOH auf 7,0 eingestellt.	

2.11 Erfassung des Peptidabbaus mittels HPLC

Die Messung des Abbaus zweier zöliakierelevanter Peptide erfolgte gemäß Geßendorfer *et al.* (2011) mittels HPLC. Vader *et al.* (2003) ermittelten anhand von Patienten mit Zöliakie die Toxizität verschiedener Getreideproteine. Die Auswahl der Peptide in dieser Arbeit erfolgte basierend auf diesen Ergebnissen.

Die für den Abbau eingesetzten Peptide wurden von Proteogenix SAS (Oberhausbergen, Frankreich) bezogen. Verwendet wurden ein zöliakierelevantes Peptid aus Weizen (P1, PQQQLPYQPQLPY, Molekulargewicht: 1.665,92 g mol⁻¹, Reinheit: 98,7%) sowie ein zöliakierelevantes Peptid aus Gerste (P2, SQQQFPQQPFPQQP, Molekulargewicht 1.910,09 g mol⁻¹, Reinheit: 98,0%).

Für den Abbaustest wurden 1 mg der jeweiligen Peptide in 5 mL Reinstwasser gelöst. Zur Hydrolyse von P1 wurden 90 µL Substratlösung mit 60 µL Enzymlösung und 10 µL Saccharinlösung (eingesetzt als interner Standard, 0,4 mg mL⁻¹) versetzt und für 30, 60 und 90 min bei 25 °C auf einem Thermoschüttler bei 600 rpm inkubiert. Analog wurden für den Abbaustest von P2 100 µL Substratlösung mit 100 µL Enzymlösung und 10 µL Saccharinlösung versetzt und unter den o.g. Bedingungen inkubiert.

Nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 100 °C für 15 min gestoppt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 14.000 rpm (14.565 g) wurde der Überstand entnommen und für die Analyse mittels HPLC eingesetzt.

Parallel wurden Proben nach 0 min Inkubationszeit als Blindwert angefertigt. Hierfür wurde das Enzym mit dem internen Standard versetzt und für 15 min bei 100 °C inaktiviert. Nach Zugabe des jeweiligen Peptids wurde die Probe erneut für 15 min bei 100 °C inaktiviert. Der Leerwert bestand aus Wasser und der Enzymlösung und wurde nach 15 min bei 100 °C nach Zentrifugation mittels HPLC gemessen.

Die HPLC-Analyse erfolgte mit Hilfe einer Jasco-HPLC, welche mit einem DG-2080-53 *Degaser*, einer LG-2080-02S-Pumpe und einem UV-2075-Plus UV-Detektor ausgestattet war. Die Proben wurden über einen Autosampler (231 *Sampling XL injector*) durch eine 20 µL-Schleife injiziert. Für die Trennung wurde eine EC 250/4 Nucleosil 100-5-C₁₈-Säule (Macherey-Nagel) verwendet. Als Eluenten dienten Reinstwasser mit 0,1% TFA (Eluent A)

und Acetonitril mit 0,1% TFA (Eluent B). Die Flussrate betrug $1,26 \text{ mL min}^{-1}$, die Peptide wurden bei 210 nm detektiert. Die verwendete Methode ist Tabelle 2.38 zu entnehmen.

Tabelle 2.38: HPLC-Gradient zur Untersuchung des Peptidabbaus. Eluent A = Wasser mit 0,1% TFA, Eluent B = Acetonitril (HPLC *gradient grade*) mit 0,1% TFA

Zeit [min]	Beschreibung	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0 – 13	Isokratischer Fluss	100	0
13 – 13,1	Linearer Gradient	100 → 65,5	0 → 34,5
13,1 – 17	Isokratischer Fluss	65,5	34,5
17 – 17,1	Linearer Gradient	65,5 → 10	34,5 → 90
17,1 – 18	Isokratischer Fluss	10	90
18 – 18,1	Linearer Gradient	10 → 100	90 → 0
18,1 - 23	Isokratischer Fluss	100	0
33	Ende der Methode		

2.12 Sequenzierung der Peptid-Fragmente nach Hydrolyse der Peptide P1 und P2 durch Enzymextrakte

Die während der Hydrolyse durch die Käferextrakte generierten Peptid-Fragmente wurden in 50% Methanol mit 1% Ameisensäure gelöst. Die Lösung wurde direkt mittels eines Quadrupol Orbitrap Hybrid-Massenspektrometers ('Q Exactive', Thermo Fisher Scientific) analysiert. Die Probenzufuhr erfolgte über eine Nanospray-Quelle (Thermo Fisher Scientific). Die signifikanten Peaks des MS¹ Übersicht-Scans (Auflösung 140.000 bei m/z 200) wurden mittels HCD fragmentiert (Auflösung 35.000 bei m/z 200). Die Kollisionsenergie wurde individuell festgelegt, um eine bestmögliche Fragmentierung zu erhalten. Die Peptidsequenzen wurden manuell durch *de novo* Sequenzierung ermittelt.

2.13 Sequenzierung von Proteinbanden einer denaturierenden SDS-PAGE

Die Gelbanden wurden ausgeschnitten und nach einem Standardprotokoll (Shevchenko *et al.* 2006) für die weitere Analyse aufgearbeitet. Die Messungen mittels LC-ESI-MS/MS erfolgten an einem Q Executive Massenspektrometer. Dieses war über eine Nanospray-Quelle mit einer UHPLC (Ultimate, Dionex/LCPackings, Idstein, Germany) verbunden. Die Peptide wurden auf einer Trap-Säule (Dionex, C18 PepMap, 5 mm, i.d. 300 µm) fokussiert und anschließend auf einer analytischen Säule (Dionex, Acclaim Pepmap 100, 15 cm, i.d. 75 µm, C18, 3 µm, 100 Å) getrennt. Als Eluenten dienten 2% Acetonitril (Eluent A) und 80% Acetonitril mit jeweils 0,1% Ameisensäure (Eluent B). Der lineare Gradient verlief von 5 auf 45% B in 42 min. Die Daten wurden mit Hilfe der Software Xcalibur 2.2 SP1 und Tune 2.0 SP2 aufgenommen. Die Messung erfolgte im Positivmodus mit folgenden Parametern: Kapillarspannung 2 kV, Temperatur 280 °C. Die Full-Scan MS-Messungen wurden im Bereich von m/z 400 – 2.000 mit einer Auflösung von 140.000 (bei m/z 200) durchgeführt. Die fünf intensivsten Signale wurden für MS² Experimente verwendet, die mit einer Auflösung von 30.000 (bei m/z 200) vorgenommen wurden. Die HCD-Fragmentierung wurde mit einer Kollisionsenergie von 30% durchgeführt. Das Gerät wurde unmittelbar vor der Messung mit der Standardlösung des Herstellers kalibriert. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software *Thermo Proteome Discoverer* 1.4. Vergleichbare Fragmentierungsspektren (Toleranz von 4 ppm und 1,2 min) wurden anhand des m/z -Verhältnisses gruppiert. Die Datenbanksuche wurde mittels Sequest (Eng *et al.* 1994) und der Transkriptomdaten von *R. dominica* durchgeführt. Die Massentoleranz betrug 4 ppm für die Vorläuferionen und 0,01 Da für die Fragment-Ionen. Alle von der Software ausgegebenen Identifizierungen wurden manuell überprüft.

Die Homologie-Suche der identifizierten Peptidsequenzen erfolgte mittels BLAST2GO (Conesa *et al.* 2005), wobei Proteine mit peptidolytisch relevanter Aktivität ausgewählt wurden.

2.14 Abbau von Pflanzenproteinen

2.14.1 Nachweis mittels SDS-PAGE

Der Abbau von Proteinbanden wurde durch Inkubation von Reisprotein und Gluten mit den Extrakten aus *R. dominica* und *O. surinamensis* und anschließender SDS-PAGE-Analyse untersucht. Als Substrat wurde eine Reisprotein-Lösung nach 2.7.3 hergestellt. Die Extrakte aus *R. dominica* und *O. surinamensis* wurden 1:5 verdünnt, anschließend mit dem gleichen Volumen an Reisprotein- bzw. Glutenlösung versetzt und für 3 h bei 25 °C und 800 rpm inkubiert. Analog wurden Blindwerte mit hitzeinaktivierten Käferextrakten generiert. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch gemäß 2.7.2 getrennt.

2.14.2 Verbesserung der Löslichkeit von Reisprotein

Die Verbesserung der Löslichkeit von Reisprotein durch Käferpeptidasen aus *R. dominica* und *O. surinamensis* wurde überprüft. Hierfür wurden die Extrakte der jeweiligen Käfer zunächst 1:10 verdünnt und 200 µL des verdünnten Extraktes mit je 5 mg Reisprotein versetzt. Die Proben wurden auf dem Inkubationsschüttler bei 25 °C und 800 rpm inkubiert. Nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24, 30, und 48 h wurden die Proben homogenisiert und bei 14.000 rpm (14.565 g) für 10 min zentrifugiert. 5 µL des Überstandes wurden entnommen und zur Proteinbestimmung nach Lowry (vgl. 2.8.5) eingesetzt. Analog wurden Blindwerte mit hitzeinaktivierten Käferextrakten geführt.

Die Proteinlöslichkeit wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Löslichkeit[\%]} = \frac{\text{Proteingehalt Überstand}}{\text{Gesamtproteingehalt der Probe}}$$

2.15 Heterologe Expression der rekombinanten RdoT3 in *E. coli*

2.15.1 Verwendete Medien und Puffer für die heterologe Expression

Tabelle 2.39: Zusammensetzung LB-Medium

Substanz	Konzentration
Trypton	10,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
Natriumchlorid	10,0 g L ⁻¹

Tabelle 2.40: Zusammensetzung TB-Medium

Substanz	Konzentration
Trypton	10,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
Natriumchlorid	10,0 g L ⁻¹
D-(+)-Glucose · H ₂ O	2,2 g L ⁻¹

Tabelle 2.41 Zusammensetzung 6M Guanidiniumchloridpuffer

Substanz	Konzentration
Guanidiniumchlorid	573,18 g L ⁻¹
Tris-HCl	3,15 g L ⁻¹
Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,5 eingestellt.	

Tabelle 2.42: Zusammensetzung 6 M Harnstoffpuffer

Substanz	Konzentration
Harnstoff	360,36 g L ⁻¹
Tris-HCl	3,15 g L ⁻¹
NaCl	5,84 g L ⁻¹
Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,5 eingestellt.	

Tabelle 2.43: Zusammensetzung Imidazolpuffer

Substanz	Konzentration
Harnstoff	360,36 g L ⁻¹
Tris-HCl	3,15 g L ⁻¹
NaCl	5,84 g L ⁻¹
Imidazol	13,62 g L ⁻¹

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,5 eingestellt.

Tabelle 2.44: Zusammensetzung Dialysepuffer

Substanz	Konzentration
NaCl	8,77 g L ⁻¹
Tris-HCl	3,15 g L ⁻¹

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 8,5 eingestellt.

2.15.2 Transformation und Expression

Die rekombinante Herstellung der RdoT3 sowie die Klonierung der cDNA in den Expressionsvektor pASK-IBA33plus erfolgte durch Eurofins, Hamburg. Die anschließende Expression erfolgte in *E. coli* BL DE3-Zellen. In Vorversuchen sollte zunächst getestet werden, bei welcher Temperatur und zu welchem Zeitpunkt die maximale Enzymmenge exprimiert wird.

Für die Transformation wurde 1 µL des Plasmids (32 ng mL⁻¹) in 1,5 mL Eppendorf-Cups mit 50 µL BL21 DE3-Zellen versetzt und für 30 min auf Eis gelagert. Für die Aktivierung wurden die Zellen bei 42 °C für 45 s einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wurden 250 µL LB-Medium (Tabelle 2.39) hinzugefügt und für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen auf einer mit Ampicillin (Stammlösung: 300 mg mL⁻¹, Endkonzentration der Platte 150 µg mL⁻¹) versetzten LB-Platte ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die auf der Platte angewachsenen Kolonien wurden in eine Flüssigkultur (Übernachtskultur) überführt. Als Medium wurden 400 mL LB-Medium mit Ampicillin versetzt

(Endkonzentration im Nährmedium $150 \mu\text{g mL}^{-1}$). Die Kolben wurden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ auf dem Inkubationsschüttler (160 rpm) über Nacht inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden auf eine optische Dichte von 0,5 verdünnt und für die weitere Expression verwendet. In Vorversuchen mit verschiedenen Temperaturen wurde ermittelt, dass die Expression für 4 h bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ am besten verlief. 20 mL der zuvor verdünnten Übernachtskultur wurden zu 400 mL TB-Medium (Tabelle 2.40) und Ampicillin (Endkonzentration im Nährmedium $150 \mu\text{g mL}^{-1}$) gegeben und nach 30 minütiger Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für weitere 30 min bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt (180 rpm). Anschließend wurden die Kolben mit Anhydrotetracyclin induziert (Stammlösung: 2 mg mL^{-1} , eingesetztes Volumen $40 \mu\text{L}$). Nach der Induktion wurden die Zellen bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ für weitere 4 h auf dem Inkubationsschüttler kultiviert (180 rpm).

Der Kulturüberstand wurde für 10 min bei 75.000 g (24.934 rpm) zentrifugiert und die Pellets für die weitere Aufarbeitung verwendet. Die Pellets wurden mit 20 mM Tris-Puffer resuspendiert und in einem Gefäß vereinigt. Mit Hilfe eines Homogenisators wurden die *E. coli*-Zellen anschließend mehrere Male aufgeschlossen. Das so entstandene Homogenisat wurde erneut bei 75.000 g (24.934 rpm) für 30 min zentrifugiert und jedes entstandene Pellet danach in 35 mL eines 6 M Guanidiniumchloridpuffers (Tabelle 2.41) gelöst und über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung erneut für 30 min bei 75.000 g (24.934 rpm) zentrifugiert und der Überstand anschließend für die Reinigung mittels FPLC (vgl. 2.15.3) eingesetzt.

2.15.3 Reinigung der Serin-Endopeptidase RdoT3 mittels FPLC

Die am Vortag gewonnene Lösung wurde anhand einer selbst gepackten Säule (*ECOplus frit set for SR-revision*, I.D. 15 mm Glas, $10 \mu\text{m}$, Kronlab, Sinsheim) gereinigt. Als Säulenmaterial wurde TALON[®] *Superflow Metak Affinity* (Clontech, Mountain View, USA) verwendet. Das Säulenmaterial hatte eine Höhe von ca. 5 cm. Tabelle 2.45 zeigt den für die Reinigung verwendeten Gradienten. Eluiert wurde die Probe mit Hilfe eines 6 M Harnstoffpuffers (Tabelle 2.42) sowie eines Imidazolpuffers (Tabelle 2.43). Während des gesamten Laufes betrug der Fluss 5 mL min^{-1} .

Tabelle 2.45: FPLC-Gradient

Zeit [min]	Beschreibung	Harnstoffpuffer [%]	Imidazolpuffer [%]
0	Beladen der Säule	0	0
0	Start	100	0
19,99	Linearer Gradient	100 → 0	0 → 100
20	Isokratischer Fluss	0	100
39,99	Linearer Gradient	0 → 100	100 → 0
40	Isokratischer Fluss	100	0
60	Ende der Methode		

Sobald ein Peak im Chromatogramm sichtbar wurde, wurden manuell Fraktionen von 2 mL gesammelt und für die weiteren Versuche verwendet.

2.15.4 Rückfaltung

Die unter 2.15.3 gewonnenen RdoT3-Fraktionen wurden vor der weiteren Verwendung zunächst rückgefaltet. Hierfür wurden für die gewonnenen Hauptfraktionen der Chromatographie zunächst vereinigt und mit β -Mercaptoethanol versetzt (Endkonzentration in der Lösung 3% v/v). Anschließend wurden die Proben für 20 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und dann in einen Dialyseschlauch überführt. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C; auf 6 mL Probe kamen 4 L Dialysepuffer (Tabelle 2.44). Nach der Dialyse wurde das Enzym dem Dialyseschlauch entnommen und ausgefallenes Protein bei 14.000 rpm (14.565 g) für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Konzentrierung der Lösung erfolgte durch Membranfilter (Pall Nanosep[®] centrifugal device, 10K Omega membrane, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

2.15.5 Aktivierung der Serin-Endopeptidase RdoT3 durch Faktor Xa

Anhand der Aminosäuresequenz der RdoT3 war nach einem Abgleich mit Daten einer Peptidase der Feuerameise *Solenopsis invicta* (Botos *et al.*, 2000) davon auszugehen, dass es sich bei den ersten 29 Aminosäuren um ein Pro-Peptid handelte. Für die Abspaltung des Pro-Peptids wurde die Peptidase Faktor Xa (FXa) eingesetzt. Hierfür wurden 20 µL der gemäß 2.15.4 gewonnenen RdoT3 in Vorversuchen mit jeweils 1 µL FXa versetzt und für 2, 7 und 22 h bei 24 °C und 200 rpm auf dem Inkubationsschüttler inkubiert. Das beste Ergebnis zeigte sich hierbei nach 2 h Inkubationszeit der Probe mit FXa. Diese Bedingungen wurden für die Aktivierung des Enzyms verwendet.

2.16 Optimierungsversuche

Optimierungsversuche wurden bzgl. der Temperatur und des pH-Wertes durchgeführt. Als Basis hierfür diente der Azocasein-Assay (vgl. 2.8.1). Zunächst wurde das pH-Optimum bestimmt. Analog zu 2.8.1 wurde die 0,5%-ige wässrige Azocasein-Lösung mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer versetzt. Für die Optimierungsversuche wurde der Tris-HCl-Puffer auf die pH-Werte 3,0 – 10,0 mit einem jeweiligen Abstand von 0,5 eingestellt. Anschließend wurde der Assay wie unter 2.8.1 weiter durchgeführt.

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die Probe gemäß 2.8.1 bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Getestet wurden Temperaturen im Bereich zwischen 20 °C und 80 °C bei pH 6.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zum Screening der insektenassoziierten Pilze

Die insektenassoziierten Pilze *C. pseudorhagii*, *M. fragilis*, *P. commune*, *P. echinolatum*, *A. areolatum*, *A. chailletii* und *S. sanguinolentum* wurden auf ihre Peptidaseaktivität getestet. Die Pilze wurden zunächst in einem Screening auf Milchagarplatten hinsichtlich ihrer peptidolytischen Aktivität getestet. Im Anschluss wurden die Pilze in Submerskultur (vgl. 2.5.3 und 2.5.4) überführt und die Peptidaseaktivität in den Kulturüberständen während des Kulturverlaufs mittels Azocasein-Assay (vgl. 2.8.1) bestimmt. Des Weiteren wurden die Kulturüberstände auf PsP-Aktivität getestet sowie die Gesamtproteinkonzentration im Kulturüberstand nach Bradford (vgl. 2.8.4) ermittelt. Kulturüberstände mit der höchsten Aktivität wurden gelelektrophoretisch anhand von Gluten-Zymogrammen (vgl. 2.7.3) untersucht. Zusätzlich wurde der Abbau zweier zöliakierrelevanter Peptide gemessen (vgl. 2.11).

3.1.1 Kulturführung der insektenassoziierten Pilze

Bei der Kultivierung auf Agarplatten zeigten die Pilze ein sehr unterschiedliches Wachstum (Abb. 3.1). *A. areolatum* zeigte ein sehr schnelles und hinsichtlich der Ausbildung des Myzels sehr feines Wachstum, *A. chailletii* zeigte ein langsames, wenngleich sehr dichtes Mycelwachstum. Bei dem Pilz *S. sanguinolentum* war ein sehr langsames und feines Wachstum des Myzels zu beobachten.

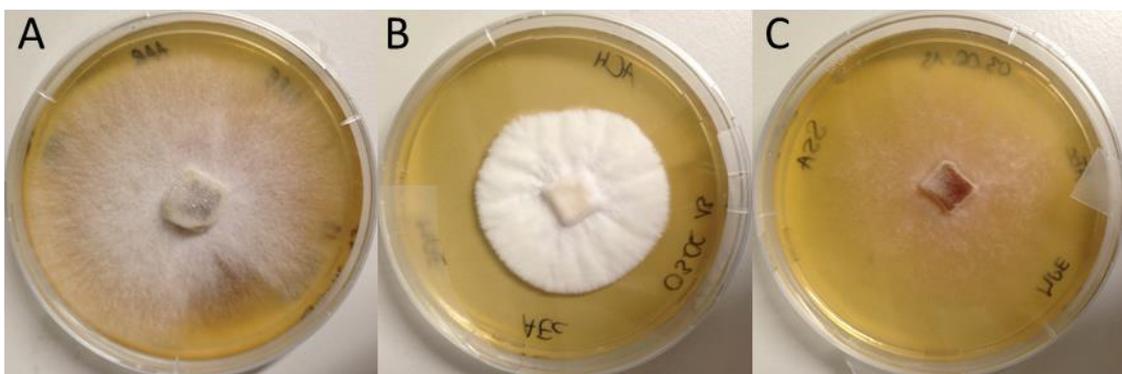


Abb. 3.1: MPE-Agarplatten nach 9 Tagen im Inkubationsschrank bei 24 °C (A: *A. areolatum*, B: *S. sanguinolentum*, C: *A. chailletii*)

Nach Überführung der Pilze in Submerskultur zeigte der Pilz *A. areolatum* das geringste Wachstum und fiel zudem durch seine dunkle Färbung auf (Abb. 3.2). Bereits zu Beginn der Kulturführung (Tag 2) wies der Kulturüberstand eine deutlich dunklere Färbung auf, welche sich im weiteren Verlauf intensivierte. Die Flüssigkulturen der Pilze *A. chailletii* und *S. sanguinolentum* zeigten ein deutlich besseres Wachstum in den jeweiligen Medien.



Abb. 3.2: Kulturkolben der Pilze *A. areolatum*, *A. chailletii* und *S. sanguinolentum* an Kulturtag 9. Reihe A: MM-Medium, Reihe B: PDE-Medium, Reihe C: SNL-Medium, Reihe D: MPE-Medium; Spalte I + II: *A. areolatum*, Spalte III + IV: *A. chailletii*, Spalte V + VI: *S. sanguinolentum*

3.1.2 Ergebnisse des Screenings auf Agarplatten

Mit Hilfe des Screenings auf Magermilch-Agarplatten wurde eine Hydrolyse der im Agar enthaltenen Proteine sichtbar gemacht. Hierfür wurde der Pilz auf einfache und komplexe Milchagarplatten (Tabellen 2.17 und 2.18) gesetzt und für mehrere Tage inkubiert (vgl. 2.5.2).

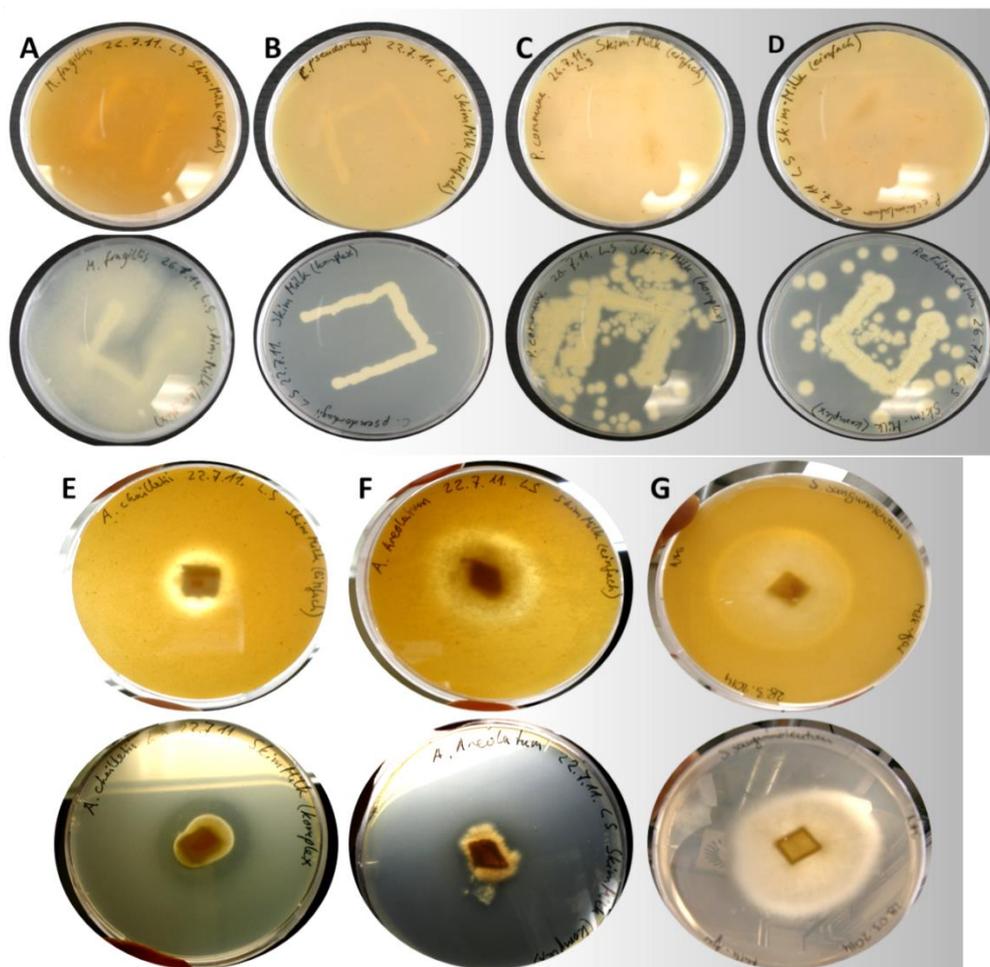


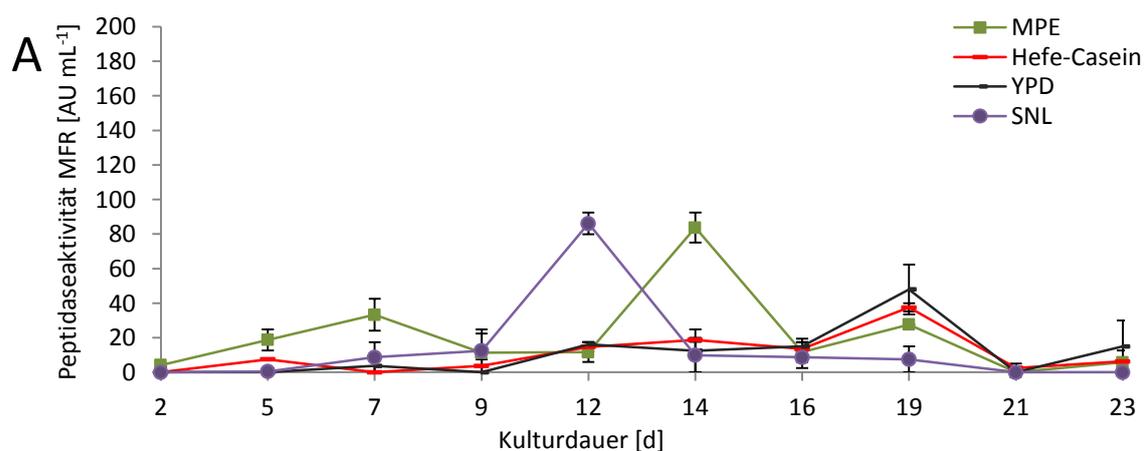
Abb. 3.3: Screening nach Peptidaseaktivität auf Agarplatten. Obere Reihe: komplexer Milchagar, untere Reihe: einfacher Milchagar. A: *M. fragilis*, B: *C. pseudorhagii*, C: *P. commune*, D: *P. echinulatum*, E: *A. chailettii*, F: *A. areolatum*, G: *S. sanguinolentum*

Drei von sieben Pilzen erzeugten in den entsprechenden Agarplatten Hydrolysezoneen (Abb. 3.3). Dabei handelte es sich um die aus den Bohrlöchern der Holzwespe isolierten Pilze *A. chailettii*, *A. areolatum* und *S. sanguinolentum*. Die Pilze, welche aus dem Darm des asiatischen Laubholzbockkäfers isoliert wurden, zeigten im Agarplatten-Screening keine Aktivität.

3.1.3 Photometrisch ermittelte Peptidaseaktivität

Die Bestimmung der Peptidaseaktivität in den Submerskulturen während des Kulturverlaufs erfolgte anhand des Azocasein-Assays (vgl. 2.8.1). Dabei zeigte sich ein dem Screening auf Agarplatten ähnliches Bild. Die Pilze, welche aus dem Darm des asiatischen Laubholzbockkäfers isoliert wurden (Abb. 3.4 A – D), zeigten im Gegensatz zu den der Holzwespe assoziierten Pilzen (Abb. 3.5 A – C) nur eine relativ geringe Aktivität. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung; pro Probe wurde ebenfalls ein separater Blindwert angefertigt. Die Messung der Peptidaseaktivitäten erfolgte in verschiedenen Nährmedien (vgl. 2.5.1).

Der Pilz *M. fragilis* zeigte über eine Kulturdauer von 23 Tagen eine maximale Peptidaseaktivität von 86 AU mL^{-1} im SNL-Kulturmedium an Kulturtag 12 (Abb. 3.4 A). Die Hefe *C. pseudorhagii* zeigte mit maximal 45 AU mL^{-1} im Hefe-Casein-Medium generell eine geringere Peptidaseaktivität (Abb. 3.4 B). Die Pilze *P. commune* und *P. echinulatum* (Abb. 3.4 C und D) unterschieden sich deutlich hinsichtlich ihrer Peptidaseaktivität. Während *P. commune* an Kulturtag 7 eine Aktivität von 136 AU mL^{-1} im PDE-Medium erreichte, wurde im Kulturüberstand von *P. echinulatum* eine maximale Aktivität von 80 AU mL^{-1} am ersten Kulturtag im MPE-Medium nachgewiesen.



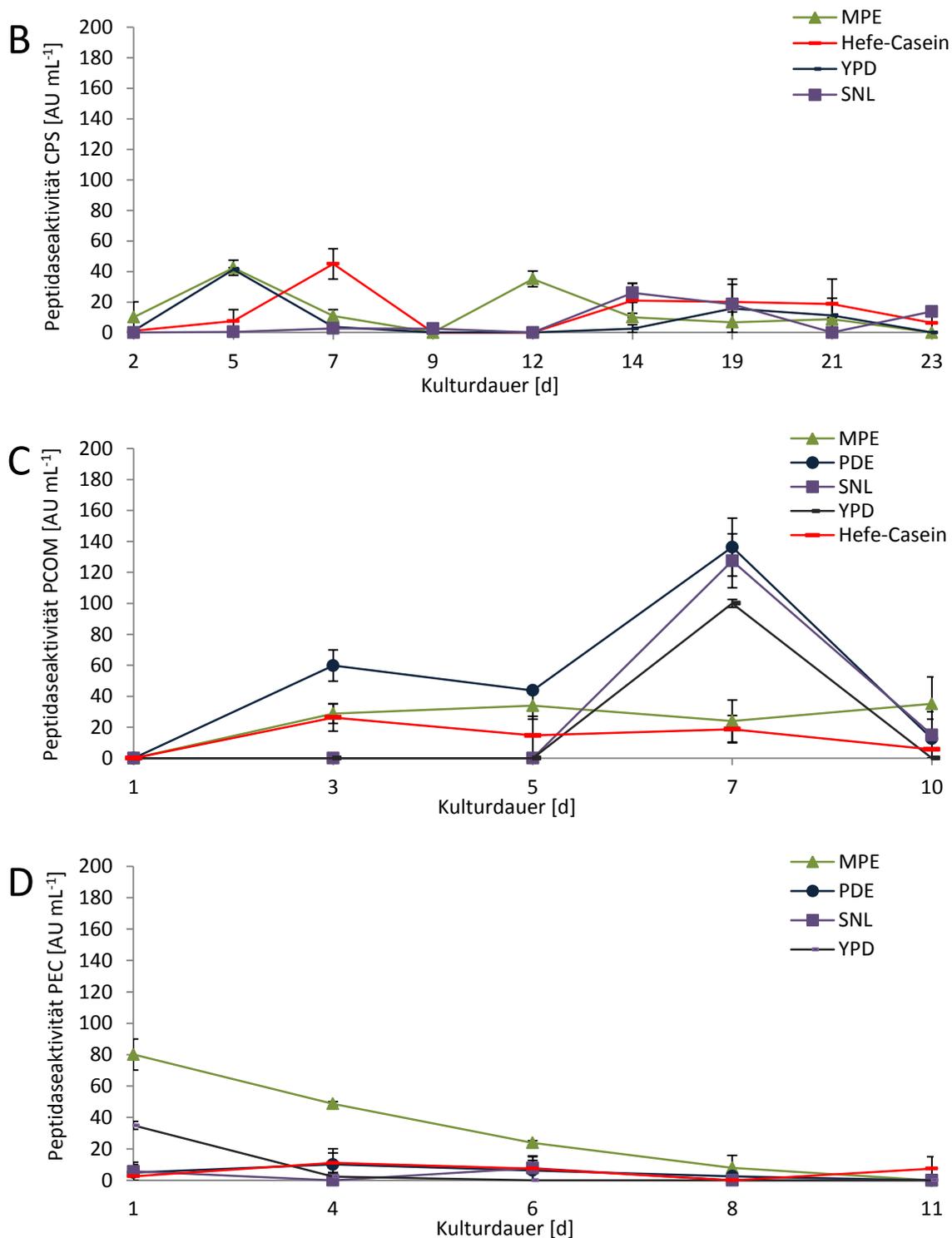
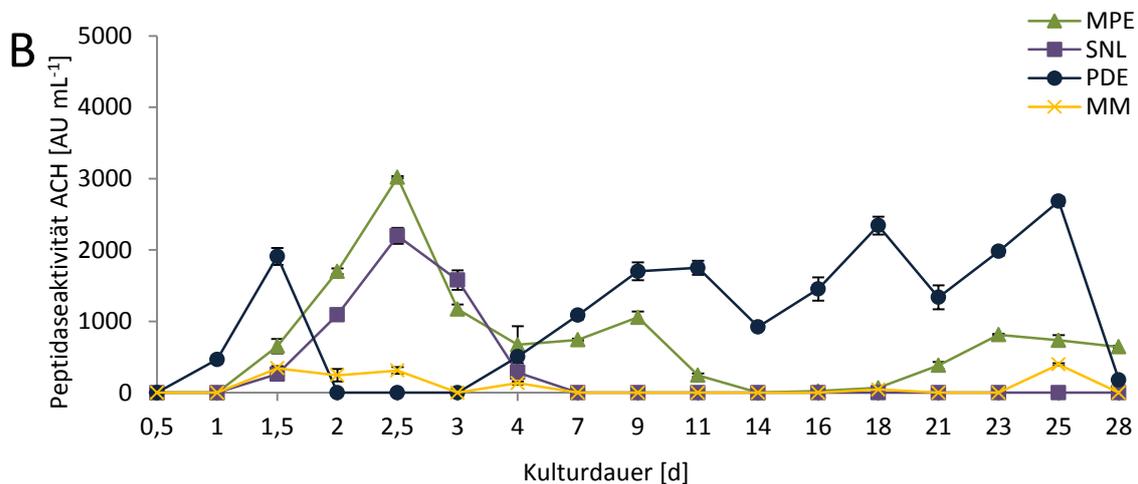
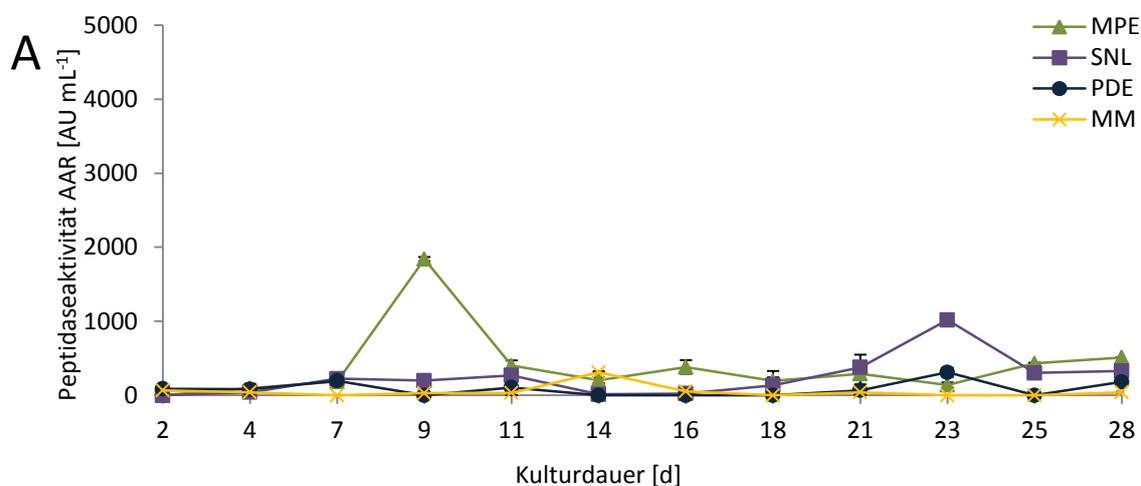


Abb. 3.4: A: Peptidaseaktivität des Pilzes *M. fragilis* (MFR). Die Kulturdauer betrug 23 Tage;
 B: Peptidaseaktivität des Pilzes *C. pseudorhagii* (CPS). Die Kulturdauer betrug 23 Tage;
 C: Peptidaseaktivität des Pilzes *P. commune* (PCOM). Die Kulturdauer betrug 10 Tage;
 D: Peptidaseaktivität des Pilzes *P. echinulatum* (PEC). Die Kulturdauer betrug 11 Tage.
 Die Bestimmung der Peptidaseaktivitäten erfolgte mittels Azocasein-Assay, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung

Die den Bohrlöchern der Holzwespe assoziierten Pilze zeigten generell höhere Aktivitäten (Abb. 3.5 A – C). Der Pilz *A. areolatum* (Abb. 3.5 A) zeigte im MPE-Medium eine maximale Peptidaseaktivität von 1.840 AU mL^{-1} am 9. Kulturtag. Der Pilz *A. chailletii* zeigte mit 1.910 AU mL^{-1} bereits zu Beginn der Kulturführung eine deutlich größere Peptidaseaktivität und erreichte im MPE-Medium maximal 3.017 AU mL^{-1} (Abb. 3.5 B). Ähnlich zu *A. chailletii* zeigte der Pilz *S. sanguinolentum* die höchste Peptidaseaktivität zu Beginn der Kulturführung (Abb. 3.5 C). Die maximale Aktivität von 8.650 AU mL^{-1} wurde im MPE-Medium an Tag 2 gemessen.



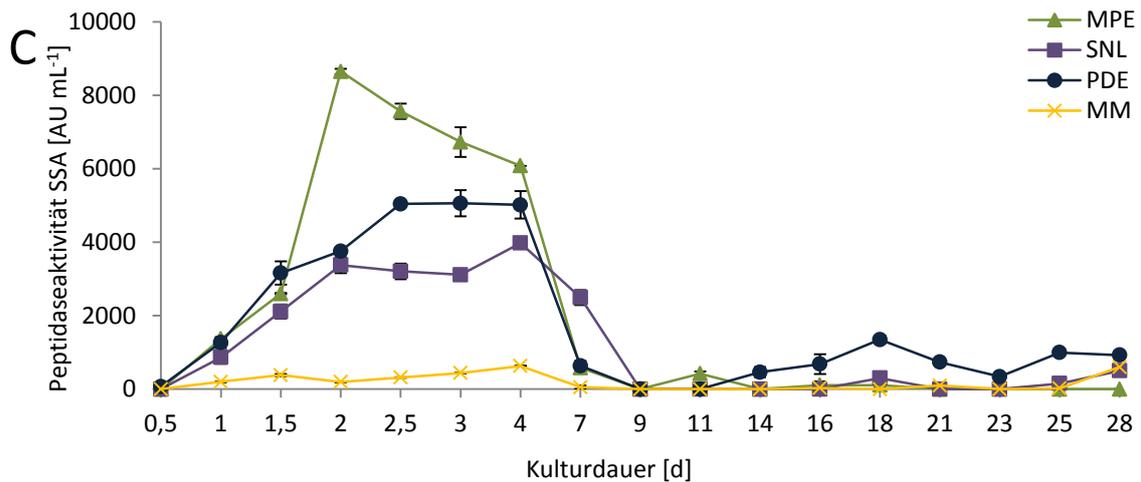


Abb. 3.5: A) Peptidaseaktivität des Pilzes *A. areolatum* (AAR). Die Kulturdauer betrug 28 Tage
 B) Peptidaseaktivität des Pilzes *A. chailletii* (ACH). Die Kulturdauer betrug 28 Tage;
 C) Peptidaseaktivität des Pilzes *S. sanguinolentum* (SSA). Die Kulturdauer betrug 28 Tage.
 Die Bestimmung der Peptidaseaktivitäten erfolgte mittels Azocasein-Assay, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung

Neben der Bestimmung der Peptidaseaktivität mittels Azocasein wurde die PsP-Aktivität (vgl. 2.8.2) in den jeweiligen Kulturüberständen ermittelt. In keinem der Pilze war jedoch Prolyl-spezifische Aktivität nachweisbar.

3.1.4 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford

Die Gesamtproteinkonzentration der Pilzkulturüberstände wurde kulturbegleitend mittels Bradford-Assay bestimmt (vgl. 2.8.4). Untersucht wurden die unter 3.1.2 erwähnten Proben der Pilze *A. areolatum*, *A. chailletii* und *S. sanguinolentum* der Kulturstage 2 – 21.

Die Proteinkonzentration im Kulturüberstand von *A. areolatum* (Abb. 3.6) zeigte im Laufe der Kultivierung im MPE-Medium einen steten Anstieg und erreichte im untersuchten Zeitraum einen Maximalwert von $135 \mu\text{g mL}^{-1}$. Die Proteinkonzentration im SNL- und PDE-Medium nahm ab Tag 9 ab, wobei der Proteingehalt im PDE-Medium ab Tag 14 auf $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ sank. Im MM-Medium wurde über den gesamten Kulturverlauf ein nahezu konstanter Wert zwischen 25 und $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ gemessen.

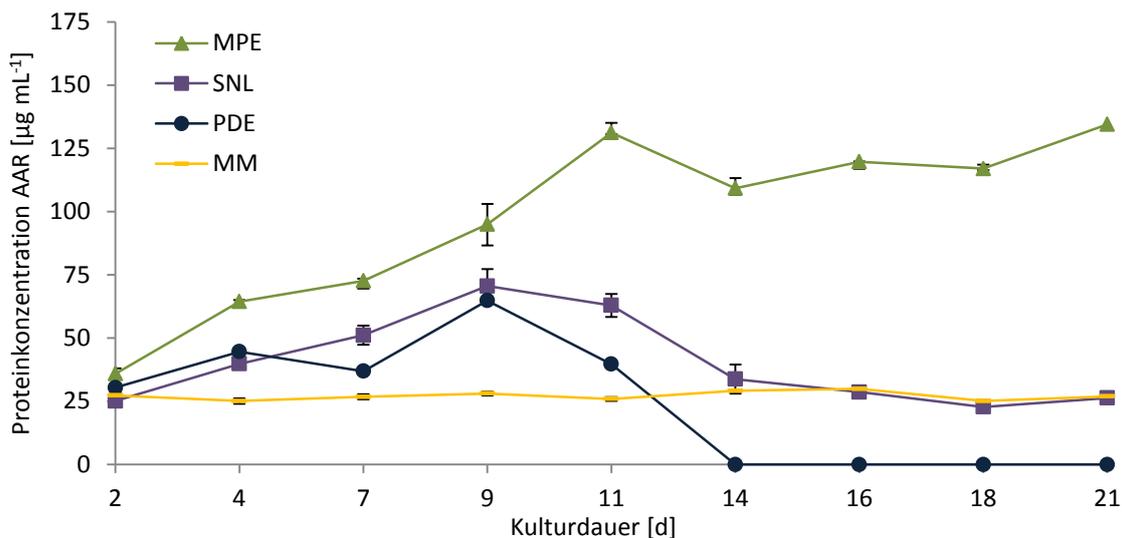


Abb. 3.6: Proteinkonzentration im Kulturüberstand von *A. areolatum* während der Kultivierung. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung

Bei der Messung der Proteinkonzentration im Kulturüberstand von *A. chailletii* (Abb. 3.7) zeigte sich im SNL- und MPE-Medium im Verlauf der Kulturdauer eine Zunahme der Proteinkonzentration. Im MPE-Medium wurde ein maximaler Wert von $74 \mu\text{g mL}^{-1}$ erreicht, im SNL-Medium betrug die Proteinkonzentration an Tag 21 $84 \mu\text{g mL}^{-1}$.

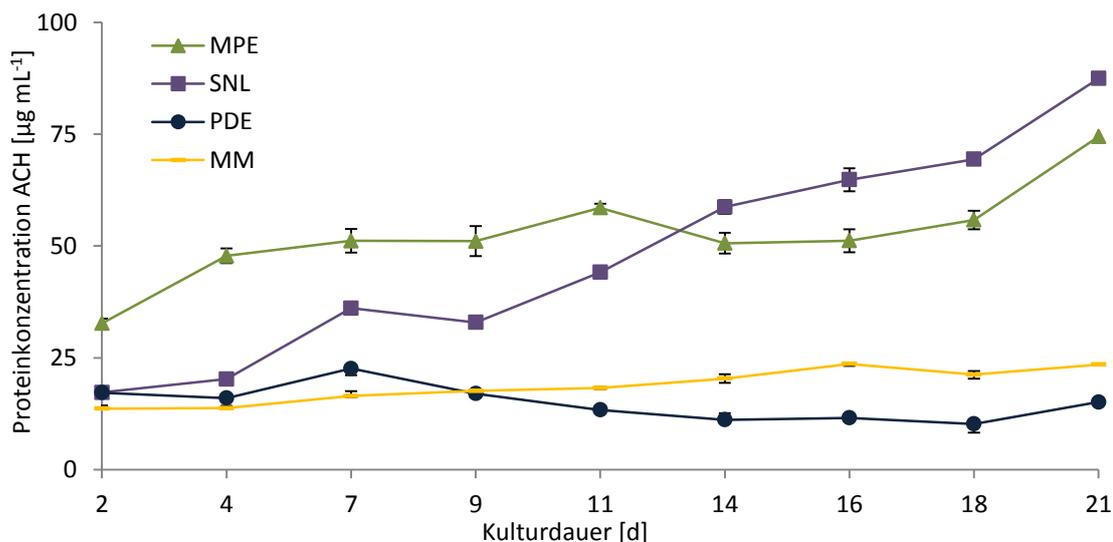


Abb. 3.7: Proteinkonzentration im Kulturüberstand von *A. chailletii* während der Kultivierung. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung

Bei *S. sanguinolentum* (Abb. 3.8) wurde im MM-Medium eine Proteinkonzentration von 15 bis 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bestimmt. Die maximale Proteinkonzentration im Kulturüberstand von *S. sanguinolentum* mit 373 $\mu\text{g mL}^{-1}$ wurde im MPE-Medium an Tag 16 gemessen. Die vergleichsweise hohen Werte der Proteinkonzentration korrelierten mit der Peptidaseaktivität (Azocasein-Assay). Auch hier zeigte *S. sanguinolentum* im MPE-Medium die maximale Aktivität.

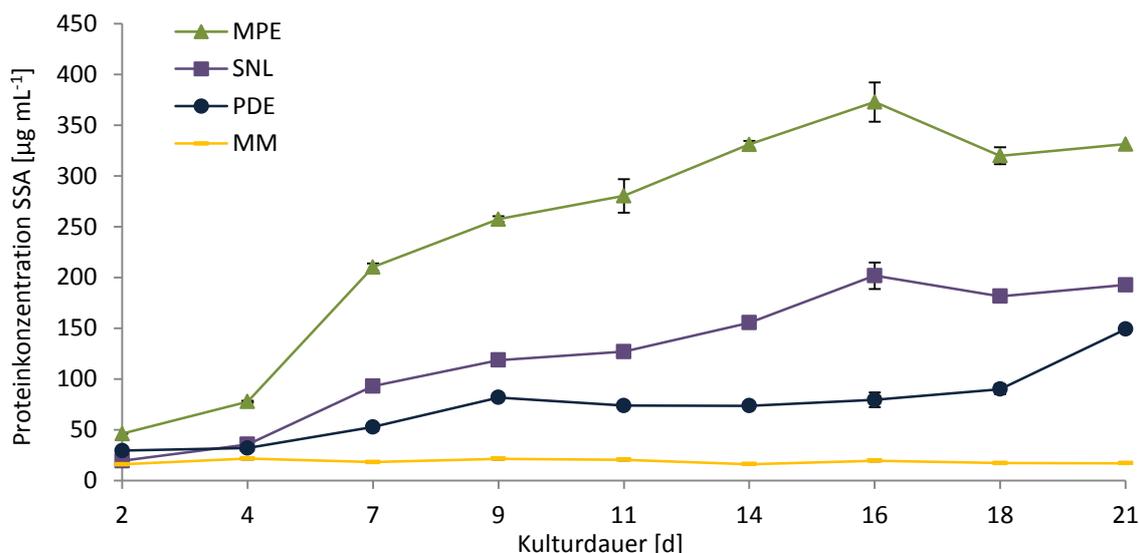


Abb. 3.8: Proteinkonzentration im Kulturüberstand von *S. sanguinolentum* während der Kultivierung.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung

Anhand der ermittelten Peptidaseaktivität und des Proteingehaltes wurde die spezifische Aktivität der Pilze *A. areolatum*, *A. chailletii* und *S. sanguinolentum* bestimmt. Für *A. areolatum* (Abb. 3.9 A) wurden die geringsten spezifischen Aktivitäten ermittelt. Die maximale spezifische Aktivität von 19 $\text{AU } \mu\text{g}^{-1}$ Protein wurde an Tag 9 im MPE-Medium ermittelt. Bei *A. chailletii* (Abb. 3.9 B) zeigten sich die besten Ergebnisse im PDE-Medium mit einer maximalen spezifischen Aktivität von 228 $\text{AU } \mu\text{g}^{-1}$ Protein an Kulturtag 18. Bei *S. sanguinolentum* wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten mit 187 bzw. 175 $\text{AU } \mu\text{g}^{-1}$ Protein im MPE sowie im SNL-Medium zu Beginn des Kulturverlaufs ermittelt (Abb. 3.9 C).

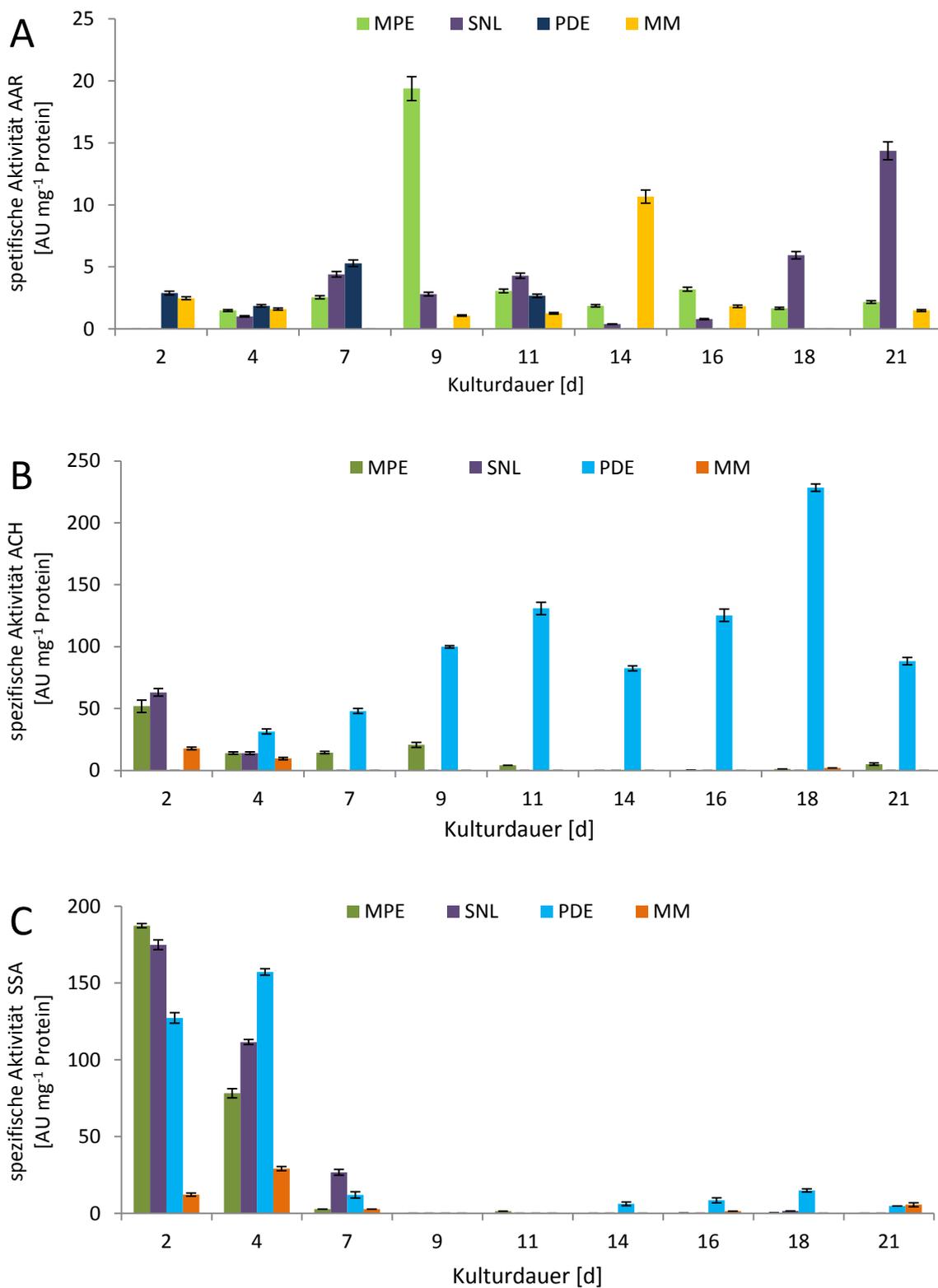


Abbildung 3.9: Vergleich der spezifischen Aktivitäten im Kulturverlauf der Pilze *A. areolatum* (A), *A. chailletii* (B) und *S. sanguinolentum* (C)

3.1.5 Gelelektrophoretische Untersuchung der Kulturüberstände der insektenassoziierten Pilze

Wie unter 3.1.2 und 3.1.3 beschrieben, zeigten nur die Pilze *A. areolatum*, *A. chailletii* und *S. sanguinolentum* im Agarplattenscreening und im photometrischen Assay Peptidaseaktivität. Aus diesem Grund wurden die weiteren Analysen auf diese Pilze beschränkt.

Für den Nachweis des peptidolytischen Abbaus diverser Proteine wurden Zymogramme mit den Substraten BSA, Casein, Guten und Reisprotein angefertigt und mit Kulturüberständen beladen (vgl. 2.7.3). Als Proben wurden die Pilzkulturüberstände jedes Kulturmediums am Tag maximaler Aktivität aufgetragen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Ausgewählte Proben für die gelelektrophoretische Untersuchung

Nr.	Stamm	Nährmedium	Kulturdauer [d]	Peptidaseaktivität [AU mL ⁻¹]
1	<i>S. sanguinolentum</i>	MPE	2	8.650
2	<i>S. sanguinolentum</i>	SNL	4	3.975
3	<i>S. sanguinolentum</i>	PDE	4	5.015
4	<i>S. sanguinolentum</i>	MM	28	599
5	<i>A. chailletii</i>	MPE	2,5	3.017
6	<i>A. chailletii</i>	SNL	2,5	2.199
7	<i>A. chailletii</i>	PDE	25	2.681
8	<i>A. chailletii</i>	MM	25	395
9	<i>A. areolatum</i>	MPE	9	1.840
10	<i>A. areolatum</i>	SNL	23	1.018
11	<i>A. areolatum</i>	PDE	23	310
12	<i>A. areolatum</i>	MM	14	311

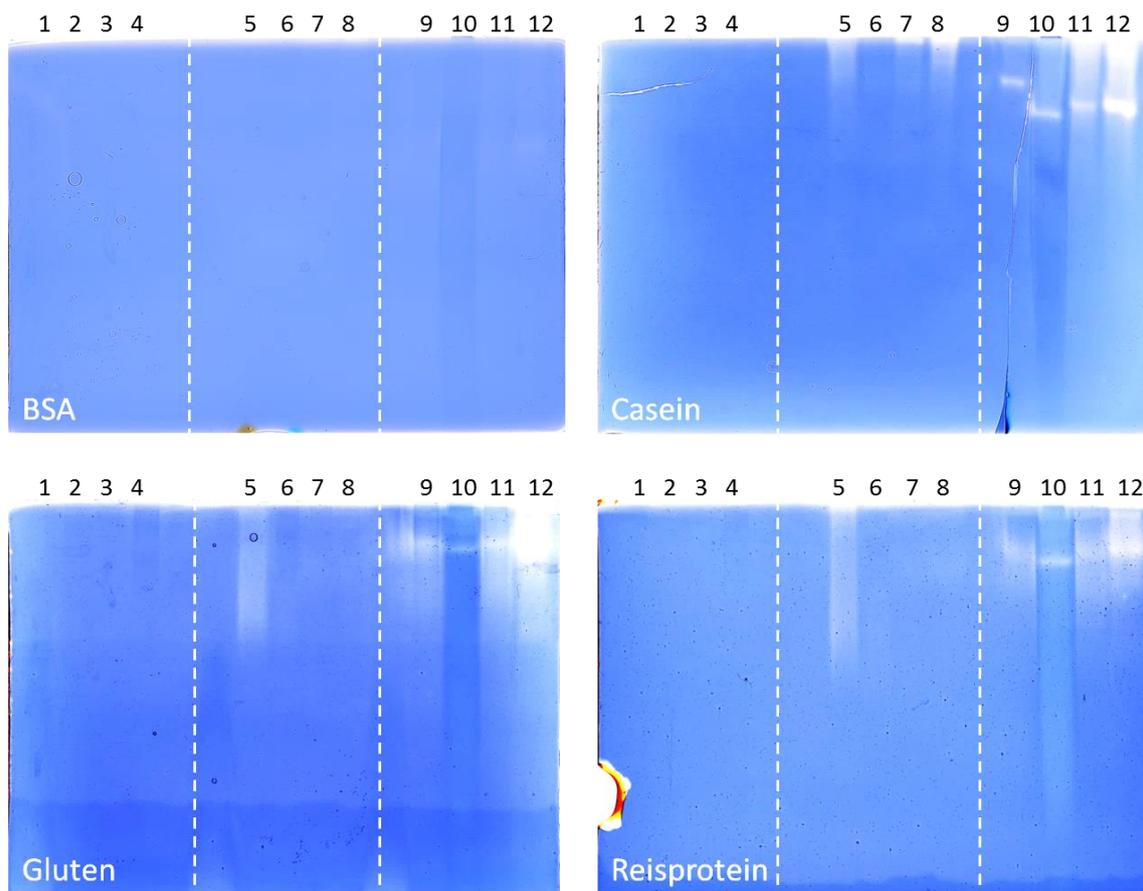


Abb. 3.10: Zymogramme mit den Substraten BSA, Casein, Gluten und Reisprotein, beladen mit den in Tabelle 3.1 beschriebenen Kulturüberständen von *S. sanguinolentum* (1 - 4), *A. chailletii* (5 - 8) und *A. areolatum* (9 - 12)

Obwohl *S. sanguinolentum* bei der Messung der Peptidaseaktivität mittels Azocasein die höchsten Aktivitäten besaß (Tabelle 3.1), zeigte keine der aufgetragenen Fraktionen einen Abbau der eingearbeiteten Substrate (Abb. 3.10). Bei *A. chailletii* waren alle aufgetragenen Proben in der Lage, Casein zu hydrolysieren. Die Substrate Gluten und Reisprotein hingegen wurden nur von Probe 5 hydrolysiert. *A. areolatum* zeigte die niedrigsten Peptidaseaktivitäten im Azocasein-Assay (Tabelle 3.1), dennoch erzeugten alle aufgetragenen Proben Hydrolysezonen für die Substrate Casein, Reisprotein und Gluten. Das Substrat BSA wurde durch keine aufgetragene Probe hydrolysiert.

3.1.6 Peptidabbau mit Pilzkulturüberständen

Neben der Bestimmung der Peptidaseaktivität und dem peptidolytischen Abbau verschiedener lebensmittelbiotechnologisch relevanter Proteine wurden die Pilzkulturüberstände ausgewählter Proben (Tabelle 3.2) auf den Abbau zweier zöliakierelevanter Peptide getestet (vgl. 2.11).

Tabelle 3.2: Für den Peptidabbau verwendete Pilzkulturüberstände

Stamm	Nährmedium	Kulturdauer [d]	Peptidaseaktivität [AU mL ⁻¹]
<i>A. areolatum</i>	SNL	23	1.018
<i>A. chailletii</i>	MPE	2,5	3.017
<i>S. sanguinolentum</i>	MPE	2	8.650

Die Proben wurden jeweils für 30 und 90 min mit dem jeweiligen Peptid bei 37 °C inkubiert, die Inkubationszeit von 0 min erfolgte mit vorher bei 100 °C abgekochtem Kulturüberstand und diente somit als Blindwert.

Das Weizenpeptid P1 wurde durch den Kulturüberstand von *A. areolatum* abgebaut. Das Signal des Peptids im HPLC-UV-Chromatogramm (Abb. 3.11 A; 14,7 min) wurde mit zunehmender Inkubationszeit kleiner. Zugleich wurde ein Abbauprodukt bei 14,3 min sichtbar. Für den Abbau des Gerstenpeptids P2 durch *A. areolatum* zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb. 3.11 B). Im Unterschied zu P1 eluierten die Abbauprodukte jedoch später als P2 bei 13,3 min.

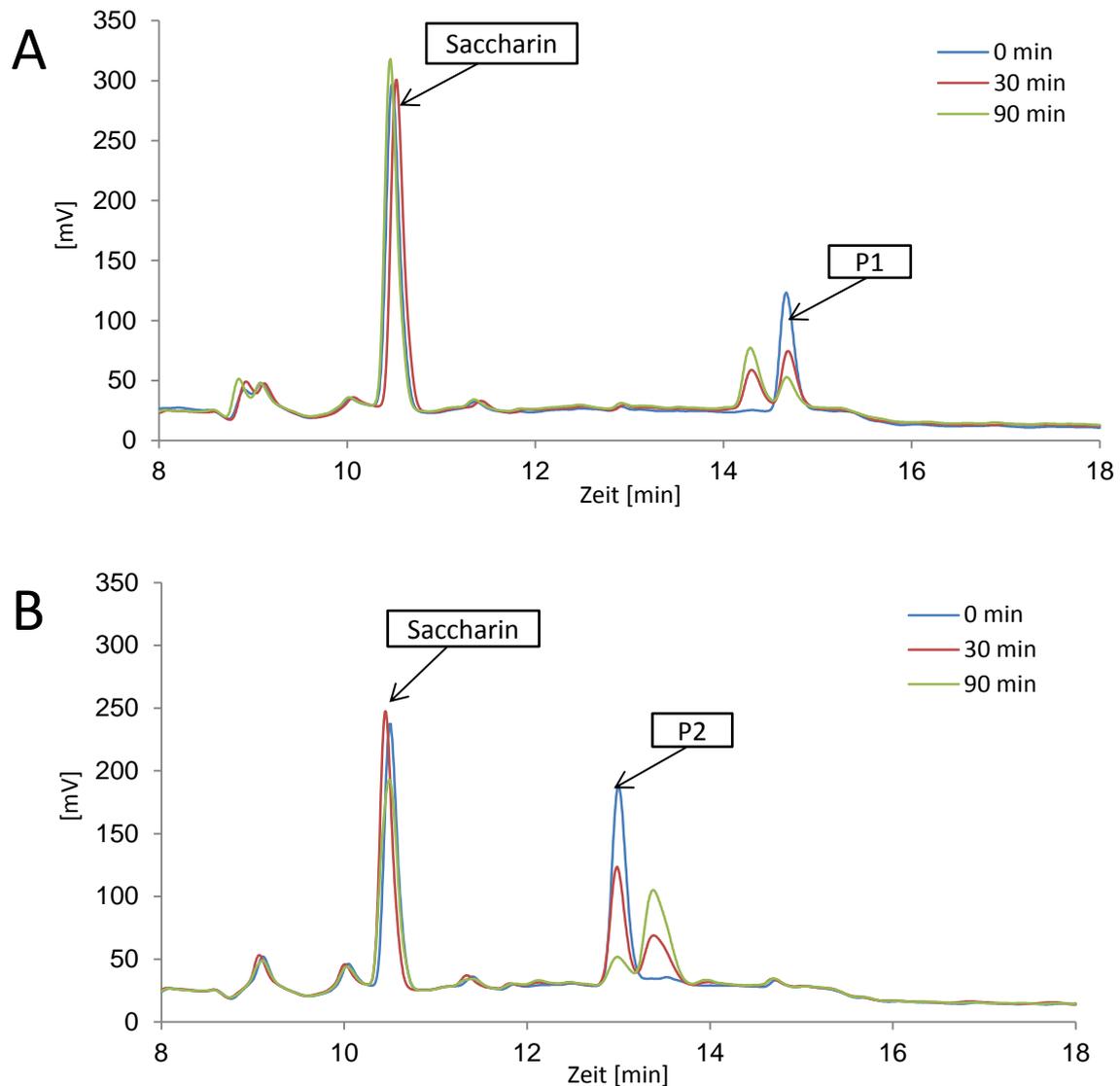


Abb. 3.11: A: Abbau des Weizenpeptids P1 mit Kulturüberstand von *A. areolatum* im SNL-Medium.

B: Abbau des Gerstenpeptids P2 mit Kulturüberstand von *A. areolatum* im SNL-Medium.

Anhand einer graphischen Auswertung des Peptidabbaus durch *A. areolatum* (Abb. 3.12) ließ sich das Ergebnis der erreichten Hydrolyserate deutlicher erfassen. Nach 30 min Inkubationszeit wurden 36,6% P1 und 51,0% P2 hydrolysiert, nach 90 min erhöhten sich die Hydrolyseraten auf 74,7% für P1 und 71,3% für P2. Somit wurde durch den Kulturüberstand von *A. areolatum* ein deutlicher Abbau der zöliakierelevanten Peptide P1 und P2 erzeugt.

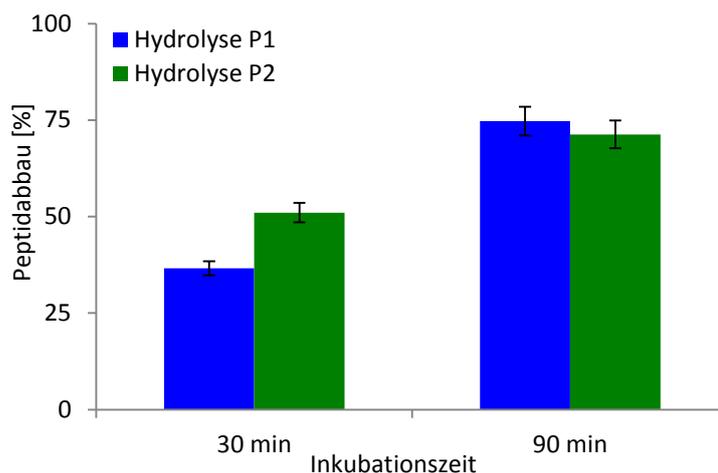
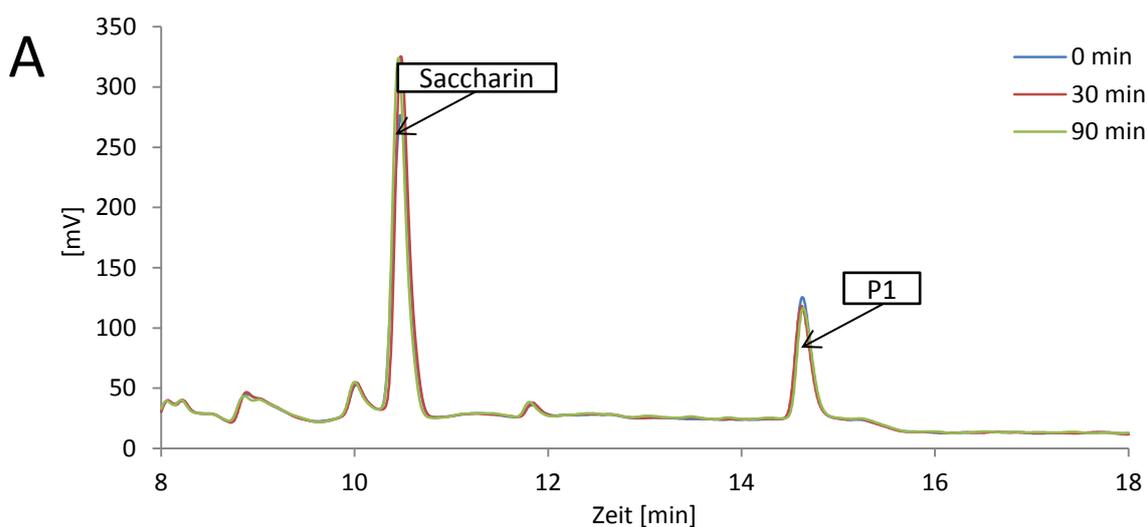


Abb. 3.12: Graphische Darstellung zum Abbau von P1 und P2 mit Kulturüberstand von *A. areolatum*

Im Unterschied zu *A. areolatum* wurde bei *A. chailletii* auch nach 90 min Inkubationszeit kein Abbau des Weizenpeptids P1 beobachtet (Abb. 3.13 A). Die HPLC-UV-Chromatogramme des Abbaus von P2 (Abb. 3.13 B) zeigten hingegen ein ähnliches Bild wie beim Abbau von P2 durch *A. areolatum*. Nach 30 min und 90 min wurde ein deutlicher Abbau des Gerstenpeptids P2 sichtbar und es trat auch hier ein neuer Peak bei 13,3 min auf.



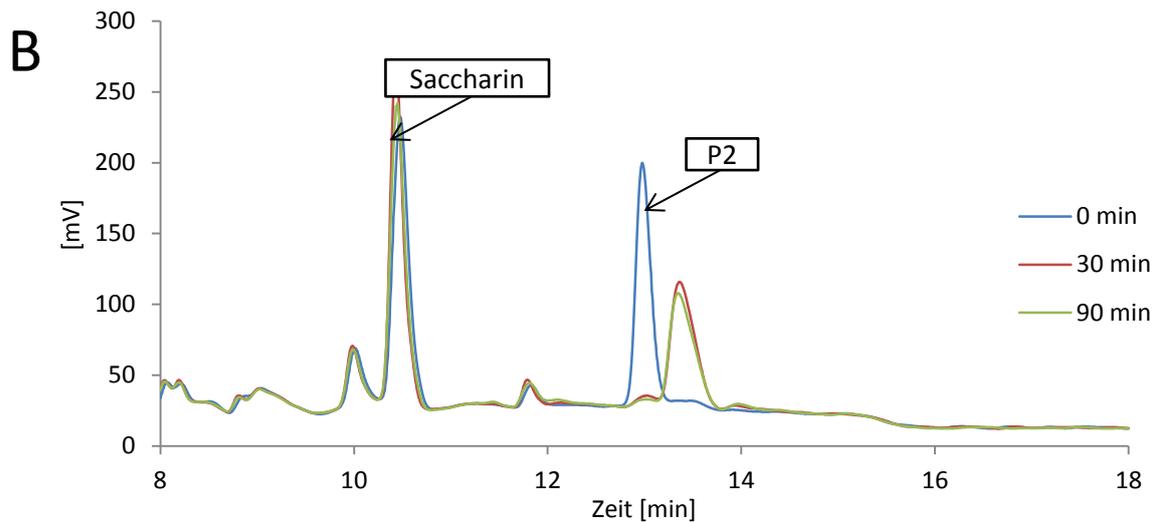


Abb. 3.13: A: Abbau des Weizenpeptids P1 mit Kulturüberstand von *A. chailletii* im MPE-Medium. B: Abbau des Gerstenpeptids P2 mit Kulturüberstand von *A. chailletii* im MPE-Medium

Bei P2 betrug die Abbaurate nach 30 min 69,2% und nach 90 min 85,5% (Abb. 3.14).

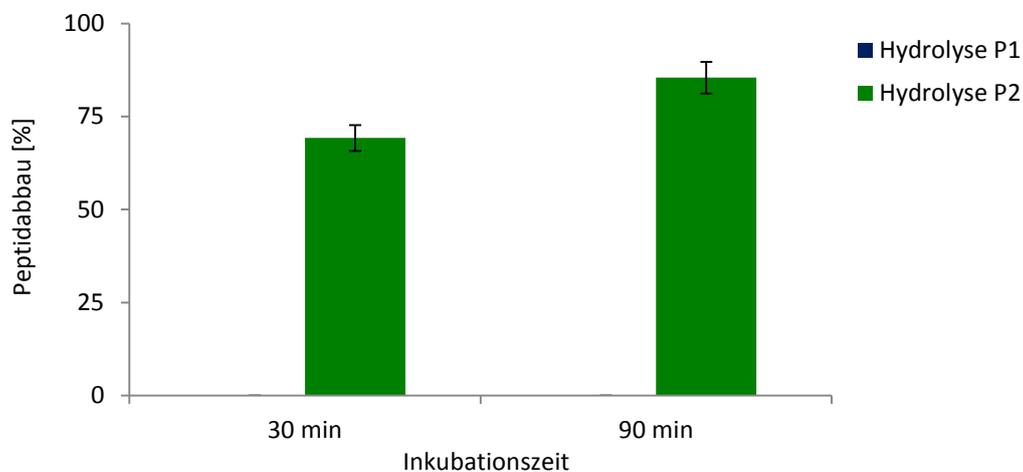


Abb. 3.14: Graphische Darstellung des Peptidabbau von P1 und P2 mit Kulturüberstand von *A. chailletii*

Mit dem Kulturüberstand von *S. sanguinolentum* wurde der Überstand mit der insgesamt höchsten Peptidaseaktivität für den Peptidabbau eingesetzt (vgl. Tabelle 3.2). Im HPLC-UV-Chromatogramm wurde ein Abbau des Peaks P1 nach 30 und 90 min beobachtet (Abb. 3.15 A). Beim Abbau von P2 durch *S. sanguinolentum* zeigte sich im Vergleich zu den anderen Pilzen ein neues Bild (Abb. 3.15 B). Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde analog zu

A. areolatum und *A. chailletii* ein neuer Peak bei 13,3 min beobachtet. Nach 90 min Inkubationszeit war dieser Peak jedoch nicht mehr zu detektieren. Stattdessen traten im Bereich von 12 min und damit vor P2 neue Peaks auf, die bei den anderen beiden Pilzen nicht detektiert wurden. Somit wurde mit *S. sanguinolentum* ein anderes Hydrolysemuster des Gerstenpeptids P2 beobachtet.

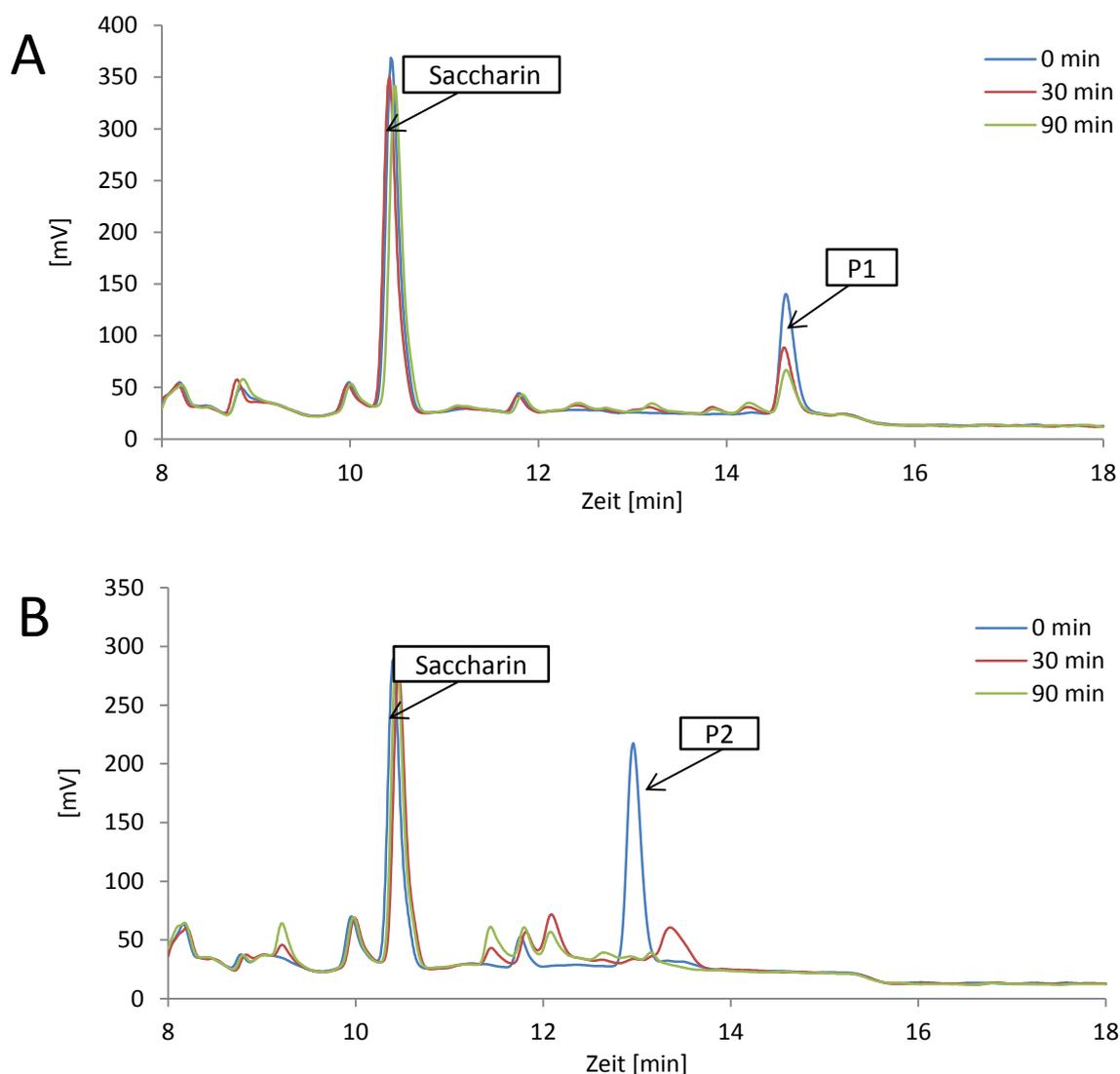


Abb. 3.15: A: Abbau des Weizenpeptids P1 mit Kulturüberstand von *S. sanguinolentum* im MPE-Medium. B: Abbau des Gerstenpeptids P2 mit Kulturüberstand von *S. sanguinolentum* im MPE-Medium

Die graphische Auswertung zur Hydrolyse von P1 und P2 durch *S. sanguinolentum* (Abb. 3.16) zeigte einen Abbau von 31,1% nach 30 sowie nach 90 min Inkubationszeit. Bei P2 wurde eine deutliche Hydrolyse nach 30 und 90 min detektiert.

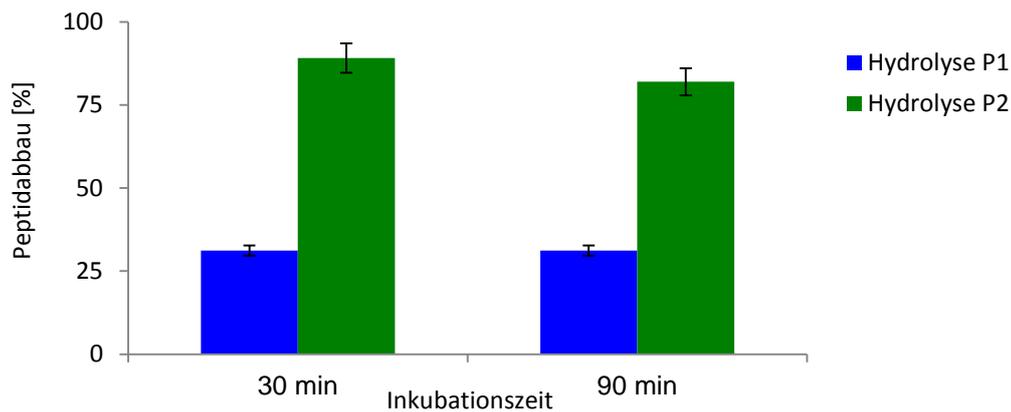


Abb. 3.16: Graphische Darstellung zum Abbau von P1 und P2 mit Kulturüberstand von *S. sanguinolentum*

3.1.7 Zusammenfassung zum Screening der insektenassoziierten Pilze

Fünf aus dem Darm des asiatischen Laubholzbockkäfers isolierte Pilze wurden auf Milchagarplatten und in Submerskultur kultiviert. In beiden Fällen wurde keine deutliche Peptidaseaktivität nachgewiesen. Die Pilze wurden deswegen für die weiteren Analysen ausgeschlossen. Die Pilze, welche aus den Bohrlöchern der Holzwespe isoliert wurden, zeigten sowohl im Agarplattenscreening als auch im photometrischen Assay zur Bestimmung der Peptidaseaktivität aussichtsreiche Ergebnisse. Besonders der Pilz *S. sanguinolentum* zeigte hohe Aktivitäten im Azocasein-Assay. Die Ergebnisse der Zymogramme zeigten jedoch, dass kein eingesetzter Kulturüberstand von *S. sanguinolentum* in der Lage war, die eingearbeiteten Substrate BSA, Casein, Gluten und Reisprotein zu hydrolysieren. Als effizientester Pilz erwies sich hier *A. areolatum*, welcher jedoch im Azocasein-Assay die geringste Aktivität zeigte. Durch jeden seiner eingesetzten Kulturüberstände wurden deutliche Hydrolysezonen im Gel erreicht. *A. chailletii*, welcher hinsichtlich seiner Aktivität zwischen den beiden anderen Pilzen lag, zeigte keine Hydrolyse von BSA im Gel, Gluten und Reisprotein wurden nur durch Kulturüberstand aus dem SNL-Medium hydrolysiert. Die Ergebnisse des Peptidabbaus zeigten eine deutliche Hydrolyse der Peptide P1 und P2 durch den Kulturüberstand von *A. areolatum*. *A. chailletii* hingegen zeigte lediglich einen deutlichen Abbau des Peptids P2. *S. sanguinolentum* zeigte nach 90 min ebenfalls einen effizienten Abbau beider Peptide. Zusätzlich wurde hierbei ein im Vergleich zu den anderen Kulturüberständen anderes Abbaumuster im HPLC-UV-Chromatogramm sichtbar.

3.2 Ergebnisse zum Screening der Getreideschädlinge

Getreide- und Vorratsschädlinge, die sich hauptsächlich von den Zielsubstraten dieser Arbeit ernähren, wurden auf Peptidaseaktivität gescreent. Das Screening erfolgte anhand der gleichen analytischen Methoden wie das Screening der insektenassoziierten Pilze. Für die Durchführung der Analysen wurden Käferextrakte verwendet (vgl. 2.6.3).

3.2.1 Photometrisch ermittelte Peptidaseaktivität

3.2.1.1 Bestimmung der Peptidaseaktivität mittels Azocasein-Assay

Im Unterschied zu den insektenassoziierten Pilzen wurde für die Getreideschädlinge pro hergestellte Charge einmalig die Peptidaseaktivität mittels Azocasein-Assay (2.8.1) ermittelt. Darüber hinaus wurden die ermittelten Peptidaseaktivitäten für eine bessere Vergleichbarkeit untereinander zusätzlich auf das Gewicht der Käfer bezogen (Tabelle 3.3). Die so ermittelte Peptidaseaktivität variierte je nach Zusammensetzung der Käfer teilweise sehr deutlich. *O. surinamensis* zeigte, gefolgt vom adulten *T. molitor* sowie *R. dominica*, stets die höchste Peptidaseaktivität. Die mit Abstand geringste Peptidaseaktivität zeigte *T. castaneum*.

Tabelle 3.3: Ermittelte Peptidaseaktivitäten in den Extrakten der Getreideschädlinge

Probe	Peptidaseaktivität [AU mg ⁻¹]
<i>R. dominica</i>	61 ± 1
<i>O. surinamensis</i>	134 ± 2
<i>T. molitor</i> (Larve)	44 ± 3
<i>T. molitor</i> (Käfer)	107 ± 6
<i>S. granarius</i>	44 ± 8
<i>A. diaperinus</i>	43 ± 3
<i>T. castaneum</i>	11 ± 2

3.2.1.2 Bestimmung der Prolyl-spezifischen Peptidaseaktivität

Die Käfer wiesen eine geringe PsP-Aktivität auf. Die höchste Aktivität wurde mit $1,2 \cdot 10^{-3}$ U mg⁻¹ für *R. dominica* gemessen (Tabelle 3.4). Die Käfer *T. castaneum* und *O. surinamensis*, *T. molitor*, *S. granarius* sowie *A. diaperinus* zeigten die geringste PsP-Aktivität.

Tabelle 3.4: PsP-Aktivitäten in den Extrakten der Getreideschädlinge

Probe	PsP-Aktivität [U mg ⁻¹]
<i>R. dominica</i>	$1,2 \cdot 10^{-3}$
<i>O. surinamensis</i>	$4,4 \cdot 10^{-4}$
<i>T. molitor</i> (Larve)	$9,9 \cdot 10^{-6}$
<i>T. molitor</i> (Käfer)	$4,6 \cdot 10^{-6}$
<i>S. granarius</i>	$1,2 \cdot 10^{-5}$
<i>A. diaperinus</i>	$8,8 \cdot 10^{-6}$
<i>T. castaneum</i>	$3,2 \cdot 10^{-4}$

3.2.2 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach Bradford gestaltete sich aufgrund der komplexen Matrix der Käferüberstände schwierig. Bestandteile wie Fett oder Teile des Chitinpanzers, welche nicht durch Zentrifugation abgetrennt werden konnten, behinderten den Assay und führten zu Trübungen. Bestimmt wurde demnach der Anteil an löslichem Protein der Käfer. Für die Messung wurden die Käferextrakte in einer 1:100-Verdünnung gemessen (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Käferextrakten nach Bradford

Insekt	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$]
<i>R. dominica</i>	32 ± 1
<i>O. surinamensis</i>	25 ± 2
<i>T. molitor</i> (Larve)	46 ± 4
<i>T. molitor</i> (Käfer)	56 ± 3
<i>S. granarius</i>	41 ± 2
<i>A. diaperinus</i>	32 ± 2
<i>T. castaneum</i>	181 ± 8

Die höchste spezifische Peptidaseaktivität von 5.360 AU mg^{-1} wurde in *O. surinamensis* nachgewiesen (Abb. 3.17). *R. dominica* und *T. molitor* (Käfer) zeigten mit etwa 1.910 AU mg^{-1} die zweitstärksten spezifischen Peptidaseaktivitäten. Im Vergleich zu den insektenassoziierten Pilzen wurden deutlich höhere spezifische Peptidaseaktivitäten nachgewiesen.

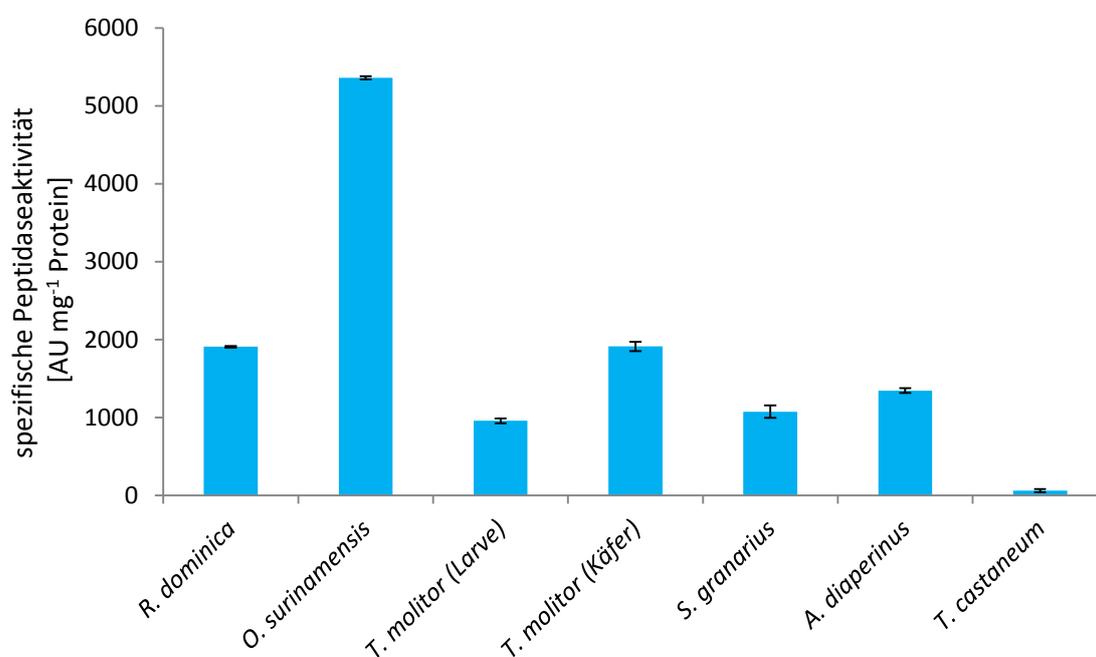


Abb. 3.17: Spezifische Peptidaseaktivität der Käferextrakte

3.2.3 Gelelektrophoretische Untersuchungen von Extrakten aus Getreideschädlingen

Anhand von Zymogrammen wurde die peptidolytische Aktivität der Käfer gegen verschiedene Proteine getestet (vgl. 2.7.3). Die Käferextrakte wurden hierfür auf eine Peptidaseaktivität von 1 AU mL^{-1} verdünnt; dies entsprach einer Aktivität von $0,025 \text{ AU}$ pro Geltasche.

Die Gele zeigten einen peptidolytischen Abbau der Substrate durch nahezu alle Käfer (Abb. 3.18). Lediglich *T. castaneum* und *S. granarius* zeigten keinen Abbau der eingearbeiteten Proteine. Obwohl die Extrakte auf gleiche Konzentrationen hinsichtlich der Peptidaseaktivität verdünnt wurden, zeigten sich in den Gelen starke Unterschiede in den jeweiligen Hydrolysemustern sowie in der Intensität der Hydrolysebanden. Mit den Extrakten von *O. surinamensis* und *R. dominica* war in allen Zymogrammen die stärkste peptidolytische Aktivität zu erkennen. Mit den Extrakten von *T. molitor* und *A. diaperinus* wurden jeweils einzelne aktive Banden auf verschiedenen Höhen sichtbar. Bei *T. molitor* zeigten sich zusätzlich unterschiedliche Hydrolysebanden in den verschiedenen Entwicklungsstufen der Käfer.

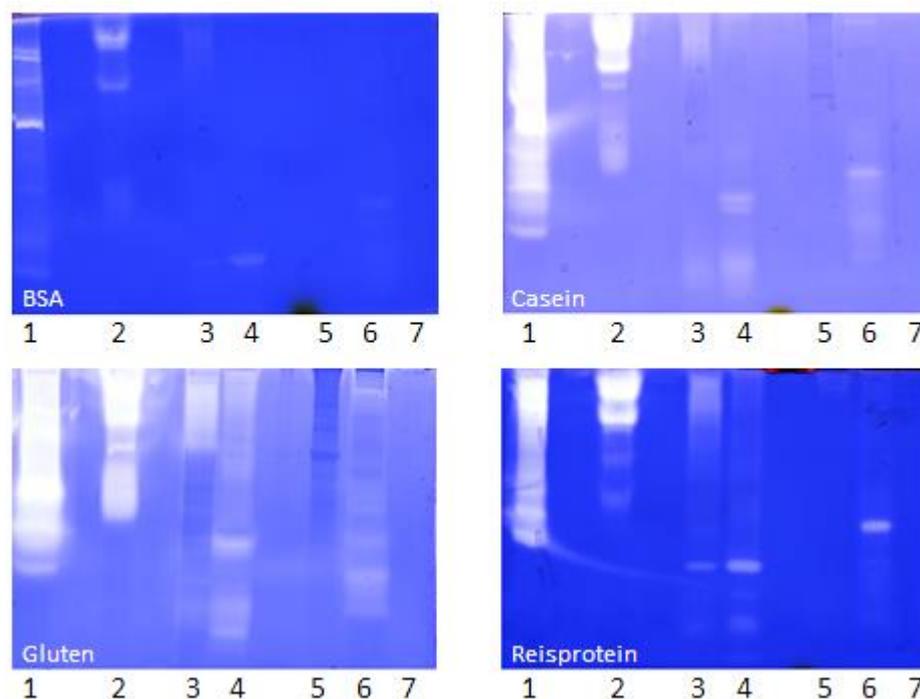


Abb. 3.18: halbnative Zymogramme mit den Substraten Gluten, Casein, Reisprotein und BSA. Als Proben wurden aufgetragen 1: *R. dominica*, 2: *O. surinamensis*, 3: *T. molitor* (Larve), 4: *T. molitor* (Käfer), 5: *S. granarius*, 6: *A. diaperinus*, 7: *T. castaneum*

3.2.4 Peptidabbau mit Extrakten aus Getreideschädlingen

Die Extrakte der Getreideschädlinge wurden für den Abbau der Peptide P1 und P2 verwendet. Die Probenaufarbeitung erfolgte wie unter 2.11 beschrieben. Der Abbau wurde nach 30 sowie 90 min analysiert; vereinfacht graphisch dargestellt wurde der Abbau nach 90 min (Abb. 3.19). Nach 90 min zeigten alle Getreideschädlinge einen Abbau eines oder beider Peptide. Mit Extrakten der Käfer *O. surinamensis*, *T. molitor* (Larve), *A. diaperinus* sowie *R. dominica* gelang der Abbau beider Peptide. *T. molitor* (Käfer) und *T. castaneum* zeigten lediglich einen Abbau von P1, mit dem Extrakt aus *S. granarius* wurde ausschließlich ein Abbau von P2 nachgewiesen. Insgesamt wurden durch die Extrakte der Käfer *O. surinamensis* und *R. dominica* maximale Hydrolyseraten erzielt.

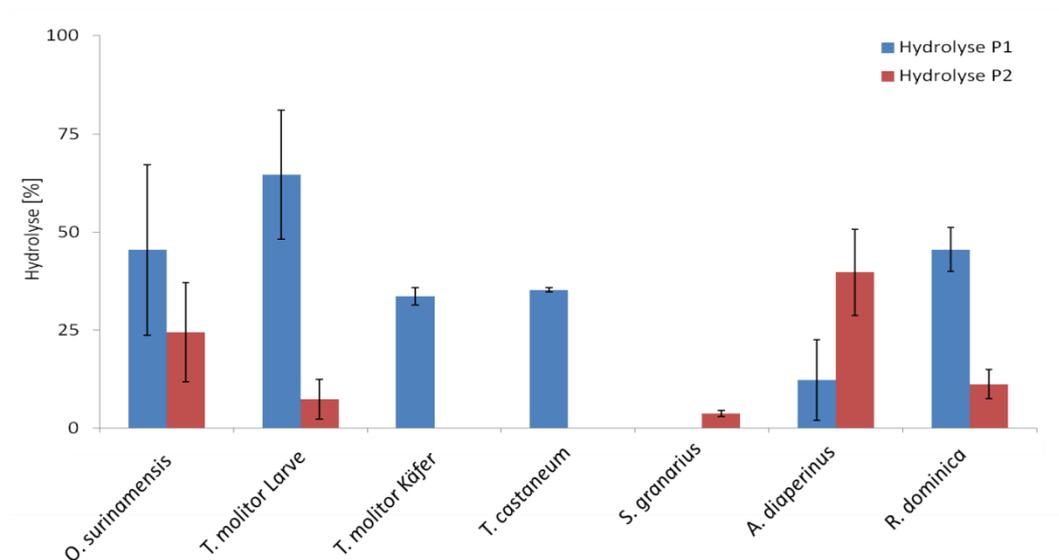


Abb. 3.19: Abbau der Peptide P1 und P2 nach 90 min durch die Extrakte der Getreideschädlinge *O. surinamensis*, *T. molitor* (Larve und Käfer), *T. castaneum*, *S. granarius*, *A. diaperinus* und *R. dominica*

3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Screening der Getreideschädlinge

Aus einer zusammenfassenden Betrachtung der Ergebnisse des Screenings (Tabelle 3.6) wurde deutlich, dass die Käfer *S. granarius* und *T. castaneum* für weitere Analysen ungeeignet waren. Zwar wurde in *T. castaneum* die dritthöchste PsP-Aktivität ermittelt, jedoch war die mittels Azocasein-Assay ermittelte Peptidaseaktivität (PA) verhältnismäßig gering. Beide Käfer waren zudem nicht in der Lage, die eingearbeiteten Proteine in den jeweiligen Zymogrammen zu hydrolysieren.

Tabelle 3.6: Übersicht über die während des Screenings der Getreideschädlinge ermittelten Ergebnisse. Angaben von PA in [AU mg⁻¹], PsP in [U mg⁻¹], spezifische Aktivität in [AU mg⁻¹Protein]

	Casein	Reis-protein	Gluten	BSA	PA	PsP	Spezif. Aktivität
<i>R. dominica</i>	+	+	+	+	61	1,2·10 ⁻³	1.906
<i>O. surinamensis</i>	+	+	+	+	134	4,4·10 ⁻⁴	5.360
<i>T. molitor</i> (Larve)	+	+	+	+	44	9,9·10 ⁻⁶	957
<i>T. molitor</i> (Käfer)	+	+	+	+	107	4,6·10 ⁻⁶	1.911
<i>S. granarius</i>	-	-	-	-	44	1,2·10 ⁻⁵	1.073
<i>A. diaperinus</i>	+	+	+	+	43	8,8·10 ⁻⁶	1.344
<i>T. castaneum</i>	-	-	-	-	11	3,2·10 ⁻⁴	61

+: Hydrolysebanden im Zymogramm, -: keine Hydrolysebanden im Zymogramm,

AU bzw. U mg⁻¹: Aktivität pro mg gemörserter Käfer

Die besten Ergebnisse lieferten die Extrakte der Käfer *R. dominica*, *O. surinamensis* und *T. molitor* (adulte Käfer). Alle Käfer zeigten eine sehr effiziente Hydrolyse der in den Zymogrammen eingearbeiteten Substrate und zeigten ebenfalls hohe Peptidaseaktivitäten. Herausragend war hierbei *R. dominica*, der die höchste PsP-Aktivität aufwies.

Im Vergleich zu den insektenassoziierten Pilzen zeigten die Getreideschädlinge bessere Ergebnisse. Es wurden intensivere Hydrolysebanden in den jeweiligen Zymogrammen sichtbar. Zusätzlich zeigten die Getreideschädlinge ähnliche Abbauraten der zöliakierelevanten Peptide. Im Vergleich zu den insektenassoziierten Pilzen war hier verstärkt der Abbau von P1 zu beobachten. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die weitere Arbeit mit Extrakten aus *R. dominica* und *O. surinamensis* fortgesetzt.

3.3 Inhibierungsversuche

Anhand von Inhibierungsversuchen wurden die in den Käferextrakten identifizierten Peptidasen hinsichtlich ihres reaktiven Zentrums genauer charakterisiert. Als Inhibitoren wurden EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) für die Hemmung von Metallo-Peptidasen, AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid) für die Hemmung von Serin-Peptidasen und E-64 (*N*-[*N*-(*L*-3-(*E*)-Carboxyiran-2-carbonyl)-*L*-leucyl]-agmatin) für die Hemmung von Cystein-Peptidasen eingesetzt. Es wurden verschiedene Konzentrationen jeweils in einer Doppelbestimmung (vgl. 2.9) getestet.

Ohne Einfluss eines Inhibitors wurde im Extrakt von *R. dominica* eine Peptidaseaktivität von 1.260 AU mL^{-1} ermittelt (Abb. 3.20). Die Zugabe von 2 mM EDTA ließ die Peptidaseaktivität auf 882 AU mL^{-1} sinken, nach Zugabe von 0,5 mM AEBSF fiel die Aktivität auf 557 AU mL^{-1} . Lediglich AEBSF zeigte bei Einsatz einer höheren Inhibitorkonzentration einen stärkeren Einfluss auf die Peptidaseaktivität. Die Inkubation des Extraktes von *R. dominica* mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors E-64 rief keine Absenkung der Peptidaseaktivität hervor.

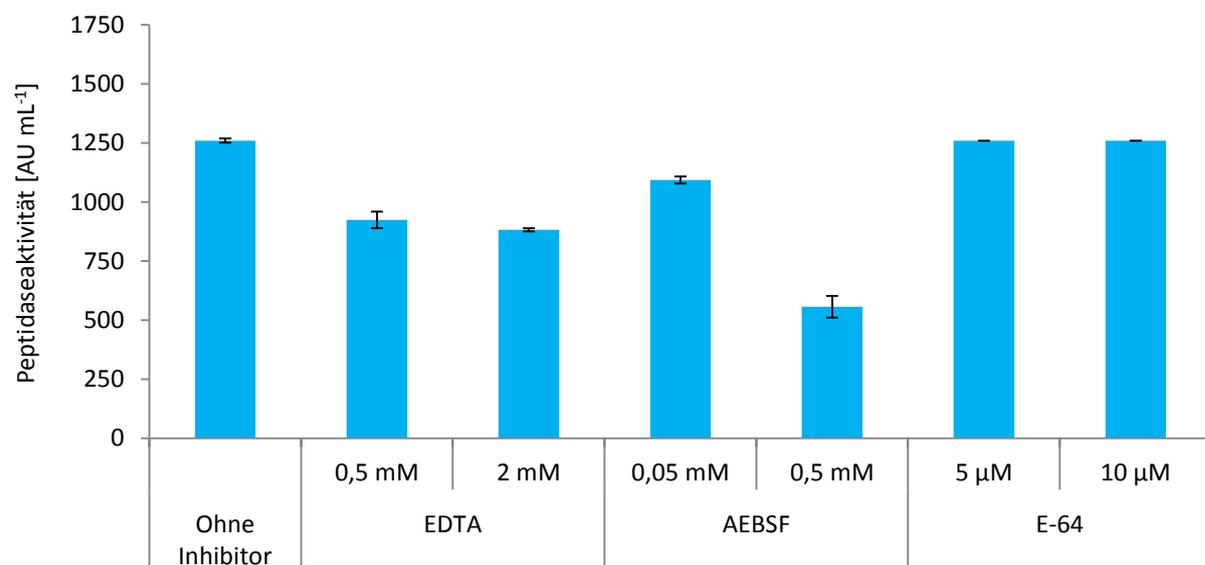


Abb. 3.20: Graphische Darstellung der Peptidaseaktivitäten der Extrakte von *R. dominica*. Vergleich der Aktivitäten ohne und mit den Inhibitoren EDTA, AEBSF und E-64

Ohne Inhibitor betrug die Peptidaseaktivität der Extrakte von *O. surinamensis* 1.790 AU mL^{-1} . Nach Inkubation mit 2 mM EDTA sank die Peptidaseaktivität auf 1.465 AU mL^{-1} , die Inkubation mit 0,5 mM AEBSF ließ die Aktivität auf 857 AU mL^{-1} absinken (Abb. 3.21).

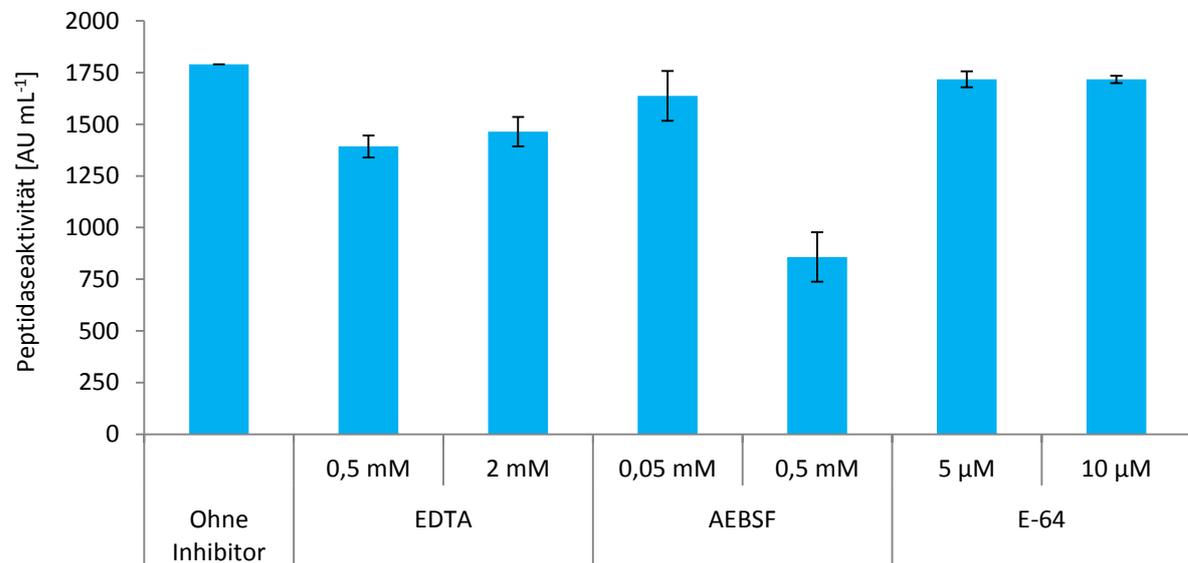


Abb. 3.21: Graphische Darstellung der Peptidaseaktivitäten der Extrakte von *O. surinamensis*. Vergleich der Aktivitäten ohne und mit den Inhibitoren EDTA, AEBSF und E-64

3.4 Lokalisierung der Peptidaseaktivität

Der Darm der Käfer (Abb. 3.22) wurde herauspräpariert und die Peptidaseaktivität der entdarmten Käfer mit der Peptidaseaktivität der kompletten Käfer verglichen. Die Messung der Peptidaseaktivität in den herauspräparierten Därmen direkt war aufgrund des zu geringen Probematerials nicht möglich. Neben der photometrischen Bestimmung der Peptidaseaktivität wurden die Extrakte der kompletten und entdarmten Käfer mittels Zymogrammen untersucht.

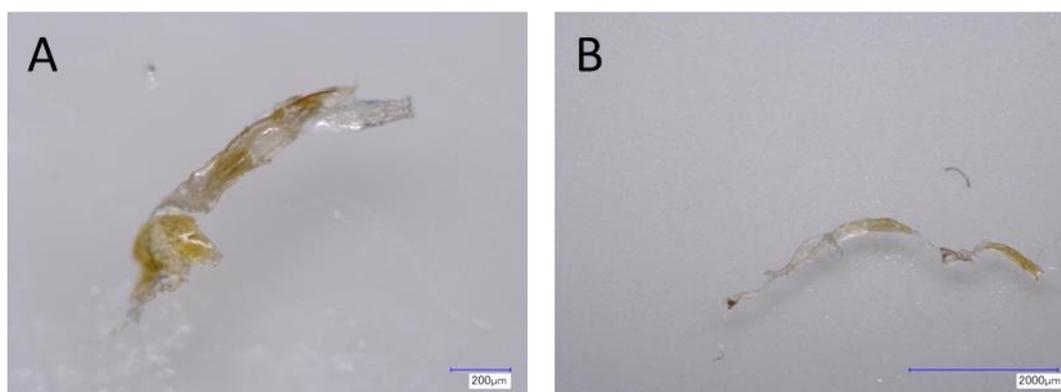


Abb. 3.22: Herauspräparierte Därme von *O. surinamensis* (A) und *R. dominica* (B)

Tabelle 3.7: Vergleich der Peptidaseaktivitäten in Extrakten entdarmter und kompletter Käfer von *R. dominica* und *O. surinamensis*

Insekt	Peptidaseaktivität [AU mg ⁻¹]	
	entdarmte Käfer	komplette Käfer
<i>R. dominica</i>	2	8
<i>O. surinamensis</i>	2	38

Alle aufgetragenen Proben bewirkten eine Hydrolyse in Zymogrammen (Abb. 3.23). In den Extrakten der kompletten Käfer waren allerdings größere Hydrolysezonen zu beobachten.

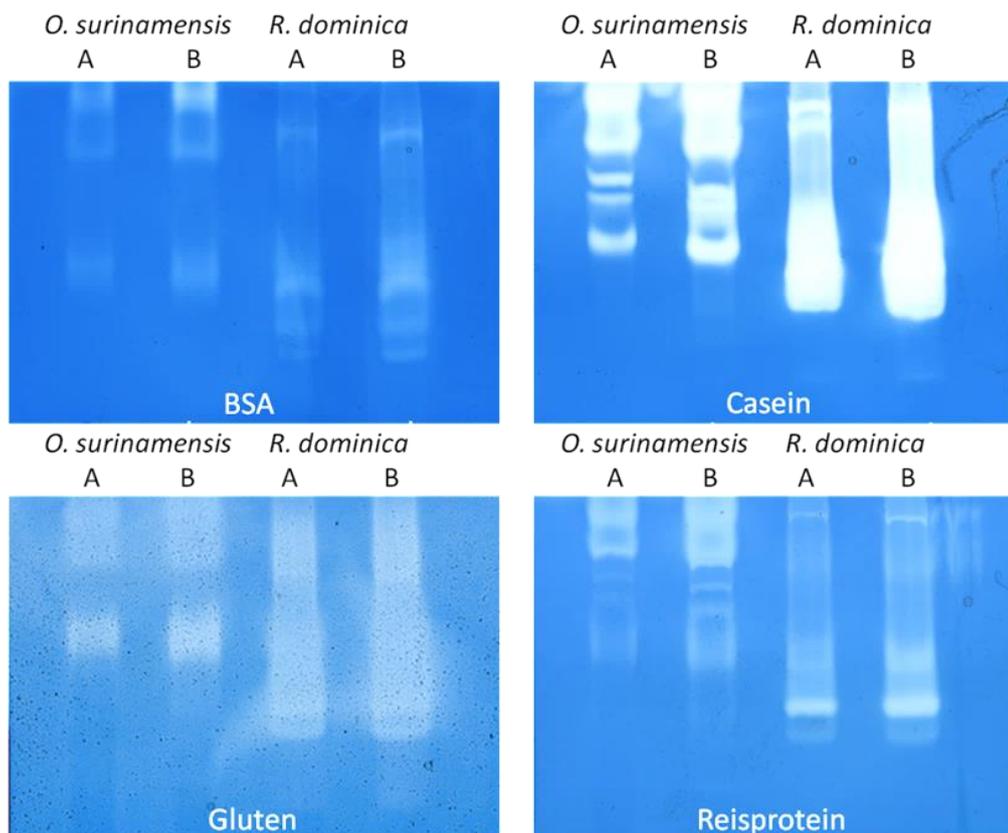


Abb. 3.23: Zymogramme mit Extrakten von entdarnten (A) und kompletten (B) Käfern von *O. surinamensis* und *R. dominica*

3.5 Enzymreinigung

3.5.1 Reinigung des Käferextraktes von *R. dominica*

Für die Isolierung der Peptidasen wurde der Extrakt von *R. dominica* mittels FPLC Ionenaustauschchromatographie (IEX) gereinigt. Nach einer Methodenoptimierung wurde der Käferextrakt von *R. dominica* (Peptidaseaktivität = 9.950 AU mL^{-1}) in einer 1:10-Verdünnung an einem schwachen Anionenaustauscher chromatographiert (vgl. 2.10 und Abb. 3.24). Die Fraktionen 4 bis 37 wurden auf Peptidaseaktivität und Prolyl-Spezifität getestet. Des Weiteren wurde der Abbau von P1 und P2 bestimmt und die proteolytische Aktivität anhand von Zymogrammen getestet.

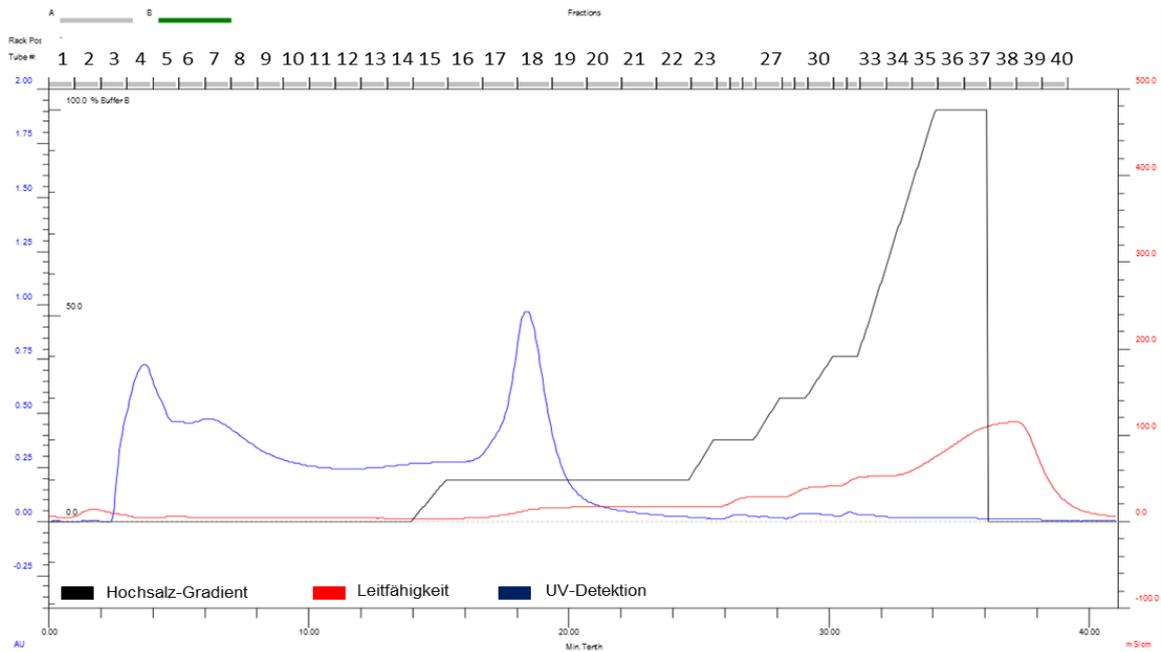


Abb. 3.24: FPLC-Chromatogramm des Extraktes von *R. dominica* mittels schwachem Anionenaustauscher

Von jeder der gesammelten Fraktionen wurden der Proteingehalt, die Peptidaseaktivität sowie die PsP-Aktivität bestimmt. Die Proteingehalte (Abb. 3.25) korrelierten mit der UV-Absorption. Das Maximum betrug $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Fraktion 19, das Minimum wurde mit $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Fraktion 37 nachgewiesen.

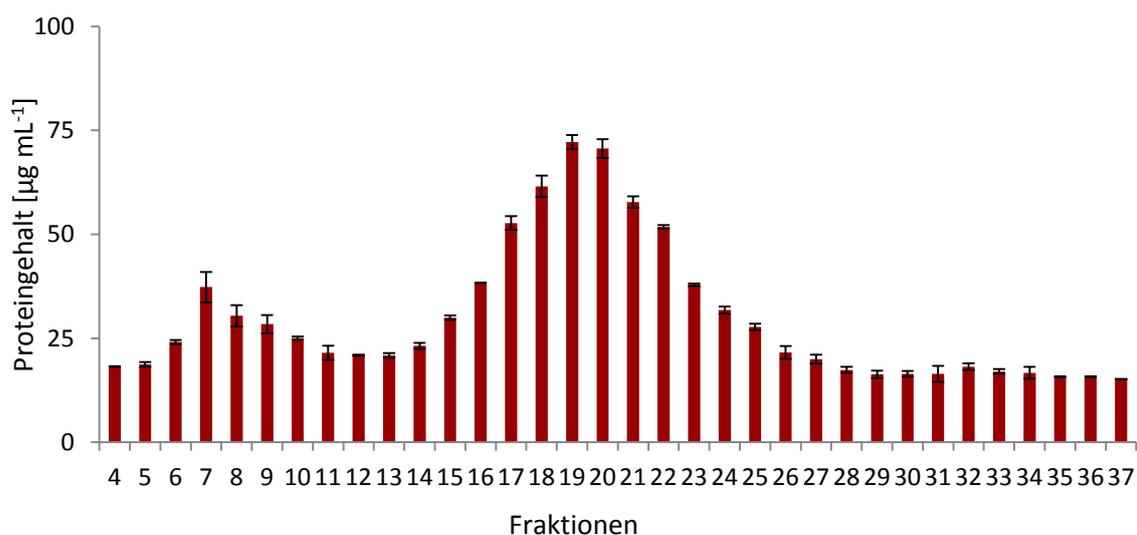


Abb. 3.25: Bestimmung des Proteingehaltes in den mittels FPLC gewonnenen Fraktionen

Die Messung der Peptidaseaktivität (Abb. 3.26) zeigte nur in wenigen Fraktionen Aktivität. Vor Beginn des Gradienten wurde in Fraktion 11 eine Peptidaseaktivität von 307 AU mL^{-1} nachgewiesen. Die maximale Peptidaseaktivität wurde im Bereich der größten UV-Detektion mit 754 AU mL^{-1} in Fraktion 18 gemessen. In den Fraktionen 25 – 35, welche lediglich kleine Peaks zeigten, wurden Aktivitäten von 30 bis 83 AU mL^{-1} nachgewiesen.

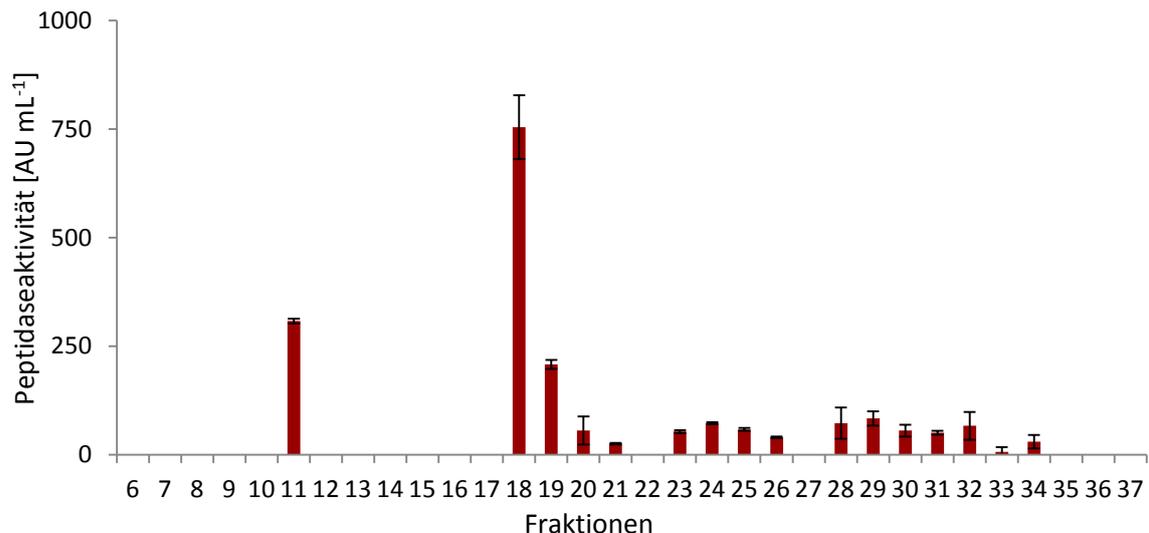


Abb. 3.26: Bestimmung der Peptidaseaktivität in den mittels FPLC gewonnenen Fraktionen

Bei der Bestimmung der PsP-Aktivität wurden lediglich sehr geringe Werte von maximal $0,3 \text{ U L}^{-1}$ ermittelt.

Für die weitere Reinigung des Käferextraktes *R. dominica* wurde die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) genutzt. Hierbei wurden die nach der Reinigung mittels IEX gewonnenen Fraktionen 17 und 18 vereinigt und auf die Säule geladen. Abweichend zur IEX wurde durch die eingesetzten Liganden Butyl, Phenyl und Octyl keine Reinigung des Extraktes von *R. dominica* erreicht. Bei allen drei Liganden eluierte die aufgetragenen Proteine bereits vor Beginn des Gradienten von der Säule. Ebenfalls kein Ergebnis lieferte die Reinigung über einen Kationentauscher.

3.5.1.1 Applikationstest der gereinigten Fraktionen von *R. dominica*

Die in dem FPLC-Lauf (Abb. 3.24) gesammelten Fraktionen wurden auf Gluten-Zymogramme aufgetragen. Die Auswertung der Zymogramme zeigte leichte proteolytische Aktivität in Fraktion 3 sowie in den Fraktionen 18 bis 19. Trotz der schwachen Peaks im FPLC-Chromatogramm zeigten auch die Fraktionen 25, 29 bis 32 sowie 34 und 35 in den Zymogrammen deutliche Hydrolysebanden. Nach Abgleich mit dem FPLC-Chromatogramm wurden die Fraktionen entsprechend der detektierten Peaks vereinigt und auf ein Gluten-Zymogramm aufgetragen. In dem Gel waren lediglich in Fraktion 25 sowie den gepoolten Fraktionen 29 + 30, 31 + 32 sowie 34 + 35 (nachstehend A, B, C und D benannt) klare Hydrolysebanden erkennbar (Abb. 3.27). Trotz der mit maximal 84 AU mL⁻¹ verhältnismäßig geringen Peptidaseaktivität lag der Fokus der weiteren Charakterisierung auf diesen Fraktionen.

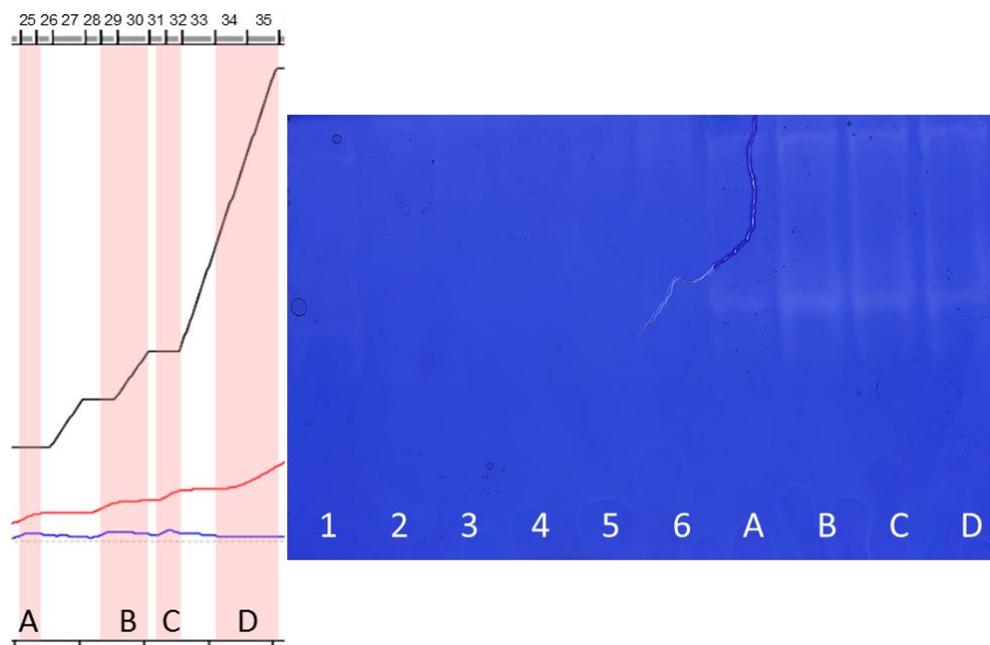


Abb. 3.27: links: Auszug FPLC-Chromatogramm (Abb. 3.24). rechts: Gluten-Zymogramm mit Fraktion 3 (1), 5 (2), gepoolten Fraktionen 7+8 (3), Fraktion 9 (4), Fraktion 17 (5), gepoolten Fraktionen 18 + 19 (6), Fraktion 25 (A), gepoolten Fraktionen 29+30 (B), gepoolten Fraktionen 31+32 (C) sowie gepoolten Fraktionen 34+35 (D)

Die weitere Charakterisierung der Proben A bis D erfolgte anhand des Peptidabbaus von P1 und P2. Die Fraktionen wurden hier unverdünnt eingesetzt. Der Abbau der Peptide P1 und P2 wurde nach 90 min nur durch die Fraktionen B und C erzeugt (Abb. 3.28). Während Fraktion B lediglich einen Abbau des Weizenpeptids P1 von 65,5% zeigte, war mit der Fraktion C sowohl ein Abbau von Peptid P1 mit 34,5% als auch der Abbau von P2 mit 7,5% nachweisbar. Die zugehörigen Chromatogramme sind Anhang 7.1, Abb. 7.1 – 7.8 zu entnehmen. Die inkubierten Proben der Fraktionen B und C wurden anschließend für die Identifizierung der entstandenen Peptidfragmente mittels LC-ESI-MS/MS sequenziert (vgl. 2.12).

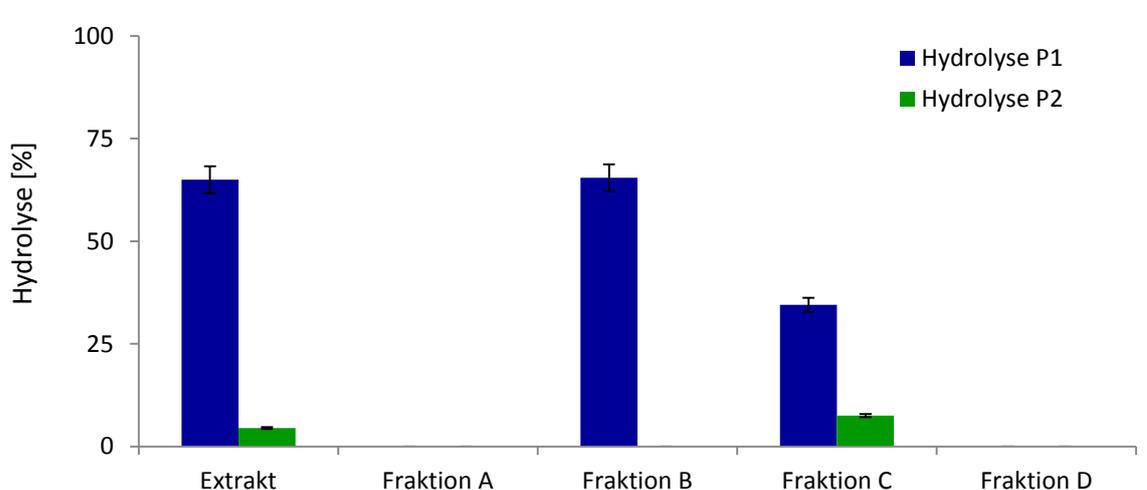


Abb. 3.28: Abbau der Peptide P1 und P2 nach 90 min durch Extrakt von *R. dominica* sowie durch die mittels FPLC gereinigten Fraktionen A – D

Die Überprüfung der Reinheit der aktiven Fraktionen B und C erfolgte anhand einer denaturierenden SDS-PAGE. Insgesamt wurden 4 Banden mit Molekulargewichten von 23,5 und 28,5 kDa detektiert und analysiert (Abb. 3.29). Die Banden 1 und 2 stammten aus der mittels FPLC gereinigten Fraktion B, die Banden 3 und 4 wurden in Fraktion C detektiert. Die Banden der Fraktionen B und C wurden aus einer denaturierenden SDS-PAGE ausgeschnitten und mittels LC-ESI-MS/MS ansequenziert (2.13).

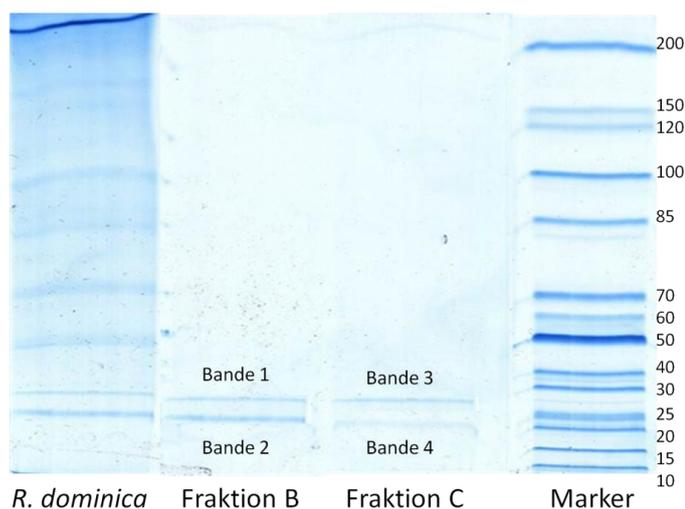


Abb. 3.29: Denaturierende SDS-PAGE mit den Fraktionen B und C. Als Vergleich wurde der Extrakt von *R. dominica* in einer 1:100-Verdünnung aufgetragen

Für eine Detektion des Glutenabbaus wurden die Fraktionen B und C sowie der Käferextrakt von *R. dominica* mit Glutenlösungen inkubiert (vgl. 2.14.1). Für die Probenaufarbeitung wurden die Glutenlösungen I ($3,7 \text{ mg mL}^{-1}$) und II ($2,4 \text{ mg mL}^{-1}$) jeweils mit den nach FPLC gereinigten Fraktionen B und C sowie mit nicht gereinigtem Extrakt von *R. dominica* (1:10 verdünnt) versetzt und für 30 bzw. 90 min bei 37°C inkubiert (Tabelle 3.8). Für Fraktion B wurde eine Peptidaseaktivität gegen Azocasein von $2,13 \text{ AU mL}^{-1}$ ermittelt, die Peptidaseaktivität von Fraktion C betrug $1,25 \text{ AU mL}^{-1}$. Der als Vergleich eingesetzte Extrakt von *R. dominica* besaß in seiner 1:10-Verdünnung eine Peptidaseaktivität von 1.020 AU mL^{-1} .

Tabelle 3.8: Inkubationsschema der Fraktionen B und C mit Glutenlösungen I und II

Nr.	Glutenlösung	FPLC-Fraktion	<i>R. dominica</i>	reinst H ₂ O	Inkubationszeit [min]
1	I (100 µL)	-	-	50 µL	-
2	I (100 µL)	-	-	50 µL	90
3	I (100 µL)	-	100 µL	-	90
4	I (100 µL)	50 µL Fraktion B	-	-	30
5	I (100 µL)	50 µL Fraktion B	-	-	90
6	I (100 µL)	50 µL Fraktion C	-	-	30
7	I (100 µL)	50 µL Fraktion C	-	-	90
8	-	50 µL Fraktion C	-	-	-
9	-	50 µL Fraktion B	-	-	-
10	II (100 µL)	-	-	50 µL	-
11	II (100 µL)	-	-	50 µL	90
12	II (100µL)	-	100 µL	-	90
13	II (100µL)	50 µL Fraktion B	-	-	30
14	II (100µL)	50 µL Fraktion B	-	-	90
15	II (100µL)	50 µL Fraktion C	-	-	30
16	II (100µL)	50 µL Fraktion C	-	-	90

Nach der Elektrophorese waren bei den Proben 3 und 12 keine Banden im Gel zu erkennen (Abb. 3.30). Hierbei handelte es sich um die Glutenlösungen A und B, welche mit dem kompletten Käferextrakt versetzt wurden und anschließend für 90 min bei 37 °C inkubiert wurden. In den Proben 8 und 9 waren ebenfalls keine Banden im Gel zu sehen. Hierbei handelte es sich um die reinen Fraktionen B und C. Der Versuch zeigte einen deutlichen Abbau beider Glutenlösungen durch den ungereinigten Käferextrakt von *R. dominica*. Nach Inkubation der Glutenlösungen mit den jeweiligen gereinigten FPLC-Fraktionen wurde zwar kein Abbau der Proteinbanden des Glutens erkennbar, es kam jedoch zu einer deutlichen Intensitätsabschwächung der detektierten Banden.

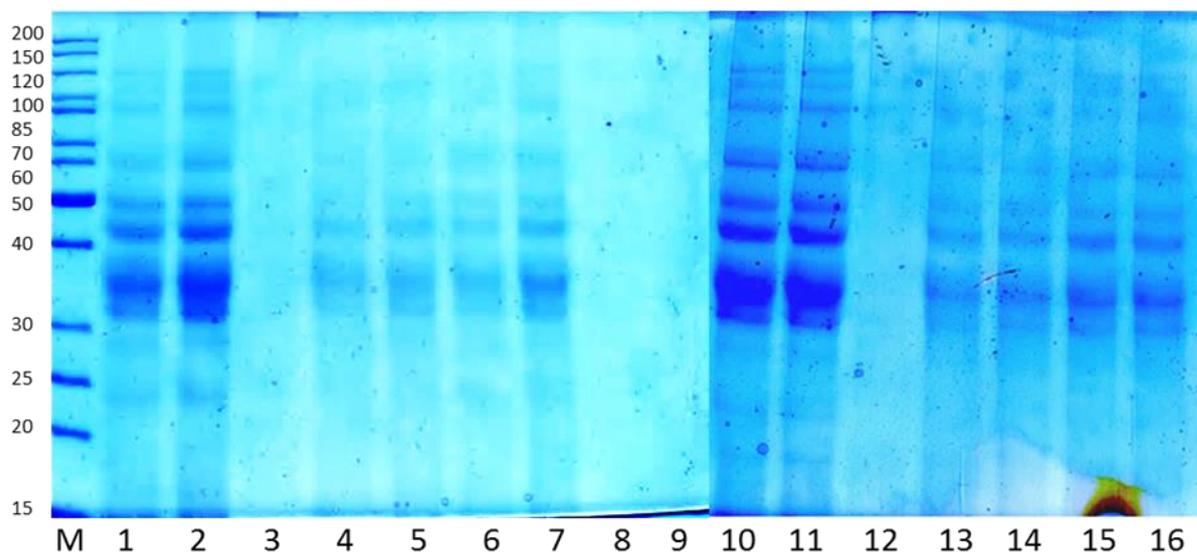


Abb. 3.30: Denaturierende SDS-PAGE der gereinigten IEX-Fractionen B und C nach Inkubation mit Glutenlösungen I (1-7) und II (10-16). Die aufgetragenen Proben der Positionen 1 bis 16 sind Tabelle 3.8 zu entnehmen

3.5.2 Reinigung des Käferextraktes von *O. surinamensis*

Die Isolierung der Peptidasen aus dem Käferextrakt von *O. surinamensis* erfolgte analog zu dem Schema bei *R. dominica*. Der Käferextrakt (Peptidaseaktivität = $19.700 \text{ AU mL}^{-1}$) wurde in einer 1:10-Verdünnung injiziert und unter den in 2.10 (Tabelle 2.32) beschriebenen Bedingungen eluiert (Abb. 3.31).

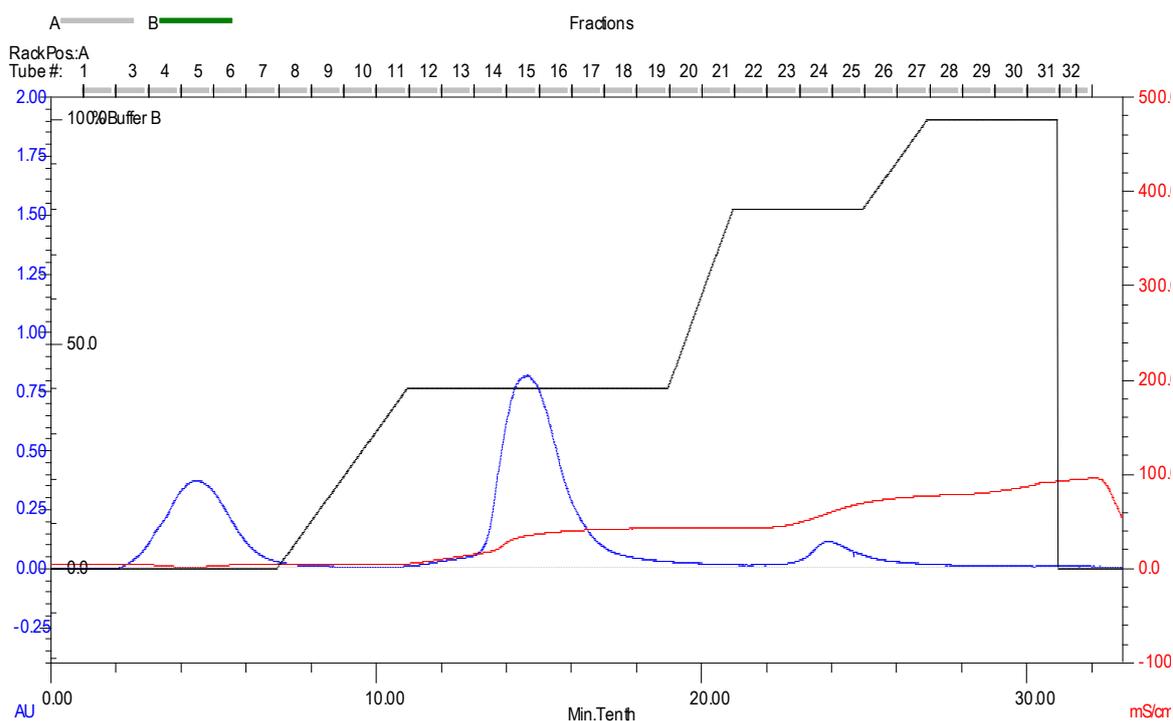


Abb. 3.31: FPLC-Chromatogramm des Extraktes von *O. surinamensis* mittels starkem Anionenaustauscher

Analog zu *R. dominica* wurden die während der Reinigung gesammelten Fraktionen hinsichtlich ihres Proteingehalts sowie ihrer Peptidase- und PsP-Aktivität getestet.

Der Proteingehalt der jeweiligen FPLC-Fraktionen (Abb. 3.32) korrelierte gut mit dem FPLC-Chromatogramm. Der höchste Proteingehalt wurde mit etwa $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ in den Fraktionen 4 und 14 gemessen. In den Fraktionen 22 bis 25 wurde ein Proteingehalt von $6,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ermittelt.

3.5.2.1 Applikationstest der gereinigten Fraktionen von *O. surinamensis*

Die gewonnenen Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer peptidolytischen Aktivität im Gel untersucht. Hierfür wurde ein Reisprotein-Zymogramm verwendet. Nahezu alle auf das Gel aufgetragenen Fraktionen zeigten peptidolytische Aktivität im Gel (Abb. 3.34). Die verschiedenen Hydrolysemuster der jeweiligen Fraktionen ließen auf eine Vielzahl verschiedener Peptidasen schließen.

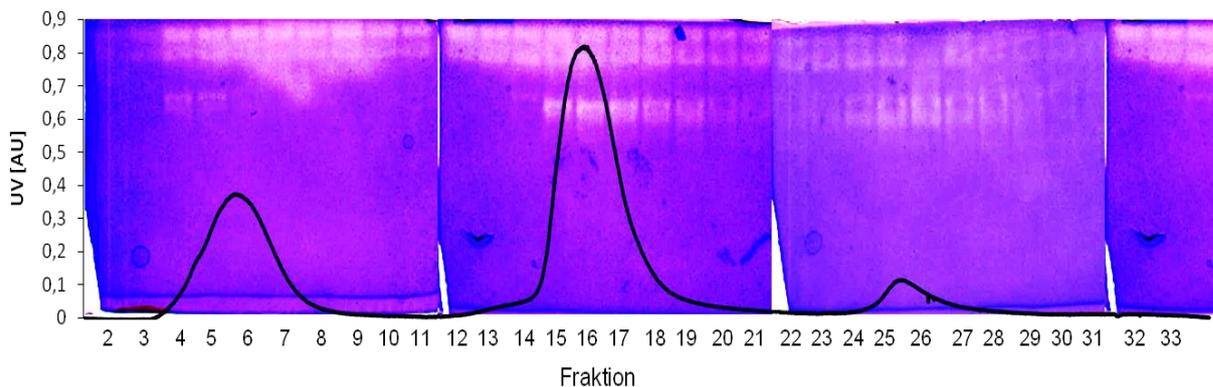


Abb. 3.34: Reisprotein-Zymogramm mit während der Reinigung von *O. surinamensis* gesammelten FPLC-Fractionen

Die Auswahl aussichtsreicher Fraktionen für weitere Applikationstests gestaltete sich im Fall von *O. surinamensis* deutlich schwieriger als bei *R. dominica*. Anhand des Reisprotein-Zymogramms ließ sich keine ausreichende Reinigung erkennen. Auf die Durchführung des Peptidabbaus und weitere gelelektrophoretische Untersuchungen zur Charakterisierung der jeweiligen Fraktionen wurde daher verzichtet.

3.6 Transkriptomanalyse

Ausgehend von den im Rahmen der Enzymreinigung gewonnenen Ergebnissen wurde für die molekulare Charakterisierung der Peptidasen eine Transkriptomanalyse des Käfers *R. dominica* durchgeführt. Alle Schritte der Transkriptomanalyse (RNA-Isolierung aus *R. dominica*, Transkription der mRNA in cDNA, 454-Sequenzierung der cDNA) wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte durch das Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME.

3.7 Sequenzierung

3.7.1 Peptidsequenzen nach Peptidhydrolyse

Die Peptide P1 und P2 wurden nach Inkubation mit den unter 3.6.2 aus *R. dominica* gereinigten Fraktionen B und C mittels LC-ESI-MS/MS sequenziert (2.13). Das durch die Fraktion B erzeugte Hydrolysemuster (Tabelle 3.9) zeigte für P1 eine stark präferierte Schnittstelle zwischen Glutamin (Q) und Prolin (P). Ebenso konnte je eine Spaltstelle nach Tyrosin (Y) und Leucin (L) ermittelt werden. Fraktion C lieferte ein vergleichbares Hydrolysemuster, es erfolgte jedoch keine Hydrolyse nach Tyrosin.

Für das Peptid P2, welches sehr glutaminreich ist, wurden generell weniger Peptidfragmente gefunden. Dies spiegelte sich auch in den geringeren Abbauraten (Abb. 3.28) wider. Fraktion B hydrolysierte P2 an vier verschiedenen Stellen, dreimal davon nach Prolin und einmal nach Glutamin. Fraktion C spaltete P2 jeweils zweimal nach Prolin und Glutamin und einmal nach Serin.

Tabelle 3.9: Hydrolysemuster der Peptide P1 und P2 durch die Fraktionen B und C

Fraktion B		Fraktion C	
Peptid 1	Peptid 2	Peptid 1	Peptid 2
P.QPQLPYPQPQLPY	SQ.QQFPQPQQPFPQQP	P.QPQLPYPQPQLPY	S.QQQFPQPQQPFPQQP
PQPQLPYPQPQLP.Y	SQQQFPQPQQPFP.QQP	PQPQLPYPQPQLP.Y	SQQQFPQPQQPFP.QQP
P.QPQLPYPQPQLP.Y	SQQQFP.QPQQPFPQQP	P.QPQLPYPQPQLP.Y	SQQQFP.QPQQPFPQQP
PQ.PQLPYPQPQLP.Y	SQQQFPQP.QQPFPQQP	PQ.PQLPYPQPQL.PY	SQQQ.FPQPQQPFPQQP
PQP.QLPYPQPQLPY		PQP.QLPYPQPQLPY	SQQQFPQPQQPFPQ.QP
PQP.QLPYPQPQLP.Y		PQP.QLPYPQPQLP.Y	
PQPQLP.YPQPQL.PY		PQPQL.PYPQPQLPY	
PQPQLPY.PQPQLPY		PQPQLP.YPQPQLPY	

3.7.2 Sequenzierung der Proteinbanden

Die Proteinbanden der mittels FPLC gereinigten Fraktionen B und C (vgl 3.6.1.1, Abb. 3.29) wurden ausgeschnitten und mittels LC-ESI-MS/MS analysiert. Anschließend wurden die ermittelten Daten mit der Transkriptomdatenbank von *R. dominica* und der NCBI-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen. Die besten Ergebnisse für die Suche in der NCBI-Datenbank sind unter Aufführung des Namens sowie des zugehörigen Organismus in Tabelle 3.10 aufgelistet.

In drei der vier Banden wurden Peptidsequenzen ermittelt, welche Homologien zu drei verschiedenen Peptidasen zeigten. In Bande 1 (aus Fraktion B) wurden Peptidsequenzen gefunden, welche Ähnlichkeiten zu drei verschiedenen Peptidasen enthielten. Die in den ausgeschnittenen Banden 2 (aus Fraktion B) und 4 (aus Fraktion C) sequenzierten Peptidfragmente hingegen zeigten nur Homologien zu einer Peptidase. In allen drei Banden wurden Homologien zu einer Serin-Endopeptidase (NP_001164207) identifiziert. Homologien zu einer weiteren Serin-Endopeptidase (EFA12269) sowie einer Carboxypeptidase (EEZ98226) waren lediglich in Bande 1 vorhanden.

Tabelle 3.10: Sequenzierung der ausgeschnittenen Banden 1 bis 4 der Fraktionen B und C (Abb. 3.29) mittels LC-ESI-MS/MS

Bande	Peptidsequenz	NCBI	MEROPS
1	NAVAVNGINEGYVK ASHNVDFYNVLK VGNLALYWVNR QFYEQNPEFK	Hypothetisches Protein, EEZ98226, <i>T. castaneum</i>	S10 Carboxy-Peptidase
	YVVTAAHCTDGSSTLLSIR AAYGQADVTDR	Serinprotease P76 precursor, NP_001164207, <i>T. castaneum</i>	S1A Chymotrypsin A, S1 Serin- Endopeptidase
	FTTSGGTFFCGGSLIDR	Serinprotease P167, EFA12269, <i>T. castaneum</i>	S1A Chymotrypsin A, S1 Serin- Endopeptidase
2	YVVTAAHCTDGSSTLLSIR AAYGQADVTDR	Serinprotease P76 precursor, NP_001164207, <i>T. castaneum</i>	S1A Chymotrypsin A, S1 Serin- Endopeptidase
3	-	-	-
4	YVVTAAHCTDGSSTLLSIR AAYGQADVTDR	Serinprotease P76 precursor, NP_001164207, <i>T. castaneum</i>	S1A Chymotrypsin A, S1 Serin- Endopeptidase

(-) keine Homologien zu Peptidasen

3.8 Charakterisierung der insektenassoziierten Peptidase RdoT3

3.8.1 Heterologe Expression der insektenassoziierten Peptidase

Nach Sequenzierung der Gelbanden der Fraktionen B und C (3.8.2) wurden über den Abgleich mit den Daten der Transkriptomanalyse (3.7) drei verschiedene Peptidasen ermittelt, wobei eine der Peptidasen in jeder sequenzierten Gelbande vorhanden war. Es handelte sich um eine Serin-Endopeptidase (RdoT3) mit folgender Sequenz:

```
MFKLVAILCLVASAIALPRKTKVPRLDGRIVGGEDAEIEDNYTVQLLYFGSHICGGSIISPKYVVTAHCTD
GSSTLLSIRAGSTLRNQGGTVVNVAAIHQNPFDWSYIDYDISILELAEELFSSSIGPISLPEVNQIVEAGT
NSTVTGWGTTTEGGSLPSILQVVQVPIVSLEECRAAYGQADVTDRMVCAGYTEGGKDACCQGDSSGGLV
VGDELIGIVSWGYGCCARPNYPGVYGSVPAMRDYVYNITGL
```

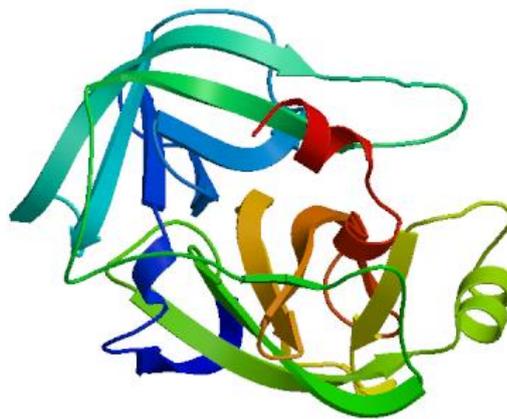


Abb. 3.35: Aminosäuresequenz und Strukturmodell der insektenassoziierten Serin-Endopeptidase NP_001164207 (RdoT3), ermittelt durch SWISS-MODEL *Homology Modeling Report*, kursiv in der Sequenz dargestellt ist das Pro-Peptid des Enzyms

Der Abgleich der Sequenz mit dem Chymotrypsin der Feuerameise *S. invicta* (Botos *et al.*, 2000) zeigte hohe Homologien bzgl. des N-Terminus. In Analogie zu o.g. Enzym sind die ersten 29 Aminosäuren (kursiv dargestellt) wie bei *S. invicta* wahrscheinlich ein Pro-Peptid, welches für die Aktivierung der Peptidase mittels FXa abgespalten werden muss (vgl. 2.15.5).

Das Enzym wurde heterolog in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.15). In Vorversuchen mit verschiedenen Temperaturbedingungen wurde ermittelt, dass die Expression für 4 h bei 28 °C am besten verlief (Abb. 3.36).

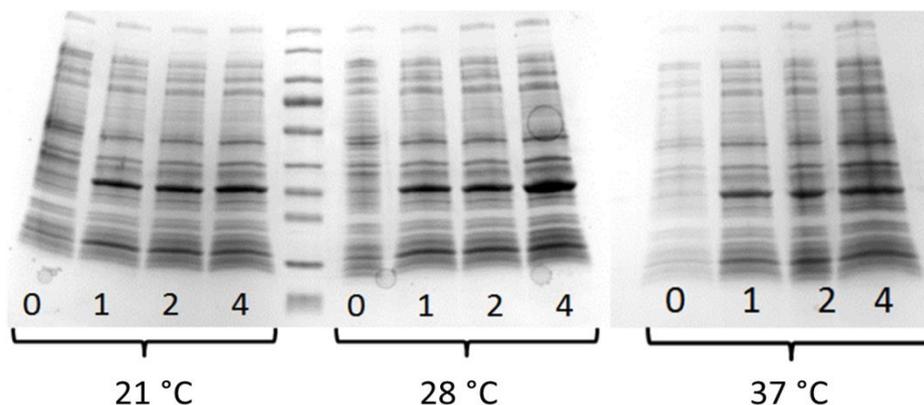


Abbildung 3.36: Denaturierende SDS-PAGE mit Proben zu Vorversuchen der heterologen Expression bei 21, 28 und 37 °C. 0 = Zellen vor der Induktion, 1 = Probenahme nach 1 h, 2 = Probenahme nach 2 h, 4 = Probenahme nach 4 h

Die bei der anschließenden Reinigung mittels FPLC gewonnenen Fraktionen wurden für die Überprüfung der erfolgreichen Expression mittels denaturierender SDS-PAGE (vgl. 2.7.2) sowie gemäß 2.7.4 anhand eines Western-Blots (Abb. 3.37) überprüft.

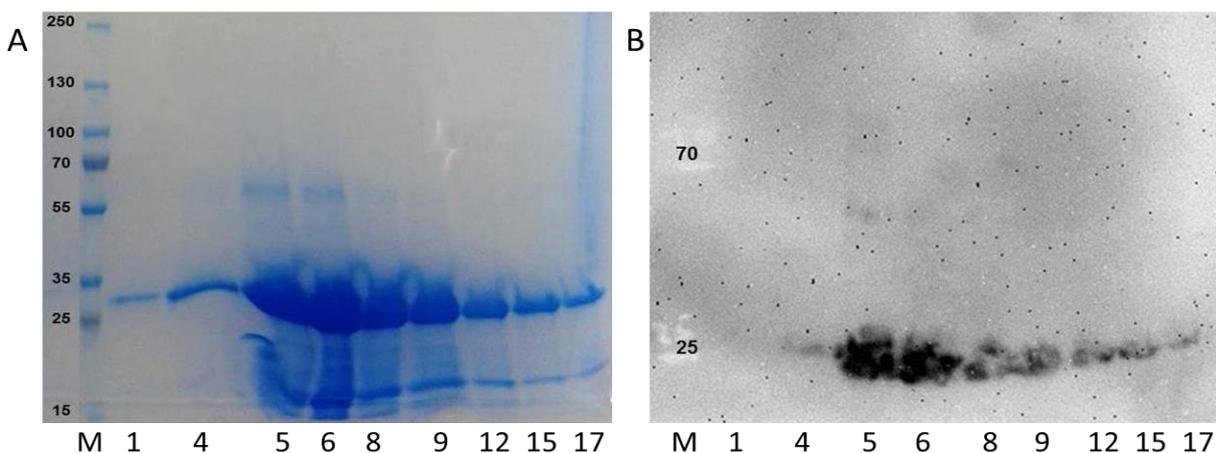


Abb. 3.37: Gelelektrophoretische Methoden zur Überprüfung der erfolgreichen Expression der insektenassoziierten Peptidase RdoT3 in *E. coli*. M = Marker, 1-17 = gesammelte Fraktionen nach der Reinigung mittels FPLC. A: denaturierende SDS-PAGE, B: Western-Blot

Die Proteinkonzentration nach der heterologen Expression wurde nach der anschließenden Rückfaltung mittels Bradford-Assay (vgl. 2.8.4) bestimmt. Nach eintägiger Dialyse im Dialysepuffer (vgl. 2.15.4) wurde eine Proteinkonzentration von $423 \mu\text{g mL}^{-1}$ gemessen. Nach Filtration über 10 kDa Membranfilter betrug die Proteinkonzentration der RdoT3-Proben $813 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.8.2 Isoelektrische Fokussierung der RdoT3

Der isoelektrische Punkt (pI) der RdoT3-Proben wurde mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF, vgl. 2.7.5) bestimmt. Als Probenmaterial wurde die heterolog exprimierte RdoT3 nach der Rückfaltung eingesetzt. In dem IEF-Gel wurden zwei klare Banden sichtbar, eine stark ausgeprägte Bande bei pI 5,9 sowie eine schwache Bande bei pI 4,7 (Abb. 3.38).

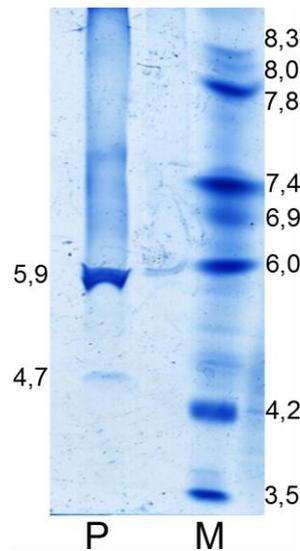


Abb. 3.38: Isoelektrische Fokussierung der RdoT3. P: RdoT3 nach Rückfaltung mittels 1-tägiger Dialyse, M: IEF-Marker mit pI 3,5 (Amyloglucosidase), pI 4,2 (Glucoseoxidase), pI 6,0 (Carboanhydrase), pI 6,9/ 7,4 (Myoglobin Pferd), pI 7,8/8,0/8,3 (Linsenlektin)

3.8.3 Aktivierung der RdoT3

Wie unter 3.9.1 beschrieben, handelte es sich bei den ersten 29 Aminosäuren der RdoT3 um ein Pro-Peptid, welche für die Aktivierung der Peptidase mittels FXa abgespalten werden musste (vgl. 2.15.5). Mittels denaturierender SDS-PAGE wurde das Ergebnis der Aktivierung visualisiert (Abb. 3.39). Die aufgetragene RdoT3-Probe zeigte eine deutliche Bande bei etwa 30 kDa, 2 weitere klare Banden wurden bei 23 und 18 kDa sichtbar. Bei den RdoT3-Proben nach Inkubation mit FXa sieht man einen deutlichen Abbau der 30 kDa-Bande, eine neue deutliche Bande bei 27 kDa wurde detektiert. Die Abspaltung des Pro-Peptids der RdoT3 verlief demnach erfolgreich.

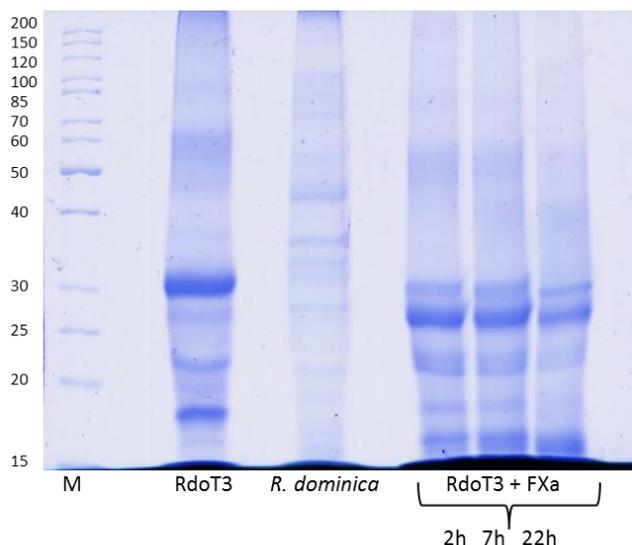


Abb. 3.39: Denaturierende SDS-PAGE. Aufgetragen wurden Marker, RdoT3 ohne FXa, 1:10 verdünnter Extrakt von *R. dominica* sowie RdoT3 nach 2, 7 und 22-stündiger Inkubation mit FXa

Die Überprüfung der erfolgreichen Abspaltung des Pro-Peptids der RdoT3 und somit der Aktivierung der Peptidase erfolgte anhand eines Gluten-Zymogramms (Abb. 3.40).

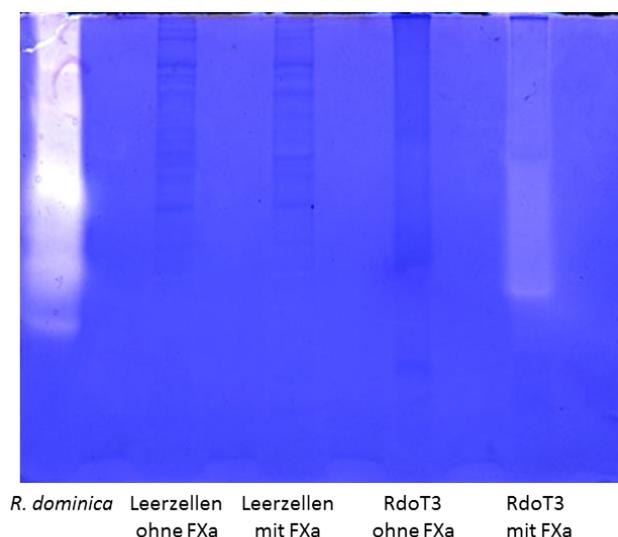


Abb. 3.40: Gluten-Zymogramm zur Überprüfung der Aktivierung der RdoT3. Aufgetragen wurde eine Positivkontrolle (*R. dominica*-Extrakt) sowie *E. coli* Leerzellen und RdoT3 mit und ohne Zugabe von FXa

Das Gluten-Zymogramm zeigte deutliche Hydrolysebanden bei der Positivkontrolle des *R. dominica*-Extrakts und ebenfalls eine deutliche Hydrolysebande bei der mit FXa aktivierten RdoT3. Die als Negativkontrolle eingesetzten *E. coli*-pUC 19 Leerzellen zeigten mit und ohne FXa-Zugabe keine Hydrolysebande, ebenso wie RdoT3 ohne FXa-Zugabe.

3.8.4 Peptidaseaktivität und -spezifität der RdoT3

Die Bestimmung der Peptidaseaktivität mittels Azocasein-Assay (vgl. 2.8.1) erfolgte mit den *E. coli*-Leierzellen sowie mit rekombinanter RdoT3, jeweils mit und ohne Zugabe von FXa. Der Assay lieferte keine aussagekräftigen Ergebnisse. Trotz vorheriger Konzentrierung der aktivierten RdoT3-Proben über 10 kDa Membranfilter wurden mittels Azocasein-Assay keine signifikanten Peptidaseaktivitäten ermittelt. Der Assay wurde hinsichtlich der Inkubationszeit, der Temperatur und des pH-Wertes modifiziert. Dennoch war keine Peptidaseaktivität in den RdoT3-Proben messbar. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der Bestimmung der Peptidasespezifität. Auch hier wurde keine Aktivität gegen die eingesetzten Substrate detektiert (vgl. 2.8.2 und 2.8.3).

3.8.5 Stabilität der RdoT3

Die weitere Charakterisierung zur Bestimmung eines Temperaturoptimums der RdoT3 erfolgte anhand gelelektrophoretischer Methoden. Die aktivierte RdoT3 (vgl. 2.15.5) wurde auf ein Gluten-Zymogramm (vgl. 2.7.3) geladen, welches während der Inkubation in 50 mM Natriumphosphatpuffer über Nacht bei verschiedenen Temperaturen gelagert wurde. Das Ergebnis (Abb. 3.41) zeigte nach der Inkubation bei 4 °C, 24 °C und 37 °C einen deutlichen Glutenabbau. Bei 37 °C ist der Abbau des Glutens durch RdoT3 am deutlichsten, es waren sogar 2 Hydrolysebanden zu erkennen. Das Zymogramm mit einer Inkubation bei 4 °C zeigte ebenfalls zwei Hydrolysebanden sowie einen stärkeren Abbau des Glutens als bei einer Inkubationstemperatur von 24 °C.

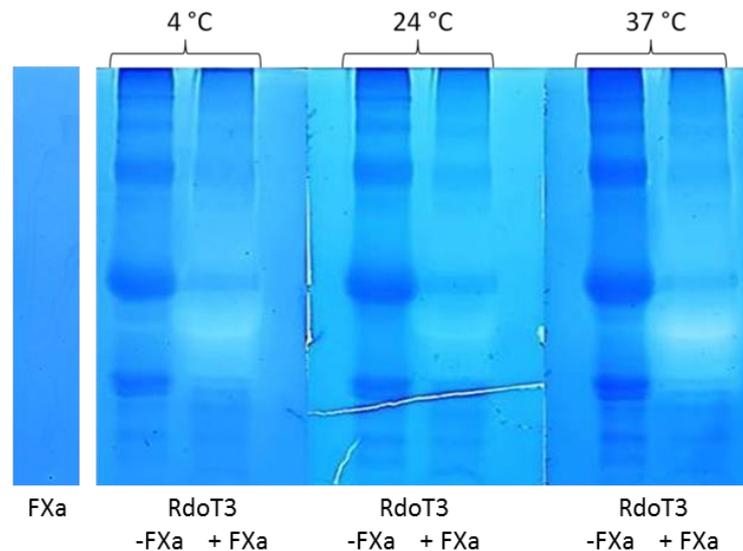


Abb. 3.41: Gluten-Zymogramm mit aktiver und inaktiver RdoT3 nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen sowie mit FXa als Kontrolle

Zur Überprüfung der thermischen Stabilität von RdoT3 wurden mit FXa aktivierte Proben für 0, 5, 15 und 30 min thermisch inaktiviert und auf ein Gluten-Zymogramm geladen. Als weitere Proben wurden nativer sowie abgekochter Extrakt von *R. dominica* aufgetragen (Abb. 3.42). Sowohl der thermisch inaktivierte Extrakt von *R. dominica* also auch die abgekochten RdoT3-Proben erzeugten deutliche Hydrolysebanden im Zymogramm. Während bei dem abgekochten Extrakt von *R. dominica* eine kräftige Hydrolysebande sichtbar wurde, zeigten sich bei den jeweiligen RdoT3-Proben zwei Hydrolysebanden. Die obere der beiden Banden lag dabei auf gleicher Höhe wie die durch den Käferextrakt erzeugte Hydrolysebande. Es wurde somit gezeigt, dass die RdoT3 auch nach 30-minütiger Hitzebehandlung bei 100 °C ihre Wirksamkeit behielt.

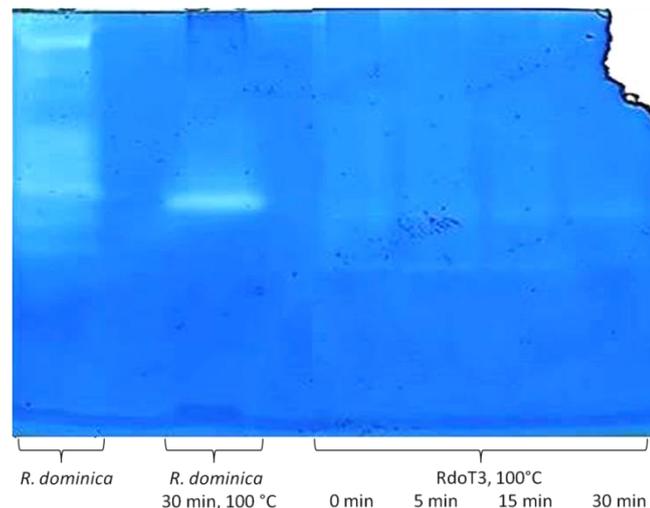


Abb. 3.42: Temperaturstabilität der RdoT3

Nachdem gezeigt wurde, dass die Peptidase RdoT3 trotz 30-minütiger Hitzebehandlung noch Aktivität im Gluten-Zymogramm zeigte, wurde der Serin-Peptidase-Inhibitor AEBSF eingesetzt. Durch Einsatz einer hohen Inhibitor-Konzentration sollte die vollständige Inaktivierung der RdoT3 erzielt werden. Die RdoT3-Proben (Tabelle 3.11) wurden zunächst mit FXa inkubiert, bevor sie mit der Inhibitorlösung in den jeweiligen Konzentrationen versetzt wurden. Ein Teil der Proben wurde zusätzlich einer 15-minütigen Hitzebehandlung unterzogen. Die Proben des Käferextraktes wurden mit den jeweiligen Inhibitorlösungen versetzt bzw. 15 min bei 100 °C abgekocht. Nach einstündiger Inkubation mit der Inhibitorlösung auf Eis wurden die Proben auf ein Gluten-Zymogramm geladen (Abb. 3.43).

Tabelle 3.11: Eingesetzte Proben für die Inhibierung mittels AEBSF

Position	Probe
1	RdoT3 + FXa, 15 min hitzebehandelt
2	RdoT3 + FXa + Inhibitor 1 mM
3	RdoT3 + FXa + Inhibitor 10 mM
4	RdoT3 + FXa, 15 min hitzebehandelt + Inhibitor 1 mM
5	RdoT3 + FXa, 15 min hitzebehandelt + Inhibitor 10 mM
6	<i>R. dominica</i> , 15 min hitzebehandelt
7	<i>R. dominica</i> + Inhibitor 1 mM
8	<i>R. dominica</i> + Inhibitor 10 mM
9	<i>R. dominica</i> , 15 min hitzebehandelt + Inhibitor 1 mM
10	<i>R. dominica</i> , 15 min hitzebehandelt + Inhibitor 10 mM

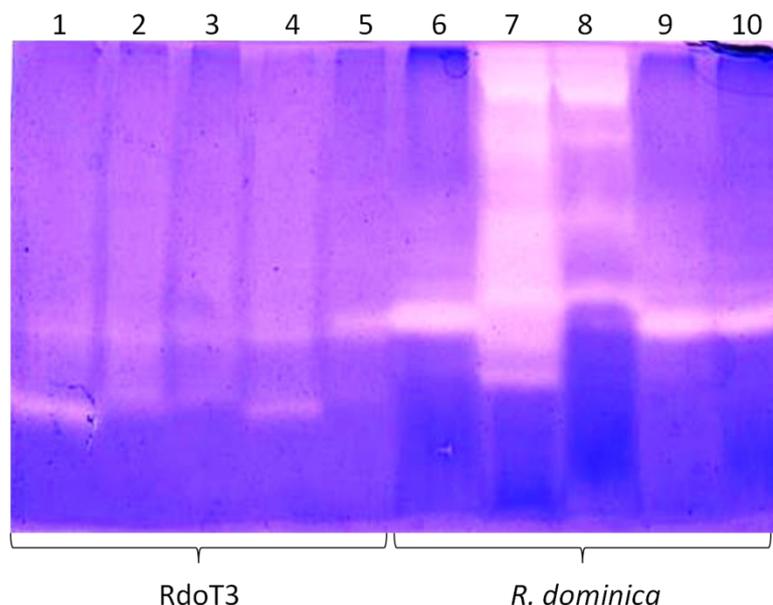


Abb. 3.43: RdoT3- und *R. dominica*-Proben zum Nachweis der Inhibierung der Serin-Peptidasen mittels AEBSF. Die Proben wurden entsprechend Tabelle 3.11 beladen

Bei der Auswertung der Inhibierungsversuche ließ sich keine vollständige Inaktivierung der RdoT3 erkennen, bei allen aufgetragenen Proben der RdoT3 wurden zwei Hydrolysebanden im Zymogramm detektiert. Die Inkubation mit 10 mM AEBSF zeigte eine Abschwächung der unteren Bande (Position 5). Der Vergleich der Positionen 2 und 4 ließ zudem darauf schließen, dass die untere Hydrolysebande durch die Hitzeinaktivierung induziert wurde. Auch der *R. dominica*-Extrakt zeigte keine vollständige Inaktivierung durch AEBSF und Hitzebehandlung. Effizienter als die Inkubation mit der Inhibitorlösung erwies sich hierbei die Hitzeinaktivierung.

3.8.6 Applikationstest RdoT3

3.8.6.1 Nachweis des Proteinabbaus mittels Gelelektrophorese

Mittels des gelelektrophoretischen Applikationstests wurde der Abbau von diversen Proteinen aus zwei verschiedenen Glutenproben (Carl Roth sowie Beneo), Casein und BSA in einer denaturierenden SDS-PAGE ermittelt. Die Proben (Tabelle 3.12) wurden gemäß 2.14.1 vorbereitet und anschließend gelelektrophoretisch getrennt. Bei den RdoT3-Proben

handelte es sich um zuvor mit FXa aktivierte Proben, die RdoT3-Blindwerte wurden zunächst für 30 min bei 100 °C deaktiviert und anschließend mit der jeweiligen Proteinlösung versetzt.

Tabelle 3.12: Eingesetzte Proben für den gelelektrophoretischen Nachweis zum Abbau von Proteinen

Position	Zusammensetzung
M	Marker
1	10 µL Gluten-Lösung (Carl Roth, 5 mg mL ⁻¹) + 10 µL reinst H ₂ O
2	10 µL Gluten-Lösung (Carl Roth, 5 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3-Blindwert
3	10 µL Gluten-Lösung (Carl Roth, 5 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3
4	10 µL Gluten-Lösung (Carl Roth, 12 mg mL ⁻¹) + 10 µL reinst H ₂ O
5	10 µL Gluten -Lösung (Carl Roth, 12 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3-Blindwert
6	10 µL Gluten -Lösung (Carl Roth, 12 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3
7	10 µL Gluten-Lösung (Beneo, 5 mg mL ⁻¹) + 10 µL reinst H ₂ O
8	10 µL Gluten-Lösung (Beneo, 5 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3-Blindwert
9	10 µL Gluten-Lösung (Beneo, 5 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3
10	10 µL Gluten-Lösung (Beneo, 12 mg mL ⁻¹) + 10 µL reinst H ₂ O
11	10 µL Gluten-Lösung (Beneo, 12 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3-Blindwert
12	10 µL Gluten-Lösung (Beneo, 12 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3
13	10 µL BSA-Lösung (5 mg mL ⁻¹) + 10 µL reinst H ₂ O
14	10 µL BSA-Lösung (5 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3-Blindwert
15	10 µL BSA-Lösung (5 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3
16	10 µL BSA-Lösung (12 mg mL ⁻¹) + 10 µL reinst H ₂ O
17	10 µL BSA-Lösung (12 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3-Blindwert
18	10 µL BSA-Lösung (12 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3
19	10 µL Casein-Lösung (5 mg mL ⁻¹) + 10 µL reinst H ₂ O
20	10 µL Casein-Lösung (5 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3-Blindwert
21	10 µL Casein-Lösung (5 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3
22	10 µL Casein-Lösung (12 mg mL ⁻¹) + 10 µL reinst H ₂ O
23	10 µL Casein-Lösung (12 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3-Blindwert
24	10 µL Casein-Lösung (12 mg mL ⁻¹) + 10 µL RdoT3

Nach der Gelelektrophorese ließ sich ein Abbau einer Proteinbande (118 kDa) im Gluten (Carl Roth) an Positionen 3 und 6 durch die mit FXa inkubierte RdoT3-Probe erkennen (Abb. 3.44 A). An den Positionen 2 und 5 zeigte sich, dass die mit FXa inkubierte und inaktivierte RdoT3 noch leichte Aktivität besaß, da die Banden bei ca. 118 kDa schwächer wurden. Bei 30 kDa wurde die Bande der RdoT3 detektiert. Das Gluten der Firma Beneo (Abb. 3.44 B) wurde hingegen nach Inkubation mit RdoT3 nicht abgebaut. In der denaturierenden SDS-PAGE mit den inkubierten BSA-Proben (Abb. 3.44 C, Positionen 15 und 18) sowie Casein-Proben (Abb. 3.44 D, Positionen 21 und 24) ließ sich ein deutlicher Abbau einer Proteinbande bei 40 kDa feststellen. Des Weiteren wurde eine Proteinbande bei 55 kDa deutlich durch die mit FXa aktivierte RdoT3 abgeschwächt.

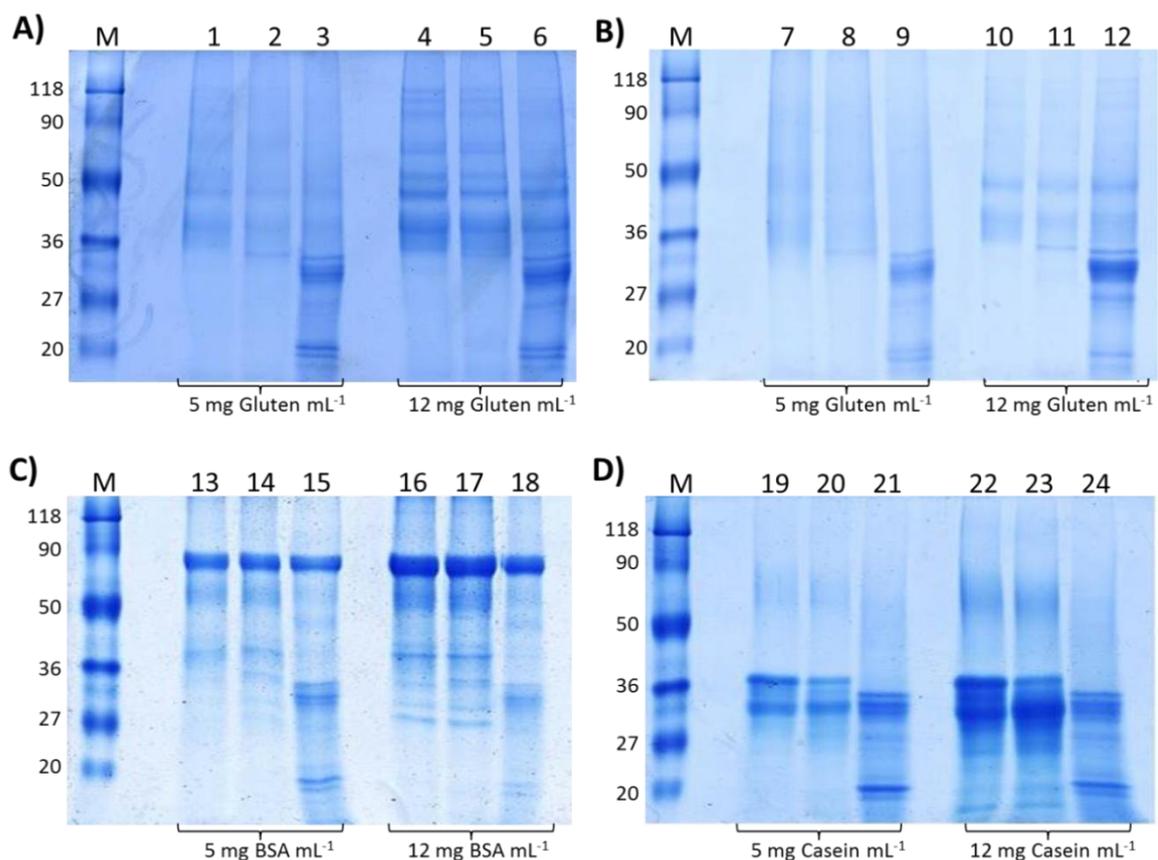


Abb. 3.44: SDS-PAGE-Analyse verschiedener Proben (Tabelle 3.12) zum Nachweis des Proteinabbaus. Als Proteine eingesetzt wurden A: Gluten der Firma Carl Roth, B: Gluten der Firma Beneo, C: BSA, D: Casein

3.8.6.2 Peptidabbau mittels RdoT3

Ein weiterer Applikationstest erfolgte durch den Abbau der zöliakierelevanten Peptide P1 und P2. RdoT3 wurde mittels FXa aktiviert (2.15.5) und anschließend für den Peptidabbau eingesetzt (2.11).

Zunächst wurde der Peptidabbau von P1 nach 0, 30, 60, 120 und 180 min gemessen (Abb. 3.45). Ab einer Inkubationszeit von 30 min wurden im HPLC-UV-Chromatogramm Peaks nach ca. 8,4 min, 9,4 min und 11,0 min, 13,6 min und 14,2 min detektiert, welche jeweils bei einer längeren Inkubationszeit größer wurden. Der interne Standard Saccharin eluierte nach 10,4 min, der Peak des Weizenpeptids P1 nach 14,8 min.

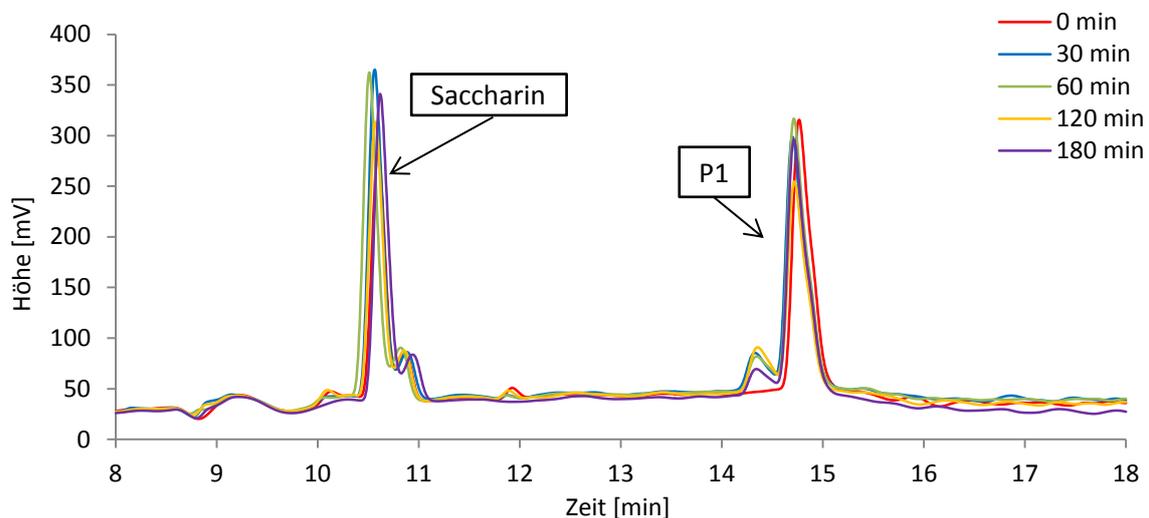


Abb. 3.45: Abbau von P1 nach Inkubation mit RdoT3 für 0, 30, 60, 120 und 180 min

Zur weiteren Untersuchung wurde der Peptidabbau außerdem mit den Inkubationszeiten 6, 16 und 24 h durchgeführt (Abb. 3.46). Hierbei wurde in den jeweiligen Proben ein deutlicher Peakshift beobachtet. Im Vergleich zu Abb. 3.45 wurde deutlich, dass eine längere Inkubationszeit zu mehr Abbauprodukten von P1 oder auch der RdoT3 selbst führte. Bereits nach 6 h wurden wesentlich mehr Peaks sichtbar, als nach 180 min.

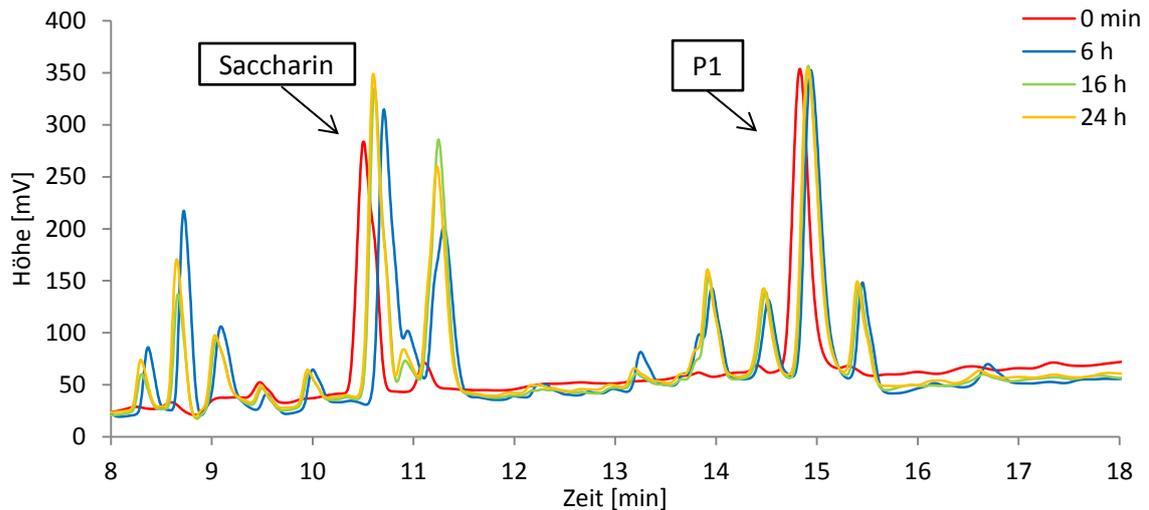


Abb. 3.46: Abbau von P1 nach Inkubation mit RdoT3 für 0 min sowie 6, 16 und 24 h

Der Peptidabbau wurde ebenfalls mit dem Gerstenpeptid P2 durchgeführt. Wie bereits im Fall von P1 wurde der Peptidabbau von P2 zunächst nach 0, 30, 60, 120 und 180 min gemessen (Abb. 3.47). Der interne Standard Saccharin eluierte nach 10,4 min, das Gerstenpeptid P2 nach 13,0 min. Bei beiden Peaks wurde mit steigender Inkubationszeit keine Abnahme sichtbar.

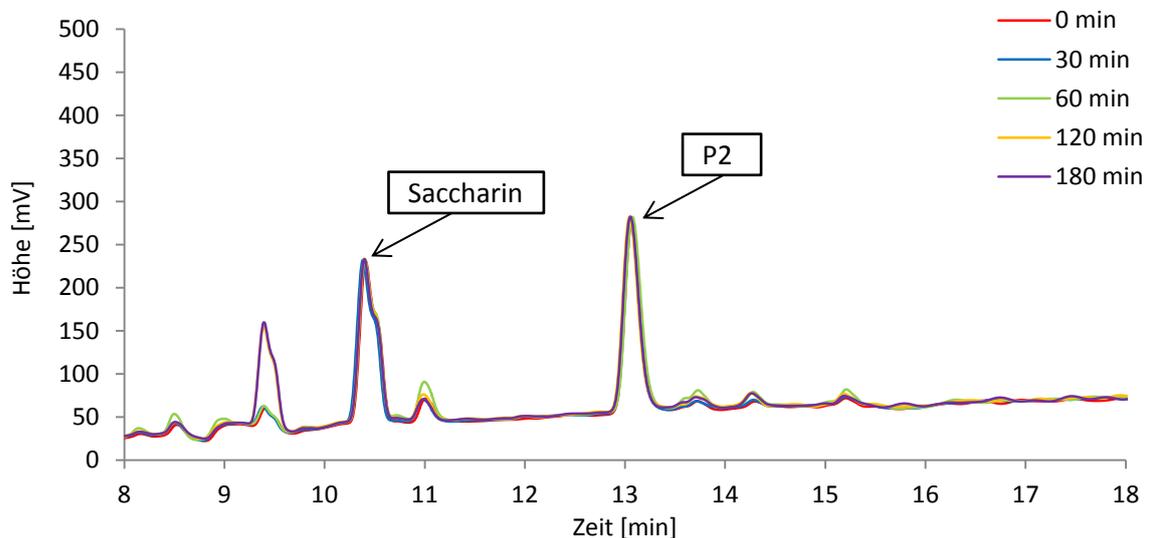


Abb. 3.47: Abbau von P2 nach Inkubation mit RdoT3 für 0, 30, 60, 120 und 180 min

Analog zu P1 wurde auch P2 im weiteren Verlauf für eine längere Zeit mit RdoT3 inkubiert (Abb. 3.48). Im Vergleich zu Abb. 3.47 wurde erneut deutlich, dass eine längere Inkubationszeit zu mehr Abbauprodukten von P2 oder der RdoT3 führte. Bereits nach 6 h

wurde eine Vielzahl an Peaks im gesamten HPLC-UV-Chromatogramm detektiert. Dabei eluierten die neu entstandenen Peaks vor und nach dem Gerstenpeptid P2.

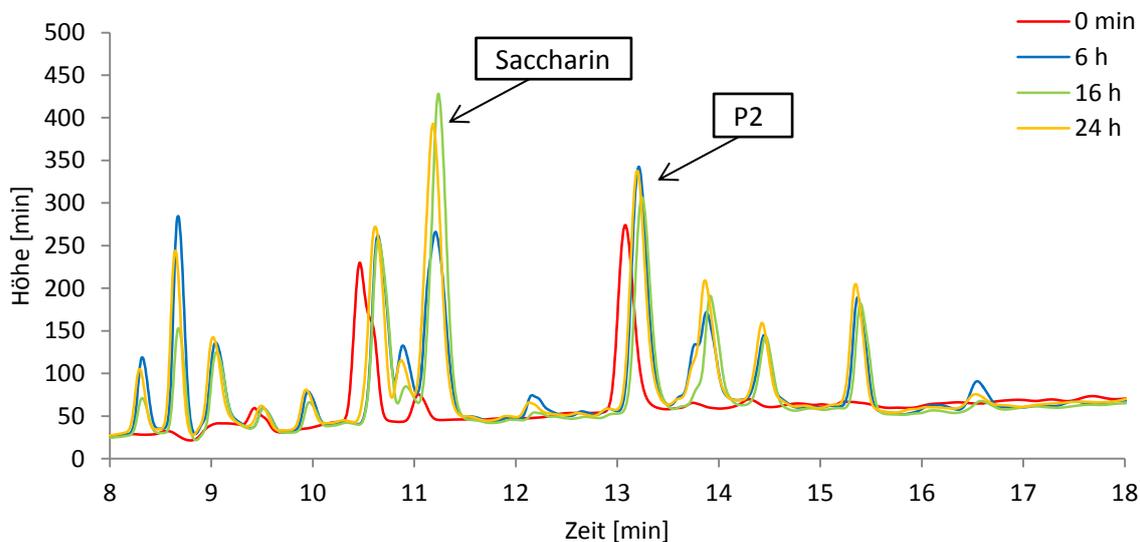


Abb. 3.48: Abbau von P2 nach Inkubation mit RdoT3 für 0 min sowie 6, 16 und 24 h

Die nach der Hydrolyse von P1 und P2 mittels RdoT3 entstandenen Peptid-Fragmente wurden anschließend mittels LC-ESI-MS/MS sequenziert (vgl. 2.13). Exemplarisch sind die Spektren nach 24-stündiger Inkubation der jeweiligen Peptide mit RdoT3 dargestellt (Abb. 3.49 A - B). Neben den Peptiden P1 (m/z 1665,9) und P2 (m/z 1909,9) wurden in den Spektren verschiedene Abbauprodukte nachgewiesen.

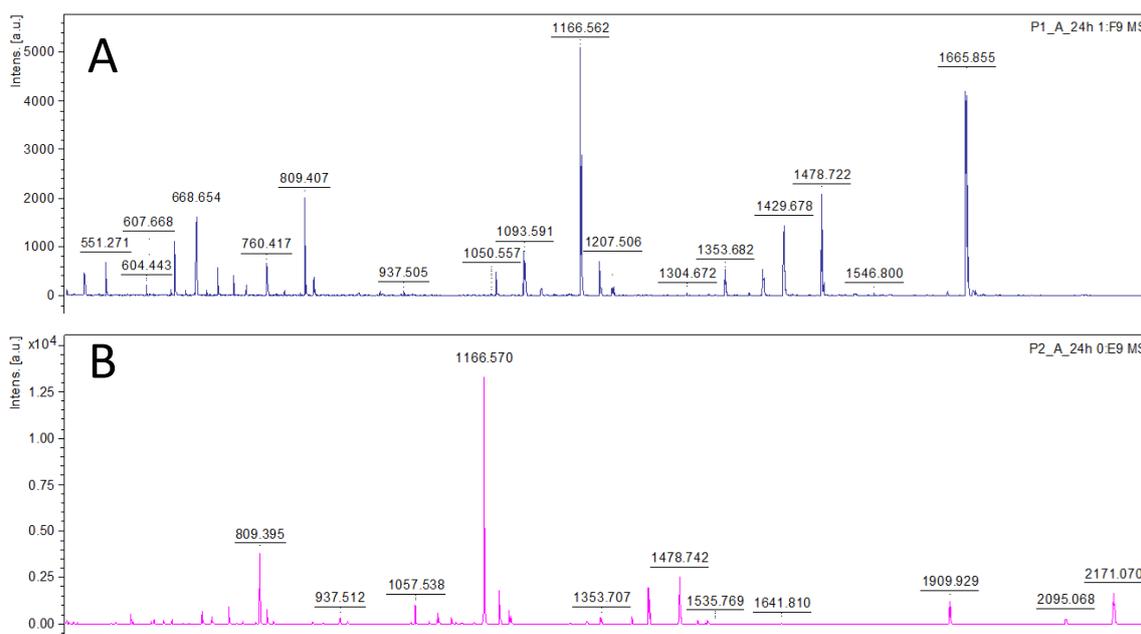


Abb. 3.49: LC-ESI-MS/MS-Spektren nach 24-stündiger Inkubation der RdoT3 mit P1 (A) und P2 (B)

Für den Ausschluss eines verunreinigten Peptidstandards bzw. einer direkten Reaktion der Protease FXa mit den jeweiligen Peptiden wurden Blindwerte angefertigt (Abb. 3.50 A - B). Sowohl P1 ($m/z = 1665,9$) als auch P2 ($m/z = 1909,9$) zeigten nach 120 bzw. 30 min ein sehr sauberes Spektrum (Abb. 3.45 und 3.47). Es konnte somit gezeigt werden, dass die entstandenen Abbauprodukte durch den Einsatz der RdoT3 hervorgerufen wurden.



Abb. 3.50: LC-ESI-MS/MS-Spektren von P1 (A) und P2 (B), jeweils nach Zugabe von FXa

Bei Betrachtung des dabei entstandenen Hydrolysemusters (Tabelle 3.13) ließ sich keine eindeutig präferierte Spaltposition der RdoT3 ermitteln. Im Fall von P1 wurden Hydrolysestellen nach Prolin (P), Glutamin (Q) und Leucin (L) ermittelt. Bei P2 lagen die Spaltpositionen nach Glutamin (Q), Phenylalanin (F) und Prolin (P).

Tabelle 3.13: Hydrolysemuster der Peptide P1 und P2 durch RdoT3

Peptid 1	Peptid 2
P. QPQLPYPQPQLPY	SQ. QQFPQPQQPFPQQP
PQ. PQLPYPQPQLPY	SQQQ. FPQPQQPFPQQP
PQPQL. PYPQPQLPY	SQQQF. PQPQQPFPQQP
PQPQLPYPQPQLPY	SQQQFP. QPQQPFPQQP
	SQQQFPQPQQPFP. QQP
	SQQQFPQPQQPFPQ. QP
	SQQQFPQPQQPFPQQP

4 Diskussion

Insekten bilden mit bislang mehr als einer Million beschriebenen Arten die artenreichste Klasse im Reich der Tiere. Der Bereich der Insektenbiotechnologie umfasst aufgrund dieser hohen Biodiversität viele verschiedene Forschungsgebiete. Mehr als 200.000 Insektenarten sind Pflanzenschädlinge, welche ihren Stoffwechsel daran angepasst haben, pflanzliche Schutzvorkehrungen zu überwinden. Ein großer Teil der Forschungsbereiche befasst sich demnach mit der Suche nach Pflanzentoxinen, welche gegen die Schädlinge wirksam sind oder aber mit verschiedenen Mechanismen der Insekten diese Toxine unschädlich zu machen (Kumar *et al.* 2012; Mehrabadi *et al.* 2011). Neben dem Schutz der Nutzpflanzen werden jedoch auch verschiedene enzymatische Systeme der Insekten adaptiert und für eine Vielzahl medizinischer Anwendungen, wie z.B. einer besseren Wundheilung oder einer Wirkung gegen Thrombose, eingesetzt (Buszewska-Forajta *et al.* 2014; Wang *et al.* 2012). Die insektenassoziierten Enzyme können ebenfalls in diversen technologischen Prozessen eingesetzt werden. Für die Lebensmittelbiotechnologie stehen hierbei neben der Suche nach neuartigen Peptidasen auch andere Enzyme, wie Amylasen oder Lipasen, im Fokus. Amylasen werden für den Abbau von Stärke in Bierwürze, die Herstellung diverser Backwaren oder die Produktion von Glucose oder anderer Zuckerspezialitäten eingesetzt. In der Regel wurden die hierbei eingesetzten Amylasen aus Schimmelpilzen oder Bakterien gewonnen; inzwischen wurden jedoch auch insektenassoziierte Amylasen für mögliche technologische Applikationen identifiziert. Mehrabadi *et al.* (2011) charakterisierten beispielsweise α -Amylasen aus Getreideschädlingen wie *S. granarius* und *R. dominica*. Weitere Studien haben zusätzlich das Potential der Gewinnung von Lipasen, z.B. aus *Rhodinus prolixus* (Grillo *et al.* 2007), oder Pektinasen, z.B. aus *Sitophilus oryzae* (Shen *et al.* 2005), aus Insekten aufgezeigt. Bei der Suche nach neuen enzymatischen Systemen liegen neben den Insekten selbst auch oftmals insektenassoziierte Symbionten, wie Pilze oder Bakterien, im Fokus. Neben dem Abbau von verschiedenen Proteinen oder Lipiden steht hierbei ebenfalls der Abbau von ligninreichen Verbindungen im Vordergrund. So ließen sich beispielsweise aus dem aus den Larven des asiatischen Laubholzbockkäfers *A. glabripennis* isolierten Ascomyceten *Fusarium solani* verschiedene Esterasen, Pektinasen sowie mehrere Glycosidasen nachweisen, welche in der Lage sind, Lignocellulose sowie Polysaccharide aus der Zellwand abzubauen (Scully *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl

insektenassoziierte Pilze als auch Insekten selbst eingesetzt und deren Fähigkeit zum enzymatischen Abbau von Getreideproteinen überprüft.

4.1 Vergleich der insektenassoziierten Pilze und Getreideschädlinge

4.1.1 Peptidaseaktivität der insektenassoziierten Pilze

Die Ausbildung verschiedener enzymatischer Systeme wird oftmals nicht durch die Insekten selbst, sondern auch durch symbiontische Mikroorganismen wie Pilze oder Bakterien, bewerkstelligt. Diese Mikroorganismen dienen den Wirten beispielsweise als Verdauungshelfer oder Futter selbst (Currie *et al.* 2001). Im Rahmen der Arbeit wurden daher neben den Insekten auch insektenassoziierte Pilze auf ihre Enzymaktivität überprüft. Von den insgesamt 7 getesteten insektenassoziierten Pilzen zeigten unter den getesteten Bedingungen nur 3 Pilze signifikante Peptidaseaktivität. Bei den Stämmen handelte es sich um die der Holzwespe *U. gigas* assoziierten Basidiomyceten *A. areolatum*, *A. chailletii* (Hajek *et al.* 2013) und *S. sanguinolentum* (Kleist 2001). Ein Vorteil bei der Kultivierung von Pilzen liegt bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch Einhaltung eines gleichen Protokolls. Zudem besteht die Möglichkeit, die Peptidaseaktivität durch eine Nährmedienoptimierung, beispielsweise durch Zugabe von Gluten, zu steigern.

Das schlechte Wachstum von *A. areolatum* (vgl. 3.1.1) spiegelte sich in einer geringen Peptidaseaktivität wider. Mit einer maximalen Peptidaseaktivität von 1.840 AU mL^{-1} wurde in *A. areolatum* von allen drei Stämmen die niedrigste Peptidaseaktivität gemessen. Ebenfalls auffällig im Verlauf der Kulturführung von *A. areolatum* war die stark sinkende Proteinkonzentration im PDE-Medium ab dem 9. Kulturtag. Als mögliche Begründung kann hier die intrazelluläre Speicherung der Proteine oder der komplette Abbau der im Medium enthaltenen Proteine durch die vorhandenen Peptidasen vermutet werden. *S. sanguinolentum* zeigte das schwächste Wachstum auf den Agarplatten, in Submerskultur hingegen wurde die höchste Peptidaseaktivität aller während der Arbeit getesteten Pilze zu Beginn der Kultivierung an Kulturtag 2 mit 8.650 AU mL^{-1} im MPE-Medium erreicht. Die in den insektenassoziierten Pilzen ermittelten Peptidaseaktivitäten könnten durch eine

Medienoptimierung weiter beeinflusst werden. Bouws *et al.* (2008) kultivierten beispielsweise den Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* in Submerskulturen ($0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4$, $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 2 g L^{-1} Hefeextrakt, 1 mL Spurenelementlösung). Zusätzlich wurde zur Steigerung der Biomasse sowie der Enzymsekretion ein fein gemahlenes lignocellulosehaltiges Substrat hinzugefügt. Als Resultat wurde an Kulturtag 6 eine Peptidaseaktivität von rund 360 AU mL^{-1} erreicht.

Die Zugabe von 2 g Pappelholz zu den jeweiligen Nährmedien führte bei *A. chailletii* zu einer leichten Steigerung der Peptidaseaktivität. An Kulturtag 8 wurde so im MM-Medium eine Peptidaseaktivität von 900 AU mL^{-1} gemessen. Ohne Pappelzusatz war in diesem Zeitraum keine Peptidaseaktivität detektierbar. Der Zusatz weiterer Induktoren, z.B. von Gluten, könnte zu einer weiteren Steigerung der Peptidaseaktivität führen. Grimrath *et al.* (2011) untersuchten 28 Basidiomyceten, die auf 16 verschiedenen Substraten kultiviert wurden, auf ihre extrazellulären Peptidasen. Getestet wurden die Pilze unter anderem in einem MM-Medium und mit Glutenpellets als einziger Kohlen- und Stickstoff-Quelle. Fast alle Pilze waren in der Lage, das Gluten zu metabolisieren. Der Pilz *Flammulina velutipes* erreichte dabei sogar eine maximale Peptidaseaktivität von $16.188 \text{ AU mL}^{-1}$ an Kulturtag 10. *Trametes* ssp. erreichte eine Aktivität von $10.153 \text{ AU mL}^{-1}$, gefolgt von den Stämmen *Meripilius giganteus*, *Hericium erinaceus* und *Polyporus umbellatus* mit etwa 3.000 AU mL^{-1} . In einem weiteren Versuchsansatz wurde *F. velutipes* in einer Emerskultur auf Glutenpellets kultiviert. Der Pilz zeigte ein starkes Wachstum und erreichte anschließend in Submerskultur an Kulturtag 13 eine maximale Peptidaseaktivität von $169.480 \text{ AU mL}^{-1}$. Die Emerskultivierung auf Glutempulver hingegen führte zu keiner messbaren Peptidaseaktivität.

Für die Bestimmung der Peptidaseaktivität wurde von den Autoren ebenfalls der Azocasein-Assay verwendet, jedoch in einer leicht modifizierten Version. So wurde die Aktivität bei 43 °C gemessen, die Azocasein-Konzentration betrug in den jeweiligen Proben $0,9 \text{ mg}$ pro mg Protein des Kulturüberstandes. Trotz des modifizierten Assays bei Grimrath *et al.* (2011) zeigte der Datenvergleich, dass die insektenassoziierten Pilze generell eine deutlich schwächere Peptidaseaktivität besitzen. Die Zugabe von Gluten zu den jeweiligen Medien sollte bei einer weiteren Kultivierung der insektenassoziierten Pilze bedacht werden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Pilze sind Holzschädlingen assoziiert. Die Pilze *A. areolatum*, *A. chailletii* sowie *S. sanguinolentum* werden bei der Eiablage von der

Holzwespe *U. gigas* in das Holz injiziert, zersetzen das Holz und liefern so eine leicht zugängliche Nahrungsquelle für die Insektenlarven. Die Vermutung liegt somit nahe, dass in den insektenassoziierten Pilzen durch das vorliegende Substrat vorrangig die Ausbildung ligninolytischer Enzyme induziert wird. Die Wahl der Insekten könnte demnach eine ausschlaggebende Rolle bei der Suche nach Peptidasen spielen. Es ist anzunehmen, dass in Därmen von Getreideschädlingen insektenassoziierte Pilze am Proteinverdau beteiligt sind und somit über ein größeres Spektrum an Peptidasen verfügen.

Insektenassoziierte Pilze, vor allem Ascomyceten und Hefen, wurden bereits in mehreren Arbeiten isoliert und teilweise charakterisiert. So fanden Ozdal *et al.* (2012) 19 insektenassoziierte Pilzspezies in dem großen Kolbenwasserkäfer *Hydrophilus piceus* sowie dem Gelbrandkäfer *Dytiscus marginalis*. Bei den isolierten Pilzen handelte es sich um insgesamt 230 Isolate aus den Gattungen *Penicillium*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Acremonium* sowie *Paecilomyces*-Arten. Auch Suh *et al.* (2011) isolierten 13 Ascomyceten sowie fünf Basidiomyceten aus dem Baumschädling *Platypus koryoensis*. Bei den Basidiomyceten handelte es sich um *Schizophyllum commune*, *Rhizochaete filamentosa*, *Irpex* sp., *Peniophora nuda* sowie *Pestalotiopsis* sp., wobei in diesem Zusammenhang bei den Pilzen *S. commune*, *R. filamentosa* und *P. nuda* jeweils die Produktion extrazellulärer Peptidasen beschrieben wurde.

Durch eine Optimierung der bisher eingesetzten Nährmedien sowie ein Screening nach weiteren insektenassoziierten Pilzen (z.B. aus Getreideschädlingen), könnten weitere Peptidasen für den Abbau verschiedener Getreideproteine gewonnen werden.

4.1.2 Kultivierung der Getreideschädlinge

Getreideschädlinge kommen ubiquitär vor und verursachen allein bei der Lagerung speziell in Entwicklungsländern einen Ernteschaden von bis zu 15% (Herrera-Estrella, 2000). Um in verschiedenen, teils extremen Lebensräumen zu überleben, haben Insekten diverse biologische und chemische Systeme entwickelt. Hierzu zählt beispielsweise die Produktion verschiedener Abwehrmoleküle (Gross *et al.* 2008; Schlipalius *et al.* 2012), stabilisierender Proteine (Bale *et al.* 2002) oder lytischer Enzyme (Landureau *et al.* 1970).

Die Wahl der zu untersuchenden Insekten fiel auf verschiedene Getreideschädlinge bzw. Vorratsschädlinge, da diese Käfer auf proteinreiche Nahrungsquellen fokussiert sind. Im Unterschied zu den insektenassoziierten Pilzen aus den Holzschädlingen wurde vermutet, in den Getreideschädlingen ein großes Peptidasespektrum für den enzymatischen Abbau dieser Nahrung vorzufinden. Durch ihren kurzen Lebenszyklus sind sie einfach unter Laborbedingungen zu kultivieren. Um optimale Zuchterfolge zu erzielen, sollte eine Temperatur von etwa 26 °C sowie eine relative Luftfeuchtigkeit von 50 – 65% eingehalten werden. Die Einhaltung der Temperatur stellte kein Problem dar, die Einstellung der Luftfeuchtigkeit war aufgrund der räumlichen Gegebenheiten jedoch nicht möglich. Das Wachstum der Käfer wurde dadurch jedoch nicht wesentlich beeinflusst. Im Vergleich zu den insektenassoziierten Pilzen gestaltete sich die Kulturführung der Getreideschädlinge deutlich schwieriger. Während neu angesetzte Submerskulturen der insektenassoziierten Pilze stets reproduzierbare Ergebnisse lieferten, zeigte sich in den zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellten Käferextrakten nur eine geringe Reproduzierbarkeit der Werte (vgl. 3.2.1.1). Des Weiteren erschwerte die limitierte Verfügbarkeit der Käfer die Analysen. Der nach dem Mörsern gewonnene Käferextrakt war trotz Zentrifugation meist trüb und feine Matrixbestandteile wie Fett, Proteine oder Teile des Chitinpanzers behinderten die Messungen. Eine Filtration des Extraktes wiederum war aufgrund des limitierten Probenvolumens nicht möglich.

4.1.3 Peptidaseaktivität der Getreideschädlinge

Die in den Getreideschädlingen ermittelte Peptidaseaktivität zeigte unter Einbezug der geringen Masse der Käfer bessere Ergebnisse als die insektenassoziierten Pilze. Während der Arbeit wurden aufgrund des limitierten Probenvolumens mehrere Chargen an Käferextrakt gewonnen. Von jedem frisch gewonnenen Käferextrakt wurden der Proteingehalt, die Peptidaseaktivität und die PsP-Aktivität ermittelt. Während der Proteingehalt der Käfer im Laufe der Arbeiten nahezu konstant blieb, zeigte die Peptidaseaktivität teilweise deutlich schwankende Werte. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt an der Zusammensetzung junger und alter Käfer. Der Schädling *R. dominica* beispielsweise hat eine Lebensdauer von bis zu 240 Tagen. Jedes Weibchen legt während dieser Zeit bis zu 500 Eier, welche dann nach 3 – 4 Tagen in ein bis zu 46-tägiges Larvenstadium übergehen. Nach einer einwöchigen

Verpuppung entstehen schließlich die adulten Käfer. Zwar wurden für die Gewinnung des Käferextraktes stets adulte Käfer verwendet, jedoch variierte das Alter der Käfer und somit vermutlich auch die Zusammensetzung der proteolytischen Enzyme. Die altersspezifische Verdauung von *T. molitor* wurde durch Dastranj *et al.* (2013) untersucht. Die Peptidase-, α -Amylase-, sowie Glucosidaseaktivität aus Därmen von *T. molitor* wurde hierbei in verschiedenen Stadien des Wachstums betrachtet. Anhand von Zymogrammen mit Stärke und Gelatine wurde gezeigt, dass in den verschiedenen Nymphenstadien unterschiedliche Enzyme ausgebildet wurden. Die Ergebnisse korrelieren mit den während dieser Arbeit ermittelten Daten (vgl. 3.2.3, Abb. 3.18). In Zymogrammen mit den Substraten Gluten, Reisprotein, BSA und Casein zeigten die Käferextrakte von *T. molitor* als Larve und Käfer jeweils unterschiedliche Hydrolysebanden.

Zudem zeigten Dastranj *et al.* (2013), dass die Konzentration an α -Amylasen und Glucosidasen bis zur Ausbildung adulter Käfer stetig stieg. Bei der Betrachtung der Peptidasen zeigte sich hingegen ein anderes Bild. Im vierten Nymphenstadium von *T. molitor* erreichte die Peptidaseaktivität ihr Maximum, ab dem fünften Nymphenstadium nahm die Peptidaseaktivität bis zur Ausbildung des adulten Käfers stetig ab. Als Begründung wurden die diätetischen Anforderungen der Käfer herangezogen. Während des Wachstums der Larven werden hauptsächlich Proteine verwertet, wodurch die Ausbildung peptidolytischer Enzyme notwendig wird. Mit fortschreitendem Wachstum wird die Nahrung zunehmend polysaccharidreich, wodurch vermehrt α -Amylasen und Glucosidasen als Verdauungsenzyme benötigt werden. Die Untersuchung von Larven selbst war aufgrund der begrenzten Zuchtkapazitäten nicht möglich. Die während des Verlaufs der Arbeit gemessenen unterschiedlichen Peptidaseaktivitäten lassen sich jedoch durch die Ergebnisse von Dastranj *et al.* (2013) erklären. Eine weitere interessante Beobachtung wurde bei der Messung der PsP-Aktivität während des Zuchtverlaufs von *R. dominica* gemacht. Die höchste PsP-Aktivität wurde in den Käfern zu Beginn der Kulturführung mit etwa 3 U mg^{-1} gemessen. Mit steigender Kulturdauer sank die PsP-Aktivität stetig, zum Ende der Arbeit wurde eine konstante Aktivität von $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ U mg}^{-1}$ ermittelt. Gleiches war, wenn auch nicht so deutlich, ebenfalls in den anderen Getreideschädlingen zu beobachten. Es wird vermutet, dass die Abnahme der Aktivität durch einen steigenden Inzuchtfaktor in dem Zuchtansatz herbeigeführt wurde.

4.1.4 Vergleich der peptidolytischen Aktivitäten

Die peptidolytische Aktivität der Pilze sowie der Getreideschädlinge wurde anhand von Zymogrammen getestet, in welche die Substrate Casein, Gluten, Reisprotein und BSA eingearbeitet wurden. Von den insektenassoziierten Pilzen war lediglich der Basidiomycet *A. areolatum* in der Lage, die eingearbeiteten Proteine (mit Ausnahme von BSA) zu hydrolysieren (vgl. 3.1.5, Abb. 3.10). Dieses Ergebnis war dahingehend auffällig, dass dieser Pilz eine schwache Peptidaseaktivität sowie ein schlechtes Wachstums aufwies. Die stärkste Hydrolysebande wurde in einem MM-Medium (Tag 14, Peptidaseaktivität 311 AU mL^{-1}) erreicht. Unabhängig von den jeweils eingesetzten Medien wurden in den Protein-Zymogrammen nur eine bis zwei Hydrolysebanden durch Enzyme aus *A. areolatum* erzeugt. Der im MPE-Medium kultivierte Pilz *A. chailletii* (Tag 2,5, Peptidaseaktivität 3.017 AU mL^{-1}) zeigte ebenfalls einen Abbau der Proteine Casein, Gluten und Reisprotein im Zymogramm. Im Unterschied zu *A. areolatum* wurden jedoch keine einzelnen Banden sichtbar; es entstand vielmehr ein breiter Hydrolysebereich.

Verglichen mit den insektenassoziierten Pilzen zeigten die Getreideschädlinge in den Protein-Zymogrammen eine wesentlich stärkere peptidolytische Aktivität. Während BSA nur durch *R. dominica*, *O. surinamensis* sowie *T. molitor* und *A. diaperinus* hydrolysiert wurde, zeigten sich bei den restlichen Substraten deutliche Hydrolysebanden. Einzig die Käfer *S. granarius* und *T. castaneum* zeigten gegenüber keinem der eingearbeiteten Substrate peptidolytische Aktivität. Nach dem aktuellen Stand der Literatur wurden keine Peptidasen aus *S. granarius* weitergehend biochemisch und molekularbiologisch untersucht. Der Fokus der Verdauungsenzyme bei diesem Käfer lag auf Amylasen (Piasecka-Kwiatkowska *et al.* 2014). Bei *T. castaneum* hingegen liegt der Fokus der Untersuchungen oftmals auf der Charakterisierung von Peptidasen. Vinokurov *et al.* (2009) zeigten beispielsweise die peptidolytische Aktivität in *T. castaneum* anhand eines Gelatine-Zymogramms. Die Käfer wurden auf Haferflocken und Weizenkleie (1:1) kultiviert und für das Zymogramm wurden Larvendärme verwendet. In der vorliegenden Arbeit wiesen die adulten Käfer aus *T. castaneum* trotz geringer Aktivität gegen Azocasein sowie fehlender peptidolytischer Aktivität im Zymogramm gegen die eingesetzten Proteine Casein, Reisprotein, Gluten und BSA eine hohe PsP-Aktivität auf. Diese Aktivität kann durch Prolin-Oligopeptidasen

(EC 3.4.21.28) hervorgerufen worden sein, welche im Transkriptom des Käfers identifiziert wurden (Morris *et al.* 2009).

Für die Zymogramme wurden Käferextrakte mit identischer azocaseinspezifischer Peptidaseaktivität verwendet. Dabei zeigte *R. dominica* insgesamt die stärkste peptidolytische Aktivität. Neben einzeln erkennbaren Banden wurde ein großer Hydrolysebereich sichtbar, welcher sich durch das Zymogramm zog. Zhu *et al.* (1999) zeigten, dass der Extrakt aus dem Mitteldarm von *R. dominica* in einem Casein-Zymogramm 7 Banden mit hydrolytischer Aktivität aufwies. Diese Daten korrelierten gut mit den während dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen. Auch hier zeigten die kompletten Käferextrakte im Vergleich zu den Extrakten entdarmter Käfer eine größere peptidolytische Aktivität, was darauf schließen ließ, dass sich die gesuchten Peptidasen hauptsächlich im Darm der Käfer befinden. Die geringe Peptidaseaktivität innerhalb der Extrakte der entdarmten Käfer war vermutlich auf Darmrückstände oder andere peptidolytisch aktive Bereiche des Käfers zurückzuführen.

4.1.5 Abbau der zöliakierelevanten Peptide aus Weizen und Gerste

Die Pilze *A. areolatum*, *A. chailletii* sowie *S. sanguinolentum* wurden auf die Fähigkeit untersucht, zöliakierelevante Peptide aus Weizen (P1) und Gerste (P2) abzubauen. Alle für den Peptidabbau eingesetzten Pilze waren in der Lage, das Gerstenpeptid P2 abzubauen. Die Pilze *A. areolatum* und *S. sanguinolentum* hydrolysierten zudem das Weizenpeptid P1. Hierbei wurde ein maximaler Abbau des Weizenpeptids von 74,4% durch *A. areolatum* nachgewiesen. *S. sanguinolentum* zeigte mit 89,1% den besten Abbau von P2. Die Getreideschädlinge erzielten bei dem Peptidabbau leicht geringere Hydrolyseraten. Die besten Ergebnisse lieferten hierbei *O. surinamensis* (45% Abbau P1, 24% Abbau P2) und *R. dominica* (45% Abbau P1, 11% Abbau P2). Beide zeigten sowohl einen Abbau des Weizen- als auch des Gerstenpeptids. Geßendorfer *et al.* (2011) führten die Hydrolyse des Weizenpeptids mit Extrakten aus gekeimter Kleie durch. Zum Einsatz kamen hierbei Getreideextrakte aus Weizen, Dinkel, Emmer, Einkorn, Roggen und Gerste. Nach 60-minütiger Inkubation bei pH 4,0 wurde eine Hydrolyse von 70,6% P1 durch Roggenkleie detektiert, bei pH 6,5 lieferte die Inkubation mit Roggenkleie eine Abbaurrate von 76,1%. Für

den Peptidabbau wurden 100 mg Kleie in 1 mL Extraktionspuffer aufgenommen und im Verhältnis 1:1 mit den jeweiligen Peptiden inkubiert. Zum Vergleich wurden ebenfalls etwa 100 mg der jeweiligen Getreideschädlinge in 1 mL Extraktionspuffer gelöst. Eine 100-fache Verdünnung des so gewonnenen Extraktes wurde anschließend gemäß 2.11 mit den jeweiligen Peptiden inkubiert. Die während dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse der insektenassoziierten Pilze und der Getreideschädlinge sind folglich als effizienter einzuordnen.

4.2 Lokalisierung der Peptidaseaktivität

Die Verdauung der Getreideproteine erfolgt meist innerhalb des gastrointestinalen Systems der Käfer. Forschungsprojekte im Bereich der Insektenbiotechnologie beschäftigen sich daher auch vermehrt mit den sich im Darm der Käfer befindlichen Peptidasen. Vermutlich aufgrund seiner Größe ist *T. molitor* der am besten untersuchte Getreideschädling. Die Verdauungsenzyme dieses Käfers sind entsprechend gut erforscht (Applebaum *et al.* 1964, Elpidina *et al.* 2007). In den Larven von *T. molitor* erfolgt der Proteinverdau im Mitteldarm. Dabei konnten Vinokurov *et al.* (2006) sowie Elpidina *et al.* (2006) einen scharfen pH-Gradienten von pH 5,6 im vorderen Mitteldarm bis pH 7,9 im hinteren Mitteldarm ermitteln. Die Verdauungsenzyme sind entsprechend ihrer pH-Optima in den verschiedenen Bereichen des Darmes lokalisiert. Im schwach sauren Bereich des vorderen Mitteldarms fanden sich z.B. Cystein-Peptidasen und Glykosidasen. Serin-Peptidasen wurden hingegen eher im hinteren Mitteldarm nachgewiesen. Goptar *et al.* (2012) isolierten drei Cystein-Peptidasen aus dem Mitteldarm von *T. molitor*, welche Proteine jeweils spezifisch nach Glutamin hydrolysierten. Ein ähnliches Bild zeigte sich in den Larven von *T. castaneum* und *Tribolium confusum*. Hier wurde ebenfalls ein pH-Gradient von 5,6 – 6,0 im vorderen Mitteldarm bis 7,0 – 7,5 im hinteren Mitteldarm nachgewiesen (Vinokurov *et al.* 2009). 80% der gesamten Peptidaseaktivität war zudem im vorderen Mitteldarm lokalisiert, die restlichen 20% im hinteren Mitteldarm der Larven. Die hierbei dominierenden Peptidasen zeigten eine 97%-ige Homologie zu den in den Larven von *T. molitor* identifizierten Peptidasen.

Für die Lokalisierung der Peptidasen in den untersuchten Getreideschädlingen wurden die Käfer entdarnt und die Peptidaseaktivitäten der entdarnten anschließend mit denen der kompletten Käfern anhand eines photometrischen Assays sowie eines Zymogramms verglichen. Die gemessenen Aktivitäten sowie der peptidolytische Abbau im Zymogramm zeigten eine deutlich bessere Hydrolyse bei den kompletten Käfern (vgl. 3.5, Abb. 3.23). Es liegt somit nahe, dass die Peptidasen im Darm der Käfer lokalisiert sind. Dennoch wurde in den entdarnten Käfern ebenfalls eine leichte Peptidaseaktivität im photometrischen Assay nachgewiesen. Der peptidolytische Abbau im Zymogramm zeigte zudem nahezu gleich starke Hydrolysebanden wie mit den kompletten Käfern. Dieser Effekt kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Bei der Präparation der Käfer war es zum einen schwierig, den kompletten Darm zu entfernen. Die Aktivität von 2 AU mg^{-1} könnte demnach auf Darmrückstände zurückzuführen sein. Die Konzentration des eingearbeiteten Proteins im Zymogramm kann ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass Peptidasen in weiteren Teilen des Käfers, wie z.B. den Speicheldrüsen, lokalisiert sind und somit ebenfalls zu den positiven Messwerten der entdarnten Käfer beigetragen haben. So beschreiben Bezdi *et al.* (2012) beispielsweise Verdauungsenzyme in den Speicheldrüsen der Schildwanze *Eurygaster integriceps*. Die Isolierung der Speicheldrüsen in den untersuchten Käfern war aufgrund des zu geringen Probenmaterials jedoch nicht möglich.

4.3 Peptidasen aus Getreideschädlingen

Anhand der ermittelten Peptidaseaktivitäten mit und ohne Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren ließ sich grob das Verhältnis der jeweiligen Peptidasegruppen in den Käfern *R. dominica* und *O. surinamensis* abschätzen (Abb. 4.1). Im Extrakt von *R. dominica* wurden Serin-Peptidasen (56%) und Metallo-Peptidasen (30%) identifiziert. Das Vorhandensein von Cystein-Peptidasen wurde im Käferextrakt nicht nachgewiesen. Bei *O. surinamensis* betrug der Anteil an Serin-Peptidasen 47%, Metallo-Peptidasen wurden zu 20% identifiziert. Im Gegensatz zu *R. dominica* wurden hier Cystein-Peptidasen (5%) im Käferextrakt nachgewiesen. Der Anteil an nicht identifizierten Peptidasen lag bei beiden Käferextrakten zwischen 14 und 28%.

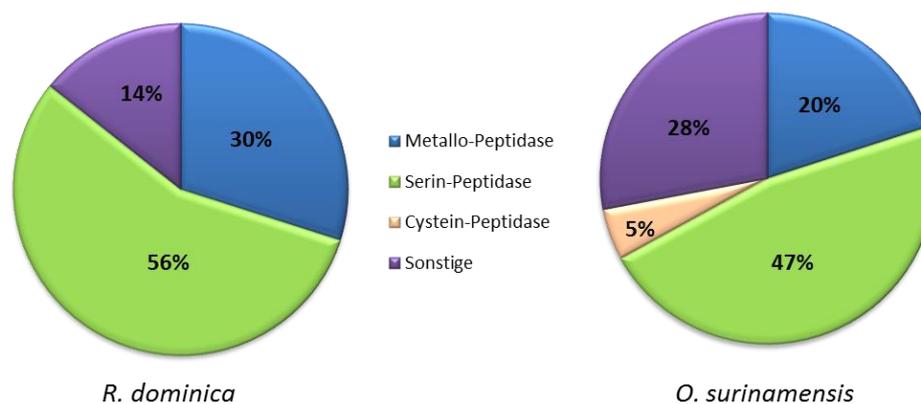


Abb. 4.1: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Peptidasen in Extrakten von *R. dominica* (links) und *O. surinamensis* (rechts)

In Getreideschädlingen wurden bislang diverse Peptidasen identifiziert und charakterisiert. Die meisten Peptidasen gehören zu der Gruppe der Serin-Endopeptidasen (EC 3.4.21.x) und der Cystein-Endopeptidasen (EC 3.4.22.x). Eine Transkriptomanalyse des Mitteldarms aus Larven von *T. molitor* zeigte Homologien zur Cystein- und Serin-Peptidasen (Prabhakar *et al.* 2007). In einigen Familien wie bei den *Tenebrionideae* und *Sitophilus* spp. sind Cystein-Peptidasen vorherrschend (Murdock *et al.* 1987, Terra *et al.* 1996). Vinokurov *et al.* (2006) zeigten in einer Proteomanalyse des Gastrointestinaltraktes der *T. molitor* Larven ebenfalls die überwiegende Präsenz von Cystein-Peptidasen. Isoliert wurden zudem Cystein-Peptidasen mit einem Molekulargewicht von 23 und 38 kDa. Das pH-Optimum dieser Peptidasen lag bei pH 5,0 bis 7,0. Cystein-Peptidasen verfügen über hydrolytische Aktivität gegenüber Speicherproteinen. Die aus *T. molitor* isolierten Peptidasen hydrolysierten die Globulin-Fraktion von Hafer ebenso wie die glutaminreiche Prolamin-Fraktion aus Weizen (Goptar *et al.* 2012). Dieses Ergebnis korreliert mit den während der Arbeit gewonnenen Daten, wo sowohl Larven als auch adulte Käfer von *T. molitor* Protein-Fractionen aus Weizen und Reis hydrolysierten (vgl. 3.2.3, Abb. 3.18).

Die Dominanz der Cystein-Peptidasen gegenüber Serin-Peptidasen in Käferlarven basiert vermutlich auf einer Adaption der Larven an das zur Verfügung stehende Getreide. Terra *et al.* (1996) zeigten in diesem Zusammenhang das Vorkommen natürlicher Serin-Peptidase-Inhibitoren in Getreide. Eine weitere Erklärung liegt vermutlich in der Aminosäurezusammensetzung der Getreideproteine. So besteht etwa Prolamin, welches 50% der Speicherproteine ausmacht, zu 30 – 50% aus Glutamin sowie zu 10 – 30% aus Prolin

(Goptar *et al.* 2012, Shewry *et al.* 1990). Für den Abbau der glutaminreichen Proteine benötigen die Käferlarven folglich spezifisch hydrolysierende Verdauungsenzyme.

Neben Cystein-Peptidasen wurden ebenfalls bereits Serin-Peptidasen in Getreide- und Vorratsschädlingen näher charakterisiert. Die meisten Peptidasen wurden hierbei im Mehlkäfer *T. molitor* beschrieben. Tsybina *et al.* (2005) identifizierten eine Trypsin-ähnliche Peptidase aus *T. molitor* und reinigten diese aus dem Larvenextrakt mittels Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie. Das Molekulargewicht dieser Peptidase betrug 25,5 kDa, das pH-Optimum wurde bei 8,5 ermittelt. Ebenfalls aus *T. molitor* isolierten Elpidina *et al.* (2005) eine Chymotrypsin-ähnliche Peptidase (TmC1). Diese Peptidase wurde aus dem Mitteldarm der Larve isoliert und hatte ein Molekulargewicht von 23 kDa sowie ein pH-Optimum von 9,5. Auch aus der Schildwanze *E. integriceps* isolierten Konarev *et al.* (2011) eine Glutenin-spezifische Serin-Peptidase mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa. Die bevorzugte Spaltposition dieser Peptidase wurde anhand von Weizenglutinin bestimmt und lag zwischen dem sich wiederholenden Hexapeptid und Nonapeptid des Weizenglutinins (PGQGQQ - GYYPTSLQQ). Serin-Peptidasen wie Trypsin und Chymotrypsin wurden bisher ebenfalls in weiteren Käferarten beschrieben.

4.3.1 Isolierung einer Serin-Endopeptidase aus *R. dominica*

R. dominica lieferte während der durchgeführten Analysen, speziell hinsichtlich der hohen PsP-Aktivität, die aussichtsreichsten Ergebnisse. Die Isolierung der Peptidasen aus diesem Käfer erfolgte mittels Reinigung durch FPLC. Zhu *et al.* (1999) zeigten, dass für den Proteinverdau von *R. dominica* hauptsächlich ein Komplex von Serin-Peptidasen im Mitteldarm des Käfers verantwortlich ist. Sie klonierten und sequenzierten drei cDNAs für Trypsinogen-ähnliche Enzyme (RdoT1, RdoT2 und RdoT3) mit Molekulargewichten von 23,1, 28, und 23,8 kDa. Für die Isolierung der Peptidase aus *R. dominica* wurden nach der Reinigung mittels FPLC zwei Fraktionen gewählt, welche eine hohe hydrolytische Aktivität gegenüber verschiedenen Proteinen aufwiesen. Die Fraktionen wurden nach gelelektrophoretischer Trennung mittels LC-ESI-MS/MS sequenziert. So wurden Homologien zu zwei Serin-Endopeptidasen sowie einer Carboxypeptidase ermittelt. Die identifizierten Peptidfragmente zeigten dabei hohe Ähnlichkeiten zu einer Vorstufe der Serin-Peptidase

P 76 aus *T. castaneum* sowie einer Trypsin-ähnlichen Peptidase aus *T. molitor*, AAX45475; PM 2-70 (Prabhakar *et al.* 2007). Auch die von Zhu *et al.* beschriebene Peptidase RdoT3 (AAD31269) wurde durch die Sequenzierung identifiziert und war zudem in beiden gereinigten aktiven Fraktionen vorhanden. Während sich Cystein-Peptidasen überwiegend im vorderen und somit leicht saureren pH-Bereich des Darmtrakts befinden, sind Serin-Peptidasen eher im hinteren, neutralen bis leicht basischen Darmabschnitt der Käfer lokalisiert (Goptar *et al.* 2012). Abweichend zu Zhu *et al.* (1999) wurde vermutet, dass die Peptidase präferiert nach Prolin und nicht wie beschrieben nach Arginin hydrolysiert. Für die Überprüfung dieser Hypothese wurde diese Peptidase für die rekombinante Herstellung und anschließende heterologe Expression ausgewählt.

4.3.2 Sequenzierung und Homologievergleich

RdoT3 gehört zur Gruppe der Serin-Peptidasen, welche typischerweise ein Pro-Peptid beinhalten und durch welches das Enzym zunächst in seiner inaktiven Form vorliegt. Ein Vergleich mit Hilfe einer Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) gegen Serin-Peptidasen aus Insekten zeigte Ähnlichkeiten zu dem von Botos *et al.* (2000) charakterisierten Chymotrypsin aus der Feuerameise *Solenopsis invicta*. Das Enzym verfügte ebenfalls über ein Pro-Peptid bestehend aus 15 Aminosäuren. Nach dem Alignment beider Sequenzen zeigte sich, dass die aus *R. dominica* isolierte Peptidase ebenfalls über ein Pro-Peptid, bestehend aus 29 Aminosäuren, verfügt. Das C-terminale Ende des Pro-Peptids besteht aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Glycin und Arginin. Diese Sequenz wird durch den Protease Faktor Xa (FXa) hydrolysiert (He *et al.* 1992), welcher für die anstehenden Arbeiten eingesetzt wurde.

Neben der Übereinstimmung zu der von Zhu *et al.* (1999) identifizierten RdoT3 zeigten sich weitere Homologien zu Peptidasen aus *T. castaneum* sowie aus dem Bergkiefernkäfer *Dendroctonus ponderosae*. Ebenfalls wurden Homologien zu zwei Serin-Peptidasen (ABZ04009.1 sowie ABZ04010.1) der Blatthornkäferspezies *Costelytra zealandica* identifiziert.

4.3.3 Heterologe Expression der RdoT3

Für die Produktion größerer Enzymmengen wurde die Serin-Endopeptidase RdoT3 im Bakterium *E. coli* heterolog exprimiert. Die Expression in *E. coli* stellt ein gut funktionierendes Expressionssystem dar. In optimal gewählten Nährmedien verdoppelt sich das Wachstum der Zellen etwa alle 20 min (Sezonov *et al.* 2007), eine rasche Produktion eines rekombinant hergestellten Enzyms ist somit möglich. Die heterologe Expression der rekombinanten RdoT3 wurde nach 4 h bei 28 °C beendet. Zu diesem Zeitpunkt wurde die maximale Enzymausbeute ermittelt. Bei der Expression der RdoT3 kam es zur Ausbildung von Einschlusskörperchen. Durch die heterologe Expression in *E. coli* wurde das Enzym nicht optimalen Bedingungen hinsichtlich pH, Osmolarität, Redoxpotential oder auch Cofaktoren ausgesetzt. Die Entstehung von Einschlusskörperchen wird so begünstigt. Ebenfalls führt die bei einer Überexpression vorliegende hohe Proteinkonzentration zu Interaktionen ähnlicher Regionen, wodurch Einschlusskörperchen gebildet werden können (Hartley und Kane 1988, Carrio und Villaverde 2002). Die Ausbildung von Einschlusskörperchen kann jedoch auch Vorteile liefern und wird teilweise gezielt induziert, sofern das Protein problemfrei *in vitro* zurückgefaltet werden kann (Basu *et al.* 2011). Das Enzym RdoT3 wurde durch Denaturierung mittels eines hoch konzentrierten Salzpuffers aus den Einschlusskörperchen isoliert. Nach einer Reinigung mittels FPLC wurden die Proteine anschließend durch Dialyse über Nacht bei 4 °C zurückgefaltet.

Nach der Dialyse wurde durch Konzentrierung über einen Membranfilter ein Proteingehalt von 814 U mg⁻¹ nachgewiesen. Trotz dieses Proteingehalts zeigte das Enzym nur schwache Aktivität im Azocasein-Assay. Als mögliche Erklärung kann primär eine fehlerhafte Rückfaltung des Enzyms während der Dialyse vermutet werden. Für eine bessere Rückfaltung wurden weitere Dialysepuffer getestet. Die Optimierungsversuche führten allerdings zu keinem besseren Ergebnis. In einem weiteren Versuchsansatz wurde eine 3-tägige Dialyse bei 4 °C getestet. Ein Vergleich dieser zwei Methoden mittels denaturierender SDS-PAGE zeigte, dass nach 1-tägiger Dialyse eine deutliche Proteinbande bei etwa 30 kDa zu erkennen war, nach 3-tägiger Dialyse zeigten sich zwei Banden zwischen 25 und 30 kDa (Abb. 4.2). Es kann eine Autolyse des Enzyms vermutet werden. Anhand der Größe der neu entstandenen Proteinbande kann auch die Abspaltung des Pro-Peptids angenommen

werden. Die Überprüfung dieser Vermutung anhand von zymographischen Methoden zeigte jedoch keine Aktivität.

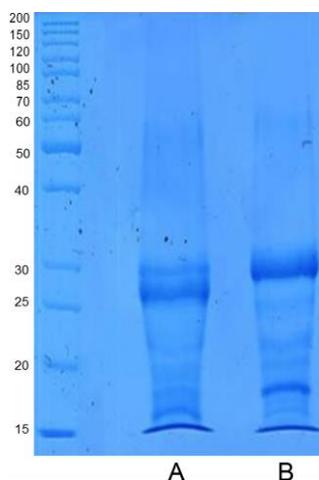


Abb. 4.2: SDS-Gel mit RdoT3 nach unterschiedlicher Rückfaltung. A = Dialyse für 3 Tage bei 4 °C, B = Dialyse für 1 Tag bei 4 °C

Vera *et al.* (2007) zeigten, dass sich eine geringere Kultivierungstemperatur positiv auf die Produktion des rekombinanten Proteins hinsichtlich seiner Konformation und Funktionalität auswirkt. Die Zugabe von kleinen Molekülen, Ionen oder prosthetischen Gruppen (wie z. B. Häm oder FAD) in das Kulturmedium kann die Qualität und Ausbeute des exprimierten Proteins zusätzlich steigern (Weickert *et al.* 1999, Yang *et al.* 2003).

Neben der heterologen Expression in *E. coli* wurde die Produktion von RdoT3 in der Hefe *Pichia pastoris* getestet. Wie bei *E. coli* handelt es sich bei diesem Expressionssystem um ein etabliertes System, welches oftmals für die Herstellung von Biopharmaka oder industrieller Enzyme eingesetzt wird. Die Expression mit *P. pastoris* zeichnet sich dabei analog zu *E. coli* durch die hohe Anzahl an verfügbaren Promotoren, die Ausbildung einer hohen Zelldichte sowie der Möglichkeit zur Produktion einer großen Menge des rekombinanten Proteins im $g\ L^{-1}$ -Maßstab aus (Ahmad *et al.* 2014). Im Vergleich zum *E. coli*-Expressionssystem war die Produktion der RdoT3 in den *P. pastoris* Transformanden schneller durchzuführen, jedoch auch deutlich problembehafteter. So wurde beispielsweise der Abbau von Gluten im Zymogramm ebenfalls mit *P. pastoris* Leerzellen gezeigt. Auf Grund von starken Matrixeffekten war es zudem nicht möglich, den Abbau der Peptide P1 und P2 mittels HPLC zu detektieren. Die heterologe Expression der RdoT3 erfolgte somit in *E. coli*.

Mit Hilfe eines alternativen Expressionssystems könnten die bei der Expression in *E. coli* entstandenen Probleme, wie die Ausbildung von Einschlusskörperchen und die geringe Aktivität hinsichtlich der Rückfaltung des Enzyms, umgangen werden. Auch die Expression in SF9-Insektenzellen (Chen *et al.* 2004) oder in Basidiomyceten (Burns *et al.* 2005) wäre denkbar.

4.4 Charakterisierung der RdoT3

Nach erfolgreicher Expression in *E. coli* wurde die Peptidase RdoT3 charakterisiert. Die Vorversuche mit dem aus *R. dominica* gewonnenen Extrakt zeigten eine hohe PsP-Aktivität, einen effizienten Abbau von Gluten sowie einen Abbau der zöliakierelevanten Peptide P1 und P2 aus Weizen bzw. Gerste. Anhand des photometrischen Assays wurde keine PsP-Aktivität in den gereinigten Fraktionen nachgewiesen. Es ist hierbei möglich, dass die im Anschluss an die Reinigung mittels FPLC durchgeführte Konzentrierung der Enzymlösung nicht ausreichend für die Detektion mittels eines photometrischen Assays war. Im Zymogramm zeigten sich dagegen ein Abbau von Gluten sowie eine Hydrolyse der Peptide P1 und P2. Zusätzlich wurde durch die Identifizierung der beim Peptidabbau entstandenen Fragmente mittels LC-ESI-MS/MS eine bevorzugte Hydrolyseposition nach Prolin identifiziert. Dies steht im Widerspruch zu der von Zhu *et al.* (1999) aufgestellten Hypothese, dass es sich bei der RdoT3 um eine Arginin-spezifische Peptidase handelt.

4.4.1 Charakterisierung anhand von gelelektrophoretischen Methoden

Die Aktivitätsbestimmung der RdoT3 erfolgte zunächst anhand gelelektrophoretischer Methoden. In Zymogrammen wurde eine hydrolytische Aktivität gegen Gluten deutlich sichtbar. Ebenfalls wurde gezeigt, dass das Enzym erst nach Aktivierung durch eine vorherige Abspaltung des Pro-Peptids Hydrolysebanden erzeugte (vgl. 3.9.3, Abb. 3.40). Des Weiteren ließ sich in den Zymogrammen die hohe, jedoch zeitlich begrenzte, thermische Stabilität der RdoT3 nachweisen. Bei der zymographischen Aktivitätsbestimmung handelt es sich im Allgemeinen um eine sensitive Methode, durch welche bereits geringe Enzymaktivitäten detektiert werden können.

Da der photometrische Assay keine aussagekräftigen Ergebnisse lieferte (vgl. 4.4.2), erfolgte die grobe Abschätzung des Temperaturoptimums anhand von Zymogrammen, welche bei 4 °C, 24 °C sowie 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Die unterschiedlichen Temperaturen führten zu unterschiedlich stark ausgeprägten Hydrolysebanden im Gel. Die stärksten Hydrolysebanden wurden bei 37 °C erzielt, die schwächsten bei 24 °C. Saboia-Vahia *et al.* (2013) ermittelten das Temperatur-Optimum einer Serin-Peptidase aus der asiatischen Tigermücke *Aedes albopictus* ebenfalls mittels Zymogrammen, die bei 4 °C, 10 °C, 37 °C, 50 °C und 60 °C inkubiert wurden. Die Inkubation bei 50 °C zeigte dabei die höchste Enzymaktivität.

Für einen weiteren Aktivitätsnachweis wurde das Enzym mit Lösungen aus BSA, Casein sowie Gluten zweier verschiedener Hersteller versetzt. Die Proteinhydrolyse wurde schließlich nach einer definierten Inkubationszeit mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Es zeigte sich ein Abbau von Proteinbanden aller eingesetzten Substrate mit Ausnahme des Glutens der Firma Beneo. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung liegt in der unterschiedlichen Herstellungsweise der Glutensorten und evtl. im Einsatz verschiedener Weizensorten.

4.4.2 Charakterisierung anhand photometrischer Assays

Die Bestimmung der Aktivität der RdoT3 anhand photometrischer Assays lieferte keine Ergebnisse. Trotz Variation der pH- und Temperatureinstellungen war mittels Azocasein-Assay keine Aktivität nachweisbar. Interessant war hierbei vor allem, dass eine peptidolytische Aktivität gegenüber Casein im Zymogramm nachgewiesen wurde. Der photometrische Azocasein-Assay hingegen lieferte trotz des ähnlichen Substrates keine Ergebnisse.

Die photometrischen Assays zur Bestimmung der PsP- und Arginin-Spezifität der Peptidase zeigten ebenfalls keine aussagekräftigen Ergebnisse. Es kann wie bereits in 4.3.3 diskutiert vermutet werden, dass das Enzym nach der heterologen Expression in *E. coli* noch nicht ausreichend aktiv war und die Aktivität lediglich durch die empfindlichere zymographische Bestimmung erfassbar war.

4.4.3 Beeinflussung der RdoT3-Aktivität durch Peptidase-Inhibitoren

Bei Peptidasen aus Insekten handelt es sich meist um Serin- oder Cystein-Peptidasen. Auch die während der Arbeit identifizierte RdoT3 wurde als Serin-Peptidase charakterisiert. Für die Verifizierung des Peptidase-Typs wurde die RdoT3 mit dem Serin-Peptidase-Inhibitor AEBSF inkubiert. Nachdem die Peptidase nicht durch Hitze inaktiviert werden konnte, führte die Inkubation mit AEBSF trotz Einsatz hoher Konzentrationen ebenfalls nicht zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Die Kombination aus Hitzeinaktivierung sowie Zugabe der 10 mM Inhibitorlösung führten lediglich zum vollständigen Verschwinden einer Hydrolysebande.

Die Inkubation einer Serin-Peptidase aus Weizenblättern mit 10 mM AEBSF zeigte bei Wang *et al.* (2013) eine deutliche Hemmung der Enzymaktivität. Sie testeten zusätzlich 100 μ M Leupeptin, 25 μ M E-64, 100 μ M TPCK, 25 μ M Pepstatin, 10 mM Phenanthrolin, 10 mM PMSF, 10 mM EGTA und 10 mM EDTA als Inhibitoren. AEBSF und PMSF zeigten hierbei die maximale Inhibierung. Es ist dennoch möglich, dass die Konzentration an AEBSF zum Inaktivieren der RdoT3 nicht ausreichte oder der Inhibitor nicht optimal geeignet ist. Saboia-Vahia *et al.* (2013) inkubierten die zu untersuchende Serin-Peptidase aus *A. albopictus* mit 10 μ M E-64, 1 mM PMSF, 100 μ M TLCK, 100 μ M TPCK, Pepstatin-A 10 μ M und 10 mM 1,10-Phenanthrolin. In diesem Versuchsansatz zeigten ebenfalls PMSF neben TLCK die deutlichste Hemmung der Enzymaktivität.

4.4.4 Peptidabbau mittels RdoT3

Das nach der Peptidhydrolyse durch RdoT3 entstandene Hydrolysemuster wurde mit dem Hydrolysemuster der nach Reinigung mittels FPLC generierten Fraktionen B und C verglichen; dabei wurden einige Gemeinsamkeiten detektiert. So wurden 5 Hydrolysepositionen (nach Prolin, Glutamin, Tyrosin, Serin, Leucin) nach Inkubation der Peptide P1 und P2 mit den gereinigten Fraktionen B und C identifiziert, 4 Hydrolysepositionen (nach Prolin, Glutamin, Phenylalanin und Leucin) wurden nach der Inkubation mit der heterolog exprimierten RdoT3 identifiziert. Die Präferenz der Spaltstellen lag dabei in allen Fällen nach Prolin und Glutamin. Es wurde ebenfalls durch RdoT3 eine Spaltung nach Leucin identifiziert, jedoch nicht wie mit

den gereinigten Fraktionen B und C nach Tyrosin und Serin. Zusätzlich wurde im Fall von RdoT3 eine zusätzliche Spaltstelle nach Phenylalanin ermittelt. Vergleichbare Untersuchungen wurden von Hartmann *et al.* (2006) durchgeführt. Hier zeigte die Hydrolyse durch Enzyme aus Getreidekeimlingen Hydrolysepositionen an insgesamt 5 Stellen zweier zöliakierelevanter α -Gliadin Peptide. Die präferierten Hydrolysepositionen lagen dabei nach Prolin, Glutamin, Lysin, Phenylalanin und Glycin.

Durch den Peptidabbau ließ sich abermals die Aktivität der RdoT3 nachweisen. Analog zu den gelelektrophoretischen Methoden handelt es sich auch hierbei um eine sehr empfindliche Nachweismethode. Bei der Untersuchung des Peptidabbaus mittels RdoT3 traten jedoch einige Probleme auf. Es zeigte sich, dass das Abkochen der Probe nach der Inkubation mit den jeweiligen Peptiden nicht zu einer Inaktivierung der Enzymaktivität führte. Diese Beobachtung korrelierte mit den Ergebnissen der gelelektrophoretischen Methoden, in welchen RdoT3 ebenfalls trotz Hitze einwirkung noch Aktivität im Gel zeigte. Des Weiteren ließ sich keine Linearität innerhalb der bestimmten Inkubationszeiten erkennen (vgl. 3.9.6.2, Abb. 3.49). Eine mögliche Erklärung liegt hierbei in der erschwerten Hitzeinaktivierung der Probe nach der jeweiligen Inkubationszeit. Nach 24-stündiger Inkubationszeit der jeweiligen Peptide mit RdoT3 wurde zudem eine große Anzahl an Peaks im HPLC-UV-Chromatogramm sichtbar, wodurch die Auswertung erschwert wurde. Bei den gereinigten Fraktionen B und C wurden nur wenige Peaks in den HPLC-UV-Chromatogrammen detektiert.

Obwohl der Peptidabbau auf eine Aktivität der RdoT3 schließen ließ, wurden durch die Hydrolyse mit RdoT3 weniger Hydrolyseprodukte identifiziert als durch die gereinigten Fraktionen B und C. Hierbei liegt erneut die Vermutung nahe, dass das Enzym aufgrund der erschwerten Rückfaltung nicht seine komplette Aktivität erreicht hatte. Eine geringe Aktivität wurde gegenüber dem Gerstenpeptid P2 detektiert. Diese Beobachtung wurde bereits in den kompletten Käferüberständen und in den gereinigten Fraktionen B und C gemacht. Auch diese zeigten verhältnismäßig geringe peptidolytische Aktivität gegen das glutaminreiche Gerstenpeptid P2.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen zöliakierelevanten Peptiden (Vader *et al.* 2003) ist zu vermuten, dass weitere Prolamin-Fraktionen aus Roggen (Secalin) oder Hafer (Avenin)

ebenfalls durch RdoT3 abgebaut werden können. Für eine allgemeine Entgiftung von zöliakierelevanten Peptiden müssen diese auf eine maximale Anzahl von 8 Aminosäuren abgebaut werden (Schwalb *et al.* 2012). Nach Betrachtung der Spaltprodukte der durch RdoT3 erzeugten Peptidfragmente mittels LC-ESI-MS/MS ließ sich eine Endo-Aktivität der Peptidase vermuten. Weitere Untersuchungen zum Abbau des kompletten Speicherproteins mit RdoT3 müssen zeigen, inwiefern dieses Kriterium erfüllt werden kann.

4.5 Applikationsmöglichkeiten der RdoT3

4.5.1 Einsatzgebiet Zöliakie

Der Käfer *R. dominica* sowie die daraus isolierte Peptidase RdoT3 zeigten hohe Aktivitäten gegen verschiedene lebensmitteltechnologisch relevante Proteine. Herausragend war hierbei jedoch in erster Linie die hohe PsP-Aktivität des Käferextraktes gegen das Substrat z-Glycyl-L-Prolin-4-Nitroanilid. PsP sind in der Lage, prolinreiche Proteine, zu welchen z.B. die zöliakierelevanten Prolamin- und Glutelin-Fractionen in Getreideproteinen zählen, zu hydrolysieren.

Die bislang einzige Therapiemöglichkeit der Zöliakie ist ein strikter Verzicht auf glutenhaltige Produkte. Patienten müssen aus diesem Grund auf eine Vielzahl von Produkten verzichten. Auf der anderen Seite fehlt es Lebensmittelherstellern an einfachen sowie kostengünstigen Methoden, auf den Bedarf der Patienten zu reagieren.

Trotz vieler spezifischer Enzyme ist die Möglichkeit der oralen Enzymtherapie fraglich und dient bestenfalls für den Abbau geringer Mengen zöliakierelevanter Peptide (Schuppan *et al.* 2009). Laufende Forschungsarbeiten schlagen dennoch stets neue Therapieansätze für die Behandlung der Zöliakie vor. So gibt es beispielsweise die Idee einer zytokinen Therapie (Salvati *et al.* 2005) oder klinische Pilot-Studien über eine Prolyl-Endopeptidase aus *Aspergillus niger*, welche eine gute Verträglichkeit des Enzyms bei Zöliakie-Patienten zeigte (Tack *et al.* 2013).

Toft-Hansen *et al.* (2014) testeten ebenfalls eine PsP aus *A. niger*, AN-P2, in Vorversuchen für den medizinischen Gebrauch. AN-P2 war stabil bei pH 2,5 – 7,5 und zeigte einen Abbau von Gluten bei 37 °C. Die Peptidase wurde ebenfalls mittels diverser glutenaktiver T-Zellen von Erwachsenen und Kindern getestet. Durch den Einsatz von AN-P2 kam es zu keiner

Reaktion der T-Zellen gegen toxische Gluten-Peptide, eine Anwendung im medizinischen Bereich könnte folglich in Erwägung gezogen werden. Die Peptidase zeigte präferierte Hydrolysepositionen nach Prolin und Glutamin, anhand weiterer Tests muss jedoch eine genauere Charakterisierung des Enzyms erfolgen.

4.5.2 Einsatzgebiet Lebensmittelindustrie

Der Einsatz von Enzymen in biotechnologischen Verfahren bei der Lebensmittelherstellung ist unerlässlich. Eine stete Entwicklung im lebensmittelchemischen Bereich, wie beispielsweise die Vereinfachung diverser Produktionsschritte oder die Herstellung neuer Produkte, erfordert den Einsatz neuartiger Enzyme aus verschiedenen Organismen. Die aus dem Getreideschädling *R. dominica* gewonnene Peptidase RdoT3 zeigte einen effizienten Abbau speziell von Gluten und Reisprotein. Für die Lebensmittelindustrie sind besonders Getreideproteine relevant. Wie bereits unter 4.5.1 erwähnt, stellt insbesondere die Herstellung von glutenfreien Produkten eine Herausforderung dar. Hierbei gilt es, die durch den Codex alimentarius (codex stan 118 – 1979 „codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten“) definierte Höchstmenge von 20 mg kg^{-1} bei der Herstellung der glutenfreien Produkte einzuhalten. Zusätzlich war die Erhaltung verschiedener Produkteigenschaften, speziell bei Brot, bislang nicht möglich. Gluten ist reich an den Aminosäuren Prolin und Glutamin. Die Herstellung von entsprechenden glutenfreien Produkten kann demnach durch Prolin- oder Glutamin-spezifische Peptidasen erfolgen.

Der enzymatische Abbau von Gluten wird in der Literatur durch diverse Organismen beschrieben. So wurde beispielsweise der Abbau von prolinreichen Proteinen durch Milchsäurebakterien während der Sauerteigfermentation gezeigt (di Cagno *et al.* 2002). De Angelis *et al.* (2006) zeigten in einer Langzeitfermentation von Weizenmehl mit einer Mischung aus Milchsäurebakterien und Bifidobakterien ebenfalls einen fast vollständigen Abbau von Gliadin. Auch Rizello *et al.* (2007) präsentierten durch eine Kombination diverser Peptidasen aus Milchsäurebakterien und Pilzen ein erfolgreiches System zur Hydrolyse verschiedener Weizenmehle während der Langzeitfermentation. Während Albumine, Globuline und Gliadine durch dieses System vollständig hydrolysiert wurden, blieben etwa 20% der Glutenin-Fraktion bestehen.

Das in der Literatur prominenteste Beispiel zum Glutenabbau ist eine PsP, AN-PEP, aus *A. niger*. AN-PEP gehört zur S28-Familie der Serin-Peptidasen, ist besonders aktiv im sauren pH-Bereich und zeigte sowohl die Hydrolyse von einzelnen zöliakierelevanten Gluten-Peptiden als auch von komplettem Gluten (Edens *et al.* 2005, Stepniak *et al.* 2006). Walter *et al.* (2014) testeten AN-PEP auf den Abbau von zöliakierelevanten Peptiden und verglichen die Aktivität mit Extrakten aus gekeimter Getreidekleie, welche ebenfalls reich an PsP waren. Es wurde gezeigt, dass AN-PEP den Glutengehalt dreier Weizenmehle unter den kritischen Gehalt von 20 mg kg^{-1} hydrolysierte. Zusätzlich wurde unter Zugabe von AN-PEP die Herstellung eines glutenfreien Roggenbrotes gezeigt. Das Brot verfügte über gute sensorische Eigenschaften. Die Zugabe von AN-PEP war zudem nicht hinderlich für die Sauerteigfermentation (Walter *et al.* 2014). Der Vorteil der AN-PEP liegt in der einfachen und kostengünstigen Produktion sowie in der Einhaltung von Qualitätsstandards (Lopez *et al.* 2005). Wie auch AN-PEP zeichnet sich RdoT3 durch eine hohe Thermostabilität aus und kann daher, insbesondere für Backprozesse, ein interessantes Enzym für lebensmittelbiotechnologische Verfahren sein.

Während Gluten massive Probleme bei Zöliakie-Patienten hervorrufen kann, besitzt Reisprotein kein hohes Allergiepotezial und wird oftmals in hypoallergenen Lebensmitteln eingesetzt. Bei der Lebensmittelherstellung kann es jedoch zur Ausbildung von Bitterpeptiden kommen, welche den Geschmack der jeweiligen Produkte negativ beeinflussen. Hierbei spielen die Länge und Aminosäurezusammensetzung der entstandenen Peptidfragmente eine entscheidende Rolle (Guigoz *et al.* 1976). Ishibashi *et al.* (1988) stellten eine stärkere Bitterkeit bei einem vermehrten Vorkommen an hydrophoben Aminosäuren wie Prolin, Valin, Leucin, Phenylalanin oder Alanin fest. Fukui *et al.* (1983) identifizierten das stark bittere Heptapeptid BPl_a (Arg-Gly-Pro-Pro-Phe-Ile-Val) aus Casein. Durch sensorische Evaluierung wurde nachgewiesen, dass das Bitterpeptid mindestens über 6 Aminosäuren verfügen muss; eine Schlüsselrolle für den bitteren Geschmack wurde zudem L-Prolin zugeteilt. Otigari *et al.* (1985) zeigten eine Verstärkung der Bitterkeit von Di- und Tripeptiden, wenn beispielsweise Phenylalanin C-terminal und Glycin N-terminal lokalisiert sind. Die Bitterkeit der Peptide wurde zudem in ihrer Intensität beeinflusst, wenn Arginin und Prolin angrenzend lokalisiert waren. So zeigten beispielsweise das Dipeptid Arg-Pro sowie die Tripeptide Arg-Pro-Gly und Gly-Arg-Pro eine stärkere Bitterkeit als Koffein. Prolin spielt also eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines bitteren

Geschmackseindruckes. Auch für diese Applikation im Bereich der Lebensmittelindustrie könnte RdoT3 eingesetzt werden.

5 Literatur

Applebaum SW, Birk Y, Harpaz I (1964) Comparative studies on proteolytic enzymes of *Tenebrio molitor*. *Comp Biochem Physiol* 11:85–103

Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5301-5317

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

Bale JS (2002) Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philos T Roy Soc B* 357:849–862

Basu A, Li X, Leong SS (2011) Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:241–251

Bezdi MS, Toorchi M, Pourabad RF et al. (2012) Proteome analysis of gut and salivary gland proteins of fifth-instar nymph and adults of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *Arch Insect Biochem Physiol* 81:105–19

Botos I, Meyer E, Nguyen M, Swanson SM, Koomen JM, Russell DH, Meyer EF (2000) The structure of an insect chymotrypsin. *J Mol Biol* (2000) 298:895-901

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Bouws H, Schüttmann I, Zorn H (2008) Pilzsekretome zum effizienten Ligninaufschluss. DBU

Burns C, Gregory KE, Kirby M, Cheung MK, Riquelme M, Elliott TJ, Challen MP, Bailey A, Foster GD (2005) Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns. *Fungal Genetics and Biology* 42:191–199

Buszewska-Forajta M, Struck-Lewicka W, Bujak R, Siluk D, Kaliszan R (2014) Determination of water-soluble components of abdominal secretion of grasshopper (*Chorthippus spp.*) by GC/MS/MS in search for potential wound healing agents. *Chromatographia* 77(15-16):1091–1102

Carrio MM, Villaverde A (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol* 96:3–12

Catassi C, Rossini M, Ratsch IM (1993) Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: a clinical and jejunal morphometric study. *Gut* 34:1515–1519

Chen YS, CHien CH, Goparaju CM (2004) Purification and characterization of human prolyl dipeptidase DPP8 in Sf9 insect cells. *Protein Express Purif* 35:142–146

Conesa A, Götz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinform* 21:3674-3676

Currie CR (2001) A community of ants, fungi, and bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:357–380

Dastranj M, Bandani AR, Mehrabadi M (2013) Age-specific digestion of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) and inhibition of proteolytic and amylolytic activity by plant proteinaceous seed extracts. *J Asia Pac Entomol* 16:309–315

De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, De Simone C, Silano M, De Vincenzi M, Losito I, Gobbetti M (2006) VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. *BBA Mol Bas* 1762: 80–93

Di Cagno R, De Angelis M, Lavermicocca P, De Vincenzi M, Giovannini C, Faccia M, Gobbetti M (2002) Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: Effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol* 68(2): 623–633

Edens L, Dekker P, van der Hoeven R, Deen F, de Roos A, Floris R (2005) Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 53:7950–7957

Elpidina E, Goptar I (2007) Digestive peptidases in *Tenebrio molitor* and possibility of use to treat celiac disease. *Entomol Res* 37:139–147

Elpidina E., Tsybina T., Dunaevsky Y., Belozersky M., Zhuzhikov D., Oppert B. (2005) A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of larvae. *Biochimie* 87(8):771–779

Eng JK, McCormack AL, Yates JR (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom* 5:976-989

Focus (2014) Einschätzung der Häufigkeit von Lebensmittelunverträglichkeiten in der Bevölkerung in Deutschland im Jahr 2014. Statista - Das Statistik-Portal. Juli 2014. 11. Dezember 2014. <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/314821/umfrage/geschaeztzte-haeufigkeit-von-lebensmittelunvertraeglichkeit-in-deutschland/>

Fukui H, Kanehisa H, Ishibashi N, Miyake I, Okai H (1983) Studies of bitter peptides from casein hydrolysate. 1. Synthesis of bitter peptide BPIA corresponding to ARG-GLY-PRO-PRO-PHE-ILE-VAL from casein hydrolysate by alkaline proteinase of *Bacillus subtilis*. *Bull Chem Soc Jpn* 56:766–769

Geßendorfer B, Hartmann G, Wieser H (2011) Determination of celiac disease-specific peptidase activity of germinated cereals. *Eur Food Res Technol* 232:205–209

Goptar IA, Semashko T, Danilenko S et al. (2012) Cysteine digestive peptidases function as post-glutamine cleaving enzymes in tenebrionid stored-product pests. *Comp Biochem Phys B* 161:148–154

Green P, Cellier C. (2007) Celiac disease. *N Engl J Med* 357:1731–1743

Grillo LA, Majerowicz D, Gondim KC (2007) Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochem Molec Biol* 37:579–588

Grimrath A, Berends P, Rabe S, Berger RG, Linke D (2011) Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. *Eur Food Res Technol* 232:415–424

Gross J, Schumacher K, Schmidtberg H, Vilcinskis A (2008) Protected by fumigants: Beetle perfumes in antimicrobial defense. *J Chem Ecol* 34(2):179–188

Guigoz Y, Solms J (1976) Bitter peptides, occurrence and structure. *Chemical Senses and Flavor* 2:71–84

Hartley DL, Kane JF (1988) Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Soc Trans* 16:101–102

Hartmann G, Köhler P, Wieser H (2006) Rapid degradation of gliadin peptides toxic for celiac disease patients by proteases from germinating cereals. *J Cereal Sci* 44:368–371

He M, Jin L, Austen B (1992) Specificity of factor Xa in the cleavage of fusion proteins. *J Prot Chem* 12(1):1–5

- Hedstorm L (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 102:4501-4523
- Herrera-Estrella LR (2000) Genetically modified crops and developing countries. *Plant Physiol* 124:923–926
- Hodkinson ID, Casson D (1991) A lesser predilection for bugs: Hemiptera (Insecta) diversity in tropical forests. *Biol J Linn Soc* 43:101–119.
- Ishibashi N, Ono I, Kato K, Shigenaga T, Shinoda I, Okai H, Fuki S (1988) Role of the hydrophobic amino acid residue in the bitterness of peptides. *Agric Biol Chem* 52:91–94
- Kilcawley KN, Wilkinson MG, Fox PF (2002) Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme Microb Technol* 31:310–320
- Kleist G (2001) Rotstreifigkeit im Fichtenholz – ein Pilzschaden und seine Ursachen. *Z Mykol* 67(2):213-224
- Konarev AV, Beaudoin F, Marsh J (2011) Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of sunn bug *Eurygaster integriceps* put. *J Agric Food Chem* 59:2462–2470
- Kumar P, Pandit SS, Baldwin IT (2012) Tabaco rattle virus vector: A rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interferences. *PLoS ONE* 7(2):e31347
- Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Landureau JC, Jolles P (1970) Lytic enzyme produced in vitro by insect cells: lysozyme or chitinase. *Nature* 225:968–9

Lopez M, Edens L (2005) Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem. 53:7944–7949

López-Otín C, Bond JS (2008) Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. J Biol Chem 283:30433–30437

Lottenberg R, Jackson CM, (1983) Solution composition dependent variation in extinction coefficients for *p*-Nitroanilide. BBA 742:558-564

Lowry OH, Rosebrough A, Farr L, Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275

Machado Pereira M, Alcantara Silva B, Ribeiro Pinto M, Barreto-Bergter E, Souza dos Santos AL (2009) Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB. Mycopathologia 167:25–30

Mehrabadi M, Bandani AR, Saadati F, Mahmudvand M (2011) α -amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. J Agr Sci Tech 13:1173–1182

Morris K, Lorenzen MD, Hiromasa Y, Tomich JM, Oppert C, Elpidina EN, Vinokurov K, Jurat-Fuentes JL, Fabrick J, Oppert B (2009) *Tribolium castaneum* larval gut transcriptome and proteome: a resource for the study of the coleopteran gut. J Proteome Res 8:3889–3898

Murdock, L. L., Brookhart G., Dunn P. E. Foard D. E., Kelley S., Kitch L. *et al.* (1987) Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol 87(4):783–787

Nielsen (2014) Aussagen zum ökologischen Bewusstsein beim Lebensmittelkauf in Deutschland in den Jahren 2010 bis 2013. Statista - Das Statistik-Portal. September 2014. 10. Dezember 2014 <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/324326/umfrage/aussagen-zum-oekologischen-bewusstsein-beim-lebensmittelkauf-in-deutschland/>

Otagiri K, Nosho Y, Kouge K, Ishibashi N, Okai H, Tatsumi K, Kikuchi E (1985) Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. I. bitter taste of di- and tripeptides, and bitterness increase of the model peptides by extension of the peptide chain. *Agric Biol Chem* 49(4):1019-1026

Ozidal M, Incekara U, Polat A, Gur O, Kurbanoglu EB, Tasar GE (2012) Isolation of filamentous fungi associated with to common edible aquatic insects *Hydrophilus piceus* and *Dytiscus marginalis*. *JMBFS* 2(1):95–105

Piasecka-Kwiatkowska D, Nawrot J, Zielinska-Dawidziak M, Gawlak M, Michalak M (2014) Detection of grain infestation caused by the granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) using zymography for α -amylase activity. *Journal of Stored Products Research* 56:43–48

Polgár L (2005) The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* 62:2161-2172

Poshina D, Novozhilov E (2015) Modification of spruce sulphite pulp by cellulose treatment. *Cellulose Chem Technol* 49 (2):187-194

Prabhakar S, Chen MS, Elpidina EN, Vinokurov KS, Smith CM, Marshall J, Oppert B (2007) Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Insect Mol Biol* 16:455–468

Rizzello C, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, De Vincenzi M, De Bari M, Palmisano F, Maurano F, Gianfrani C, Gobbetti M (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: New perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 73:4499–4507

Saboia-Vahia L, Borges-Veloso A, Mesquita-Rodrigues C, Cuervo P, Dias-Lopes G, Britto C, de Barros Silva AP, De Jesus JB (2013) Trypsin-like serine peptidase profiles in the egg, larval, and pupal stages of *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors* 6:50

Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, Levings MK, Stefanile R, de Giulio B (2005) Recombinant human IL-10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured celiac intestinal mucosa. *Gut* 54:46–53

Schlupalius DI, Valmas, N, Tuck AG; Jagadeesan R, Ma L; Kaur R (2012): A core metabolic enzyme mediates resistance to phosphine gas. *Science* 338(6108):807–810

Schuppan D, Junker Y, Barisani D (2009) Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* 137:1912-1933

Schwalb T, Wieser H, Köhler P (2011): Vergleich verschiedener Proteinreferenzen und ELISA-Kits. *Dtsch Lebensm Rundsch* 107(7):306-312

Schwalb T, Wieser H, Köhler P (2012) Studies on the gluten-specific peptidase activity of germinated grains from different cereal species and cultivars. *Eur Food Res Technol* 235:1161–1170

Scully ED, Hoover K, Carlson J, Tien M, Geib SM (2012) Proteomic analysis of *Fusarium solani* isolated from the asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis*. *PLoS ONE* 7(4):e32990

Sezonov G, Joselau-Petit D, D'Ari R (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189:8746–8749

Shen Z, Pappan K, Mutti NS et al. (2005) Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. *J Insect Sci* 5:21

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen J V, Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1:2856-2860

Shewry PR, Tatham AS (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem J* 267:1-12.

Suh DY, Hyun MW, Kim SH, Seo ST, Kim KH (2011) Filamentous fungi isolated from *Platyplus koryoensis*, the insect vector of oak wilt disease in Korea. *Mycobiology* 39(4):313-316

Stressler T, Eisele T, Schlayer M, Lutz-Wahl S, Fischer L (2013) Characterization of the recombinant exopeptidases PepX and PepN from *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 important for food protein hydrolysis. *PLOS ONE* 8(7):e70055

Swajcer-Dey E, Rasmussen J, Meldal M, Breddam K (1992) Proline-specific endopeptidases from microbial sources: isolation of an enzyme from *Xanthomonas sp.* *J Bacteriol* 174:2454-2459

Szweda RT, Schmidt K, Zorn H (2013) Bleaching of colored whey and milk by a multiple-enzyme system. *Eur Food Res Technol* 237:377–384

Thomas L, Sindhu R, Binod P, Pandey A (2015) Production of a cellulase-free alkaline xylanase from *Bacillus pumilus* MTCC 5015 by submerged fermentation and its application in biobleaching. *Indian J Exp Biol* 53:356-363

Towbin H.; Staehelin T.; Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354

Tack G, van de Water J, Bruins MJ, Kooy-Winkelaar EMC, van Bergen J, Bonnet P, Vreugdenhil ACE, Korponay-Szabo I, Edens L, von Blomberg M, Schreurs M, Mulder CJ,

Koning F (2013) Consumption of gluten with gluten-degrading enzyme by celiac patients: A pilot-study. *World J Gastroenterol* 19(235):5837–5847

Terra WR, Cristofolletti PT (1996) Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comp Biochem Physiol* 113:725–730

Toft-Hansen H, Rasmussen KS, Staal A, Roggen EL, Sollid LM, Lillevang ST, Barington T, Husby S (2014) Treatment of both native and deamidated gluten peptides with an endopeptidase from *Aspergillus niger* prevents stimulation of gut-derived gluten-reactive T cells from either children or adults with celiac disease. *Clin Immunol* 153:323–331

Vader LW, Stepniak D, Bunnik E, Kooy Y, de Haan W, Drijfhout J, van Veelen P, Koning F (2003) Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* 125:1105–1113

Vera A, Gonzalez-Montalban N, Aris A, Villaverde A (2007) The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol Bioeng* 96:1101-1106

Vinokurov K, Elpidina E, Oppert B et al. (2006) Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion. *Comp Biochem Phys B* 145:138–146

Vinokurov K, Elpidina E, Zhuzhikov D et al. (2009) Digestive proteolysis organization in two closely related Tenebrionid beetles: red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium confusum*). *Arch Insect Biochem Physiol* 70:254–279

Walter T, Wieser H, Koehler P (2014) Degradation of gluten in rye sourdough products by means of a proline-specific peptidase. *Eur Food Res Technol* 240(3):517-524

Wang Y, Yan H, Wang Y, Yang H, Wei L, Xiao Y, Ye H, Lai R, Liu R (2012) Proteomics and transcriptome analysis coupled with pharmacological test reveals the diversity of anti-thrombosis proteins from the medical insect, *Eupolyphaga sinensis*. *Insect Biochem Molec Biol* 42:537–544

Weickert MJ, Pagratis M, Glascock CB, Blackmore R (1999) A mutation that improves soluble recombinant hemoglobin accumulation in *Escherichia coli* in heme excess. *Appl Environ Microbiol* 65:640-647

Yang Q, Xu J, Li M, Lei X, An L (2003) High-level expression of a soluble snake venom enzyme, glosedobion in *E. coli* in the presence of metal ions. *Biotechnol Lett* 25:607-610

Zhu YC, Baker JC (1999) Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochem Molec Biol* 29:1053–1063

Zhu YC, Baker JE (2000) Molecular cloning and characterization of a midgut chymotrypsin-like enzyme from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Archi Insect Biochem Physiol* 43:173–184

6 Anhang

6.1 Peptidabbau Fraktionen A - D

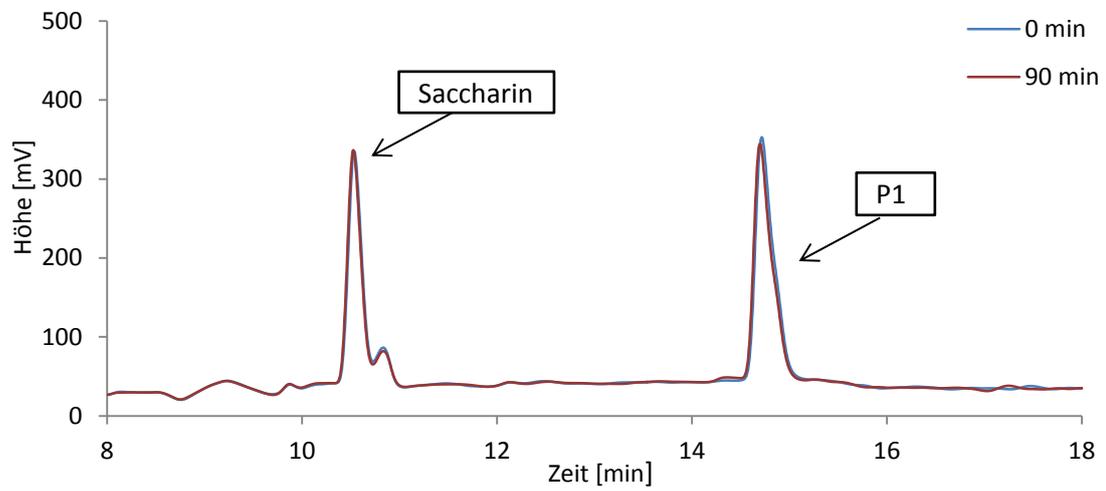


Abb. 7.1: Fraktion A Peptidabbau Peptid P1 nach 0 sowie 90 min

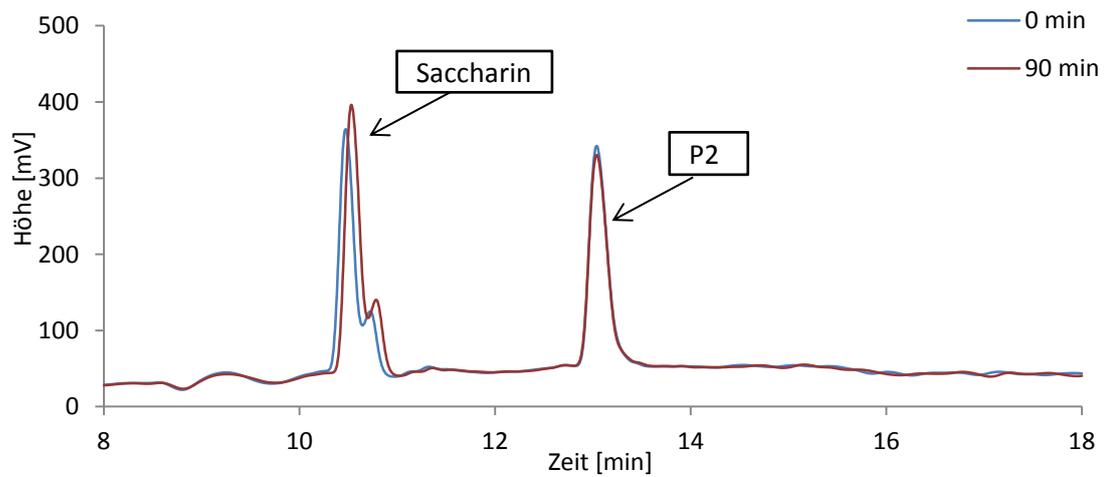


Abb. 7.2: Fraktion A Peptidabbau Peptid P2 nach 0 sowie 90 min

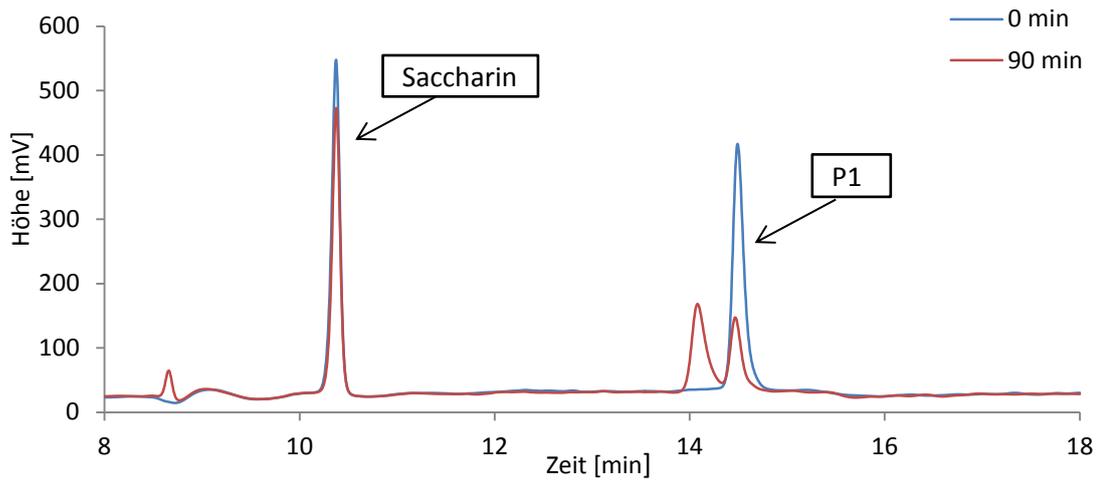


Abb. 7.3: Fraktion B Peptidabbau Peptid P1 nach 0 sowie 90 min

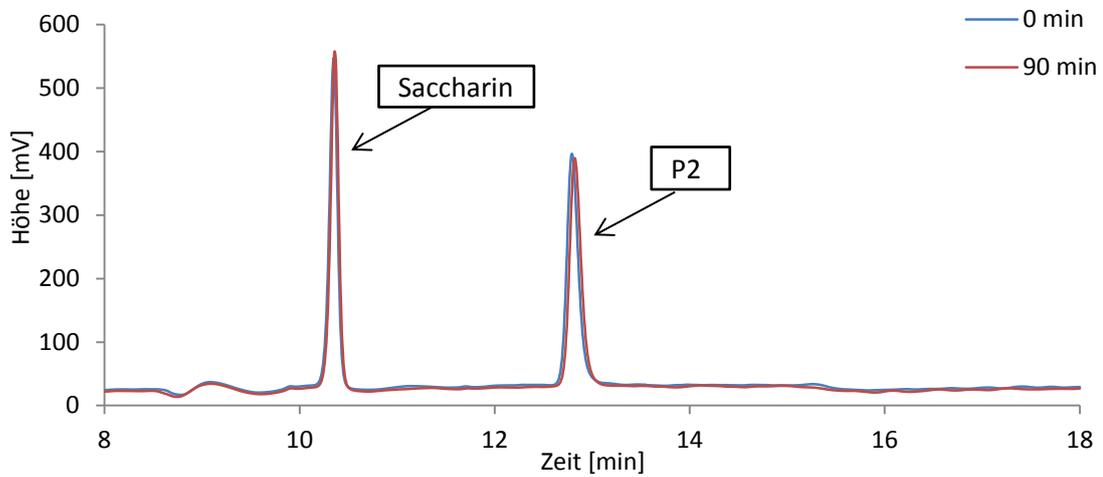


Abb. 7.4: Fraktion B Peptidabbau Peptid P2 nach 0 sowie 90 min

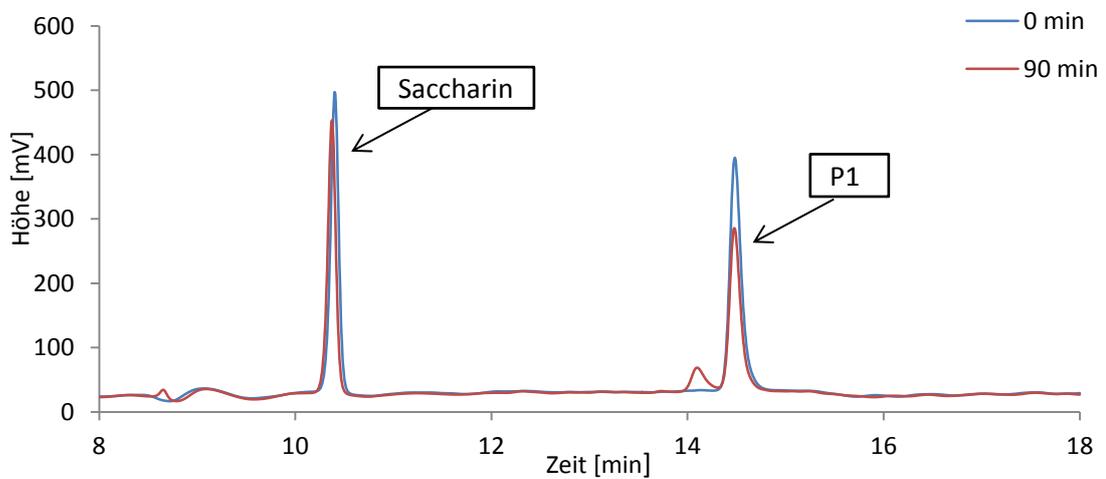


Abb. 7.5: Fraktion C Peptidabbau Peptid P1 nach 0 sowie 90 min

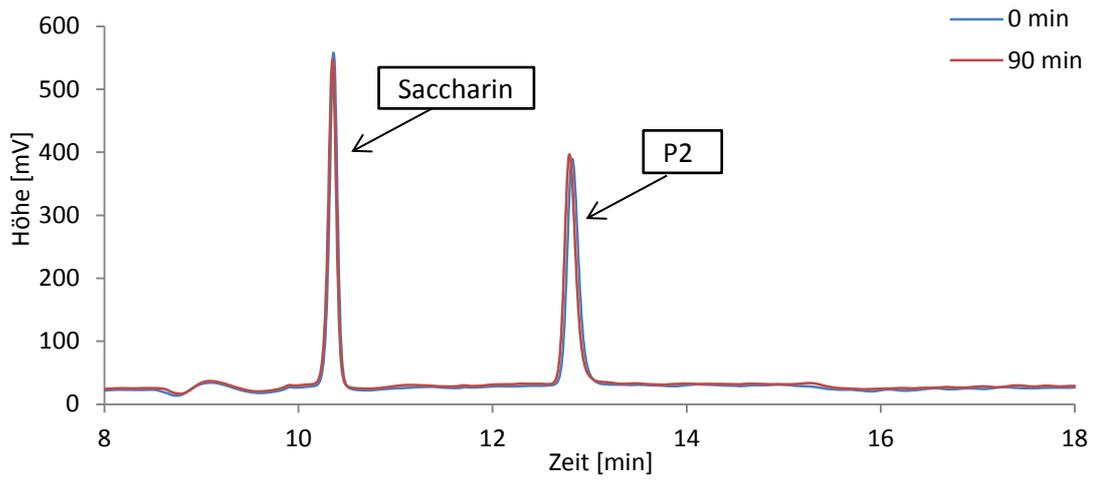


Abb. 7.6: Fraktion C Peptidabbau Peptid P2 nach 0 sowie 90 min

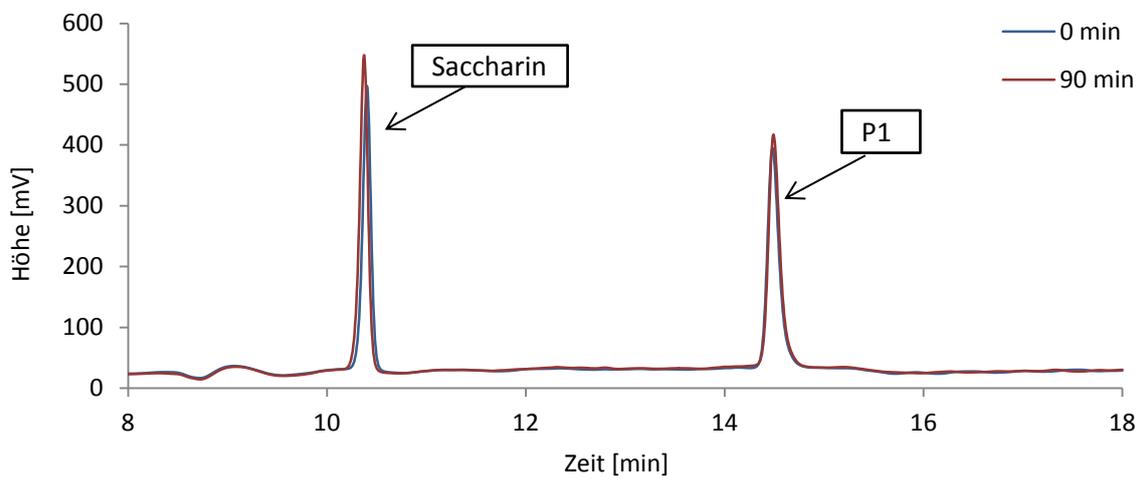


Abb. 7.7: Fraktion D Peptidabbau Peptid P1 nach 0 sowie 90 min

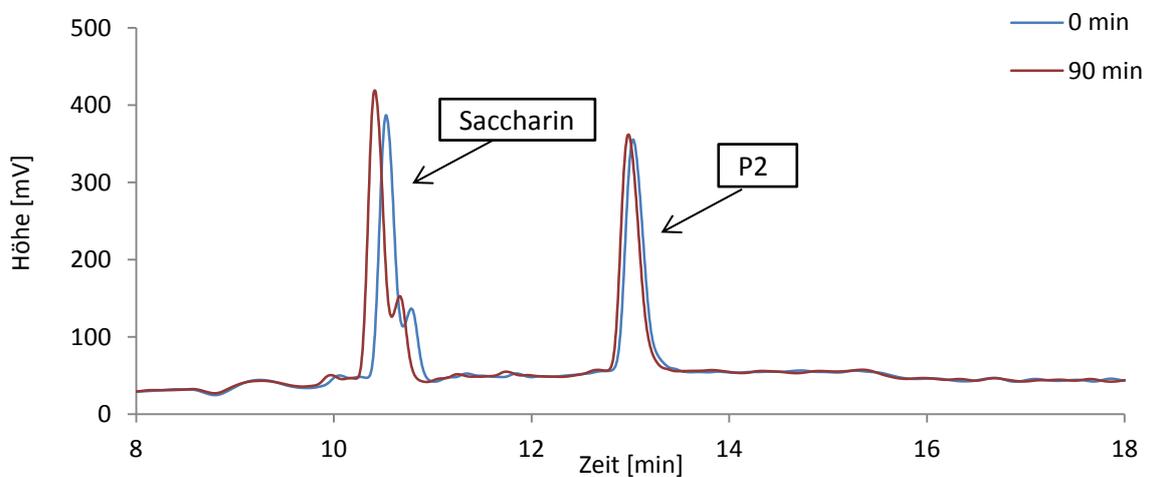


Abb. 7.8: Fraktion D Peptidabbau Peptid P2 nach 0 sowie 90 min