

**Enzymatische Oligomerisierung von  
Lebensmittelproteinen unter Hochdruck:  
Reaktionsorte und funktionelle Konsequenzen**

**DISSERTATION**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt**

**der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden**

**von**

**Susanne Schuh**

**Eingereicht am 10.12.2012**

Die Dissertation wurde in der Zeit von September 2007 bis Juli 2012 an der  
Professur für Lebensmittelchemie angefertigt.

**Disputation:** 25.04.2013

**Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle

Prof. Dr. rer. nat. Harshadrai Rawel

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1 Lysozym	3
2.1.1 Wirkmechanismen des Lysozyms	4
2.1.2 Anwendungsmöglichkeiten von Lysozym	7
2.1.3 Modifizierung des Lysozyms	8
2.1.3.1 Fibrillen und amyloide Strukturen von HEWL	9
2.1.3.2 Neue biologische Funktionen durch Konformationsänderung	13
2.1.4 Evolutionäre Entwicklung und Verwandtschaft zu $\alpha$ -Lactalbumin	14
2.2 Die enzymatische Vernetzung	15
2.2.1 Mikrobielle Transglutaminase	15
2.2.1.1 TGase katalysierte Reaktionen und Reaktionsmechanismus	17
2.2.1.2 Analytische Aspekte	19
2.2.1.3 Einsatz in der Lebensmittelindustrie	19
2.3 Nicht-enzymatische Vernetzung	21
2.3.1 Thermisch induzierte Vernetzung	21
2.3.2 In-Vacuo Zero-Length Cross-Linking	23
2.3.3 Anwendungsmöglichkeiten nicht-enzymatisch vernetzter Proteine	23
2.4 Wirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Proteine	24
2.4.1 Wirkung von Hochdruck auf Hühnereiweiß-Lysozym	26
2.4.2 Wirkung von Hochdruck auf die mikrobielle Transglutaminase	27
<b>3 Experimenteller Teil</b>	<b>29</b>
3.1 Chemikalien, Materialien, Geräte und Software	29
3.1.1 Chemikalien	29
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	31
3.1.3 Untersuchungsmaterialien	33
3.1.4 Software	33

3.2	Erzeugung modifizierter Proteine.....	34
3.2.1	Enzymatische Vernetzung von Proteinen .....	34
3.2.1.1	Erzeugung von Protein-Oligomeren unter Hochdruck .....	34
3.2.1.2	Reinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) .....	35
3.2.1.3	Konzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung .....	35
3.2.2	Thermisches und Vakuum-induziertes Zero-length Cross-linking.....	36
3.3	Erzeugung von HEWL-Fibrillen.....	38
3.4	Isolierung von $\alpha$ -Lactalbumin.....	38
3.5	Dialyse der Proteinlösungen.....	39
3.6	Aktivität der Transglutaminase.....	39
3.7	Analytische Verfahren zur Strukturuntersuchung und Charakterisierung der Proteinproben .....	41
3.7.1	Restwasserbestimmung mittels Karl-Fischer-Titration .....	41
3.7.2	Proteinbestimmung mittels Lowry .....	42
3.7.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
3.7.4	Aminosäureanalytik (ASA) .....	47
3.7.4.1	Saure Hydrolyse .....	49
3.7.4.2	Enzymatische Hydrolyse.....	49
3.7.5	Hochdruckflüssigchromatographie mit anschließender Massenspektroskopie (RP-HPLC/ESI-TOF-MS) .....	51
3.7.5.1	Probenvorbereitung - Tryptischer Verdau.....	51
3.7.5.2	RP-HPLC/ESI-TOF-MS-Messung .....	51
3.7.6	Aktivitätsbestimmung für HEWL und HEWL-haltige Proben.....	52
3.7.6.1	Klassische Methode - Trübungsassay.....	52
3.7.6.2	Modifizierte Methode der Aktivitätsermittlung mit Blue-ML .....	53
3.7.7	Methode zur Oberflächenhydrophobitätsermittlung.....	54
3.7.8	Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur mittels Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie) .....	56
3.7.9	Charakterisierung der HEWL-Fibrillen.....	57
3.7.9.1	8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure-Assay (ANS-Assay).....	57
3.7.9.2	Kongorot-Assay .....	58
3.7.9.3	Thioflavin-T-Assay .....	59
3.7.9.4	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	61

---

3.7.10	Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit .....	62
3.7.10.1	Agardiffusionstest .....	62
3.7.10.2	Bakterieller Hemmtest .....	63
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1	Enzymatische Vernetzung von HEWL mittels mTGase und Einfluss verschiedener Reaktionsparameter .....	64
4.1.1	Geeignete Puffersysteme und pH-Werte .....	67
4.1.2	Einfluss variierender Inkubationsdauer und unterschiedlicher Drücke .....	68
4.1.3	Einfluss der Lysozymkonzentration .....	70
4.1.4	Einfluss der mTGase-Aktivität .....	71
4.1.5	Temperatur .....	73
4.1.6	Optimierte Parameter für den höchstmöglichen Vernetzungsgrad .....	74
4.2	Analytik der Isopeptide .....	76
4.2.1	Identifizierung des N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin-Isopeptids (Glu_Lys) .....	76
4.2.2	Beurteilung einer intra- und intermolekularen Vernetzung .....	79
4.2.3	Lokalisierung der reaktiven Lysin- und Glutaminreste mittels HPLC/MS .....	80
4.2.4	Strukturvorschlag .....	88
4.3	Isolierung und Konzentrierung enzymatisch vernetzter Lysozym-Oligomere .....	89
4.3.1	Ammoniumsulfatfällung .....	89
4.3.2	Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie .....	91
4.4	Funktionelle Charakterisierung der LMW-, MMW- und HMW-Proben des HEWL .....	96
4.4.1	Vergleichende Untersuchungen der verbleibenden Enzymaktivität .....	97
4.4.2	Beurteilung der Oberflächenhydrophobität .....	100
4.4.3	Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur .....	104
4.4.4	Fibrillbildung und -eigenschaften von HEWL .....	109
4.4.4.1	Etablierung der Charakterisierungsmethoden für HEWL-Fibrillen .....	110
4.4.4.2	Fibrillinduktion an HEWL-Präparaten ausgewählter Vernetzungsgrade .....	118
4.4.5	Antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen .....	126
4.5	Vergleichende Untersuchungen an dem strukturanalogen Protein $\alpha$ -Lactalbumin ...	137
4.6	Orientierende Untersuchungen zur nicht-enzymatischen In-Vakuo-Thermo-Vernetzung von HEWL und ausgesuchten Proteinen .....	142
4.6.1	Einfluss verschiedener Reaktionsparameter auf die Vernetzung von HEWL .....	143

## Inhaltsverzeichnis

---

4.6.2	Identifizierung der gebildeten Isopeptide.....	145
4.6.3	Vergleich der nicht-enzymatischen und enzymatischen Vernetzung von HEWL ..	146
4.6.4	Vergleich der In-Vakuo-Thermo-Vernetzung an HEWL mit $\beta$ -Casein und erste Untersuchungen an einem Molkenproteinisolat.....	149
4.7	Fazit der Untersuchungen zur enzymatischen und der nicht-enzymatischen Vernetzung verschiedener Proteine .....	152
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>154</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>157</b>
	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>172</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>173</b>
	<b>Versicherung</b> .....	<b>174</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 2-1:</b> Dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur des HEWL (pdb-File 1e8l).....	4
<b>Abbildung 2-2:</b> Primärstruktur im Vergleich mit der Sekundärstruktur von Lysozym (pdb-File: 1e8l).....	4
<b>Abbildung 2-3:</b> schematischer Querschnitt über den äußeren Abgrenzungsbereich grampositiver (links) und gramnegativer Mikroorganismen (rechts) ( <i>Ibrahim et al., 2002</i> ) .....	5
<b>Abbildung 2-4:</b> mögliche katalytische Reaktionsmechanismen für HEWL, A: Koshland-Mechanismus, B: Phillips-Mechanismus ( <i>Vocadlo et al., 2001</i> ) .....	6
<b>Abbildung 2-5:</b> Mikroskopische Darstellung <i>in vitro</i> erzeugter Fibrillen des HEWL ( <i>Wang et al., 2009a</i> )	10
<b>Abbildung 2-6:</b> Kinetik der Fibrillierung analog einer sigmoidalen Kurve ( <i>Nielsen et al., 2001</i> ) .....	11
<b>Abbildung 2-7:</b> Vergleich der Primärstrukturen von HEWL (LYSC_CHICK) mit bovinem $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA, LALBA_BOVIN) ( <a href="http://www.uniprot.org/align">www.uniprot.org/align</a> ) .....	15
<b>Abbildung 2-8:</b> Sekundärstruktur der mTGase nach <i>Kashiwagi et al. (2002)</i> (pdb-File 1iu4).....	16
<b>Abbildung 2-9:</b> mTGase katalysierte Reaktionen ( <i>Lauber, 2002; Jaros et al., 2006</i> ) .....	17
<b>Abbildung 2-10:</b> postulierter Ping-Pong-Reaktionsmechanismus ( <i>Kashiwagi et al., 2002</i> ) .....	18
<b>Abbildung 2-11:</b> Bildung von Lysinoalanin (LAL) aus Dehydroalanin (DHA) und Lysin ( <i>Annan und Manson, 1981</i> ).....	21
<b>Abbildung 2-12:</b> Phasendiagramm des HEWL bei pH 2, mittels Fluoreszenzmessung ( <i>Maeno et al., 2009</i> ).....	26
<b>Abbildung 2-13:</b> Inaktivierung der mTGase unter Hochdruckbehandlung bei 0,1, 200, 400, und 600 MPa und je 40°C ( <i>Menéndez, 2006</i> ) .....	27
<b>Abbildung 3-1:</b> Versuchsschema Zero-Length Cross-Linkings .....	37
<b>Abbildung 3-2:</b> Kalibriergerade: Abhängigkeit der UV-Absorption bei $\lambda = 525$ nm von der Konzentration an L-Glutaminsäure- $\gamma$ -hydroxamat.....	40
<b>Abbildung 3-3:</b> Kalibriergerade, Abhängigkeit der UV-Absorption bei $\lambda = 660$ nm von der Konzentration an HEWL [ $\mu\text{g/ml}$ ] .....	43
<b>Abbildung 3-4:</b> Kalibrierung des ANS-Assays mit $\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 480$ nm, unbehandeltes HEWL im Vergleich zu HEWL nach Fibrillierung über 96 h (nach <i>Wang et al., 2009b</i> ) .....	58
<b>Abbildung 3-5:</b> Ausschnitt aus UV-VIS-Spektren, 5 $\mu\text{M}$ Kongorot-Standard und fibrilliertes HEWL nach 96 h (nach <i>Wang et al., 2009b; Krebs et al., 2000</i> ).....	59
<b>Abbildung 3-6:</b> Kalibrierung des ThT-Assays, $\lambda_{\text{ex}} = 440$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 485$ nm, unbehandeltes HEWL im Vergleich zu HEWL nach Fibrillierung über 96 h (nach <i>Wang et al., 2009b</i> ) .....	60
<b>Abbildung 4-1:</b> SDS-Page der mTGase und/oder HD behandelten HEWL-Proben .....	65
<b>Abbildung 4-2:</b> Mittels SDS-PAGE ermittelte Gehalte an Mono- und Oligomeren nach Inkubation von 2% HEWL mit 80 U mTGase/g Protein bei 40°C und 600 MPa für 15, 30, 60 oder 120 min .....	69
<b>Abbildung 4-3:</b> SDS-PAGE von HEWL mit mTGase unter variierenden Drücken inkubiert .....	70
<b>Abbildung 4-4:</b> Korrelation zwischen Monomergehalt und Oligomerenanteil des HEWL bei verschiedenen Konzentrationen, konstanten 40 U mTGase/g Protein über 30 min, 600 MPa und 40°C .	71
<b>Abbildung 4-5:</b> variierende Mengen an mTGase .....	72
<b>Abbildung 4-6:</b> SDS-PAGE der stark vernetzten HEWL-Probe .....	75
<b>Abbildung 4-7:</b> Chromatogramm des Isopeptidstandards N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin (Glu_Lys) nach enzymatischer Hydrolyse (EH) und saurer Hydrolyse (SH), sowie Blindwert der EH (BW) .....	77
<b>Abbildung 4-8:</b> ASA-Chromatogrammausschnitt des HEWL-Standards; unbehandeltes HEWL mit dem Isopeptid-Standard (Glu_Lys) und das reine Isopeptid (Glu_Lys) .....	78
<b>Abbildung 4-9:</b> Chromatogrammausschnitt des enzymatisch hydrolysierten HEWL nach HD; mit mTGase; LMW (Vernetzungsgrad 12,3%) und HEWL mit mTGase nach HD.....	78

<b>Abbildung 4-10:</b> RP-HPLC des tryptisch verdauten HEWL.....	81
<b>Abbildung 4-11:</b> Massenspektren bei einer Retentionszeit von 18,1 min (in Zusammenhang mit Abbildung 4-10) .....	82
<b>Abbildung 4-12:</b> Massenspektren der sechs identifizierte Isopeptidsequenzen (A - F) nach tryptischem Verdau bei verschiedenen Retentionszeiten und deren Isopeptidfragmente.....	85
<b>Abbildung 4-13:</b> Lysin und Glutaminreste innerhalb der Tertiärstruktur des HEWL (pdb-File 1e8l) .....	86
<b>Abbildung 4-14:</b> SDS-PAGE der resolubilisierten Präzipitate nach Fällung mit 25%iger, 40%iger und 60%iger gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung, von enzymatisch vernetztem HEWL (LMW) .....	90
<b>Abbildung 4-15:</b> UV-Spektrum einer 0,5%igen unbehandelten HEWL-Probe .....	92
<b>Abbildung 4-16:</b> Gelpermeationschromatographie (GPC) bei 240 nm vom Leerwert - nur Tris-HCl-Puffer, Dextranblau-Totvolumen (2000 kDa), unbehandeltes HEWL (1%, w/v) und HMW (0,8%, w/v).....	92
<b>Abbildung 4-17:</b> Gelpermeationschromatographie (GPC) Chromatogramm einer HMW-Probe, 20 mg Probe in 2,5 ml Tris-HCl-Puffer ohne bzw. mit 3 M oder 6 M Harnstoff .....	94
<b>Abbildung 4-18:</b> SDS-Page der GPC-Fraktionen F1 - F6 nach Lösen der HMW-Probe .....	94
<b>Abbildung 4-19:</b> Einzelne Oligomeranteile in den GPC-Fraktionen (F1 - F6) in der HMW-Probe .....	95
<b>Abbildung 4-20:</b> Vergleich von ML-Blue und Trübungsassay zur Bestimmung der Lyseaktivität .....	98
<b>Abbildung 4-21:</b> A - Trübungsassay; B - ML Blue Aktivitätstest; ○ : vernetzte und über GPC fraktionierte Proben, ■ : vernetzte Proben (nicht GPC-gereinigt), Δ : unbehandeltes HEWL (Ausgangprobe).....	99
<b>Abbildung 4-22:</b> Oberflächenhydrophobität; Proben analog zu Abbildung 4-1: .....	101
<b>Abbildung 4-23:</b> Oberflächenhydrophobität ermittelt über den Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Interaktion mit 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) gegenüber dem Vernetzungsgrad .....	102
<b>Abbildung 4-24:</b> CD-Spektren im Nah-UV-Bereich von 260 bis 320 nm.....	105
<b>Abbildung 4-25:</b> Ferne UV-VIS Spektren von 190 bis 260 nm.....	107
<b>Abbildung 4-26:</b> ANS-Fluoreszenzintensität von HEWL, unbehandelt (0,5 mg/ml), über verschiedene Zeiträume inkubiert bei pH 2,2 und 55°C unter Zusatz der ANS-Lösung bei $\lambda_{ex} = 370$ nm .....	111
<b>Abbildung 4-27:</b> Ergebnisse des ANS-Assays mit nicht vernetztem HEWL nach Inkubation.....	112
<b>Abbildung 4-28:</b> Absorptionsspektren von 200 bis 700 nm des HEWL inkubiert bei pH 2,2 und 55°C über verschiedene Inkubationszeiten mit Kongorot, sowie unbehandeltes HEWL und Kongorot .....	113
<b>Abbildung 4-29:</b> Kalibrierung des Kongorot-Assays, UV-VIS-Messung bei $\lambda = 540$ nm (nach <i>Wang et al., 2009b</i> ).....	114
<b>Abbildung 4-30:</b> Ergebnisse des Kongorot-Assays mit nicht vernetztem HEWL nach Inkubation bei pH 2,2, 55°C über 96 h, $\lambda = 540$ nm.....	115
<b>Abbildung 4-31:</b> ThT-Fluoreszenzintensitäten bei $\lambda_{ex} = 440$ nm von HEWL (0,5 mg/ml) inkubiert über variierende Zeiträume.....	116
<b>Abbildung 4-32:</b> Ergebnisse des ThT-Assays mit nicht vernetztem HEWL, $\lambda_{ex} = 440$ nm und $\lambda_{em} = 485$ nm.....	117
<b>Abbildung 4-33:</b> Ergebnisse des ANS-, Kongorot und ThT-Assays (A - C) mit unbehandeltem und vernetztem HEWL (LMW und HMW) nach Inkubation .....	119
<b>Abbildung 4-34:</b> Lösungen der unbehandelten HEWL-Probe und die nach 96 h bei pH 2,2 und 55°C inkubierten HEWL-, LMW- und HMW-Fibrillierungen (v.l.n.r.).....	120
<b>Abbildung 4-35:</b> Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen (TEM) von unbehandeltem HEWL und Proben nach Fibrillierung.....	121
<b>Abbildung 4-36:</b> SDS-PAGE von unbehandeltem HEWL sowie LMW- und HMW-Proben vor (0 h) und nach (96 h) Inkubation .....	122
<b>Abbildung 4-37:</b> Oben - schematische Sekundärstruktur von HEWL; Unten - Aminosäuresequenz von HEWL (nach <i>Frare et al., 2004</i> ).....	124

---

<b>Abbildung 4-38:</b> Hemmhofstest exemplarisch an <i>Bacillus subtilis</i> (grampositiv) mit je 0,4%igen (w/v) Proben .....	127
<b>Abbildung 4-39:</b> Hemmhofstest exemplarisch an <i>Pseudomonas putida</i> (gramnegativ) mit je 0,4%igen (w/v) Proben .....	128
<b>Abbildung 4-40:</b> Abgebildet ist reines HNB-Medium nachfolgend mit Bakterienzusatz, nur HEWL- bzw. HMW-Probenzugabe (je 0,1%, w/v) (v.l.n.r).....	129
<b>Abbildung 4-41:</b> Probelösungen des Trübungsassays nach 16 h Inkubation im Schüttler mit Bakterienzusatz und Proteinzugabe (0,1%), mit/ohne Guanidinhydrochlorid.....	130
<b>Abbildung 4-42:</b> Trübungstest der hoch vernetzten Probe (HMW) in HNB-Medium ohne Bakterienzusatz, $\lambda = 600$ nm, 14 h bei 30 °C im Schüttler.....	130
<b>Abbildung 4-43:</b> Trübungstest für <i>Bacillus subtilis</i> in Konzentrationen (0,1-0,00625%), $\lambda = 600$ nm ....	131
<b>Abbildung 4-44:</b> Trübungstest für <i>Escherichia coli</i> in Konzentrationen (0,1-0,00625%), $\lambda = 600$ nm....	132
<b>Abbildung 4-45:</b> Ausplattierte <i>Bacillus-subtilis</i> -Lösungen auf HNB-Agar nach Inkubation im Trübungsassay .....	133
<b>Abbildung 4-46:</b> Trübungstest <i>Bacillus subtilis</i> mit MMW- und HMW-Probe in Konzentrationen (0,625% - 0,01%), 600 nm .....	135
<b>Abbildung 4-47:</b> SDS-PAGE der $\alpha$ -LA-Proben ohne Ca-Zusatz .....	139
<b>Abbildung 4-48:</b> SDS-PAGE der $\alpha$ -LA-Proben mit Ca-Zusatz .....	139
<b>Abbildung 4-49:</b> Vergleich der Positionen von Glutamin- (links) und Lysinresten (rechts) in $\alpha$ -LA (oben, pdb-File 1f6r) und HEWL (unten, pdb-File 1e8l) .....	141
<b>Abbildung 4-50:</b> SDS-PAGE von HEWL und nach Inkubation: evakuiert mit 85 °C, pH 7 über 24 h und bis zu sechs Zyklen (1 - 6), vgl. zu <i>Simons et al. (2002)</i> .....	145
<b>Abbildung 4-51:</b> ASA-Chromatogrammausschnitt, HEWL unbehandelt, bei 85 und 100 °C unter Normaldruck, pH 7 nach je 4 Zyklen über 24 h Inkubation, sowie unbehandeltes HEWL mit Isopeptidstandard Asp_Lys bzw. Glu_Lys .....	146
<b>Abbildung 4-52:</b> SDS-PAGE des enzymatisch und nicht-enzymatisch vernetzten HEWL .....	147
<b>Abbildung 4-53:</b> SDS-PAGE von HEWL, $\beta$ -CN und Molkenproteinisolat (ARLA) nach je drei Zyklen unter Standardbedingungen mit 85 °C über 24 h und pH 7 .....	150
<b>Abbildung 4-54:</b> ASA-Chromatogrammausschnitt nach EH von HEWL (links) und $\beta$ -CN (CN, rechts), unbehandelt und nach thermischer Inkubation (ZLCL) .....	151

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2-1:</b> Modifikationen des Hühnereiweißlysozyms über ausgewählte physikalische Prozesse .....	8
<b>Tabelle 2-2:</b> Modifikationen verschiedener Lysozyme mittels chemischer Parameter .....	9
<b>Tabelle 2-3:</b> Bedingungen und Charakteristika der Fibrillierung von HEWL, (nach <i>Trexler und Nilsson, 2007</i> ) .....	12
<b>Tabelle 2-4:</b> Vergleich von HEWL und bovinem $\alpha$ -Lactalbumin .....	15
<b>Tabelle 2-5:</b> Allgemeine Anwendungsbereiche der mTGase ( <i>Marx, 2008; Jaros et al., 2006</i> ) .....	20
<b>Tabelle 2-6:</b> Isopeptidbildung nach trockener und wässriger Hitzebehandlung von Milchproteinen ( <i>Schmitz et al., 1976</i> ) .....	22
<b>Tabelle 2-7:</b> Volumenänderung ( $\Delta V$ ) bei der Ausbildung von Proteinbindungen und -wechselwirkungen ( <i>Mozhaev et al., 1996; Messens et al., 1997</i> ) .....	24
<b>Tabelle 3-1:</b> Verwendete Chemikalien .....	29
<b>Tabelle 3-2:</b> Allgemein verwendete Geräte .....	31
<b>Tabelle 3-3:</b> Verbrauchsmaterialien .....	32
<b>Tabelle 3-4:</b> Peptide, Proteine und Proteinmischungen .....	33
<b>Tabelle 3-5:</b> Mikroorganismen aus der Stammsammlung der Allgemeinen Biochemie, TU Dresden .....	33
<b>Tabelle 3-6:</b> Verwendete Software .....	33
<b>Tabelle 3-7:</b> Schema zur Herstellung verschiedener Sättigungsstufen für flüssige Proben .....	36
<b>Tabelle 3-8:</b> Konzentrationsreihe der verschiedenen Sättigungsstufen für feste Proben .....	36
<b>Tabelle 3-9:</b> Konzentrationsreihe für die Kalibrierlösungen .....	40
<b>Tabelle 3-10:</b> Pipettierschema der Kalibrierung zur Proteinbestimmung nach <i>Lowry</i> .....	43
<b>Tabelle 3-11:</b> Enthaltene Proteine der Marker 4 und 5 (Serva) .....	44
<b>Tabelle 3-12:</b> Zusammensetzung und Volumina der Acrylamidlösungen zur Herstellung eines Gradientengels (4 - 20%) für die SDS-PAGE .....	45
<b>Tabelle 3-13:</b> Trennprogramm für die SDS-PAGE bei einem Gel .....	46
<b>Tabelle 3-14:</b> Verwendete Puffer des Lithium-Systems zur allgemeinen Aminosäureanalytik .....	47
<b>Tabelle 3-15:</b> Trennprogramm für die Bestimmung von Aminosäuren, Lithium-System .....	48
<b>Tabelle 3-16:</b> Puffer des Natrium-Systems für die Bestimmung von Asp_Lys und Glu_Lys .....	48
<b>Tabelle 3-17:</b> Trennprogramm für die Bestimmung von Asp_Lys und Glu_Lys, Natrium-System .....	49
<b>Tabelle 3-18:</b> Volumina und Ablauf der enzymatischen Hydrolyse .....	50
<b>Tabelle 3-19:</b> Pipettierschema der Hydrophobitätsbestimmung .....	55
<b>Tabelle 3-20:</b> Pipettierschema des Trübungstestes .....	63
<b>Tabelle 4-1:</b> Vergleich theoretischer und mittels SDS-PAGE abgeschätzter molarer Massen der HEWL-Oligomere (über SDS-PAGE und Totallab TL 120) .....	65
<b>Tabelle 4-2:</b> Übersicht der getesteten Puffer mit Ausgangs-pH 7,5 .....	67
<b>Tabelle 4-3:</b> Darstellung der Vernetzungsgrade von 3% HEWL mit 120, 160 sowie 200 U mTGase/g Protein inkubiert .....	73
<b>Tabelle 4-4:</b> Vernetzung als Summenparameter der einzelnen Oligomere .....	74
<b>Tabelle 4-5:</b> Einteilung der enzymatisch vernetzten HEWL-Proben in drei Gruppen (LMW, MMW und HMW) .....	76
<b>Tabelle 4-6:</b> Übersicht über ausgewählte Aminosäuren (AS) in unbehandeltem HEWL; nach enzymatischer Hydrolyse (EH) und saurer Hydrolyse (SH) .....	77

---

<b>Tabelle 4-7:</b> Vergleich der berechneten Gehalte an Cross-Links aus den ASA-Daten mit den über die SDS-PAGE ermittelten $[CLAA]_{\min}$ der LMW-Proben .....	80
<b>Tabelle 4-8:</b> Identifikation der tryptischen Peptide aus HEWL durch RP-HPLC mit ESI-TOF-MS .....	81
<b>Tabelle 4-9:</b> Identifizierte Isopeptide in den Probenkategorien LMW, MMW und HMW .....	83
<b>Tabelle 4-10:</b> Partielle Aminosäuresequenz der vier AS rund um Lysin- und Glutaminreste .....	87
<b>Tabelle 4-11:</b> Protein- und Wassergehalt ausgewählter HEWL-Proben (Vernetzungsgrad: $25 \pm 2\%$ ), die Ammoniumsulfatfällung mit 40%iger-Lösung .....	90
<b>Tabelle 4-12:</b> Aktivität mittels Trübungstest nach <i>Shugar (1952)</i> ermittelt.....	97
<b>Tabelle 4-13:</b> Übersicht der errechneten Anteile der Sekundärstrukturen [%]; Proben: HD, mTGase, MMW- und HMW-Proben .....	108
<b>Tabelle 4-14:</b> Fragmente und zugehörige molare Massen nach SH des monomeren HEWL von <i>Frare et al. (2004)</i> identifiziert .....	124
<b>Tabelle 4-15:</b> Fragmente und zugehörige molare Massen nach SH und Reduktion des enzymatisch verknüpften HEWL, angelehnt an <i>Frare et al. (2004)</i> .....	125
<b>Tabelle 4-16:</b> Übersicht über die für mikrobiologischen Untersuchungen eingesetzte Proben mit dem aufsummierten Oligomergehalt in [%] .....	127
<b>Tabelle 4-17:</b> Übersicht der verschieden behandelten $\alpha$ -Lactalbuminproben.....	137
<b>Tabelle 4-18:</b> Übersicht der $\alpha$ -Lactalbumin-Vernetzungsparameter für die Proteinisolate ohne und mit Calcium (-/+Ca) .....	138
<b>Tabelle 4-19:</b> Detaillierte Versuchsparemeter und Ergebnisse der enzymatisch inkubierten Proben im Vergleich zu den thermisch oligomerisierten (nicht-enz.) Analysen.....	147
<b>Tabelle 4-20:</b> Vergleich isopeptidbildender Aminosäuren in $\alpha$ -LA, $\beta$ -LG, $\beta$ -CN und HEWL .....	151

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
Å	Ångström
AMS	Ammoniumsulfat
ANS	8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure
ARLA	Molkenproteinisolat der Firma ARLA Foods Ingredients amba
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureanalytik
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BAEE	N- $\alpha$ -Benzoyl-L-Argininethylester-Hydrochlorid
BAMLET	Apoptose induzierendes bovines $\alpha$ -Lactalbumin (engl. bovine $\alpha$ -Lactalbumin made lethal to tumor cells)
bidest.	bidestilliert
BSA	bovines Serumalbumin
BTEE	N-Benzoyl-L-Tyrosinethylester
+Ca	Zusatz von Calciumchlorid zur Probenlösung
-Ca	ohne Zusatz von Calciumchlorid
CBA	Corynebakterium-Agar
CD	Zirkulardichroismus
$\beta$ -CN	$\beta$ -Casein
Cys	Cystein
dest.	destilliert
DMEM	Zellkulturvollmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	Enzyme Klassifizierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELOA	Apoptose induzierendes Pferdelysozym (engl. equine lysozyme oleic acid)
ESI-TOF-MS	Elektronenspray-Ionisation gekoppelt mit Time-of-Flight-Massenspektrometrie
FKS	fetales Kälberserum
Gln	Glutaminsäure
Glu	Glutamin
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HAMLET	Apoptose induzierendes humanes $\alpha$ -Lactalbumin (engl. human $\alpha$ -Lactalbumin made lethal to tumor cells)
HD	Hochdruck
HEWL	Lysozym aus Hühnereiweiß (engl. Hen egg white lysozyme)
His	Histidin
HMW	hoch vernetzte Lysozymprobe mit > 60% Oligomerisierung
HNB	Hefenährbouillon
IC <sub>50</sub>	Konzentration der Substanz, die 50% der Zellaktivität inhibiert
ICP-OES	induktiv gekoppelte Plasma-Emissionsspektrometrie (engl. inductively coupled plasma optical emission spectrometry)
KBA	Koloniebildungsassay
kDa	Kilodalton

---

LMW	niedrig vernetzte Lysozymprobe mit < 30% Oligomerisierung
$\alpha$ -LA	$\alpha$ -Lactalbumin
$\beta$ -LG	$\beta$ -Lactoglobulin
Lys	Lysin
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
Met	Methionin
min	Minute
ML	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>
MMW	mittel vernetzte Lysozymprobe mit 30 - 60% Oligomerisierung
MO	Mikroorganismen
MPa	Megapascal
MS	Massenspektrometrie
mTGase	mikrobielle Transglutaminase
NRT	Neutralrottest
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pdb	Dateiformat der Proteindatenbank (UniProt)
rel. PE	relative Platteneffektivität
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatografie
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGase	Transglutaminase
ThT	Thioflavin T
TPCK	Tosyl-L-Phenylalaninchloromethylketon
Tris	Tris[hydroxymethyl]-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett (Absorption ultravioletter Strahlung)
Val	Valin
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Z-Glu-Gly	Benzyloxycarbonyl-L-glutamylglycin
ZLCL	Oligomerisierung ohne Einbau von Atomen/Molekülen (engl. zero length cross linking)



# 1 Einleitung und Zielstellung

Über 70% der Erdoberfläche sind von Wasser bedeckt. Damit herrschen für 5 bis 10 Billionen Tonnen der Biomasse der Erde ständig Bedingungen mit Drücken über 0,1 MPa (*Groombridge und Jenkins, 2000*). Der Druck nimmt dabei mit jedem Meter unter der Meeresoberfläche um 10 kPa zu. Dessen ungeachtet gehört die Tiefsee mit Bedingungen von bis zu 110 MPa zu den letzten kaum erforschten Gebieten unseres Planeten. Bis heute sind die Auswirkungen des Druckes auf molekularer Ebene weitgehend unbekannt und die Auswirkung auf Proteine und komplexe Strukturen ganzer Organismen nahezu unerforscht. Erste Ansätze zur Nutzung hoher hydrostatischer Drücke dienten zur fachgebietsunabhängigen Aufklärung natürlicher Effekte. Ende des 20. Jahrhunderts wurde die Methode dann vermehrt in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Durch Prozessierung unter Hochdruck (HD) gelang es pathogene Keime unter Erhalt der morphologischen und sensorischen Eigenschaften des Lebensmittels abzutöten. In den letzten Jahren sind jedoch vermehrt gesundheitsbezogene Forschung und Medizin in den Fokus der Anwendung gerückt (*Demanzeau und Rivalain, 2011*).

Mithilfe der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag zur grundlegenden Aufklärung druck-induzierter Prozesse erbracht werden. Insbesondere proteinhaltige Strukturen, welche repräsentativ als Basis für alle tierischen Lebensformen stehen, sollten nach Hochdruck-inkubation auf funktionelle und strukturelle Veränderungen hin untersucht werden.

Im Arbeitskreis wurden bereits Untersuchungen zum Verhalten von Proteinen unter HD angefertigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Enzyme wie die mikrobielle Transglutaminase (mTGase) eine Druckbehandlung von über 600 MPa unter Erhalt hoher Restaktivität überstehen (*Menéndez et al., 2006*). Basierend auf diesem Phänomen sollten neben dem bereits untersuchten Molkenprotein  $\beta$ -Lactoglobulin und dem  $\beta$ -Casein (*Partschefeld et al., 2006/2007*) weitere Proteine bezüglich ihres Verhaltens unter HD untersucht werden. Die Wahl fiel dabei exemplarisch auf das kompakte, kleine und gut erforschte Hühnereiweißlysozym (HEWL). Es liegt zu 3 bis 4% im Eiklar vor und dient dort unter anderem als antimikrobiell wirkendes Agens gegen grampositive Mikroorganismen. Für Lysozym ist bekannt, dass es unter Atmosphärendruck kein Substrat für Transglutaminasen darstellt (*Murthy et al., 2009*). Über eine potentielle Oligomerisierung während oder nach HD-Inkubation war vor Anfertigung der Arbeit nichts bekannt.

Ausgehend von den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um *Smeller et al. (2006)* wird HEWL ab Drücken von zirka 500 MPa reversibel aufgefalted. Für die zur Umsetzung mit mTGase nötigen Aminosäurereste (Lysin und Glutamin) konnte so eine verbesserte Zugänglichkeit vermutet werden. Bei erfolgter Vernetzung sollten die beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Von einer strukturellen Veränderung des Proteins war nach kovalenter Verknüpfung auszugehen. Dies konnte wiederum in entsprechenden Konsequenzen für die Funktionalität resultieren. In wieweit dies nach enzymatischer Oligomerisierung zutraf, war Gegenstand intensiver Charakterisierungsanalysen. Dabei wurden neben den funktionellen Parametern, wie der verbleibenden enzymatischen Aktivität und der Oberflächenhydrophobität auch strukturelle Aspekte mittels Zirkulardichroismus und das Assoziationsverhalten im sauren Milieu

(Fibrillierungsneigung) betrachtet. Mögliche Anwendungsaspekte lassen sich basierend auf ausführlichen Untersuchungen der grundlagenorientierten Studien ableiten.

Weiterhin wurden erste Versuche zur enzymatischen Vernetzung des evolutionsbiologisch verwandten, strukturell ähnlichen Molkenproteins  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA) durchgeführt. Trotz großer Analogien beider Proteine waren unterschiedliche Vernetzungsneigungen mit/ohne HD und/oder mTGase denkbar. Das Metallion Calcium besitzt für  $\alpha$ -LA einen enormen Einfluss auf dessen Stabilität (*Hendrix et al., 2000*) und sollte daher mutmaßlich auch für die Zugänglichkeit des oligomerisierenden Enzyms entscheidend sein.

Neben der mTGase-induzierten Vernetzung sollte die Methode des „Zero Length Cross-Linking“ (ZLCL) in ersten orientierenden Studien angewendet werden (*Simons et al., 2002*). Die auf einer thermischen Kondensationsreaktion basierende Umsetzung von reinen Proteinen zu nieder-vernetzten Präparaten wurde auf Produktseite mit der enzymatischen Oligomerisierung verglichen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war somit die Aufklärung des Einflusses struktureller Gegebenheiten ausgewählter Proteine, HEWL, auszugsweise  $\alpha$ -LA sowie  $\beta$ -Casein, auf eine Vernetzung. Untersucht werden sollten zwei verschiedene Methoden, HD bzw. thermisch induziertes Cross-Linking unter Nieder- oder Normaldruck (ZLCL). Produkte beider Mechanismen sind laut Literaturangaben kovalente Isopeptide zwischen Aminosäureseitenketten, die ohne Einbau anderer, kleinere Moleküle unter Abspaltung von Ammoniak oder Wasser ausgebildet werden. Die ausführliche Charakterisierung auf funktioneller und struktureller Ebene des HEWL-Oligomeregemisches nach enzymatischer Vernetzung mit mTGase sollte dem Erkenntnisgewinn über diese neuen Reaktionsprodukte dienen.

## 2 Theoretische Grundlagen

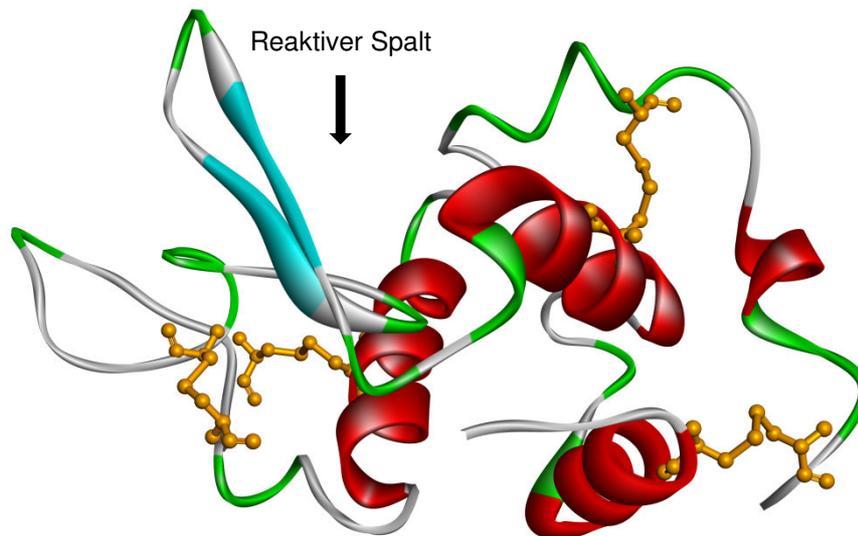
### 2.1 Lysozym

Das den Hydrolasen zuzuordnende Enzym Lysozym (EC 3.2.1.17), auch N-Acetyl-Muramidase oder N-Acetylmuramylhydrolase, gehört zu den ersten umfassend untersuchten Proteinen. Es wird bis heute als Modell zur Untersuchung von Enzymstrukturen und -funktionen verwendet. Bei der Entdeckung 1922 erhielt es seinen Namen durch Sir Alexander Fleming aufgrund der Eigenschaft grampositive Mikroorganismen lysieren zu können (*Fleming und Allison, 1922*). Die auf die Spaltung der Peptidoglycanschicht in den Mikroorganismen zurückzuführende Wirkungsweise als ein natürliches Antibiotikum ist jedoch erst zirka 40 Jahre später von *Phillips (1966)* aufgeklärt worden.

Lysozyme sind weit verbreitete Enzyme, die in einigen Vertebraten und Invertebraten gefunden werden. Auch in Bakterien, Phagen und Pflanzen wurden Lysozyme festgestellt (*Jollès, 1996*). Im Allgemeinen ist bei der Rede von Lysozym das klassische Hühnereiweißlysozym (engl. hen egg white lysozyme, HEWL) gemeint. Zur besseren Kategorisierung ist eine Unterteilung der verschiedenen Lysozyme in Familien oder Typen üblich. Hühnereiweißlysozym (HEWL) liegt mit etwa 3 - 4% nicht nur in hohen Gehalten im Hühner- und Vogeleiweiß vor (*Mine, 1995*). Es gehört ferner zur Superfamilie des c-Typs (chicken-Type oder conventional-Type), welcher auch in menschlichen Tränen (2,6 mg/ml), Speichel (0,13 mg/ml) und der Muttermilch (0,2 - 0,4 mg/ml) vorkommt (*Grossowiecz und Ariel, 1983*). Trotz mitunter abweichender struktureller und physikochemischer Eigenschaften ist allen Lysozymen die Fähigkeit zur spezifischen  $\beta$ -glykosidischen Spaltung der Peptidoglycanschicht gemein.

HEWL ist ein globuläres Polypeptid mit 129 Aminosäuren, einer molaren Masse von 14,3 kDa und einem für Proteine ungewöhnlich basischem isoelektrischen Punkt (pI) von 10,7 (*Jollès, 1969; www.brenda-enzymes.info, Zugriff am 09.01.2012*). Die Abmessungen des Monomers betragen 30 x 30 x 45 Å. Es besitzt eine ellipsoide Form (*Blake et al., 1965*) und die an der enzymatischen Reaktion beteiligten Aminosäurereste Glutamin-35 (Glu<sub>35</sub>) und Asparagin-52 (Asp<sub>52</sub>) sind in einem Spalt lokalisiert (Abbildung 2-1).

Die Aufklärung der Primärstruktur erfolgte unabhängig voneinander durch *Canfield (1963)* und *Jollès (1969)*. HEWL ist damit das zweite Protein und erste Enzym, dessen Aminosäuresequenz vollständig aufgeklärt wurde. Es enthält 20 der 22 proteinogenen Aminosäuren. Die acht enthaltenen Cysteinreste sind in vier Disulfidbrücken an den Positionen 6/127, 30/115, 76/94 und 64/80 verknüpft. Die dreidimensionale Struktur des Enzyms ist bereits drei Jahre nach der Aminosäuresequenz mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden (*Phillips 1966*). Demnach kann HEWL strukturell in zwei Domänen eingeteilt werden. Die  $\alpha$ -Domäne enthält die  $\alpha$ -Helices 5-15, 24-34, 88-96, 97-101, 119-125 und die  $\beta$ -Domäne wird durch den  $\beta$ -Faltblattbereich 41-54, die  $\alpha$ -Helix 80-85 sowie eine große Schleife 61-78 geformt (*Strynadka und James, 1996; Imoto et al., 1996; Belitz et al., 2001*). Zwischen den beiden Domänen sind die an der enzymatischen Reaktion beteiligten Aminosäuren enthalten (Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-1:** Dreidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur des HEWL, rot:  $\alpha$ -Helix, türkis:  $\beta$ -Faltblatt, grün: Schleifen, grau: ungeordnete Bereiche, vier Disulfidbrücken auf atomarer Ebene orange eingezeichnet (Discovery Studio Visualizer, v2.5, Accelrys Software Inc., San Diego, CA: pdb-File 1e8l)

1	MRSLLILVLCFLPLAALGKVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESN
56	FNTQATNTRNTDGS TDYGI LQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASV
111	NCAKKIVSDGNMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCRL

LYSC\_CHICK

**Abbildung 2-2:** Darstellung der Primärstruktur im Vergleich mit der Sekundärstruktur (Abbildung 2-1) von Lysozym (LYSC\_CHICK, pdb-File: 1e8l, rot:  $\alpha$ -Helix, türkis:  $\beta$ -Faltblatt, grün: Schleifen, schwarz: ungeordnete Bereiche, graue Schrift: Signalpeptid)

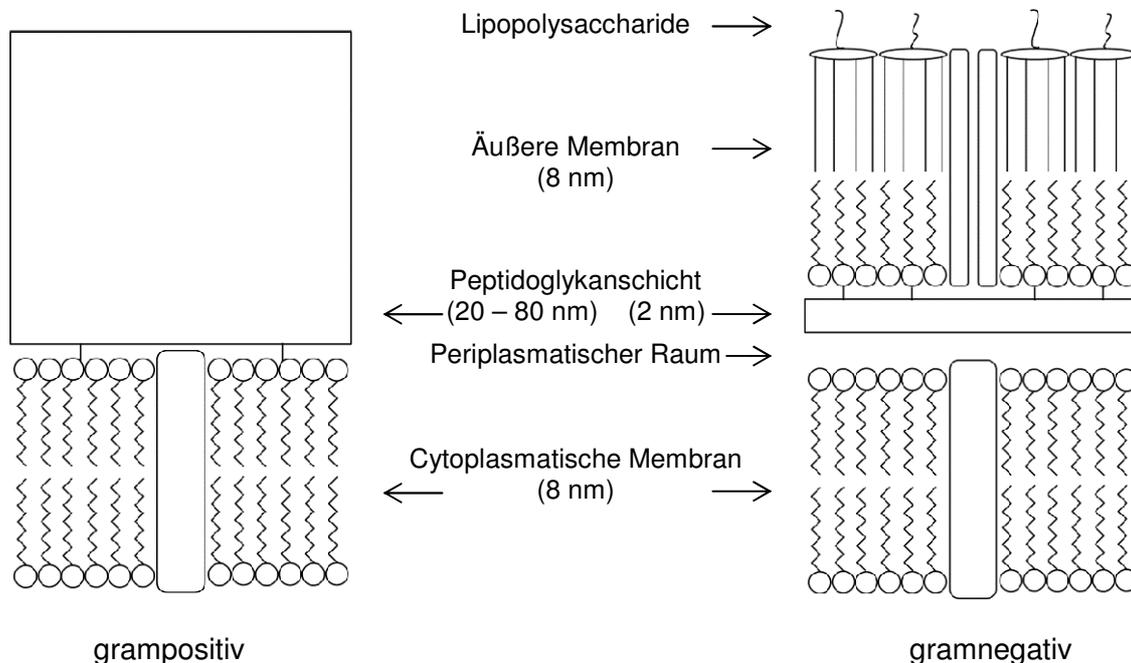
Insgesamt befinden sich 49% der Aminosäurereste in regulären Strukturen. Aufgrund dieser kompakten Struktur ist das Protein mit einer Denaturierungstemperatur von 72 - 75°C relativ hitzestabil und über einen weiten pH-Bereich von 4 bis 9 aktiv, wobei das Optimum etwa bei pH 5 liegt (Davies *et al.*, 1969). Zudem konnte in Untersuchungen von Gross und Jaenicke (1994) sowie Akasaka (1997) eine hohe Druckstabilität nachgewiesen werden.

### 2.1.1 Wirkmechanismen des Lysozyms

Erste Untersuchungen zur Wirkungsweise von Lysozym wurden im Arbeitskreis um Phillips (1966) in den 60er Jahren durchgeführt. Er konnte zeigen, dass die antibakterielle Wirkung auf der Lyse der Peptidoglykan- oder Mureinschicht in den Mikroorganismen beruht.

Ein Peptidoglykannetzwerk wird bei grampositiven und -negativen Bakterien ausgebildet, es entspricht zirka 90 bzw. 10% der Zellwand und verdeutlicht den architektonischen Unterschied beider Untergruppen (Masschalk und Michiels, 2003). Die Zellwände grampositiver Bakterien bestehen aus bis zu 40 Schichten des Netzwerkes, wohingegen gramnegative nur ein bis zwei Schichten besitzen, jedoch zusätzlich eine asymmetrische äußere Membran aufweisen (Abbildung 2-3). Bei grampositiven Bakterien besteht die Peptidoglykanschicht aus alternierenden N-Acetylmuraminsäure- (NAM) und N-Acetylglukosamin-Einheiten (NAG). Diese

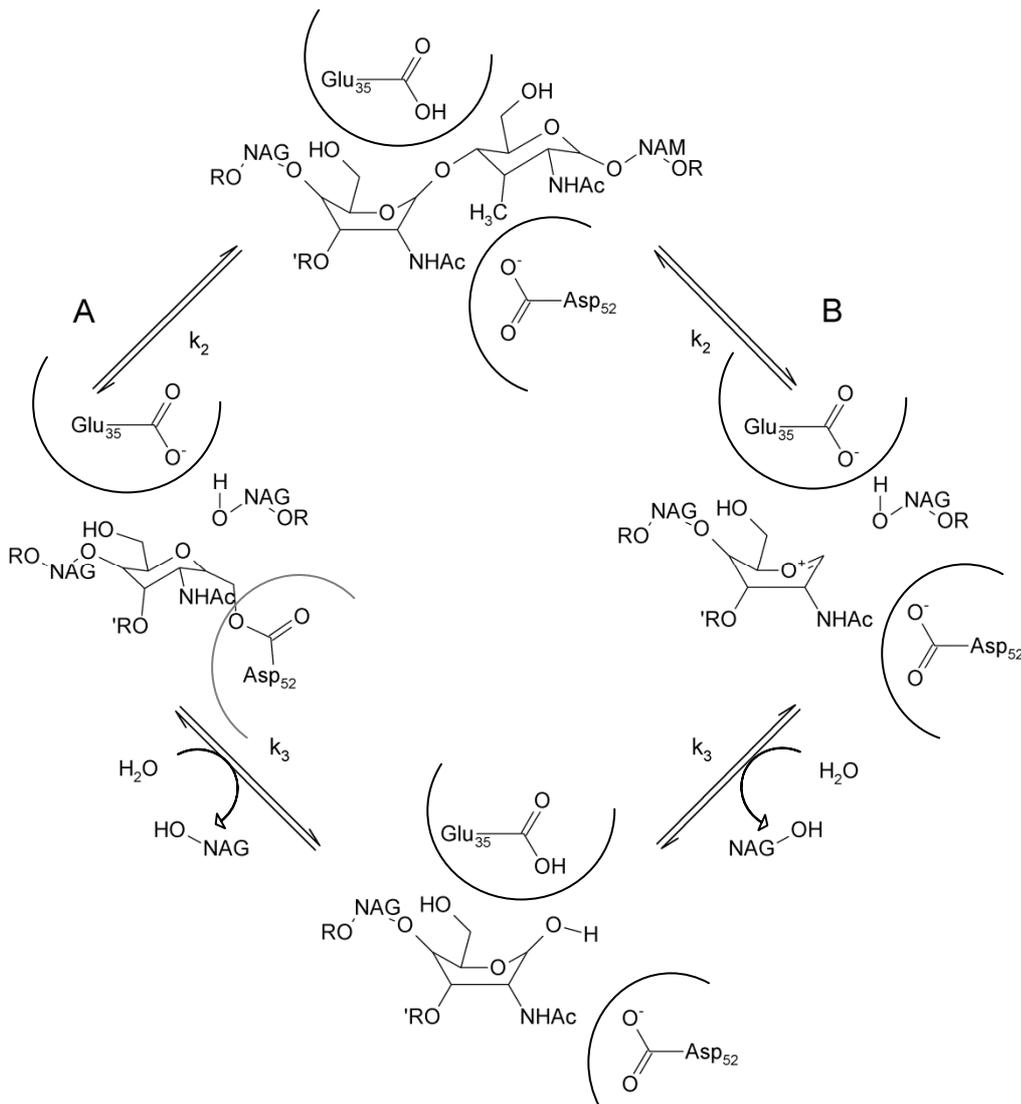
Zuckerbausteine sind durch eine  $\beta$ -(1,4)-glykosidische Bindung zwischen dem C1-Atom von NAM und dem C4-Atom des NAG miteinander verknüpft. An diese Glykanketten sind Tetrapeptide aus D- und L-Aminosäuren, welche ebenfalls untereinander verknüpft sein können, kovalent gebunden. (Höltje et al., 1996).



**Abbildung 2-3:** schematischer Querschnitt über den äußeren Abgrenzungsbereich grampositiver (links) und gramnegativer Mikroorganismen (rechts) (Ibrahim et al., 2002)

Allgemein wird neben dem von Phillips (1966) postulierten Mechanismus ein zweiter Reaktionsweg von Koshland (1953) diskutiert. Dabei wird dem langlebigen Oxo-Carbeniumion-Intermediat von Phillips (Abbildung 2-4 B) ein kovalentes Glykosyl-Enzym-Intermediat gegenüber gestellt (Abbildung 2-4 A). Die theoretische Arbeit von Bottoni et al. bestätigte 2005 die zwei möglichen Bildungswege des Intermediats für den Reaktionsmechanismus.

Das aktive Zentrum des HEWL besteht aus sechs Untergruppen und ist in der Lage sechs der alternierenden NAG-NAM-Zucker zu binden. Die Gruppen befinden sich entlang des Spaltes zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne (mit den katalytischen Aminosäureresten Glu<sub>35</sub> und Asp<sub>52</sub>). Das in einer hydrophoben Umgebung liegende Glu<sub>35</sub> wirkt als Protonendonator und überträgt ein Proton auf das Sauerstoffatom der glykosidischen Bindung, die dadurch gespalten wird. Das dabei entstehende Carbeniumion am NAM wird durch die negative Ladung des dissoziierten Asp<sub>52</sub> stabilisiert, bis es von einem Hydroxidion aus dem umgebenden Wasser abgesättigt wird. Ein Proton, ebenfalls aus dem Wasser, ersetzt das zuvor von Glu<sub>35</sub> abgespaltene Wasserstoffion. Schließlich wird die Verknüpfungsstelle zwischen der vierten und fünften Zuckerposition der NAM und der NAG gespalten (Abbildung 2-4). Die Zerstörung der Polyglykanschicht führt zur Auflösung des Exoskelettes der Mikroorganismen und damit zu einer Zellyse (Masschalck und Michiels, 2003). Darstellungen der Bindungstasche des Lysozyms zeigen Maenaka et al. (1994). Zur Aufklärung des Enzym-Substrat-Komplexes konnten Srynadka und James (1996) beitragen.



**Abbildung 2-4:** mögliche katalytische Reaktionsmechanismen für HEWL, A: Koshland-Mechanismus, B: Phillips-Mechanismus, R: Oligosaccharidkette; R': Peptidseitenkette (Vocadlo et al., 2001)

Neben dem bereits dargestellten enzymatischen Mechanismus wird seit über 25 Jahren auch ein nicht-lytischer Prozess diskutiert. So weist selbst Lysozym, welches mittels Dithiotreitol (DTT) (Laible und Germaine, 1985) oder Hitze (Ibrahim et al., 1996) denaturiert wurde, noch antibakterielles Potential auf. Postuliert wird unter anderem eine intrinsische, strukturell stimulierte Autolyse oder gestörte Membranfunktion der Bakterien in Gegenwart des Proteins (Ibrahim et al., 2001). Ferner sind einige grampositive Bakterien bekannt, die aufgrund von Modifikationen der Peptidoglykanschicht nicht inaktiviert werden können (Masschalck und Michiels, 2003).

Wie in Abbildung 2-3 dargestellt sind gramnegative Bakterien von einer äußeren hydrophoben Membran umgeben, welche für das polare HEWL nicht durchlässig ist. Trotzdem besitzt das Enzym gegen einige dieser Mikroorganismen antibakterielle Wirksamkeit (Iacono et al., 1985). Es wird angenommen, dass die positive Ladung des Lysozyms in pH-neutraler Lösung dabei eine Rolle spielt. Pellegrini et al. (1997) und Düring et al. (1999) führen hingegen die Inaktivierung auf einen Peptidstrang aus der HEWL-Sequenz zurück. Neben der Wirkung auf

unterschiedliche Bakterien besitzt das Enzym auch die Fähigkeit glykosidische Bindungen im Chitin zu spalten. Vor allem Lysozyme aus Pflanzen besitzen hohe Chitinaseaktivitäten und können durch Abbau des Biopolymers als Pathogene gegen Pilze eingesetzt werden (*Scheltinga et al., 1994*).

### 2.1.2 Anwendungsmöglichkeiten von Lysozym

Aufgrund der oben dargestellten Eigenschaft des Lysozyms, der Inhibierung verschiedener Bakterienstämme und der technologisch realisierbaren Gewinnung aus Hühnereiweiß, wird HEWL in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. In Form von Lysozymchlorid dient es als natürliches Konservierungsmittel und wird nach Zusatzstoff-Zulassungsverordnung (ZZuV) als Lebensmittelzusatzstoff E1105 gemäß dem *Quantum-satis*-Prinzip bei der Konservierung von Fleisch, Fisch, Milchprodukten, sowie Obst und Gemüse eingesetzt (*Cunningham F.E. et al., 1991* und *Cegielska-Radziejewska et al., 2003*). Ebenso kann über Beimengung des Enzyms der Säureabbau im Wein reguliert werden (*Calleweart et al., 2010*). Dabei kann es den Einsatz von SO<sub>2</sub> jedoch nicht ersetzen, da HEWL nicht gegen gramnegative Bakterien wie *Acetobacter* und *Gluconobacter* wirkt und seine antimikrobielle Wirkung in einheimischen Weinen nur 4 - 6 Wochen anhält. Die für die Gärung notwendigen Hefen beeinflusst HEWL nicht und ist in Konzentrationen bis zu 500 mg/l einsetzbar (*Sigler, 2004; Gerbaux et al., 1997*). Mithilfe von Lysozym wird weiterhin die bei der Käseherstellung durch *Clostridium tyrobutyricum* verursachte Spätblähung vermieden. *Kijowski et al. (2005)* wiesen nach, dass bei mit Lysozym behandelten Hühnchenkeulen mit Haut eine Wachstumshemmung aerober Bakterien beobachtet werden konnte. Folglich stellt Lysozym auch ein geeignetes Mittel zur Haltbarkeitsverlängerung dar.

In kosmetischen Formulierungen wie Haarfärbemitteln wird Lysozym gleichermaßen als Konservierungsstoff eingesetzt (*Nakanishi und Ando, 1990*). Eingebracht in Zahnpasta reduziert es das Kariesrisiko durch Abtötung der Bakterien im Mundraum (*Sava, 1996*). Außerdem wird es künstlichem Speichel zur Behandlung von Xerostomie (Mundtrockenheit) zugesetzt. Auch ist HEWL Gegenstand zahlreicher Forschungen im Bereich der Zahnmedizin (*Hannig et al., 2009*). In der Pharmaindustrie ist Lysozym als effektiver immunologischer Wirkstoff bekannt. Es findet zur Behandlung von bakteriellen und viralen Infektionen, zum Beispiel *Herpes simplex*, in der Humantherapie Anwendung (*Kovacs-Nolan et al., 2005*). Weiteres Interesse erfährt es im Hinblick auf seine schmerzstillenden Eigenschaften. Diese werden in Halsschmerztabletten und die Potenzierungswirkung in der Antibiotikatherapie angewandt. Außerdem wird Lysozym zur Prophylaxe und Therapie eines Mangels an Leukozyten (Leukopenie) eingesetzt, zu der es im Rahmen einer Krebstherapie kommt. Zusammen mit Cortison verabreicht, wirkt es auf der Haut antiphlogistisch zum Beispiel bei Multipler Sklerose (*Sava, 1996*).

Beim Einsatz von Lysozym sind mögliche allergene Reaktionen bei Hühnereiweiß-Allergikern zu berücksichtigen. Diese fallen jedoch deutlich schwächer aus als bei anderen Lebensmittelproteinen, wie zum Beispiel Ovalbumin und Albumin (*Bianchi et al., 1982*). Daneben bestehen aufgrund von *in-vitro*-Tests Hinweise auf eine toxische Wirkung in Fibroblastenkulturen (*Kiczka, 1995*). Diese als schwach eingestuften Effekte stellen nach

Einschätzung der Weltgesundheits-Organisation (*WHO 2012*, International Programme of Chemical Safty - IPCS) bei Aufnahme geringer Mengen Lysozym, beispielsweise über Käse kein Risiko für die menschliche Gesundheit dar.

### 2.1.3 Modifizierung des Lysozyms

Ziele der klassischen Modifizierung sind zum einen ein besseres Verständnis über den Aufbau und die Funktionsweise des Proteins zu erlangen und andererseits die Möglichkeit das Enzym mithilfe dieses Wissens in seinen Eigenschaften zu verändern. So schränkt die Wirksamkeit des HEWL auf grampositive Mikroorganismen das Anwendungsspektrum ein. Zur Gewährleistung einer sicheren Konservierung von Lebensmitteln und Kosmetika ist daher eine Kombination mit anderen, künstlichen Konservierungsmitteln nötig. Es besteht folglich schon lange ein Interesse, das hydrophile Enzym so zu modifizieren, dass neben anderen Eigenschaften eine erweiterte, idealerweise Breitbandwirkung gegenüber Bakterien resultiert. Bereits zur Modifikation angewandte Methoden lassen sich in physikalische (Tabelle 2-1) und chemische Prozesse (Tabelle 2-2) unterteilen.

In Tabelle 2-1 ist ein Auszug einiger physikalischer Veränderungen an HEWL dargestellt. Allgemein werden vor allem ungeordnete und zufällige Modifikationsmethoden eingesetzt, welche dann mit zunehmendem Wissensstand auch gerichtet und an speziellen Seitengruppen durchgeführt werden können. Hierfür werden oft chemische Reaktionen (siehe Tabelle 2-2) und genetische Mutationen (*Muraki et al., 1987/1991*) angewandt.

**Tabelle 2-1:** Modifikationen des Hühnereiweißlysozyms (HEWL) über ausgewählte physikalische Prozesse

Physikalischer Parameter	Publikation/Autor	Ergebnis/Auswirkung
pH-Wert	Jollès et al. 1996	digestive Funktion bei niedrigem pH, Verlust der bakteriostatischen Wirkung
Lösungsmittel	Ito et al. 1993	digestive Funktion in Kuh- und Schafmägen
	Abe et al., 2010	DMSO und PEG als Aggregationsinhibitoren
Hydrostatischer Druck	Maeno et al., 2009	Übergang von gefalteten zu entfalteten HEWL-Strukturen
	Smeller et al., 2006	aggregationsfreie Auf- und Rückfaltung
	Masschalck et al., 2001	antibakterielle Wirkung bei simultaner Inkubation von Bakterien und HEWL
Temperatureinwirkung	Lesnierowski et al., 2001	Sprühtrocknung unter Aktivitätserhalt
	Cegielska-Radziejewska et al., 2009; 2010	mithilfe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Polymerisierung und Veränderung des Wirkspektrums
	Ibrahim et al., 1996	Reduktion der Aktivität, Wirksamkeit gegenüber ausgewählten gramnegativen Bakterien
UV-Strahlung	Xie et al., 2011	Dimerisierung, aktives Zentrum zerstört
		Auffaltung unter Exposition von hydrophoben Gruppen und Thiolresten, anschließende Aggregation

**Tabelle 2-2:** Modifikationen verschiedener Lysozyme (v.a. Hühnereiweiß- (HEWL) aber auch Pferdelysozym) mittels chemischer Parameter

Zusatz	Publikation/Autor	Ergebnis/Auswirkung
Salze; EDTA	Shelef und Seiter, 1993 Branen, 2004	Verknüpfung detergierender Salze und HEWL Kombination verstärkt antimikrobielle Wirkung des HEWL
Trinatriumphosphat	Meloet al., 1998	Kombination verstärkt antimikrobielle Wirkung des HEWL
Ölsäure	Morozova-Roche, 2007 Mossberg et al., 2010b	Bildung des ELOA-Komplexes mit tumorizider Wirkung aus Pferdelysozym
Palmitinsäure	Ibrahim et al., 1991 Ibrahim et al., 1993	mit zwei Palmitinresten beste Wirksamkeit (HEWL) Acetylierung mit verschiedenen Kohlen- wasserstoffen, Anstieg der Hydrophobität des HEWL
Kaffee- und Zimtsäure	Valenta et al., 1998 Bernkop-Schnürch et al., 1998	antibakterielle Wirkung in verschiedenen Zahnpastaformulierungen mit HEWL
Carvacrol, Thymol	Helander et al., 1998	Kombination ermöglicht antimikrobielle Wirkung des HEWL
Milchsäure	Alakomi et al., 2000 Ellison und Giehl, 1991	Membranpermeabilitätsbeeinflussung gg. MO Kombination für gramnegative Bakterien
Dextran, Galactomanan	Nakamura et al., 1991/1993	Absenken der Aktivität und Anstieg der Emulgierfähigkeit des HEWL, Wirkung gg. gramnegative Mikroorganismen (MO)
Phenyl- und Zuckerderivate	Imoto et al., 1987	antimikrobielle Wirkung des HEWL
Polyethylenglycol	Freitas, 2010	77% Restaktivität des HEWL, protolytisch stabil
Hydrophobes Pentapeptid	Ibrahim et al., 1992	80% Restaktivität des HEWL und teilweise wirksam gegen <i>E.coli</i>

Aufgrund der kompakten Struktur des globulären HEWL sind die benötigten harschen, chemischen Modifikationen nahezu ausschließlich nicht-enzymatischer Natur. Enzymatische Untersuchungen mittels Hydrolasen führen zur Spaltung des Proteins in seine Peptidbausteine (Yeboah et al., 2004). Die Umsetzung beispielsweise mit einer Transferase führt hingegen zu keiner Veränderung (Murthy et al., 2009).

### 2.1.3.1 Fibrillen und amyloide Strukturen von HEWL

Neben den klassischen physikalischen und chemischen Modifikationen besteht die Möglichkeit, die Eigenschaften des Proteins über Konformationsänderungen zu beeinflussen. Dabei spielen Fibrillen und amyloide Anordnungen eine wichtige Rolle. Der Begriff Fibrille ist die abgeleitete Verkleinerungsform von Faser (engl. fiber), welcher eine kleine, dünne Faser mit lang gestreckter, stark geordneter Struktur beschreibt. Sie sind sowohl in der Flora (Gerüstsubstanzen in Pflanzenzellen) als auch der Fauna (Muskelgewebe) aufzufinden. Amyloid hingegen ist ein Kunstwort, welches am ehesten mit „stärkeähnlich“ übersetzt werden kann und erstmals 1838 von dem Botaniker Schleiden zur Beschreibung von Strukturen in Pflanzenstängeln verwendet wurde (Schwartz, 1970). Die Medizin übernahm den Begriff 1984 um Ablagerungen in Geweben zu beschreiben, hinter denen stärkeartige Gefüge vermutet

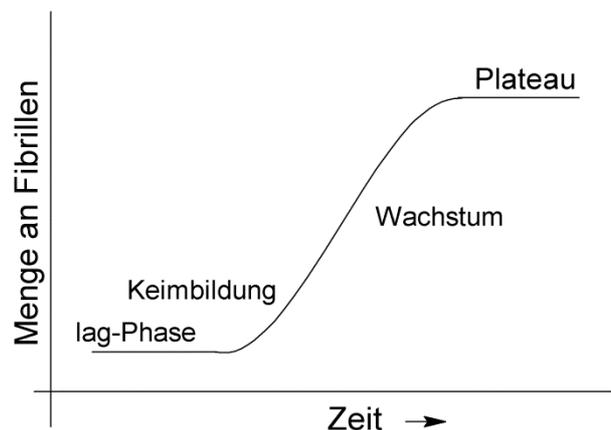
wurden, da sich diese mit Jod und Schwefelsäure blaufärben ließen (*Virchow, 1854*). Heutzutage ist bekannt, dass es sich hierbei um eiweißhaltige Substanzen handelt, die nach Konformationsänderungen und Fehlfaltung nicht mehr in den nativen Zustand überführbar sind und somit vom Organismus nicht mehr oder kaum abgebaut werden können. Intensiv erforscht wurden sie mit dem Aufkommen neuronaler Erkrankungen (BSE, bovine spongiforme Enzephalopathie) und aberranter Prionen (1997 Nobelpreis der Medizin für S.B. Prusiner), welche als Indikator sogenannter Plaques (Ablagerungen) im Hirn genutzt werden. Bisher sind 24 Proteine bekannt die zu Fibrillen aggregieren können (*Röcken, 2008*). Diese Proteine werden für verschiedene degenerative Erkrankungen, wie *Morbus Alzheimer*, *Morbus Parkinson*, Chorea Huntington, die Creutzfeldt-Jacob-Krankheit oder Diabetes Mellitus Typ II verantwortlich gemacht. Die Eigenschaft Fibrillen bilden zu können, muss allerdings nicht mit dem Krankheitsbild der Amyloidose korrelieren. Auch nicht krankheitsassoziierte Proteine sind dazu in der Lage (*Dobson, 2003*).

Mit einem Durchmesser von 5 bis 13 nm können Fibrillen elektronenmikroskopisch als ausgedehnte, unverzweigte und starre  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen dargestellt werden (Abbildung 2-5). Die Aminosäurereste in amyloiden  $\beta$ -Faltblättern sind alternierend auf gegenüberliegenden Seiten einer Achse angeordnet. Der Abstand zweier auf einer Seite liegender Reste beträgt 6,5 - 6,95 Å und wird von der Größe der Aminosäure beeinflusst. Die  $\beta$ -Stränge sind senkrecht und Wasserstoffbrückenbindungen parallel zur Fibrillachse ausgerichtet. Eine Bildung kann sowohl von aufgefalteten als auch globulären Proteinen ausgehen. Es treten dabei partiell strukturierte Konformationen sowie oligomere Protofibrillen als Übergangprodukte auf. Obwohl es unerwarteter Weise keine Homologien der Aminosäuresequenzen der fibrillbildenden Proteine oder Proteinfragmente gibt (*Rochet und Lansbury, 2000*), kann der Austausch einzelner Aminosäuren die Fibrillierungseigenschaften verändern oder sogar unterdrücken. Für das humane Lysozym werden vier genetische Varianten mit Amyloidosen in Verbindung gebracht, während eine in der britischen Bevölkerung verbreitete Variante nicht zur Fibrillierung neigt (*Merlini und Bellotti, 2005*).



**Abbildung 2-5:** Mikroskopische Darstellung *in vitro* erzeugter Fibrillen des HEWL (0,5 mg/ml), saure Inkubationsbedingungen (*Wang et al., 2009a*) nach 96 h, pH 2,0

Es existieren vier Modelle, welche die Bildung amyloider Fibrillen beschreiben (*Kelly, 2000*). In allen Theorien ist trotz variierender Verläufe der Prozess der Keimbildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Von *Rochet und Lansbury (2000)* wird die Zeit bis zur Keimbildung als lag-Phase (Abbildung 2-6) bezeichnet und eine Mindestmenge des teilweise denaturierten Proteins ist Voraussetzung sowohl für den initialen Keimbildungsschritt als auch für Wachstum und Verlängerung der Lysozymfibrillen (*Johnson et al., 2005*). Durch Zusatz von „Seeds“ (fibrillierte Keime, *Merlini und Bellotti, 2003*) und durch Erhöhung der Proteinkonzentration vor Inkubation (*Arnaudov und de Vries, 2005*) kann dieser Abschnitt verkürzt werden. Das Wachstum der Fibrillen erfolgt dann sehr schnell nach der Keimbildung (Abbildung 2-6, *Rochet und Lansbury, 2000*). Nach Untersuchungen an Disulfid-freien Varianten des Lysozyms unter Hochdruck von *Niraula et al. (2004)* bilden sich reversible Übergansformationen (U) aus nativem Protein. Diese können mit anderen aufgefalteten Proteinen einen weiteren Überganzustand (U') einnehmen, der immer noch zur Rückfaltung in der Lage ist, sich aber irreversibel zu Fibrillen umsetzen kann und damit das Gleichgewicht Richtung Fibrillierung verschiebt. Die Plateauphase ist erreicht, wenn das in Lösung befindliche Protein nahezu vollständig in seiner fibrillierten Form (umgefaltet) vorliegt.



**Abbildung 2-6:** Kinetik der Fibrillierung analog einer sigmoidalen Kurve (*Nielsen et al., 2001*)

Für das Lysozym des Hühnereiweißes wurde erstmals von *Krebs et al. (2000)* die Bildung fibrillärer Strukturen bestätigt. Das zu 60% in der Aminosäuresequenz konforme, humane Lysozym (*Trexler und Nilsson, 2007*) konnte im Vergleich dazu bereits sieben Jahre zuvor als Auslöser einer Amyloidose verifiziert werden (*Pepys et al., 1993*). *Cao et al. (2004)* sowie *Niraula et al. (2004)* zeigten, dass HEWL ohne die vier Disulfidbrücken (nach Reduktion, bzw. als genetische Variante) einfacher amyloide Fibrillen ausbildet. Diese drastische Destabilisierung des Moleküls erleichtert scheinbar den für die Keimbildung nötigen Schritt der Auffaltung des Proteins. Die erste Generation von Fibrillen aus intaktem HEWL wurde bei niedrigem pH-Wert durch starkes Erhitzen auf 100°C, anschließendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und nochmaliges Erhitzen auf 37°C gebildet (*Krebs et al., 2000*). Mittlerweile werden auch weniger drastische Bedingungen publiziert. Von verschiedenen Autoren wird oftmals ein niedriger pH-Wert (1,6 - 2,2) kombiniert mit einer erhöhten Temperatur (55 - 100°C) eingesetzt. Eine Übersicht ausgewählter Bedingungen zeigt Tabelle 2-3, wobei der Einsatz von

## 2 Theoretische Grundlagen

denaturierenden Reagenzien, wie beispielsweise Guanidinhydrochlorid, Ethanol oder Trifluorethanol bei moderatem pH-Wert und Temperatur ebenso gebräuchlich ist.

**Tabelle 2-3:** Bedingungen und Charakteristika der Fibrillierung von HEWL, (nach *Trexler und Nilsson, 2007*)

Literatur	Inkubationsbedingungen	Durchmesser [nm]	Länge [nm]
Krebs et al., 2000	pH 2,0; 100 °C, dann fl. N <sub>2</sub> und 37 °C	7,4 ± 0,5	>1000
Arnaudov und de Vries, 2005	pH 2,0; 57 °C	4,0 ± 0,7	>5000
Wang et al. 2009a	pH 2,0; 55 °C	~10*	1000*
Frare et al., 2004	pH 2,0; 65 °C	~10*	>600*
Cao et al., 2004	pH 4,5; Raumtemperatur; red. HEWL, 90% Ethanol	2 - 5	1000 - 2000
Goda et al., 2000	90% Ethanol, 10 mM NaCl, 25 °C	~7	1000 - 2000

\* abgeschätzt anhand von TEM-Aufnahmen

Der Tabelle 2-3 ist zu entnehmen, dass die gewählten Bedingungen einen auffallenden Einfluss auf die Abmessungen der resultierenden Fibrillen haben. Es werden Durchmesser von 2 (*Cao et al., 2004*) bis 10 nm (*Wang et al., 2009a*) und Längen von 600 (*Frare et al., 2004*) bis 5000 nm (*Arnaudov und de Vries, 2005*) erreicht. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei höheren Werten um mehrere, gebündelte Filamente handelt.

Eine Abhängigkeit der Fibrillbildung vor allem vom pH-Wert und weniger von der Temperatur wiesen *Arnaudov und de Vries (2005)* nach. HEWL bildete bei pH 2,0 und 57 °C nach 2 Tagen Fibrillen aus, eine Erhöhung des pH-Wertes auf 3,0 führte zu einer lag-Phasen-Verlängerung auf 11 Tage. Bei pH 4,0 können selbst nach 42 Tagen keine Fibrillen nachgewiesen werden. Unter diesen Bedingungen liegt das Protein nicht mehr säuredenaturiert, sondern praktisch nativ vor. Eine Steigerung der Temperatur auf 80 °C führt bei pH 2,0 zu sphärischen Aggregaten als Nebenprodukt, eine Fibrillbildung bei pH 4,0 fand auch hier nicht statt. Die Ursache der beobachteten Unterschiede liegt vermutlich in der abweichenden Protonierung bestimmter Glutamy- und Aspartylreste, so dass sich die Auffaltungsmechanismen bei pH 2,0 und 4,0 stark unterscheiden. Ein weiterer, entscheidender Parameter ist die Bewegung der Proteinlösung bei der Inkubation. *Humblet-Hua et al. (2008)* konnten zeigen, dass höhere Scherraten bzw. Rührgeschwindigkeiten zu einem größeren Umsatz und zu kürzeren, stäbchenartigen Fibrillen führen. Die Größenverteilung ist aufgrund turbulenter Strömung sehr inhomogen und die Fibrillen variierten stark in ihrer Länge. Der signifikante Einfluss verschiedener Parameter auf die Eigenschaften der Fibrillen kann genutzt werden, um bei Bedarf Strukturen bestimmter Funktionalität zu erzeugen.

Unter den gewählten Bedingungen tritt zudem teilweise eine Säure-induzierte Hydrolyse von HEWL auf. Einzelne Bruchstücke bei einer Spaltung vor und nach Asparaginsäure (Asp), werden bevorzugt bei pH 2,0 und 65 °C gebildet und zum Teil durch Disulfidbrücken zusammengehalten (*Frare et al., 2004*). Diese befinden sich ausschließlich im fibrillären

Aggregat, das Filtrat ist hingegen frei von Fibrillen und beinhaltet andere, lösliche Bruchstücke. Neben *Frare et al. (2004)* identifizierten *Krebs et al. (2000)* die  $\beta$ -Faltblatt-Region als Promotor der Aggregation zu Fibrillen. Die C-Helix, welche die geringste Neigung aller  $\alpha$ -Helices besitzt ihre Struktur zu erhalten, trägt ebenso zur Ausbildung amyloider Fibrillen bei (*Frare et al., 2004*).

### Methoden zum Nachweis von Fibrillen

Es existieren verschiedene Methoden zum Nachweis amyloider Fibrillen. Für diagnostische Befunde werden klassisch Gewebeschnitte angefertigt, *ex vivo* mit Kongorot gefärbt und unter polarisiertem Licht analysiert. Die Anlagerung eines Reagenz an Fibrillstrukturen ist auch Basis multipler Analysenverfahren bei denen sich die zu untersuchenden Proteine in Lösung befinden, wobei es sich oftmals um UV-aktive oder fluoreszierende Agenzien handelt. So verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Kongorot als UV-aktive Substanz in Gegenwart von Fibrillen *in vitro* um wenige nm (*Klunk et al., 1989* und *Krebs et al., 2000*). Als Fluoreszenzfarbstoff eignet sich sowohl 8-Anilino-1-Naphthalinsulfonsäure (ANS, *Scheuermann, 2003; Wang et al., 2009a/2009b*) als auch Thioflavin T (ThT, *Frare et al., 2004* und *Krebs et al., 2005*) und Nilrot (*Mishra et al., 2011*).

Die Anwesenheit größerer Aggregate wiesen *Arnaudov und de Vries (2005)* durch Lichtbrechung nach. Mithilfe moderner, hochauflösender Mikroskopietechniken wie der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, *Humblet-Hua et al., 2008; Wang et al., 2009a/2009b*) wurden die Ablagerungen genauer untersucht. Mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) wurde die Oberflächenstruktur der Fibrillen analysiert (*Arnaudov und de Vries, 2004; Rochet und Lansbury, 2000*). Die Zirkular-Dichroism-Spektroskopie (CD) liefert Informationen über die Proteinkonformation und damit über die für Fibrillen typische Zunahme von  $\beta$ -Faltblattstrukturen (*Frare et al., 2004; Wang et al., 2009a/2009b*).

### 2.1.3.2 Neue biologische Funktionen durch Konformationsänderung

Theoretisch besitzt ein Protein nahezu unendlich viele Möglichkeiten einer dreidimensionalen Anordnung. Doch innerhalb weniger Sekunden faltet es sich zu einer thermodynamisch günstigen bzw. energiearmen Konformation (*Anfinsen, 1973*). Dabei wird das Minimum der Gibbsschen freien Energie (freien Enthalpie) angestrebt, bei welcher die native, dreidimensionale Struktur und die biologische Funktion des Proteins klar definiert sind. Die tatsächliche, räumliche Form wird unter anderem von der Aminosäuresequenz beeinflusst. Veranschaulichen lässt sich dieses Modell mithilfe eines Trichters. Bei der Ausbildung der dreidimensionalen Struktur durchlaufen partiell gefaltete bzw. ungefaltete Proteine verschiedene Übergangszustände und können in lokale Energieminima fallen (*Smeller et al., 2006; Dobson, 2003*). Nur wenige Proteine sind hierbei in der Lage metastabile, gefaltete Intermediate zu bilden, welche noch seltener eigene Funktionen aufweisen (*Pettersson-Kastberg et al., 2009*).

Basierend auf diesem Wissen werden in den letzten Jahren neben den negativen Begleiterscheinungen der Fibrillierung (Amyloidose) auch positive Auswirkungen der

Konformationsänderung untersucht. Die prominentesten Vertreter mit therapeutischer Wirkung sind vor allem das HAMLET (human  $\alpha$ -Lactalbumin made lethal to tumor cells), BAMLET (bovine  $\alpha$ -Lactalbumin made lethal to tumor cells) und ELOA (equine lysozyme oleic acid). Die hier genannten drei partiell aufgefalteten Proteine bilden unter Abgabe des Kalziumions mit Ölsäure einen stabilen Komplex, der zytotoxisch auf Tumorzellen wirkt, gesunde, differenzierte Zellen jedoch nicht beeinträchtigt (*Mossberg et al., 2010b, Rammer et al., 2010*). Die tumorizide Wirkung konnte zudem *in vivo* an verschiedenen Tiermodellen (*Mossberg et al., 2010a* und *Fischer et al., 2004*), sowie klinischen Studien mittels Placebo kontrollierter Doppelblindstudie (*Gustafsson et al., 2005*) bestätigt werden und lässt auf neue Möglichkeiten der Krebstherapie hoffen. HAMLET wird im Gegensatz zu nativem  $\alpha$ -Lactalbumin von Tumorzellen in hohem Maße von gesunden Zellen jedoch nicht aufgenommen. Der Komplex akkumuliert im Zellkern und aktiviert verschiedene Wege der Apoptose, welche nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt sind (*Svensson, 2003*), aber vermutlich mit einer Schädigung der DNA einhergehen. Im Gegensatz dazu führt BAMLET zu einer lysosomalen Membran-Permeabilisierung (*Rammer et al., 2010*). ELOA interagiert verstärkt mit der Zellmembran, kann aber, aufgrund seiner Tendenz Oligomere zu bilden, nicht in die Zelle aufgenommen werden (*Mossberg et al., 2010b*).

### 2.1.4 Evolutionäre Entwicklung und Verwandtschaft zu $\alpha$ -Lactalbumin

HEWL gehört, wie zu Beginn der Arbeit erläutert, zur Superfamilie des conventional-Typs (c-Typ). Vor etwa 500 Millionen Jahren, initiiert durch genetische Duplikation und Weiterentwicklung der Wirbeltiere, entstand aus dieser Familie unter anderem die Unterfamilie der kalziumbindenden c-Lysozyme. Mit Entwicklung der Milchdrüsen in Säugern vor etwa 200 Millionen Jahren spalteten sich die  $\alpha$ -Lactalbumine von der Abstammungslinie der kalziumbindenden c-Lysozyme ab (*Jollès, 1996*) und verloren ihre antimikrobielle Aktivität nach Substitution des Glutamins (Glu<sub>35</sub>) durch Histidin. *Brew et al.* schlugen 1967 nach vergleichenden Untersuchung mit Lysozym erstmals eine Aminosäuresequenz für  $\alpha$ -Lactalbumin vor (siehe auch *McKenzie, 1996*).

Erste Indizien für die Existenz des Molkenproteins gab es bereits seit 1885, isoliert wurde  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA) allerdings 1939 von *Sørensen und Sørensen*. Doch erst 27 Jahre später wurde seine Funktion als Untereinheit B der Lactosesynthase zusammen mit der Galactosyltransferase (Untereinheit A) zur katalytischen Synthese von Lactose aufgeklärt (*Ebner et al., 1966*). Die Synthese von Lactose selbst findet nur während der Lactationsperiode in den Milchdrüsen der Säuger statt, so dass das Protein nur in der Milch (Gesamtanteil 0,1%) und im Colostrum zu finden ist. HEWL dagegen ist sehr weit verbreitet (Kapitel 2.1). Die Molmasse des  $\alpha$ -LA ist mit 14,2 kDa und 123 Aminosäuren vergleichbar, der Isoelektrische Punkt liegt hingegen im Sauren bei 4,2 - 4,5 (*Belitz et al., 2001*). Die Denaturierungstemperatur beträgt etwa 70 - 80 °C und strukturell aufgebaut ist  $\alpha$ -LA aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Domäne. Ein Vergleich der allgemeinen Fakten von HEWL und  $\alpha$ -LA ist in Tabelle 2-4 und der primäre, strukturelle Aufbau in Abbildung 2-7 dargestellt.

**Tabelle 2-4:** Vergleich von HEWL und bovinem  $\alpha$ -Lactalbumin

	HEWL	$\alpha$ -LA
Größe, Abmessung [kDa]	14,3	14,2
Gesamtaminosäuren	129	123
Disulfidbrücken	4	4
Lysinreste	6	11
Glutaminreste	3	7

Die Tertiärstruktur des Albumins wird ebenso wie beim HEWL durch vier Disulfidbrücken, hier zwischen den Cysteinresten an den Positionen 6/120, 28/111, 61/77 und 73/91, stabilisiert. Zudem besitzt es ein Calciumion im Zentrum (holo-Form, *Permyakova und Berliner, 2000*). Wird dem  $\alpha$ -LA das Calcium entzogen (apo-Form), so wird dessen Stabilität stark verringert (*Hendrix et al., 2000*). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen der genannten Proteine sind 34,5% der Aminosäuren absolut identisch (entspricht 51 Aminosäuren) und 47 Aminosäuren (32,0%) sind einander ähnlich, besitzen folglich vergleichbare physikalisch-chemische Eigenschaften.

1	MMSFVSLLLVGLFHATQAEQLTK <b>CE</b> VFRE--LKD <b>LKGYGGVSLPEWVC</b> TTFHT	
1	MRS-LLILVLCFLPLAALGKVFGR <b>CE</b> LAAAMKRHGLDN <b>YRGS</b> SLGN <b>WVCAAKFE</b>	
53	<b>SGYDTQA</b> IVQN-ND <b>STEYGLFQINNKI</b> <b>WCKD</b> DQNP <b>HSSNICNIS</b> <b>CDKFLDDDLT</b>	
54	<b>SNFNTQA</b> TNRNTD <b>GSTDYGILQINSR</b> <b>WCND</b> GRTP <b>GSRNLCNIP</b> <b>CSALLSSDIT</b>	
106	DDIM <b>CVKKIL</b> -DKV <b>GINYWL</b> AHKAL <b>CSEK</b> -LDQ <b>WL</b> CEKL-	LALBA_BOVIN
108	ASVN <b>CAKKIV</b> SDGN <b>GMNAWVA</b> WRNR <b>CKGTDVQAW</b> IRGCRL	LYSC_CHICK

**Abbildung 2-7:** Vergleich der Primärstrukturen von HEWL (LYSC\_CHICK) mit bovinem  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA, LALBA\_BOVIN); graue Schrift - Signalpeptid, grau unterlegt sind Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften und identische Aminosäuren sind fett hervorgehoben ([www.uniprot.org/align](http://www.uniprot.org/align))

## 2.2 Die enzymatische Vernetzung

Eine der beiden Hauptkategorien bei der chemischen Modifizierung von Proteinen stellt die enzymatische Umsetzung dar. Dabei können verschiedene Enzyme aus unterschiedlichen Enzymklassen (EC) eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer vernetzenden mikrobiellen Transferase gearbeitet.

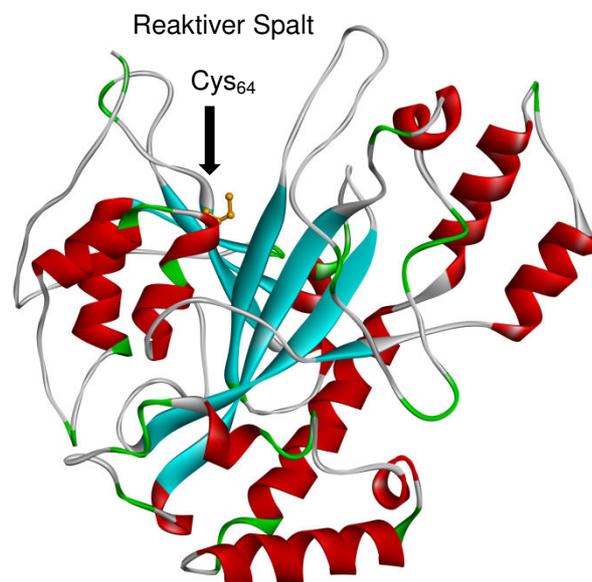
### 2.2.1 Mikrobielle Transglutaminase

Die Transglutaminase (TGase, EC 2.3.2.13, Protein-Glutamin-Amin- $\gamma$ -glutamyltransferase) gehört zur Enzymklasse der Transferasen, diese Enzyme sind in der Lage Gruppen zu übertragen. Erste Hinweise auf die Existenz von Transglutaminasen lieferten Studien an einem

Leberextrakt für den das Einbinden von Aminogruppen in Proteine beobachtet wurde (Sarkar, 1957). Kurze Zeit später wurde von Clarke *et al.* (1959) die erste TGase beschrieben.

Ähnlich wie beim Lysozym kann auch für die TGasen eine ubiquitäre Verbreitung verzeichnet werden. Sie kommen sowohl in Mikroorganismen, Pflanzen als auch in tierischem Gewebe, z.B. Fisch und Körperflüssigkeiten vor (Ando *et al.*, 1989; Falcone *et al.*, 1993; Siepaio und Meunier, 1999; Lilley *et al.*, 1998; Yasueda *et al.*, 1995; Folk, 1980). Besonders hervorzuheben sei an dieser Stelle die aus dem Mikroorganismus *Streptovorticillium sp.* S-8112 isolierte mikrobielle Transglutaminase (mTGase). Sie ist technologisch leicht zu gewinnen, da der Organismus das Enzym sezerniert. Die mTGase zeichnet sich außerdem durch eine geringe Substratspezifität aus (de Jong *et al.*, 2001 und Shimba *et al.*, 2002), was ihren zunehmenden Einsatz in der Forschung und die Anwendung speziell in der Lebensmittelindustrie seit dem Ende der 1980er Jahre ermöglicht hat.

Mit einer molaren Masse von 37,9 kDa und 331 Aminosäuren gehört die mikrobielle TGase zu den Einzelstrangpolypeptiden (Kanaji *et al.*, 1993). Sie ist im Gegensatz zu vielen TGasen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig (Nonaka *et al.*, 1996). Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 9 und das Optimum bei 5 bis 8, aber auch bei pH-Werten von 4 bis 9 ist mTGase noch aktiv. Beschrieben ist weiterhin ein breites Temperaturoptimum im Bereich von 40 - 60 °C (Ando *et al.*, 1989; Yokoyama *et al.*, 2004), wobei Untersuchungen bei wesentlich geringeren Temperaturen noch Restaktivitäten zeigen konnten. Die Größe des globulären Proteins beträgt 41 x 59 x 65 Å und es besitzt eine flache, scheibenförmige Gestalt, mit einem tiefen Spalt, in welchem sich das aktive Zentrum, eine freie Thiolgruppe des Aminosäurerests Cystein-64 ( $\text{Cys}_{64}$ ), befindet (Kashiwagi *et al.*, 2002).



**Abbildung 2-8:** Sekundärstruktur der mTGase nach Kashiwagi *et al.* (2002), rot:  $\alpha$ -Helix, türkis:  $\beta$ -Faltblatt, grün: Schleifen, grau: ungeordnete Bereiche, orange eingezeichnet im reaktiven Spalt auf atomarer Ebene der Cysteinrest ( $\text{Cys}_{64}$ ) (Discovery Studio Visualizer, v2.5, Accelrys Software Inc., San Diego, CA: pdb-File 1iu4)

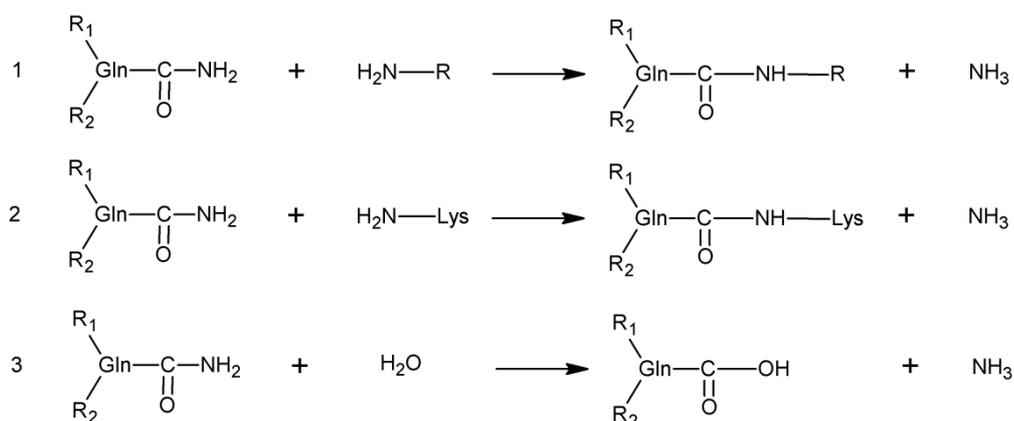
Kanaji *et al.* (1993) veröffentlichten die Primärstruktur der mikrobiellen Transglutaminase des *Streptovorticillium sp.* Bakterienstamm S-8112. Die Aufklärung der Aminosäureabfolge gelang

ihnen mittels Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie (FAB/MS) und dem klassischen Edmanabbau. Die Sequenz der Säuger-TGasen, repräsentiert durch die Meerschweinchenleber-Enzyme (GTGase), weist große Unterschiede zum mikrobiellen Enzym auf. Die sekundären Strukturen der Region um das katalytische Zentrum ähneln sich jedoch stark.

Die Sekundärstruktur der mTGase, die in Abbildung 2-8 dargestellt ist, besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten, wobei die  $\beta$ -Faltblätter im inneren und die  $\alpha$ -Helices im äußeren Bereich um diese herum angeordnet sind. Die  $\beta$ -Faltblätter (türkis) bestehen aus insgesamt sieben antiparallelen Bändern. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen dem fünften und sechsten. Die  $\alpha$ -Helices (Abbildung 2-8, rot) sind in drei Untereinheiten aufgeteilt, welche sich rechts und links, beziehungsweise unter dem reaktiven Spalt befinden. Somit besitzt das aktive Zentrum eine Breite von 13 und eine Tiefe von 16 Å (*Kashiwagi et al., 2002*). Die Oberfläche der mTGase ist vorwiegend positiv geladen, wohingegen sich innerhalb des aktiven Spaltes mehrheitlich negative Ladungen tragende saure Reste befinden. Hydrophobe und aromatische Aminosäurereste befinden sich an den äußeren Seiten des aktiven Zentrums.

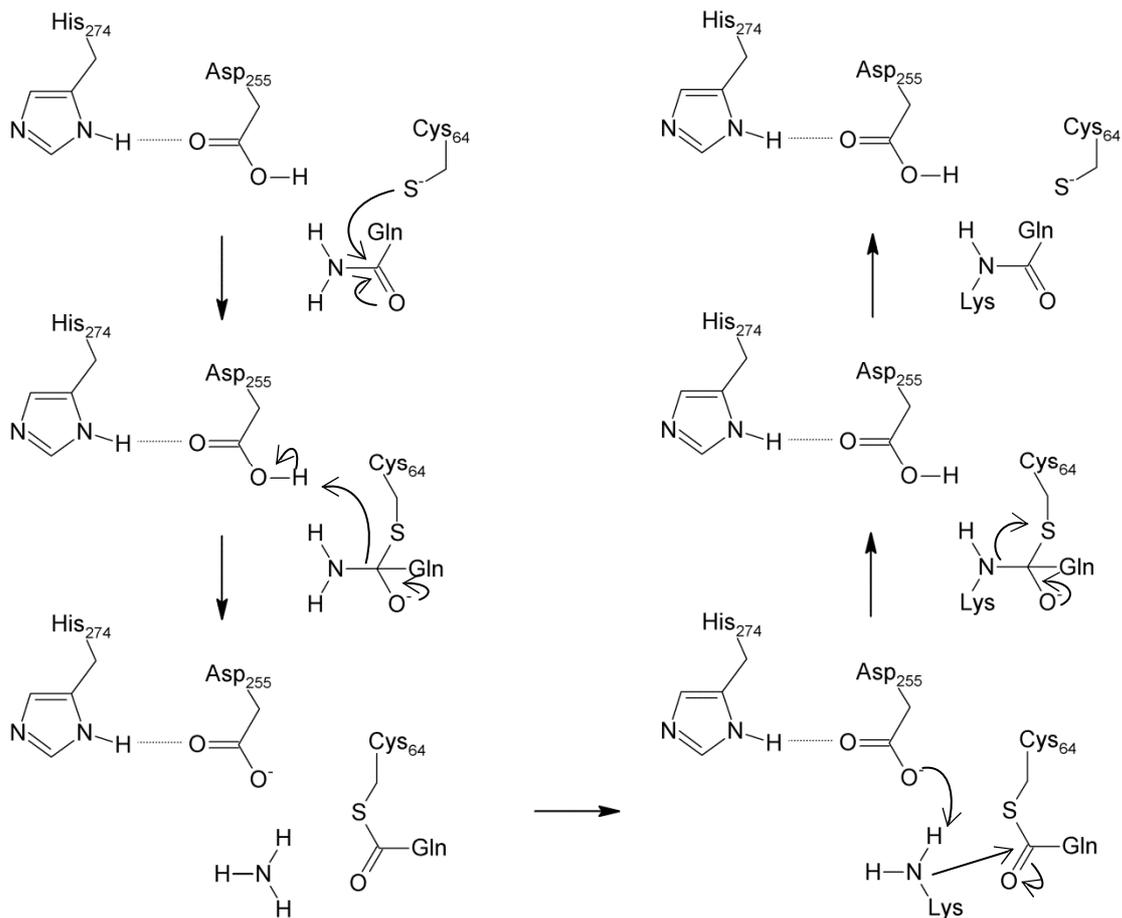
### 2.2.1.1 TGase katalysierte Reaktionen und Reaktionsmechanismus

Die im Allgemeinen durch TGasen katalysierten Reaktionen können in drei Untergruppen gegliedert werden. Aufgrund des zuvor beschriebenen Aufbaus und der stark abweichenden Aminosäuresequenz von klassischen,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen TGasen benötigt die mTGase einen Acyltransfer zwischen einem Acyldonator und unterschiedlichen Acylakzeptoren während des Reaktionsprozesses. Substratbedingt wird vor allem die  $\gamma$ -Carboxamidgruppe eines peptidgebundenen Glutamins als Acyldonator bevorzugt. Diese kann mithilfe der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines peptidgebundenen Lysinrestes das N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin-Isopeptid bilden (Gleichung 2 in Abbildung 2-9). In Abwesenheit von verfügbaren  $\epsilon$ -Aminogruppen des freien oder gebundenen Lysins können auch andere primäre Amine, Polyamine und Ammoniak als Reaktionspartner dienen (*Folk, 1969*). In Ermangelung einer Aminkomponente kann zuletzt auch Wasser als Substrat fungieren (3, Abbildung 2-9, *Griffin et al., 2002*), diese Reaktion verläuft jedoch wesentlich langsamer. Unabhängig vom vorliegenden Substrat wird jeweils Ammoniak aus der Carboxamidgruppe freigesetzt.



**Abbildung 2-9:** mTGase katalysierte Reaktionen (*Lauber, 2002; Jaros et al., 2006*)

Der für die TGase bekannte, vernetzende Mechanismus (Folk, 1969) unterteilt sich in verschiedene, katalytische Phasen und wird auch als Ping-Pong-Mechanismus beschrieben (Abbildung 2-10).



**Abbildung 2-10:** postulierter Ping-Pong-Reaktionsmechanismus (Kashiwagi et al., 2002), „.....“ Wasserstoffbrückenbindung; „—“ kovalente Bindung

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der katalytischen Zentren von TGase und mTGase postulierten Kashiwagi et al. (2002) diesen auf drei Aminosäureresten basierenden Reaktionsweg. Histidin-274 (His<sub>274</sub>), Cystein-64 (Cys<sub>64</sub>) und Asparaginsäure-255 (Asp<sub>255</sub>) sind daran beteiligt. Zuerst greift das Thiol des Cys<sub>64</sub> nucleophil den Acyldonor (Glutaminrest) an und bildet einen binären Komplex, worauf ein Proton der Asp<sub>255</sub> abgegeben und Ammoniak frei wird. Die negativ geladene Asparaginsäure lagert sich nucleophil an das ε-Amin des Donors (Lysinrest) an, welcher nun mit dem binären Komplex reagiert. Anschließend wird das neu gebildete Isopeptid aufgelöst und das Oxyanion der Thiolgruppe wird frei (Jaros et al., 2006).

Dem His<sub>274</sub> wird keine entscheidende Rolle für den Reaktionsverlauf zugeschrieben, es bildet lediglich eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asp<sub>255</sub> aus (Abbildung 2-10). Bei Substitution mit einer anderen Aminosäure behält die mTGase 50% ihrer Aktivität. Wird hingegen Asp<sub>255</sub> ersetzt, besitzt das Enzym keinerlei Aktivität mehr (Kashiwagi et al., 2002).

### 2.2.1.2 Analytische Aspekte

Die klassischen Methoden zum Nachweis der Vernetzungsreaktion mit mTGase basieren auf der Erfassung der beteiligten Gln- und Lys-Reste mittels Markierungsreagenzien, welche gezielt an eine der beiden Aminosäuren anknüpfen. Nach spezifischer Umsetzung mit der mTGase werden die Proben zumeist enzymatisch verdaut und die gebildeten Peptide einer chromatographischen Trennung mittels HPLC unterzogen. Für die Ermittlung reaktiver Lys-Reste wird Benzyloxycarbonyl-L-glutamylglycin (Z-Gln-Gly) eingesetzt, wie *Nieuwenhuizen et al.* an  $\alpha$ -Lactalbumin (2003) und  $\beta$ -Lactoglobulin (2004) zeigten.

Für die Bestimmung reaktiver Gln-Reste stehen die Agenzien Monodansylcadaverin (MDC) (*Nonaka et al.*, 1997; *Coussons et al.*, 1992; *Yan und Wold*, 1984), Triglycin (Gly-Gly-Gly) und Glycylglycinethylester (Gly-Gly-OEt) (*Nieuwenhuizen et al.*, 2003), 6-Aminohexansäure (*Nieuwenhuizen et al.*, 2003; *Nieuwenhuizen et al.*, 2004) sowie [ $^{14}$ C]-Putrescin (*Christensen et al.*, 1996; *Sørensen et al.*, 1999) zur Verfügung.

Zur spezifischen Spaltung und Freisetzung der markierten Aminosäuren werden den Proteinen anschließend Proteasecocktails oder einzelne Enzyme, wie z.B. Lys-C und V8-Protease (*Sørensen et al.*, 1999), Trypsin und V8-Protease (*Yan und Wold*, 1984), Trypsin, Pepsin und Chymotrypsin (*Christensen et al.*, 1996), Trypsin (*Coussons et al.*, 1992), sowie Glu-C Protease (*Nieuwenhuizen et al.*, 2003; *Nieuwenhuizen et al.*, 2004) zugesetzt.

Die genannten Methoden zur Identifizierung potentieller reaktiver Stellen im zu untersuchenden Molekül sind weit verbreitet, der reale, meist globulär vorliegende Bindungspartner besitzt jedoch völlig andere Eigenschaften als das in der Regel kleinere und im Überschuss zugesetzte Reagenz. Konsequenter weisen kann auf Basis dieser Daten eine Überinterpretation der reaktiven Aminosäuren nicht ausgeschlossen werden. Der Ansatz, die beteiligten Aminosäurereste direkt über die gebildeten Isopeptidbindungen nach exzessivem proteolytischen Verdau zu identifizieren, ist weitaus seltener zu finden (*Schäfer et al.*, 2005), aber zu favorisieren, da dieser eine exakte Angabe der beteiligten Reaktionsorte ermöglicht.

Modifizierte Peptide werden abhängig von der eingesetzten Markersubstanz mit verschiedenen Methoden detektiert. MDC-markierte Peptide fluoreszieren und können aufgrund dieser Eigenschaft erfasst werden, wobei sich für eine genauere Identifizierung eine Sequenzanalyse anschließt (*Yan und Wold*, 1984; *Coussons et al.*, 1992). Die mit Z-Gln-Gly und 6-Aminohexansäure markierten Peptide werden über die durch Einbau des Markers hervorgerufene Masseänderung mittels HPLC-MS detektiert und identifiziert (*Nieuwenhuizen et al.*, 2003; *Nieuwenhuizen et al.*, 2004). Andere mit [ $^{14}$ C]-Putrescin radioaktiv markierten Peptide werden über Scintillationsmessungen detektiert und teilweise zur weiteren Untersuchung einer Sequenzanalyse sowie Massenspektrometrie unterzogen (*Christensen et al.*, 1996; *Sørensen et al.*, 1999).

### 2.2.1.3 Einsatz in der Lebensmittelindustrie

Bis in die späten 80er Jahre war aus Meerschweinchenleber gewonnene TGase die einzig kommerziell erhältliche Transglutaminase. Erst seit der Entdeckung des mTGase

sekretierenden Mikroorganismus *Streptoverticillicum* sp. S-8112 durch *Ando et al. (1989)* bestand die Möglichkeit das Enzym großtechnisch zu gewinnen und damit das Applikationsspektrum zu erweitern. Die Allergenität des Proteins für die Herstellung von Lebensmitteln wurde vor dessen Einsatz geprüft. Mit dem „2001 FAO/WHO Decision Tree“ für mTGase aus *S. mobaraense* konnte für das Enzym kein allergisches Potential nachgewiesen werden (*Pedersen et al., 2004*).

Zu berücksichtigen sind weiterhin potentiell antinutritive Effekte, zum Beispiel der Verlust essentieller Aminosäuren wie Lysin (Lys) durch veränderte Bioverfügbarkeiten des Isopeptids. Dass dies nicht der Fall ist, konnten *Finot et al. (1978)* durch Verdau- und Resorptionsstudien an <sup>14</sup>C-markierten Verbindungen zeigen. Das N-ε-(γ-L-Glutamyl)-L-Lysin-Isopeptid wird hierbei intestinal aufgenommen und in den Nieren abgebaut, wobei Lysin frei wird. Die Arbeitsgruppen *Seguro et al. (1995/1996)* sowie *Motoki und Kumazawa (2000)* wiesen zudem weitere dipeptidspaltende Enzyme im Blut und der Leber nach. Ferner konnte mittels HPLC-Untersuchungen nachgewiesen werden, dass ca. 99% in den Körper aufgenommen und nur ca. 1% des Isopeptids mit dem Urin bzw. Faeces ausgeschieden werden (*Seguro et al., 1996*). Die biologische Wertigkeit der Proteine wird somit durch eine Transglutaminasebehandlung bzw. Isopeptidbildung nicht vermindert.

Aus der Literatur ist vielmehr bekannt, dass durch Einführung von Lysin, Aminosäureestern und Lysylpeptiden in Lebensmittelproteine funktionelle Eigenschaften verbessert (*Motoki et al., 1984*) und der Nährwert gesteigert werden kann. So wird die Vernetzungsreaktion ausgenutzt, um verschiedenste Proteine durch Oligomerisierung zu gelieren (*Ando et al., 1989*). In Tabelle 2-5 ist ein Auszug des Anwendungsbereiches der mikrobiellen Transglutaminase zur Modifikation konventionell hergestellter Produkte abgebildet (*Marx, 2008; Jaros et al., 2006*). Gleichwohl die Substratspezifität der mikrobiellen Transglutaminase vergleichsweise gering ist, stellen die meisten globulären Proteine kein Substrat für das Enzym dar. Offenkettige Proteine wie Caseine werden dagegen bevorzugt umgesetzt (*Kamiya et al., 2003*).

**Tabelle 2-5:** Allgemeine Anwendungsbereiche der mTGase (*Marx, 2008; Jaros et al., 2006*)

Einsatzbereich	Modifizierte Proteine	Effekt im Lebensmittel
Joghurtproduktion	Caseine, α-Lactalbumin	Erhöhung der Gelstärke, verringerte Trennung der festen und flüssigen Phase (Synärese)
Tofuproduktion	11S Globulin, 7S Globulin	Verfestigung von Sojamilch zu Sojaquark (Tofu)
Backwarenherstellung	Glutenin, Gliadin	Verbesserung der physikochemischen und rheologischen Eigenschaften des Teiges
Fleisch- und Wurstherstellung	Myosin, Kollagen, Gelatine	Verbesserung von Textur, Elastizität, Festigkeit erhöhte Beständigkeit beim Erhitzen und Einfrieren
Kosmetikindustrie	Keratinocyten-Proteine	Einbringen von primären Aminen in Sonnenschutzmittel, Haut- und Haarpflegemittel

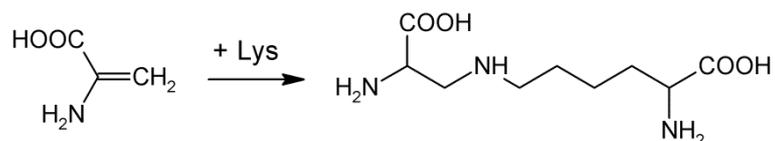
## 2.3 Nicht-enzymatische Vernetzung

Bei den nicht-enzymatischen Reaktionen handelt es sich um die zweite große Kategorie zur chemischen Modifikation von Proteinen, wobei es sowohl zu Ab- als auch Aufbaureaktionen kommen kann. Große Bedeutung hat in diesem Zusammenhang die auch als nicht-enzymatische Bräunung bezeichnete Maillard-Reaktion, bei der reduzierende Zucker als Reaktionspartner mit den Aminofunktionen der Proteine fungieren. Da die im Abschnitt 2.2 betrachteten enzymatischen Reaktionen ohne weiteren Reaktionspartner ablaufen, fokussiert sich die hier vorliegende Arbeit jedoch auch im nicht-enzymatischen Teil auf „reine“ Protein-Protein-Wechselwirkungen.

### 2.3.1 Thermisch induzierte Vernetzung

Eine einfache Methode der nicht-enzymatischen Vernetzung stellt die Reaktion unter Einwirkung von Hitze im neutralen oder basischen pH-Bereich dar. Dabei entsteht z.B. das besonders in erhitzten Milchprodukten vorkommende Dehydroalanin (DHA), welches auch als Indikator für thermische Behandlungen herangezogen wird (*Annan und Manson, 1980*). Es wird eine basenkatalysierte  $\beta$ -Eliminierung einer guten Abgangsgruppe wie Wasser oder Schwefelwasserstoff aus Hydroxy- (z.B. Serin) oder Thioaminosäuren (z.B. Cystein) abstrahiert (*Asquith und Carthew, 1972*). Eine kinetisch bevorzugte  $\beta$ -Eliminierung findet jedoch mit Phosphoserin statt. Bereits milde basische Bedingungen reichen hier für die Abspaltung des Phosphatrestes und für die Bildung des DHA aus (*Freimuth et al., 1980*). Zudem konnte in schwach saurer bzw. neutraler Lösung DHA auch während der Erhitzung von  $\beta$ -Lactoglobulin (*Watanabe und Klostermeyer, 1977*) und  $\beta$ -Casein (*Kleyn und Klostermeyer, 1980; Meyer et al., 1981*) nachgewiesen werden.

Mögliche Reaktionsprodukte und deren ausführlicher Bildungsmechanismus aus DHA können in der Dissertation von *Hellwig (2011)* eingesehen werden. Unter Anwesenheit weiterer Komponenten wie den Aminosäuren Lysin, Cystein, Serin und Histidin kann es beispielsweise zur Ausbildung von charakteristischen Vernetzungsprodukten wie Lysinoalanin (LAL, Abbildung 2-11), Lanthionin (LAN, *Horn et al., 1941*) oder Ornithinoalanin kommen. *Henle et al.* wiesen 1993 erstmals Histidinoalanin in erhitzten Milchprodukten nach. 1,4-Additionen proteingebundenen DHAs mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins, der Thiolgruppe des Cysteins oder der imidazolischen N-Atome des Histidins können weiterhin zu intra- sowie intermolekularen Vernetzungen der vorliegenden Proteine führen. In neutralen, geringfügig erhitzten Lebensmitteln wies *Sternberg et al.* im Jahr 1975 zudem LAL nach.



**Abbildung 2-11:** Bildung von Lysinoalanin (LAL) aus Dehydroalanin (DHA) und Lysin (*Annan und Manson, 1981*)

Einen weiteren Reaktionsweg der thermischen Vernetzung stellen Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen bzw. die Bildung neuer Disulfidbrücken durch Oxidation dar. *Swaisgood (2005)* postulierte die Bedeutung der Seitenketten der Cysteinreste für eine intra- oder intermolekulare Oligomerisierung. Weiterhin konnte bei trockener Erhitzung von  $\beta$ -Lactoglobulin das Proteinrückrad modifiziert werden, was auf die Zyklisierung der Cysteinreste über benachbarte Peptidbindungen unter Bildung von Thiazolinen zurückgeführt wurde (*Paulus et al., 1997*).

Andere hitzeinduzierte Oligomerisierungen basieren auf der Reaktion von Lysin mit Asparagin- oder Glutaminsäure. Dabei werden unter Wasserabspaltung kovalente Isopeptidbindungen geknüpft. Es handelt sich um klassische Kondensationsreaktionen, welche bei geringen  $a_w$ -Werten stattfinden. Abgesehen davon kann bei Reaktion der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins mit den isopeptidbildenden Aminosäuren Glutamin oder Asparagin auch die Abspaltung von Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) beobachtet werden (*Bjarnason und Carpenter, 1970*). Die gebildeten Isopeptide sind kovalent verknüpft und stellen somit eine stabile Vernetzung dar. Dabei entsteht sowohl intra- als auch intermolekular N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin (Glu\_Lys) oder N- $\epsilon$ -( $\beta$ -Aspartyl)lysin (Asp\_Lys). Unter Einsatz hoher, nicht mehr lebensmittelrelevanter Temperaturen konnte *Schmitz et al. (1976)* in verschiedenen Milcherzeugnissen eine 2 - 5%ige Blockierung der Lysinreste durch Isopeptide nachweisen (siehe Tabelle 2-6).

**Tabelle 2-6:** Isopeptidbildung nach trockener und wässriger Hitzebehandlung von Milchproteinen; „+“ 2% und „++“ 5% des jeweiligen Isopeptids, „-“ nicht nachweisbar (*Schmitz et al., 1976*)

Material	Temp. [°C]	Behandlung		Isopeptide	
		Zeit	System	Asp_Lys	Glu_Lys
Milch	136-148	3,6 s - 2 Std	wässrig	-	-
$\beta$ -Lactoglobulin A	140	2 Std	trocken	-	-
$\beta$ -Lactoglobulin AB	121	24 Std	trocken	-	+
$\alpha$ -Lactalbumin	121	24 Std	trocken	-	++
Casein	140	2 Std	trocken	-	-
Casein	121	24 Std	trocken	-	+
Magermilchpulver		walzengetrocknet		-	-
Molkenprotein		sprühgetrockent		-	-

Die Crosslink-Aminosäuren werden neben möglichen Maillard-Produkten in Zusammenhang mit der geringeren Bioverfügbarkeit essentieller Aminosäuren wie Lysin oder Histidin (für Säuglinge) und der resultierenden Nährwertminderung von Proteinen für erhitzte Produkte wie Tier- oder Säuglingsnahrung diskutiert (*Asquith et al., 1974*). Die Einführung von Grenzwerten in Milch und Milcherzeugnissen in den 80er Jahren beruht zudem auf Toxizitätsstudien. So konnte *Woodard und Short (1977)* nach Fütterungsversuchen an Ratten eine renale Toxizität des LAL nachweisen.

### 2.3.2 In-Vacuo Zero-Length Cross-Linking

Eine noch relativ neue Methode der thermisch induzierten Oligomerisierung stellt das In-Vacuo Zero-Length Cross-Linking (ZLCL) dar. Es basiert auf der thermischen Inkubation lyophilisierter Proben unter Vakuum, bei welcher eine kovalente Vernetzung zwischen Aminosäureresten entweder intra- oder intermolekular ohne die Einwirkung weiterer Zusätze/ Chemikalien beobachtet werden kann. Dieser Methode liegt die in Abschnitt 2.3.1 diskutierte Kondensationsreaktion zwischen Lysin und Glutamin(säure) oder Asparagin(säure) unter Abspaltung von Wasser oder Ammoniak zugrunde.

Zu den ersten dahingehend untersuchten Proteinen gehören neben der aus bovinem Pankreas gewonnenen RNase das Lysozym aus Hühnereiweiß (HEWL), bovines Serumalbumin (BSA), Hämoglobin und Chymotrypsin (*Simons et al., 2002*). Die Proteine werden gelöst und nach pH-Wert-Einstellung lyophilisiert, anschließend evakuiert und verschlossen. Während der Lyophilisation wird den Proteinmolekülen die Hydrathülle teilweise entzogen, so dass die Proteine im Folgenden besser interagieren können. Unter Hitzezufuhr von 85°C werden dann beispielsweise die protonierte Aminokomponente und eine deprotonierte Carboxylkomponente miteinander vernetzt (*Simons et al., 2003*). Es erfolgt die Abspaltung von Wasser respektive Ammoniak. Das Verfahren wurde anschließend mit bis zu sechs Zyklen wiederholt. Die oligomerisierten Enzyme wurden mithilfe der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) detektiert, wobei die neu entstandenen Proteinbanden doppelt so hohe Molmassen wie die monomeren Proteine aufwiesen und demzufolge als die Dimere der jeweiligen Enzyme identifiziert wurden. Die maximale Vernetzungsrate für HEWL betrug etwa 30% (sieben Zyklen über 24h, 85°C). Das Vakuum begünstigt dabei die Kondensation thermodynamisch, indem das entstehende Reaktionswasser aus dem Gleichgewicht entfernt wird und die Reaktion auf die Seite der Produkte verschoben wird. Ein vergleichbarer Effekt ist durch Temperaturerhöhung zu erzielen (siehe Abschnitt 2.3.1, Tabelle 2-6).

Weitere Publikationen beschäftigen sich mit HEWL und Meerrettich-Peroxidase (*Yaghoubi et al., 2007* sowie *Maroufi et al., 2008*). In diesen Studien konnte nach Behandlung mit Vakuum und Hitze in beiden Enzymen das Dimere als Hauptvernetzungsprodukte identifiziert werden. Die anschließend untersuchten Aktivitäten weichen für die HEWL-Proben kaum vom Monomer ab und übersteigen im Falle der Peroxidase sogar dessen Ausgangsaktivität.

### 2.3.3 Anwendungsmöglichkeiten nicht-enzymatisch vernetzter Proteine

Zu den am häufigsten modifizierten Proteinen gehören aufgrund ihrer Verfügbarkeit und der analytisch einfachen Gewinnung die Milchproteine, allen voran das Casein. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde Casein unter Zugabe von Formaldehyd, mit Hitze und Druck zu einer Art Kunststoff, dem Galalith polykondensiert. Die freien  $\epsilon$ -Aminogruppen des Lysins werden unter Wasserabspaltung vorrangig mit Glutamin- und Asparaginsäuren umgesetzt (*Nitschmann und Hadorn, 1944*). Anwendung fand das Polymer bis in die 1930er Jahre hinein bei der Herstellung von Schmuck, Knöpfen oder Kämmen (*Krätz, 2004*). Eine vergleichbare Anwendung basiert auf den Ergebnissen von *Cardoso et al. (2011)*. Das Casein wurde hier mit dem Polysaccharid Maltodextrin umgesetzt und die ablaufenden Reaktionen können der

Maillard-Reaktion zugeordnet werden. Das resultierende Biopolymer ist im Vergleich zum klassischen Galalith plastischer, hydrophiler und im sauren Milieu stabiler.

*Lauber (2002)* konnte zeigen, dass nicht-enzymatische Vernetzungsreaktionen während der Lagerung von Ultra-Hoch-Temperaturer (UHT)-Milch bei 37 und 50°C nach bis zu drei Tagen stattfanden. Sie führte die analog nach Joghurtherstellung erzeugten, stichfesteren Gele auf die entstandenen Crosslinkamino­säuren LAL, HAL und Pentosidin zurück. Diese Strukturen werden in Casein auch unter Hochdruckbedingungen, wie sie zur Konservierung von Lebensmitteln angewendet werden, gebildet (*Schwarzenbolz und Henle, 2010*). Sie stellen somit potentielle Indikatorsubstanzen für eine entsprechende Behandlung dar.

## 2.4 Wirkung hoher hydrostatischer Drücke auf Proteine

Auf der Erde herrschen natürlicherweise maximal Drücke von bis zu 110 MPa (Tiefsee) vor. Unter ähnlichen Bedingungen auftretende natürliche Phänomene nachzubilden und so erklären zu können war zunächst das fächerübergreifende Ziel der wissenschaftlichen Betrachtung von Reaktionen unter hohen hydrostatischen Drücken. Anwendung finden sowohl großvolumige Drucktanks für geringe als auch miniaturisierte Quarzzellen für extrem hohe Drücke bis zu einigen GPa. Ende des 20. Jahrhunderts wurde die Methode dann vermehrt in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, da Lebensmittel durch HD kaum morphologisch und sensorisch verändert, pathogene Keime aber abgetötet werden konnten. In den letzten Jahren sind jedoch vermehrt die gesundheitsbezogene Forschung und Medizin in den Fokus gerückt (*Demanzeau und Rivalain, 2011*).

Basierend auf dem Prinzip von LeChatelier und Braun (1885) werden unter Druck ablaufende, chemische Reaktionen im Allgemeinen in die Richtung verschoben, die mit einer Volumenreduktion einhergehen (*Holleman und Wiberg, 1995*). Entsprechend verringern Proteine unter Druck ihr Volumen. Durch Auffaltung gehen sie in einen (partiell) denaturierten Zustand über. *Mozhaev et al. (1996)* konnten beobachten, dass dies meist reversibel geschieht, im Gegensatz zur thermischen Denaturierung, welche aufgrund der Spaltung kovalenter Bindungen und Aggregation oftmals irreversibel abläuft. Somit kann HD als bedeutender Parameter zur Untersuchung der Beziehungen zwischen Struktur und Funktion von Proteinen herangezogen werden (*McCarthy und Grigera, 2006*).

**Tabelle 2-7:** Volumenänderung ( $\Delta V$ ) bei der Ausbildung von Proteinbindungen und -wechselwirkungen (*Mozhaev et al., 1996; Messens et al., 1997*)

Bindungstyp	Bindungsenergie H [kJ/mol]	$\Delta V$ [ml/mol]
Kovalente Bindung	330 - 400 (Peptidbindung) 200 (Disulfidbindung)	-10
Elektrostatische Wechselwirkung	42 - 84	+10 bis +12
Hydrophobe Wechselwirkung	4 - 12	+10 bis +12
Wasserstoffbrückenbindung	8 - 40	Werte um 0

Die von *Chalikian et al. (1996a-c)* postulierten generellen Änderungen des scheinbar spezifischen Volumens sind in Tabelle 2-7 dargestellt und können in drei verschiedene Beiträge unterteilt werden. So setzt es sich aus dem intrinsischen Volumen, welches das Volumen aus dem Van-der-Waals-Volumen der beteiligten Atome plus den Rauminhalt intrinsischer Lücken innerhalb der wasserunzugänglichen Stellen im Proteininneren beinhaltet, zusammen. Diese bei Normaldruck unzugänglichen Hohlräume werden unter Hochdruck zunächst ausgedehnt und nehmen ein größeres Volumen ein, bis zum Erreichen einer kritischen Größe, bei welcher das Lösungsmittel eindringen kann („puff-up“-Effekt) (*Royer und Winter, 2011*). Weiterhin hat das Hydrations- oder Lösungsvolumen, welches das Volumen beschreibt, das aus den Wechselwirkungen des Lösungsmittels über geladene (via elektrostatische Wechselwirkung), polare (z.B., Wasserstoffbrückenbindung) oder nichtpolare (hydrophobe Wechselwirkung) Interaktionen mit Atomgruppen des Proteins eingeht, einen Einfluss. Zuletzt genannt sei das thermodynamische Volumen, es ergibt sich aus thermisch induzierten molekularen Vibrationen und Reorientierungen.

Eine ausführliche Diskussion der variierenden Einflüsse des Druckes auf Primär-, Sekundär und Tertiärstruktur kann der Dissertation von *Partschefeld (2011)* bzw. *Menéndez (2006)* entnommen werden. Für die vorliegende Arbeit relevant ist, dass auf Ebene der Sekundärstruktur die  $\alpha$ -Helices anfälliger gegenüber hohen hydrostatischen Drücken reagieren als die kompakten  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen. Wird die Tertiärstruktur betrachtet, dissoziieren die oligomeren Proteine zu inaktiven und später partiell denaturierten Monomeren. Für einzelsträngige Proteine ist bei Normaltemperatur und einem neutralen pH-Wert hingegen eine hohe Stabilität von bis 400 MPa zu verzeichnen (*Gross und Jaenicke, 1994*).

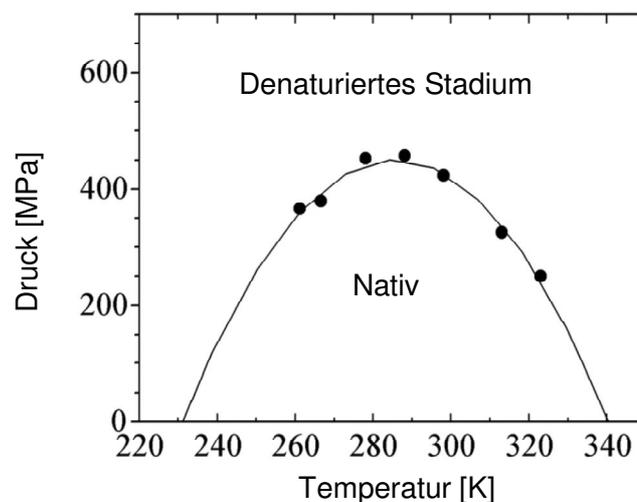
Studien zum HD-Einfluss auf die Bildung von Intermediaten der Fibrillogenese wurden anhand von Transthyretin und  $\alpha$ -Synuclein als Beispielproteine durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um *Foguel und Silva (2004)* stellte dabei das Volumen der Fibrillen der Kompression und Expansion gegenüber. Es konnte gezeigt werden, dass das Volumen der Proteine bei der Denaturierung abnimmt, die anschließende Fibrillbildung jedoch mit einer Expansion einhergeht. Weiterhin ist für Protofibrillen schon bei geringen Überdrücken von wenigen MPa eine Dissoziation zu beobachten, sie sind aber in der Lage sich bei Druckentspannung komplett reversibel zurückzubilden (*Kamatari et al., 2005; Li und Akasaka, 2006*). Diese Tatsache lässt eine Zunahme des Volumens (positives  $\Delta V$ ) während der Fibrillbildung aus dem monomeren Proteinen vermuten.

Die im Kapitel 2.1.3.1 dargestellten sauren Inkubationbedingungen zur Fibrillinduktion setzten immer eine (partielle) Auffaltung des Proteins voraus. Diese könnte im Rahmen der hier angewandten Methode durch Hochdruck substituiert werden. Der Fakt, dass die druckinduzierte Auffaltung reversibel abläuft und in Publikationen von sehr voluminösen und komprimierbaren Protofibrillen berichtet wird (*Akasaka et al., 2007*), lässt jedoch vermuten, dass unter Bedingungen von 600 MPa mutmaßlich keine Keimbildung oder Vorstrukturierung mit amyloidem Potential stattfindet.

### 2.4.1 Wirkung von Hochdruck auf Hühnereiweiß-Lysozym

Lysozym in seiner Rolle als Modellenzym und -protein ist bereits wiederholt unter hohem hydrostatischem Druck untersucht worden. So konnten beispielsweise strukturelle Veränderungen bei einem Druck von 200 MPa vorwiegend in der  $\alpha$ -helicalen Domäne identifiziert werden, während die Domäne des  $\beta$ -Faltblattes eine höhere Stabilität zeigte (Refaee et al., 2003). Vergleichende Untersuchungen bei 300 MPa bzw. 600 MPa, pH 7, 30 min zeigten, dass bei höherem Druck eine Abnahme der  $\alpha$ -helicalen Strukturen um 65,9% zu verzeichnen ist, während die Sekundärstruktur bei 300 MPa unbeeinflusst bleibt (Tedford et al., 1999). Akasaka et al. (1997) konnten für kältedenaturiertes HEWL anhand von NMR-Messungen reversible Änderungen bereits bei Drücken bis 200 MPa ausmachen, welche elastische Deformationen des Moleküls hervorriefen. Diese reversiblen, druckinduzierten Strukturänderungen waren im Wesentlichen auf hydrophobe Bereiche begrenzt. Signifikante Veränderungen der Sekundärstruktur von HEWL wurden erst ab Drücken von 600 MPa durch FTIR-Messungen beobachtet und mit der Bildung einer Random-Coil-Struktur in Verbindung gebracht (Smeller et al., 2006). Die ebenfalls reversibel verlaufende Konformationsänderungen erklärten Smeller et al. (2006) bei Entspannung mit dem zurückgedrängten Wasser, welches zunächst unter Druck in das Protein hineingepresst wurde und eine Änderung der Tertiärstruktur und nicht der Sekundärstruktur verursacht. Die bei Rückfaltung auftretenden Intermediate sind vermutlich instabil und aggregationsanfällig. Dennoch zeigen sie wesentliche Elemente der ursprünglichen Sekundärstrukturen sowie locker gepackte hydrophobe Molekülbereiche. Fink (1998) belegte die erhöhten Tendenzen zur Aggregation nach HD-Behandlung im Vergleich zum aufgefalteten Zustand durch Nachweis einer kompletten Umverteilung der hydrophoben Seitenketten über die gesamte Proteinsequenz.

Abbildung 2-12 zeigt das Phasendiagramm des HEWL bei verschiedenen Drücken und Temperaturen. Es wird deutlich, dass das Protein über eine weite Temperaturspanne selbst bei moderaten Drücken bis über 200 MPa stabil ist (Maeno et al., 2009). Auch bei Variationen der Temperaturen ändert sich das atomare Volumen von Lysozym nicht signifikant.



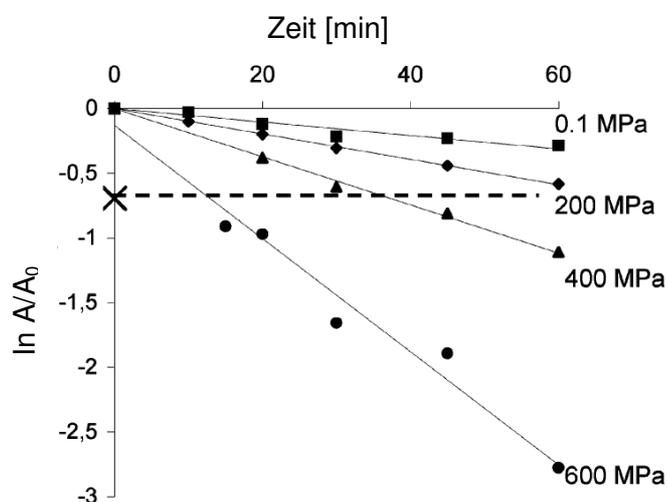
**Abbildung 2-12:** Phasendiagramm des HEWL bei pH 2, mittels Fluoreszenzmessung, Fläche von  $p_m$  (Druck beim Mittelpunkt des Übergangs zwischen nativ und entfaltet oder halb-denaturiert) gegen  $T_m$ , Kurvenverlauf gibt den besten Fit für die Experimentaldaten wieder,  $\Delta G = 0$  (Maeno et al., 2009)

Die beobachtete Temperaturabhängigkeit des scheinbar spezifischen Volumens von HEWL kann hauptsächlich den Modifikationen der Hohlräume, den Hydratationsveränderungen an der Proteinoberfläche (unter Berücksichtigung der Gesamtmolekülgröße) und den Änderungen des thermodynamischen Volumens zugeschrieben werden. Eine Vorhersage wie sich das strukturanaloge, evolutionsbiologisch verwandte  $\alpha$ -Lactalbumin unter HD verhält, ist auf Basis der Daten zu HEWL nicht möglich. Vergleichbare Proteine können sich unter Druck absolut verschieden verhalten. Zurückzuführen ist dies vor allem auf die variierenden Hohlräume im Molekülinneren (Royer und Winter, 2011).

#### 2.4.2 Wirkung von Hochdruck auf die mikrobielle Transglutaminase

Obwohl die Hochdruckbehandlung zur Inaktivierung vieler Enzyme eingesetzt wird, kann der Einsatz hoher hydrostatischer Drücke auch unter Erhalt bzw. Erhöhung der Aktivität ausgewählter Proteine angewandt werden (Eisenmenger und Corcuera, 2009). Die mikrobielle Transglutaminase zeichnet sich durch eine dem HEWL vergleichbar hohe Druckstabilität aus. Gross und Jaenicke (1994) sowie Menéndez et al. (2006) führten dies auf einen kompakten Kern mit vielen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen in Umgebung des reaktiven Zentrums zurück. Daher wird das Enzym zur Vernetzung von Proteinen unter Druck eingesetzt (Lauber et al., 2001b). Die resultierende Oligomerisierung, unter anderem von globulären Proteinen, dient der Modifikation der nativen Proteineigenschaften (Lauber et al., 2001a; Partschefeld et al., 2007a).

Menéndez et al. (2006) untersuchten das Inaktivierungsverhalten von mTGase in Abhängigkeit von verschiedenen Drücken bei einer konstanten Temperatur von 40 °C (Abbildung 2-13). Es ist zu sehen, dass das Enzym bis 200 MPa sehr stabil ist und nach einer einstündigen Druckbehandlung noch mehr als 50% seiner enzymatischen Aktivität aufweist. Ab 400 MPa ist, mittels Zirkulardichroismus-Spektrometrie (CD) detektiert, nach 30 min bei 40 °C eine Abnahme der  $\alpha$ -helicalen Strukturen einhergehend mit der Zunahme ungeordneter Bereiche zu erkennen. Nach 40 min ist eine 50%ige Inaktivierung zu verzeichnen. Unter Druckerhöhung auf 600 MPa wird bereits nach 15 min nur noch die Hälfte der Ausgangsaktivität erreicht.



**Abbildung 2-13:** Inaktivierung der mTGase unter Hochdruckbehandlung bei 0,1, 200, 400, und 600 MPa und je 40 °C; „- -“ verbleibende Restaktivität von 50% (Menéndez, 2006)

Zudem konnte *Menéndez (2006)* zeigen, dass sich bei niedrigeren Temperaturen von 20 °C und 600 MPa die zur 50%igen Inaktivierung benötigte Zeit auf zirka 100 min erhöht (versechsfacht). Weiterhin wird das Enzym bei Raumtemperatur erst ab 400 MPa bzw. bei Atmosphärendruck ab 60 °C messbar inhibiert. Basierend auf diesen Erkenntnissen nimmt die Druckempfindlichkeit der Transglutaminase mit steigenden Temperaturen ( $\geq 20$  °C) zu. Die Inaktivierung der mTGase wird somit von der Temperatur stärker als vom Druck beeinflusst und folgt einer Reaktion 1. Ordnung (*Lauber et al., 2001a*). Vollständige Deaktivierung erfolgt bei Atmosphärendruck nach 2 min und 80 °C (*Menéndez et al., 2006*). Die druckinduzierte Inaktivierung beruht folglich auf dem Abbau der  $\alpha$ -Helices im Oberflächenbereich des Enzyms, wodurch die Tertiärstruktur verändert wird, was sich wiederum auf die Substratbindung auswirkt (*Menéndez et al., 2006*). Die Rückfaltung nach Hochdruckbehandlung erscheint im Gegensatz zu HEWL unvollständig, da bei Druckreduktion der Aktivitätsverlust bestehen bleibt.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

#### 3.1.1 Chemikalien

**Tabelle 3-1:** Verwendete Chemikalien

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
1,4-Dithiothreitol (DTT)	≥ 99%,	Molecular, Leiden, Niederlande
8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS)	A1028	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetonitril	HPLC gradient grade, 20060.320	VWR, Darmstadt
Acrylamid	4 x umkristallisiert, research grade	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Aminopeptidase M, EC 3.4.11.2	28 U/ mg, L5006	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniak	25%, reinst	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	p.a., 1.01116	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (PER)	p.a., 13375	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Ammoniumsulfat	p.a., 2674	Baker, Deventer, Niederlande
Benzyloxycarbonyl-L-Glutamylglycin (Z-Gln-Gly-OH)	C-1635	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Bidestilliertes Wasser		hauseigene Destillationsanlage
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fraktion V, A-7906	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chelaplex III (EDTA)	reinst, p.a.	VEB Laborchemie, Apolda
Chymotrypsin	C4129	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliantblau G250	SERVA blue G	Fluka, Taufkirchen
Cytochrom C	250600	Merck, Darmstadt
D-(+)-Saccharose	≥ 99,5%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	zur Analyse, 12149	Merck, Darmstadt
Eisen-(III)-chlorid	wasserfrei, 98%	Grüssing, Filsum
Entsalztes Wasser		hauseigene Entsalzungsanlage
Essigsäure	p.a.; 100%, 20104.298	VWR, Darmstadt
Essigsäure	technisch	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	99%, vergällt	Berkel AHK, Berlin
Ethylenglycol	technisch, 24407.361	VWR, Darmstadt
Fleischextrakt trocken	für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt
Glutathion red.	≥ 98.0%, G4251	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	> 99,5%; wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Ph. Eur., 8486.9029	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	für mikrobiolog. Unt.	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Hydroxylammoniumchlorid	zur Analyse, 1.04616	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	kristallin, I6125	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	zur Analyse, 1.09634.2511	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	zur Analyse, 30407	Riedel-de Haen, Seelze-Hannover
Kaliumhydroxid	99,5%, 12039	Grüssing, Filsum

### 3 Experimenteller Teil

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Kongorot	min. 85%, C6767	AppliChem, Darmstadt
Laktose	wasserfrei , Ph. Eur., 17814	Fluka, Taufkirchen
L-Glutaminsäure- $\gamma$ -monohydroxamat	G2253	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lithiumcitrat-Puffer	0,12 N; pH 2,2	Sykam Chromatographie, Eresing
Maltodextrin from maize starch	31414-20	Fluka, Buchs
Methanol	reinst	Merck, Darmstadt
Methanol	rein	VWR, Darmstadt
Methylenbisacrylamid	Electrophoresis purity reagent	Bio-Rad, Richmond, USA
Methylenbisacrylamid	kristallin, rein	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Micrococcus luteus	ATCC No. 4698 lyophilized cells	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mikrobielle Transglutaminase	75-130 U/g, Activa® MP	Ajinomoto, Hamburg
<i>N,N,N,N'</i> - Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	research grade	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Natriumacetat-Trihydrat	99,5%, 12113	Grüssing, Filsum
Natriumchlorid	zur Analyse	VWR, Darmstadt
Natriumcitrat-Puffer	0,2 N; pH 2,2	Sykam Chromatographie, Eresing
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	reinst	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	kristallin, reinst	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	99,5%	Grüssing, Filsum
Natriumhydroxid	analytical reagent	VWR, Darmstadt
Natriumsulfat	wasserfrei , 99%, 12174	Grüssing, Filsum
Ninhydrin	$\geq 99\%$ , 30410	Sykam Chromatographie, Eresing
Orange G	C.I.16230	Merck, Darmstadt
Pepsin from porcine gastric mucosa	10 FIP-U/mg, 1.07192	Merck, Darmstadt
Peptone from meat	für mikrobiolog. Unt.	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Phosphorsäure	85%, 13033	Grüssing, Filsum
Prolidase from porcine kidney	278 U/ mg Protein, P6675	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pronase E from Streptomyces griseus	4000 PU/mg Protein, 1.07433	Merck, Darmstadt
Protein test mixture 4	Dalton marker proteins	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Protein test mixture 5	Dalton marker proteins	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Reinstwasser	Leitfähigkeit 0,055 $\mu$ S/cm	hauseigene Reinstwasseranlage
Remazol Brilliant Blue R	R8001	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	rauchend 37%, 1.00317	Merck, Darmstadt
Stickstoff	flüssig	Bitzer-Stiftungsprofessur für Kälte-Kryo-Technik, Dresden
Thioflavin T	$\sim 75\%$ , T3516	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymol	3209.1	Carl Roth, Karlsruhe
TPCK-treated Trypsin from bovine pancreas	10,000 BAEE units/mg protein, T1426	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	analytical reagent	VWR, Darmstadt
<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methylglycine (Tricin)	analytical grade	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Trinatriumphosphat-Dodecahydrat	reinst, p.a.	VEB Laborchemie, Apolda
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	buffer grade, A1379	AppliChem, Darmstadt

### 3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3-2:** Allgemein verwendete Geräte

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Aminosäureanalysator	S 4300	Pharmacia SYKAM, Fürstenfeldbruck
Analysensieb	Maschenweite 0,4 mm, Edelstahl	Haver & Boecker, Oelde
Analysenwaage	BP 121S und BP 3100S	Sartorius, Göttingen
Elektrophorese-Mischbehälter	SG 50	Hofer, Holliston, MA, USA
Elektrophorese-Kammer, vertikal	SE 60 Series	Hofer, San Francisco, USA
Elektrophorese-Kammer, vertikal	SE 600 Series	Hofer, San Francisco, USA
Elektrophorese-Netzgerät	EPS 3500 Electrophoresis Power Supply Model 1000/5000 Power Supply	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK Bio-Rad, München
Evaporator TurboVap LV		Zymark Ctr., Hopkinton MA, USA
Fluoreszenzspektrometer	F-4500 FL	Hitachi, Japan
Fluoreszenzspektrometer	Tecan Infinite M200	Tecan Männedorf, Schweiz
Gefriertrocknung	Beta 1-8 K, Alpha 1-4 LD plus, Alpha 1-2	Martin Christ, Osterode am Harz
GPC, semi-präparativ:	Knauer Pumpe: Wellchrom HPLC-Pump K-1001, Detektor: UV-Detektor K-2501	Knauer, Berlin
GPC-Säule	Superdex 75 HiLoadTM 26/60 prep grade	GE Healthcare, Upsala, Schweden
Gradienten-Mischkammer	SG50	Hofer, San Francisco, USA
Heizrührwerk mit Thermostat	RH basic	IKA Labortechnik, Staufen
Hochdruckanlage	max. 7000 bar	Bernd Dieckers, Willich
HPLC- Anlage	Autosampler G1329A, binäre Hochdruckpumpe G1312A, Degasser G1379A, Säulenofen G1316A, UV-Detektor G1315B	Agilent 1100 series, Agilent Technologies, Böblingen,
Injektionsspritze	ILS Microsyringes Borsilicate glass 3.3 Volumen 2,5 ml, 10 µl	ILS, Stützerbach
Inkubationsschrank BE 400		Memmert, Schwabach
Kationenaustauscher-Chromatographiesäule	Aminosäureanalytik (ASA)	Grüssing, Olching
KF-Titrino 701		Metrohm, Filderstadt
Kolbenhubpipetten	Research (500-5000; 1000; 500;100; 50; 10 µl), Reference (100-1000; 10-100; 2-20 µl)	Eppendorf, Hamburg
Kühlkammer	Isocab	Harelbeke-Bavikhove, Belgien
Massenspektrometer	electrospray ionization - time of flight - mass spectrometry (ESI-TOF-MS)	Mariner Biospectrometry Workstation, PerSeptive Biosystems, Framingham, USA
Mehrkanalpipetten	Transferringpipette®-8 30-300 µl, Transferringpipette®-S 10-100 µl	Brand, Wertheim
pH-Meter	inoLab Level 2	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim
Präzisionswaage	BP 3100S	Sartorius, Göttingen
Rührwerk	Mini MR Standard	IKA Labortechnik, Schwabach
Scanner	TLC Analyzer, VISUALIZER 510	CAMAG Chemieerzeugnisse & Adsorptionstechnik, Berlin
Spektrophotometer	Ultrospec 1000 UV/VIS	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
Spektrophotometer	Multiscan Ascent	Thermo scientific, UK

### 3 Experimenteller Teil

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Spektropolarimeter	Novaspec II Jasco J 710	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK Jasco Labor- und Datentechnik, Gross-Umstadt
Transelektronenmikroskop (TEM)	Morgagni 268, 100 kV mit einer 11- Megapixel CCD-Kamera	FEI, Hillsboro, USA
Trockenschrank	Typ ULM 500, BE 400	Memmert, Schwabach
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 Sonorex RK 52 H	Bandelin electronic, Berlin Bandelin electronic, Berlin
UV/VIS-Polychromator	SPECORD® S 100	Carl Zeiss Technology, Jena
Vakuumpumpkonzentrator	Thermo Savant SPD Speed Vac	Thermo Savant, Holbrook (NY), USA
Vakuumpumpkonzentrator mit Kühlfalle	Savant Speed Vac SPD111V mit Universal Vacuum System Plus VS400A	Avant, Farmingdale, USA
Vakuumpumpe	Drehschieberpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Vakuumpumprotationsverdampfer		Heidolph Schwabach Laborata 4000
Vortexer	Vortex Genie 2.0 MS1 Minishaker	Scientific Genie, New York, USA
Wasserbad mit Thermostat	W15	Thermo Haake, Karlsruhe
Zentrifugen	Biofuge pico Heraeus Biofuge stratos Centrifuge 5804	Heraeus, Osterode Kendro, Langenselbold Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 3-3:** Verbrauchsmaterialien

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Dialyseschlauch	D-9652-100FT, cutoff 12 kDa	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eppendorf Tubes, Safe Lock	1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Filter für Lösungsmittel-Filtration	0,45 µm, hydrophiles Polypropylen	Pall, Crailsheim
Hydrolyseröhrchen	verschraubbar	Schott, Mainz
Kryoröhrchen	2, 5 und 5 ml	Greiner, Frickenhausen
Küvetten	4 und 1,5 ml Halbmikro, PMMA	Brand, Wertheim
Membranfilter	0,45 µm ; 0,20 µm	Pall, Ann Arbor, USA
Mikrotiterplatte	NUNC 96F schwarz, pureGrade	Brand, Wertheim
Parafilm	PM 996	Pechiney Plastic packaging, Menasha, WI, USA
Pipettenspitzen	1000-10000; 100-1000; 10-100; 2-20 µl	Eppendorf, Hamburg
Plastikrührer		Brand, Wertheim
Präzisionsküvetten	Quarzglas Suprasil®, Schichtdicke 10 mm	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße	0,5; 1,5; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Standzentrifugenröhrchen	5,0 ml	VWR, Darmstadt
Vakuumpump-Hydrolyse-Röhrchen	20 ml	Perbio Science, Bonn
Zentrifugenröhrchen	Falcon Tubes 15 und 50 ml	VWR, Darmstadt

### 3.1.3 Untersuchungsmaterialien

**Tabelle 3-4:** Peptide, Proteine und Proteinmischungen

Name	Spezifikation, Katalognr.	Hersteller
Lacprodan Alpha-10 (Molkenprotein-isolat)	45,1% $\alpha$ -Lactalbumin 45,9% $\beta$ -Lactoglobulin	ARLA Foods Ingredients amba, Viby, Dänemark
Aspartyllysin	94,30%	Synthese durch Dr. M. Hellwig, TU Dresden
Glutamyglycin	G1970	Bachem
Lysozym from Hen Egg-White (HEWL)	~ 70.000 - 96.500 U/mg, 62971	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\alpha$ -Lactalbumin	~ 85%	Isolierung aus dem Molkenprotein-isolat (Kapitel 3.4)
$\alpha$ -Lactalbumin from bovine milk	> 85%	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Casein	nach Aschaffenburg (1963)	Isolierung durch Dr. C. Partschefeld, TU Dresden
$\beta$ -Lactoglobulin from bovine milk	~ 90% (PAGE)	Sigma-Aldrich, Steinheim

**Tabelle 3-5:** Mikroorganismen aus der Stammsammlung der Allgemeinen Biochemie, Technische Universität Dresden

Name	Spezifikation	Färbung nach Gram	Herkunft
Bacillus sphaericus	-	grampositiv	Bodenprobe Degussa (Antwerpen)
Bacillus subtilis	-	grampositiv	Süßmuth, Uni Hohenheim
Escherichia coli	TG 1	gramnegativ	nicht bekannt
Pseudomonas putida	ATCC 17390	gramnegativ	Institut für Mikrobiologie, Uni Hohenheim
Streptococcus lactis	B 23/2/1	grampositiv	nicht bekannt

### 3.1.4 Software

**Tabelle 3-6:** Verwendete Software

Anwendung	Programm
Aminosäureanalytik (ASA)	Chromstar 6.3, SCPA GmbH
Elektrophorese (SDS-PAGE)	Totallab TL 120 v2006c, Wincats, USA
Fluoreszenzmessung (ThT, ANS-Assay)	FL Solutions, Hitachi
Gelpermeationschromatografie (GPC)	Eurochrom 2000, Version 2.05, Knauer, Gerätetechnik Berlin
Kurvenanpassung, UV-Spektren (CD)	J-700 for Windows Standard Analysis, Version 1.35.01, JASCO Corp. und CDPro, CONTIN Methode
Massenspektroskopie (ESI-TOF-MS)	Rechnergestützte Datenaufnahme mittels ChemStation for LC 3D, Agilent Technologies, Böblingen Auswertung Data Explorer Version 4.0.0.1, Applied Biosystems, Foster City, USA
Oberflächenhydrophobität (ANS)	Tecan i-Control™
UV/VIS-Spektren (Kongorot)	Aspect Plus 1.7 (1993-2000)

## 3.2 Erzeugung modifizierter Proteine

### 3.2.1 Enzymatische Vernetzung von Proteinen

Sofern nicht anders beschrieben wurden ein Protein und das Enzym mTGase in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit Tris-HCl-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung in ein Kryoröhrchen (2 oder 5 ml) überführt und luftblasenfrei verschlossen. Die so vorbereiteten Proben wurden unterschiedlich behandelt und inkubiert.

#### Benötigte Reagenzien

Für den 50 mM **Tris-HCl-Puffer** wurde 0,6057 g Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) in 80 ml bidest. Wasser gelöst, mit 0,3 N HCl auf pH 7,5 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

**mTGase** wurde von Ajinomoto Foods Europe (Hamburg) unter der Bezeichnung „Transglutaminase Activa MP“ zur Verfügung gestellt und über ihre Aktivität charakterisiert. „Activa MP“ ist ein Lebensmittelzusatzstoff, welcher gemäß Hersteller das Enzym zu einem Proteingehalt von 1% (keine anderen Proteine detektierbar - *Menéndez et al., 2006*), Lactose (90%), und Maltodextrin (9%) enthält.

Als Proteine kamen **HEWL** (direkt von Sigma-Aldrich erworben und unverändert eingesetzt) und in ersten orientierenden Studien  **$\alpha$ -Lactalbumin** (isoliert aus Lacprodan siehe 3.4) zum Einsatz.

#### 3.2.1.1 Erzeugung von Protein-Oligomeren unter Hochdruck

Druckübertragendes Medium:	Ethylenglycol : Wasser (50:50, v/v)
Temperatur:	Raumtemperatur (RT), sowie 40 - 60 °C
Zeitdauer:	15, 30, 60 und 120 min
Druck:	1 - 600 MPa (Stufen von 200 MPa)
Konzentration der Proteine:	0,5 - 7% (w/v)
mTGase:	5 - 200 U mTGase/g Protein

Die Hochdruckanlage wurde mit Wasser/Ethylenglycol (50:50, v/v) zur Druckübertragung betrieben, auf die gewünschte Temperatur vortemperiert und währenddessen die Probelösung wie oben beschrieben vorbereitet. Die Autoklaven wurden mit den Proben bestückt und nach Anlegen des gewünschten Druckes die festgelegte Dauer der Druckbehandlung genau gestoppt. Der maximal mit der Anlage zu erreichende Druck lag bei 700 MPa und wurde mit einer Geschwindigkeit von 300 MPa/min aufgebaut. Die Dekompression auf Atmosphärendruck wurde innerhalb von 20 s erreicht. Zum Abstoppen der enzymatischen Vernetzung wurden mTGase-haltige Proben nach der Inkubation für 5 min in ein auf 85 °C erhitztes Wasserbad gestellt. Anschließend wurden die Proben einer Dialyse (siehe 3.5) unterzogen, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.1.2 Reinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC)

#### Benötigte Reagenzien

Für den **Probenpuffer** wurden 0, 0,9 oder 1,8 g Harnstoff (0 M, 3 M bzw. 6 M) in einem 5 ml Messkolben eingewogen und mit 50 mM Tris-HCl-Puffer (siehe 3.2.1) aufgefüllt.

Säule:	Superdex 75 HiLoad™ 26/60 prep grade XK 26 Pharmacia Biotech
Eluent:	0,1 M Natriumacetat, 3% NaCl, pH = 4,0 (nach <i>Wilson et al., 1993</i> ) (13,6 g Natriumacetat, 30 g NaCl in bidest. Wasser lösen, mit Eisessig auf pH 4,0 bringen, auf 1 L auffüllen, membranfiltrieren (0,45 µm) und entgasen)
Fluss:	2 ml/min
Gradient:	isokratisch, Laufzeit 180 min
Kalibrierung:	je 5 mg/ml (w/v): Cytochrome C 12,4 kDa, beta-Lactoglobulin 18,4 kDa, Ovalbumin (aus Chicken egg white) 43 kDa, bovines Albumin (Serum) Fraction V 66 kDa, Blue Dextran (Totvolumen) 2000 kDa
Probe:	20 mg Probe werden in 2,5 ml Probenpuffer gelöst, filtriert (0,45 µm)
Injektion:	2 ml, manuell
Säulentemperatur:	RT
Detektion:	240 nm
Auswertung:	Eurochrom 2000, Knauer-Software

Die zwischen der 85ten und der 145ten Minute eluierenden Substanzen wurden über eine Laufzeit von jeweils 10 min fraktioniert. Die gesammelten sechs Fraktionen wurden dialysiert (siehe 3.5) und anschließend gefriergetrocknet.

### 3.2.1.3 Konzentrierung durch Ammoniumsulfatfällung

Die Methode beruht auf *Englard und Seifert (1990)* sowie *Rosenberg et al. (1998)* und wurde von *Ereth (2008)* adaptiert.

#### Benötigte Reagenzien

Eine **gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung** (pH = 7,0) wurde hergestellt, indem 52,85 g Ammoniumsulfat (4 M,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) in etwa 80 ml bidest. Wasser unter Erhitzen gelöst wurden. Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert mit Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) eingestellt und auf 1 L aufgefüllt. Eine Kristallbildung zeigte die Sättigung an.

#### Allgemeine Versuchsbedingungen

Probe:	1%ig (w/v), ausschließlich HEWL und dessen modifizierte Proben
Temperatur:	4 - 6 °C
Inkubationszeit je Fällung:	30 min
Zentrifuge:	4 °C, 10 min, 10.000 rpm

**Tabelle 3-7:** Schema zur Herstellung verschiedener Sättigungsstufen für flüssige Proben (am Beispiel einer 1%igen Proteinprobe)

Finale Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Sättigung in [%]	Ammoniumsulfat [g]	Tris-HCl-Puffer [ml]	Probenlösung [ml]
60	3,90	Auffüllen auf 10	5
40	2,43	Auffüllen auf 10	5
25	1,44	Auffüllen auf 10	5

**Tabelle 3-8:** Konzentrationsreihe der verschiedenen Sättigungsstufen für feste Proben

Finale Konzentration, Sättigung in [%]	Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung [ml]	Tris-HCl-Puffer [ml]
100	10,0	0
60	6,0	4,0
40	4,0	6,0
25	2,5	7,5

### Fällung

Die Ammoniumsulfatfällung wurde in einem Maßstab von 2 - 5 ml erprobt und konnte problemlos auf größere Ansätze ( $V = 25$  ml) übertragen werden. Zur Fällung konnten die Probenlösungen sofort nach enzymatischer Behandlung (Kapitel 3.2.1) oder nach Dialyse und Lyophilisation als Pulver eingesetzt werden. War die Probe auf einen Gehalt von 1% (w/v) verdünnt (Tabelle 3-7) oder der Feststoff (Tabelle 3-8) gelöst (100 mg pro 10 ml), sowie die gewünschte Sättigungskonzentration erreicht, wurde zur Einstellung eines Lösungsgleichgewichtes 30 min bei 4 - 6°C gerührt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation, das erhaltene Pellet wurde abgetrennt und zweifach mit je 5 ml Ammoniumsulfat-Lösung der zur Fällung eingesetzten Konzentration gewaschen. Danach wurde das Pellet in dest. Wasser resolubilisiert und nach Abtrennung des Ammoniumsulfates mittels Dialyse lyophilisiert. Das Zentrifugat wurde abdekantiert und kann durch Zugabe von Ammoniumsulfat auf die nächste Sättigungsstufe angehoben werden. Die dazu benötigte Menge des Salzes wurde ausgehend von der bereits vorhandenen Sättigung (Berechnungstabelle: *Rosenberg et al., 1998*) ermittelt.

### 3.2.2 Thermisches und Vakuum-induziertes Zero-length Cross-linking

Das Verfahren orientierte sich an der von *Simons et al., (2002, Patent 2003)* veröffentlichten Methode, bei welcher eine kovalente Vernetzung einzelner Proteinmonomere nur über Kondensationsreaktion unter Vakuum in Hitze stattfindet. Versuchsparametervariationen wurden untersucht (*Noack, 2011*).

## Benötigte Reagenzien

Das Protein **HEWL**, sowie für erste orientierende Studien das **Molkenproteinisolat**, bzw.  **$\alpha$ -Lactalbumin** (siehe 3.4) und  **$\beta$ -Casein** (isoliert nach *Aschaffenburg, 1963*) wurden eingesetzt.

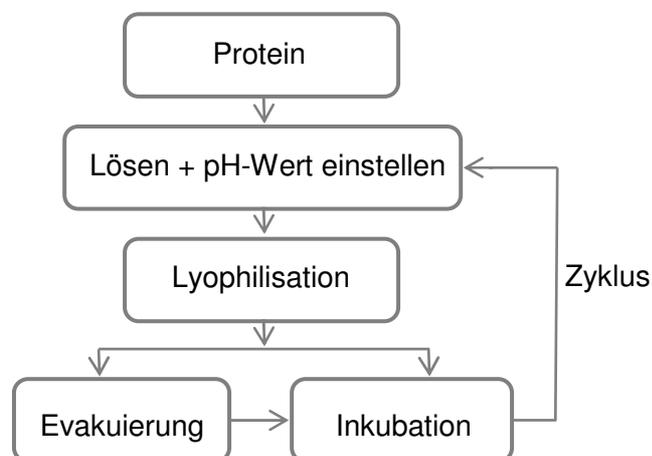
Eine 0,1 M HCl bzw. 0,1 M NaOH diente zur pH-Wert-Korrektur, so konnten ladungsbasierte Reaktionen minimiert werden.

## Probenvorbereitung

Es wurden 50 mg des jeweiligen Proteins in ein Rollrandglas eingewogen, in etwa 3 ml Reinstwasser gelöst, der pH-Wert auf 7 eingestellt und das Volumen wurde auf 5 ml aufgefüllt (10 mg/ml). Die eingestellten Lösungen wurden in ein Vakuum-Hydrolyse-Röhrchen überführt oder verblieben in dem durch perforierten Parafilm abgedeckten Rollrandglas. Die so vorbereiteten Proben wurden lyophilisiert. Anschließend wurden die Vakuum-Hydrolyse-Röhrchen mit einem Zwei-Stufen-Schraubverschluss teilverschlossen und nach zirka 15minütiger Evakuierung ganz abgedichtet. Die Rollrandgläser wurden unter Normaldruck mit Kunststoffdeckel und Parafilm luftdicht verschlossen.

## Inkubation

Konzentration der Lösung (vor Trocknung):	1%ig (w/v)
Temperatur:	RT, 70 - 100 °C
Druck:	$0,3 \times 10^{-6}$ bis 0,1 MPa (Atmosphärendruck bei RT)
Inkubationszeit:	24 h



**Abbildung 3-1:** Versuchsschema des thermisch und Vakuum-induzierten Zero-Length Cross-Linkings

Evakuierte und Normaldruck-Proben wurden im Trockenschrank in Sandbädern inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 mg zur Charakterisierung mittels Elektrophorese (Kapitel 3.7.3) entnommen. Die verbleibende Probe wurde einem weiteren Zyklus (Abbildung 3-1) unterzogen. Je nach Ansatz wurden bis zu vier Zyklen durchgeführt.

### 3.3 Erzeugung von HEWL-Fibrillen

Zur Erzeugung von Fibrillen aus HEWL sind laut Literatur zahlreiche Bedingungen anwendbar. Eine häufig angewandte Methode stellte die Absenkung des pH-Wertes über einen längeren Zeitraum bei leicht erhöhter Inkubationstemperatur dar. Die genauen Bedingungen wurden *Wang et al. (2009a)* entnommen und von *Kießling (2011)* apparativ angepasst.

#### Benötigte Reagenzien

Die **Salzlösung** (pH  $2,2 \pm 0,1$ ) bestand aus 0,7989 g Natriumchlorid (NaCl) und 0,02 g Kaliumchlorid (KCl), gelöst in ca. 85 ml bidest. Wasser. Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf 2,2 eingestellt und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

#### Fibrillengenerierung

Mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml (8 mg in 16 ml pH-2,2-Lösung) wurden die HEWL-haltigen Proben in die Salzlösung eingebracht. Jeweils 2,5 ml wurden in ein 5 ml Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden mit Parafilm abgedichtet, mithilfe eines Metallgestells fixiert und waagrecht für 4 Tage im Wasserbad bei 55°C bewegt. Probenröhrchen wurden nach Zeiten von 0, 6, 24, 48, 72 und 96 h entnommen und bis zur weiteren Untersuchung bei 4 - 6°C gelagert.

### 3.4 Isolierung von $\alpha$ -Lactalbumin

$\alpha$ -Lactalbumin wurde aus dem Molkenproteinisolat, einem Gemisch (siehe 3.1.3) aus  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\alpha$ -Lactalbumin, durch Aussalzen mit NaCl nach der Methode von *Maillart und Ribadeau-Dumas (1988)* isoliert.

#### Benötigte Reagenzien

Es wurden 1 N **HCl** und **NaCl** benötigt.

Als Ausgangsprobe diente das **Molkenproteinisolat** der Firma ARLA Foods Ingredients amba.

#### Isolierung

Es wurden etwa 0,4 g Molkenproteinisolat in etwa 30 ml dest. Wasser gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 2,0 eingestellt. Der sauren Lösung wurden 3,5 g NaCl zugegeben und nach Lösung des Salzes im Maßkolben auf 50 ml aufgefüllt (NaCl 7%, w/v). Nach 15minütiger Inkubation bei RT und gelegentlichem Durchmischen wurde bei 10.000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und das Pellet in einer 7%igen NaCl-Lösung resuspendiert, zentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Der Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das verbleibende Präzipitat wurde in dest. Wasser gelöst und nach erfolgter Dialyse lyophilisiert.

### 3.5 Dialyse der Proteinlösungen

#### Benötigte Reagenzien

Für die **5%ige Essigsäure** (v/v) wurden 5 ml Eisessig im Messkolben mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml verdünnt.

#### Dialyse

Die Zellosoeschläuche zur Dialyse mit einer Ausschlussgröße von 12 kDa wurden für sechs Stunden in 5%iger Essigsäure eingeweicht, dann mit entionisiertem Wasser gespült und mit den zu dialysierenden Proteinlösungen befüllt. Es schloss sich eine zweitägige Dialyse bei 6°C, gegen destilliertes Wasser zur Entfernung von Puffersalzen und Zuckern an. Die so entsalzten Proben wurden in ein Falkontube überführt und lyophilisiert.

### 3.6 Aktivität der Transglutaminase

Zur Aktivitätsbestimmung der mikrobiellen Transglutaminase (mTGase) wurde die colorimetrische Hydroxamatmethode nach *Folk und Cole (1966)*, mit geringfügigen Modifizierungen nach *Menéndez et al. (2006)* angewandt. Eine Überprüfung der Aktivitätsstabilität während einer Lagerung bei 6°C fand etwa alle sechs Monate und bei Chargenwechsel statt.

#### Benötigte Reagenzien

Für den 0,2 M **Tris-Acetat-Puffer** wurden 1,21 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) in ca. 25 ml bidest. Wasser gelöst, der pH-Wert mit 3%iger Essigsäure auf 6,0 eingestellt und auf 50 ml aufgefüllt.

Die 0,2 M **Tris-Lösung** enthielt ebenfalls 1,21 g Tris, allerdings ohne pH-Wertkorrektur in 50 ml bidest. Wasser.

Als **Substratlösung** für mTGase wurde 0,1 M Hydroxylammoniumchlorid (Hydroxylamin, 69,5 mg) in 2 ml 0,2 M Tris-Acetat-Puffer gelöst, mit 0,2 M Tris-Lösung auf pH 6,0 eingestellt, anschließend mit 10 mM Glutathion red. (30,73 mg) und mit 30 mM Z-Gln-Gly-OH (Benzyloxycarbonyl-L-glutamylglycin, 101,1 mg) versetzt. Die Chemikalien wurden quantitativ mit wenig Tris-Lösung überführt, der pH-Wert erneut auf 6,0 eingestellt und mit dem Tris-Acetat-Puffer auf 10 ml aufgefüllt.

Die **Abstoppreagenz** wurde aus 12%iger HCl, 12%iger Trichloressigsäure (TCA) und 5%iger Eisen-III-chloridlösung in 0,1 M HCl mit einem Verhältnis von 1:1:1 (v/v/v) hergestellt.

Die **Kalibrierstammlösung** setzte sich aus 2,5 mM L-Glutaminsäure- $\gamma$ -hydroxamat (8,1 mg) in 20 ml Tris-Acetat-Puffer zusammen. Zur Herstellung der einzelnen Kalibrierlösungen wurde wie in Tabelle 3-9 angegeben vorgegangen.

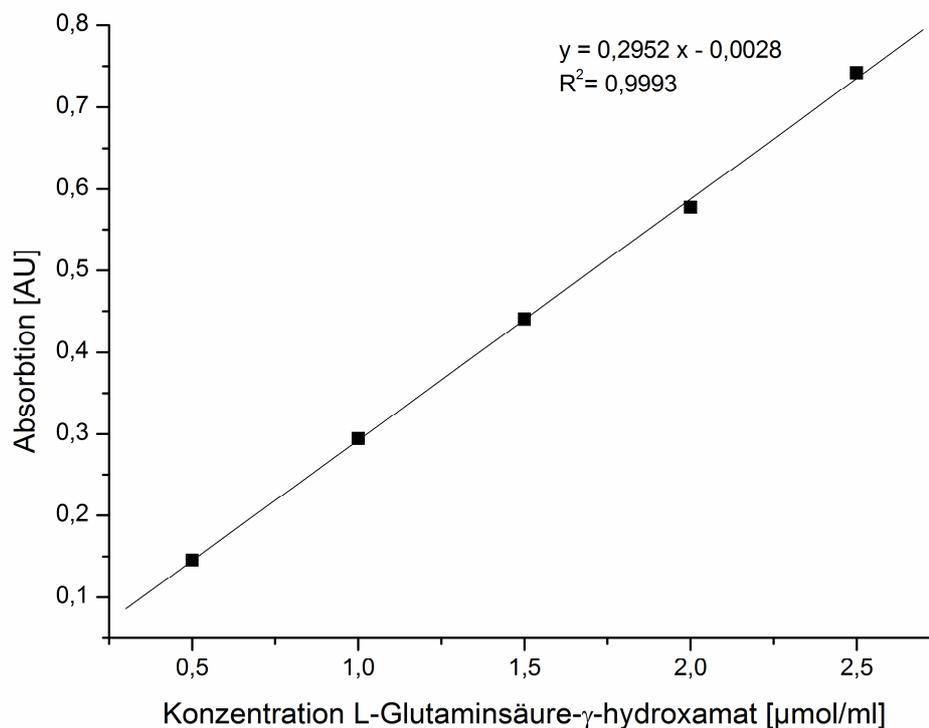
**Tabelle 3-9:** Konzentrationsreihe für die Kalibrierlösungen

Konzentration L-Glutaminsäure- $\gamma$ -hydroxamat [mM]	Kalibrierstammlösung [ $\mu$ l]	Tris-Acetat-Puffer [ $\mu$ l]	UV-Absorption $\lambda = 525$ nm
2,5	1000	0	0,742
2,0	800	200	0,578
1,5	600	400	0,441
1,0	400	600	0,295
0,5	200	800	0,146
Blindwert	0	1000	-

Für die **mTGase-Lösung** (40 U mTGase/100 ml) wurden zirka 50 mg mTGase in 10 ml 0,2 M Tris-Acetat-Puffer gelöst.

### Kalibrierung

1 ml Kalibrierlösung wurde mit 1 ml Abstoppreagenz versetzt und gegen den Blindwert bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 525$  nm gemessen (Abbildung 3-2). Es wurde immer eine Doppelbestimmung durchgeführt.



**Abbildung 3-2:** Kalibriergerade: Abhängigkeit der UV-Absorption bei  $\lambda = 525$  nm von der Konzentration an L-Glutaminsäure- $\gamma$ -hydroxamat

### Aktivitätsbestimmung und -berechnung

0,5 ml mTGase-Lösung war mit 1 ml vortemperierter Substratlösung zu versetzen und für 10 min bei 37°C zu inkubieren. Anschließend wurden 1,5 ml Abstoppreagenz zugegeben und etwas abgekühlt. Die UV-Absorption wurde bei Raumtemperatur und  $\lambda = 525$  nm gemessen. Anhand der Kalibriergerade ließ sich die gebildete Menge an L-Glutaminsäure- $\gamma$ -hydroxamat ermitteln.

Ein Unit (1 U) wurde definiert als 1  $\mu$ mol Hydroxamat, welches das Enzym mittels Katalyse aus Hydroxylamin und Benzyloxycarbonyl-L-Glutamylglycin innerhalb 1 Minute bei pH 6.0 und 37°C umsetzt (*Rodriguez-Nogales, 2006*).

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$A = \frac{c_{\text{Hydroxamsäure}} \cdot V}{m \cdot t} \quad (3-1)$$

A	Aktivität [U/g Präparat]
$c_{\text{Hydroxamsäure}}$	L-Glutaminsäure- $\gamma$ -hydroxamat [ $\mu$ mol/ml]
m	Einwaage an mTG [g/0,5 ml Puffer]
V	Testvolumen = 1,5 ml
t	Inkubationszeit = 10 min

## 3.7 Analytische Verfahren zur Strukturuntersuchung und Charakterisierung der Proteinproben

Die Methoden der Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.7.3) und der Aminosäureanalytik (siehe Abschnitt 3.7.4) wurden für alle in Tabelle 3-4 genannten Proteine durchgeführt. Für die nach Kapitel 3.2.1 hergestellten HEWL-Proben wurden jedoch noch zusätzliche im folgenden beschriebene Untersuchungen angewandt.

### 3.7.1 Restwasserbestimmung mittels Karl-Fischer-Titration

Es erfolgte eine stöchiometrische Umsetzung von Schwefeldioxid, Jod und Wasser zu Schwefeldioxid und Jodwasserstoff nach Bunsen (1853). Titriert wurde in methanolischer Imidazolösung.

#### Benötigte Reagenzien

Gebrauchsfertige Jodlösung (**HYDRANAL<sup>®</sup>-Titrant 2**) und basische Lösungsvorlage (**HYDRANAL<sup>®</sup>-Solvent**) konnten direkt zur Bestimmung eingesetzt werden.

#### Parameter der Messung

Gerät:	KF-Titrino 701, Metrohm, Filderstadt (Plattenhardt)
Extraktionszeit:	180 s
Titer:	4,7939 mg/ml
Einwaage:	8 bis 10 mg

Weitere allgemeine Messparameter wurden der Arbeit von *Schwietzke (2012)* entnommen.

#### Wassergehaltsberechnung

$$Wasser[\%] = \frac{(KFTVolumen - Blindwert) \cdot Titer \cdot Faktor}{Einwaage \cdot Divisor} \quad (3-2)$$

Wasser[%]	Wassergehalt
KFRVolumen	Titrierte Volumen der Jodlösung [ml]
Blindwert	0, Zelle vorher trockentitriert
Titer	aktuell bestimmt [mg/ml] siehe Parameter
Faktor	0,1 (Umrechnung in %)
Divisor	1 (Umrechnung in %)
Einwaage	Einwaage [mg]

#### 3.7.2 Proteinbestimmung mittels Lowry

Die Bestimmung nach *Lowry* ist von *Pomory et al. (2008)* überarbeitet und von *Bahr (2012)* angepasst worden. Über die Reaktion der Peptidbindungen mit Kupfer-Ionen im alkalischen Milieu wurden Komplexe gebildet, welche das zugegebene Folinreagenz reduzierten. Es entstand Molybdänblau, welches nach zweistündiger Inkubationszeit photometrisch bei einer Wellenlänge von 660 nm erfasst wurde. Mithilfe dieser Messung erfolgte eine Proteingehaltsermittlung in wässrigen, dialysierten Proben.

#### Benötigte Reagenzien

Für die **Lösung nach Lowry** wurde eine 1%ige Kupfersulfatlösung (w/v,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), eine 2%ige Kalium-Natriumtartratlösung (w/v) und eine 2%ige Natriumcarbonatlösung (w/v,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) im Verhältnis 1:1:100 (v:v:v) gemischt.

Weiterhin wurde eine 1 N Natronlauge (**NaOH**) benötigt.

Die gebrauchsfertige 1 N **Folin-Ciocalteu-Reagenz** konnte unverdünnt nach Temperierung eingesetzt werden.

Die Kalibrierung erfolgte mit 0,1%iger **Lysozym-Stammlösung** (w/v, Sigma) aus 10 mg HEWL in 9,5 ml 1 N NaOH und 0,5 ml bidest. Wasser.

### Photometrische Bestimmung

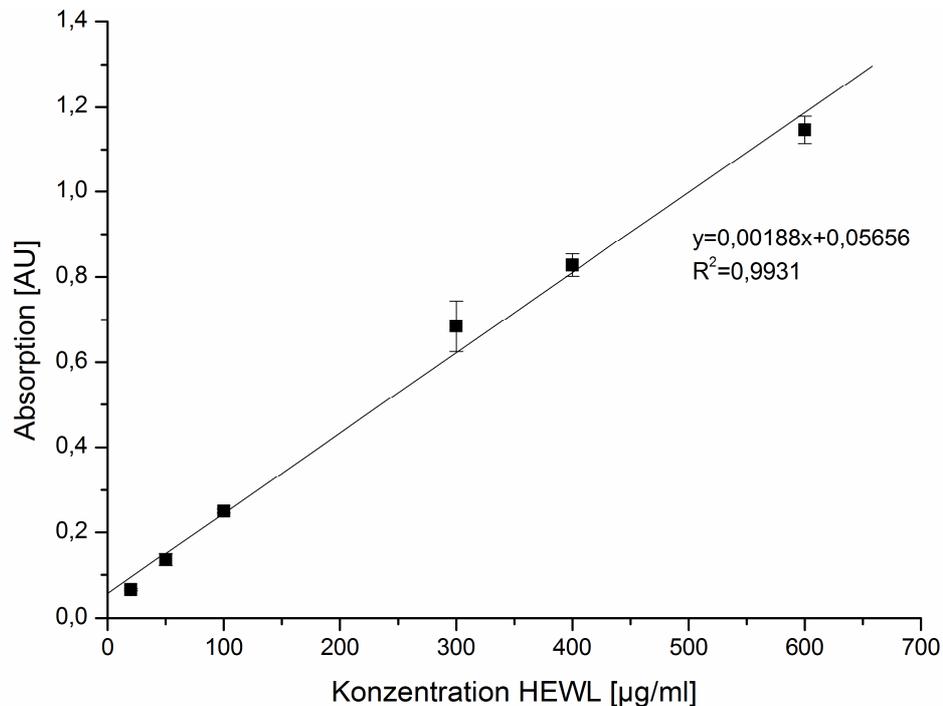
50  $\mu\text{l}$  der wässrigen Probelösung wurden mit 950  $\mu\text{l}$  NaOH in ein Eppendorftube pipettiert und mit 500  $\mu\text{l}$  Lösung nach *Lowry* versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden 500  $\mu\text{l}$  Folin-Reagenz zugegeben und die Lösungen homogenisiert. Die Absorption wurde nach 2 Stunden Inkubation bei 660 nm im Ultrospec 1000 Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Freiburg) vermessen. Die Kalibriergerade wurde unter gleichen Bedingungen mit einer Konzentration von 20 bis 600  $\mu\text{g/ml}$  Protein/ml erstellt (Tabelle 3-10 und Abbildung 3-3).

**Tabelle 3-10:** Pipettierschema der Kalibrierung zur Proteinbestimmung nach *Lowry*

HEWL-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	HEWL-Stammlösung [ $\mu\text{l}$ ]	NaOH [ $\mu\text{l}$ ]	UV-Absorption $\lambda = 660 \text{ nm}$
Blindwert	-	1000	0
20	20	980	$0,066 \pm 0,003$
50	50	950	$0,136 \pm 0,015$
100	100	900	$0,250 \pm 0,005$
300	300	700	$0,684 \pm 0,060$
400	400	600	$0,827 \pm 0,026$
600	600	400	$1,146 \pm 0,032$
Probe	50*	950	-

\* 50  $\mu\text{l}$  der Probelösung entsprechen einer Verdünnung von 1:20 bezogen auf das Testvolumen

### Kalibrierung



**Abbildung 3-3:** Kalibriergerade, Abhängigkeit der UV-Absorption bei  $\lambda = 660 \text{ nm}$  von der Konzentration an HEWL [ $\mu\text{g/ml}$ ]

### 3.7.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die vorrangig zur Untersuchung von Milchproteinen im Haus optimierte Methode (*Partschefeld, 2011*) konnte auf alle hier zu untersuchenden Proben übertragen werden.

#### Benötigte Reagenzien

##### *Stammlösungen zur Gelherstellung mit Acrylamidgradient*

Für die **Acrylamidstammlösung (54%ig)** (w/v) wurden 26,19 g Acrylamid und 0,81 g Methylenbisacrylamid (1,6%, w/v) auf 50 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt. Die Lösung war ca. eine Woche haltbar.

Der **Trenngelpuffer (pH 8,5)** enthielt 19,47 g Tris (3,2 M) und 0,16 g Natriumdodecylsulfat (SDS, 11,1 mM) in etwa 40 ml bidest. Wasser. Der pH-Wert wurde mit 6 N HCl auf 8,5 eingestellt und die Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Der Puffer war ein Jahr haltbar.

Eine Einwaage von 215 mg Ammoniumpersulfat wurde in 0,5 ml bidest. Wasser gelöst, die so erhaltene 1,5 M **Per-Lösung** musste stets frisch hergestellt werden.

Die Tetramethylethyldiamin-Lösung (**TEMED**) konnte unverdünnt eingesetzt werden.

##### *Lösungen zur Probenvorbereitung*

Der **Probenpuffer** (pH 8,0) bestand aus 0,4 M Tris, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 35 mM SDS, 0,01% Orange G (w/v), 12% Glycerol (v/v) und 6 M Harnstoff. Das entsprach Einwaagen von 4,84 g Tris, 0,03 g EDTA, 1,0 g SDS, 13,8 ml 87%igem Glycerol, 0,01 g Orange G und 36,036 g Harnstoff. Die Chemikalien wurden, bis auf den Harnstoff, in etwa 40 ml bidest. Wasser gelöst, der pH-Wert mit 6 N HCl auf 8,0 eingestellt, anschließend wird der Harnstoff hinzugegeben und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt.

Die **Iodacetamidlösung** (20%, w/v) wurde frisch hergestellt, indem 0,2 g Iodacetamid in 1 ml bidest. Wasser gelöst wurde.

0,15 g 1,4-Dithiothreitol (DTT) in 0,2 ml bidest. Wasser gelöst ergab die 75%ige **DTT-Lösung** (w/v). Die Lösung wurde stets frisch hergestellt.

##### *Molmassenmarker*

**Tabelle 3-11:** Enthaltene Proteine der Marker 4 und 5 (Serva)

Marker 4	Marker 5
Carbonic anhydrase 29000 Da	Trypsin inhibitor bovine 6500 Da
Albumin egg 45000 Da	Cytochrom C 12500 Da
Albumin bovine 67000 Da	Trypsin inhibitor soybean 21000 Da
Phosphorylase B 97400 Da	Carbonic anhydrase 29000 Da

Jeweils 1 mg des Elektrophoresemarkers 4 oder 5 in je 1 ml halbkonzentriertem Probenpuffer ohne Harnstoff gelöst und anschließend beide im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt.

*Puffer für die Elektrophorese*

Zur Herstellung des **Anodenpuffers** (0,2 M, pH 8,9) wurden 121,1 g Tris in bidest. Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 N HCl eingestellt und auf 5 L aufgefüllt.

Für den **Kathodenpuffer** (1 M Tris, 0,1 M Tricin, 3,5 M SDS, pH 8,2) wurden 12,1 g Tris, 17,9 g Tricin und 1 g SDS auf 1 L mit bidest. Wasser aufgefüllt. Es erfolgte keine pH-Wert-Einstellung.

*Detektionslösungen*

In 250 ml Methanol wurden für die **Färbelösung** nach RADOLA 400 mg Coomassie Brilliantblau G 250 gelöst und mit 100 ml Eisessig und 650 ml entionisiertem Wasser zu 1 L ergänzt (Verhältnis 25:10:65, v/v/v).

Die **Entfärbelösung** nach RADOLA mit Methanol, Eisessig und entionisiertem Wasser im Verhältnis 25:10:65 (v/v/v) hergestellt.

**Herstellung des Gradientengels**

Jeweils 7 ml der nach Tabelle 3-12 hergestellten leichten und schweren Acrylamidlösung (4 bis 20% Acrylamid) wurden in die vorgekühlte Gradientenmischkammer überführt. Nach Zugabe von jeweils 10 µl Per-Lösung wurden die Lösungen mittels Gradientenmischer in die Gelkammer gegeben. Die vollständige Ausbildung des Gradienten wurde gewährleistet indem die Gelkassette 15 Minuten im Kühlraum bei 6°C und weitere 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde. Anschließend wurde das Gel zur Polymerisation für 1 h bei 40°C im Trockenschrank inkubiert, wobei die Geloberfläche als Verdunstungsschutz vorsichtig mit entionisiertem Wasser überschichtet war. Nach Abzug des Wassers wurde die Spacergel-Lösung, welche mit 20 µl Per-Lösung versetzt wurde, aufgegeben und der Probenkamm eingesetzt. Die finale Polymerisation fand über Nacht bei 4°C statt, das Gel war dabei mit Folie bedeckt.

**Tabelle 3-12:** Zusammensetzung und Volumina der Acrylamidlösungen zur Herstellung eines Gradientengels (4 - 20%) für die SDS-PAGE

	Trenngel schwer 20% Acrylamid	Trenngel leicht 4% Acrylamid	Spacergel 4% Acrylamid
Acrylamidstammlösung 54% [ml]	3,705	0,741	0,741
Trenngelpuffer [ml]	3,120	3,120	3,120
Glycerol (87%) [ml]	3,065	-	-
	Auffüllen mit bidest. Wasser bis 10 ml		
TEMED [µl]	10,0	10,0	10,0
Per-Lösung [µl]	10,0	10,0	20,0

#### Parameter für die Elektrophorese

Kammer:	vertikale Elektrophoresekammer
Temperatur:	10 °C
Gelstärke:	0,75 mm
Spacergel:	4% Acrylamid, Länge ca. 2 cm
Trenngel:	4 - 20% Acrylamid, Länge ca. 12 cm
Elektrophoreseprogramm:	siehe Tabelle 3-13
Auftragsmenge:	Marker 12,5 µl, Probe 5 - 10 µl

#### Probenvorbereitung

Unabhängig vom zu untersuchenden Protein wurden je 1 mg Probe in 500 µl Probenpuffer gelöst. Hiervon wurden 250 µl abgenommen, zur Reduktion der Disulfidbrücken mit 60 µl DTT-Lösung versetzt und 25 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Den abgekühlten Proben wurden nochmals 20 µl DTT-Lösung sowie 75 µl Iodacetamidlösung zugefügt. Durch Addition von 95 µl Probenpuffer resultierte eine finale Konzentration von 1 mg/ml. Die Probe wurde zur vollständigen Reduktion bzw. Alkylierung der freien Thiolgruppen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die verbleibenden 250 µl wurden mit 250 µl Probenpuffer versetzt, so dass ebenfalls eine Massenkonzentration von 1 mg/ml resultierte. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden alle Proben 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Zur Elektrophorese wurden Volumina von 1 bis 10 µl der reduzierten oder nichtreduzierten Probenlösungen eingesetzt.

#### *Bedingungen für die Elektrophorese*

**Tabelle 3-13:** Trennprogramm für die SDS-PAGE bei einem Gel\*

Programm	Spannung [V]	Stromstärke [mA]	Zeit [h]
S1	400	25	1
S2	800	55	4

\* bei zwei Gelen ist die Stromstärke jeweils zu verdoppeln

#### Detektion

Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst und 20 min in eine Schale mit Färbelösung gegeben und geschwenkt. Ein Entfärben des Gelhintergrundes wurde durch zweimalige 30minütige Behandlung in der Entfärbelösung erreicht. Die Gele konnten nun eingeschweißt, eingescannt und dann mit dem Programm Totallab TL120 quantitativ ausgewertet werden.

### 3.7.4 Aminosäureanalytik (ASA)

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung (*Henle et al., 1991*) und damit verbunden der reale Protein- und Isopeptidgehalt der Proben wurde mittels ASA bestimmt. Eingesetzt wurden die in den folgenden Kapiteln 3.7.4.1 und 3.7.4.2 beschriebenen sauren und enzymatischen Probenhydrolysate. Der Rückstand wurde jeweils in 1 ml Probenpuffer gelöst, im Verhältnis 1:4 verdünnt, filtriert und direkt vermessen.

Die Kalibrierung der ASA erfolgte für die Proteinanalytik jeweils mit Standardaminosäuregemischen (2,5 - 20 nmol/Injektion). Die mittlere relative Standardabweichung dieser Methode lag bei 3 - 4%. Die Kalibration für die Messung der Isopeptidgehalte (N- $\epsilon$ -( $\beta$ -Aspartyl-)Lysin und N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin) wurde mit dem erworbenen und dem synthetisierten Standard (Tabelle 3-4, 0,05 - 10 nmol/Injektion) durchgeführt. Alle Aminosäureanalysen wurden am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden von Frau Karla Schlosser durchgeführt.

#### Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Anlage:	S4300 Sykam
Säule:	Kationenaustauscher LCA K07/Li, Sykam
Probenpuffer:	Lithiumcitrat 0,12 N, pH 2,20
Injektionsvolumen:	20 - 100 $\mu$ l
Eluenten:	siehe Tabelle 3-14
Fluss:	0,45 ml/min
Elutionsprogramme:	siehe Tabelle 3-15
Detektion:	Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin, Coil-Temperatur 130 °C,
Messung:	440 und 570 nm
Ninhydrinreagenz:	Sykam, Fürstenfeldbruck
Fluss Ninhydrinreagenz:	0,25 ml/min
Auswertung:	Chromstar 6.3

**Tabelle 3-14:** Verwendete Puffer des Lithium-Systems zur allgemeinen Aminosäureanalytik

Puffer	Zusammensetzung	Molarität	pH-Wert
Probenpuffer	Lithiumcitrat	0,12	2,2
1	Lithiumcitrat	0,12	2,9
2	Lithiumcitrat	0,30	4,2
3	Lithiumcitrat/ -borat	0,30	8,0
4	Lithiumhydroxid	0,50	

**Tabelle 3-15:** Trennprogramm für die Bestimmung von Aminosäuren, Lithium-System

Zeit [min]	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3	Puffer 4	Säulenofentemperatur [°C]
0	85	15	0	0	42
3	85	15	0	0	42
4	79	21	0	0	42
21	43	57	0	0	42
25	43	57	0	0	42
33	0	0	100	0	↓
39	0	0	0	100	↓
40					60
43	0	0	68	32	↓
46					74
63	0	0	68	32	74

### Identifizierung und Quantifizierung der Isopeptide

Anlage:	Pharmacia LKB Alpha Plus
Säule:	Kationenaustauscher-Chromatographiesäule 190 x 4,6 mm PEEK mit Harz 7 µm mit 11% Quervernetzung
Probenpuffer:	Natriumcitrat 0,2 N, pH 2,20
Injektionsvolumen:	20 - 100 µl
Eluenten:	siehe Tabelle 3-16
Fluss:	20 ml/h
Elutionsprogramm:	siehe Tabelle 3-17
Detektion:	Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin, Coil-Temperatur 135°C,
Messung:	570 nm
Ninhydrinreagenz:	Sykam, Fürstenfeldbruck
Fluss Ninhydrinreagenz:	0,18 ml/min
Auswertung:	Chromstar 6.3

**Tabelle 3-16:** Verwendete Puffer des Natrium-Systems für die Bestimmung von Asp\_Lys und Glu\_Lys

Puffer	Zusammensetzung	Molarität	pH-Wert
Probenpuffer	Natriumcitrat	0,2	2,20
1	Natriumcitrat	0,2	3,16
2	Natriumcitrat	0,2	4,03
3	Natriumcitrat mit Natriumchlorid	1,2	6,14
4	Natronlauge	0,4	

**Tabelle 3-17:** Trennprogramm für die Bestimmung von Asp\_Lys und Glu\_Lys, Natrium-System

Zeit [min]	Puffer	Säulenofentemperatur [°C]	Ninydrinreagenz [on/off]
0	1	48	on
8	2	48	on
28	3	48	on
32	3	93	on
56	4	93	on
69	1	93	on
76	1(10%)	83	off
88	1(10%)	70	off
95	1	48	on
101	1	48	on
101	1	48	on
102	1	48	on

### 3.7.4.1 Saure Hydrolyse

#### Benötigte Reagenzien

Es wurde 6 N **Salzsäure** (HCl) benötigt.

#### Hydrolyse

Es wurde eine definierte Menge Probe in ein wiederverschließbares Hydrolyseröhrchen eingewogen und mit 6 N Salzsäure versetzt, so dass eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml resultierte. Der Luftsauerstoff wurde für etwa 90 s mit Stickstoff ausgespült, das Röhrchen fest verschlossen und 23 h im vorgeheizten Sandbad bei 110 °C inkubiert (*Förster, 2006*). Ein Probenverlust bei Undichtigkeit wurde über Differenzwägung bei der Auswertung berücksichtigt. Ein Aliquot von 1 ml wurde in ein Eppendorf-Tube pipettiert und im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingengt.

### 3.7.4.2 Enzymatische Hydrolyse

Mithilfe der enzymatischen Hydrolyse konnten die Isopeptide N-ε-(β-Aspartyl)lysin und N-ε-(γ-glutamyl)lysin nachgewiesen werden, da diese so im Gegensatz zur Säurehydrolyse zwar freigesetzt, aber nicht gespalten wurden (*Asquith et al., 1974*).

#### Benötigte Reagenzien

Zur Herstellung des **Tris-HCl-Puffers** wurden 12,114 g Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, M = 121,14 g/mol) in 30 ml Reinstwasser suspendiert, der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 8,2 eingestellt und anschließend auf 50 ml aufgefüllt. Es wurden 1 - 2 Kristalle Thymol zur Konservierung zugegeben.

Für eine **0,02 N HCl** wurde 1 ml 1 N Salzsäure mit Reinstwasser im Maßkolben zu 50 ml aufgefüllt und der Lösung 1 Kristall Thymol zugegeben.

### 3 Experimenteller Teil

---

Für den stets frisch herzustellenden 1 M **Boratpuffer** wurden 12,36 g Borsäure in 160 ml Reinstwasser gelöst, der pH-Wert mit 6 N HCl auf 8,2 eingestellt und die Lösung im Maßkolben auf 200 ml aufgefüllt.

Die ebenfalls frisch herzustellende **Pepsin-Lösung** bestand aus 2 mg/ml Pepsin (10 FIP-U/mg Protein, Merck) gelöst in 0,02 N HCl.

**Pronase-Lösung** wurde aus Pronase E (4000 PU/mg Protein) in 2 M Trispuffer (pH 8,2) zu 2 mg/ml frisch hergestellt.

Es wurde eine gebrauchsfertige Suspension von Aminopeptidase M (11 U/mg Protein; 20 U/ml) als **Aminopeptidase-Lösung** eingesetzt.

Für die bei -20 °C zu lagernde **Prolidase-Lösung** wurden 9,4 mg Prolidase (1000 U, 106 U/mg Protein) in 2 ml Reinstwasser gelöst, davon wurden 200 µl mit 1800 µl Reinstwasser versetzt (Konzentration: 50 U/ml).

#### Hydrolyse

In einem Rollrandglas wurden 3,0 mg Probe eingewogen und wie in nachfolgender Tabelle 3-18 behandelt (*Henle et al., 1991*; Modifikationen nach *Förster, 2006 und Hellwig, 2011*). Ein Enzymblindwert, welcher keine Probe enthielt, wurde mitgeführt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Lösung bei -20 °C tiefgekühlt und anschließend lyophilisiert.

**Tabelle 3-18:** Volumina und Ablauf der enzymatischen Hydrolyse

Lösung	Volumen [µl]
0,02 N HCl	1000
Pepsin-Lösung	50
Inkubation 24 h, 37 °C	
Tris-HCl-Puffer	250
Pronase-Lösung	50
Inkubation 24 h, 37 °C	
Aminopeptidase-Lösung	10
Prolidase-Lösung	20
Inkubation 24 h, 37 °C	

### 3.7.5 Hochdruckflüssigchromatographie mit anschließender Massenspektroskopie (RP-HPLC/ESI-TOF-MS)

#### 3.7.5.1 Probenvorbereitung - Tryptischer Verdau

##### Benötigte Reagenzien

Es wurde ein 50 mM **Tris-Acetat-Puffer** hergestellt, indem 0,606 g Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) in 80 ml bidest. Wasser gelöst, mit 0,3 N Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 100 ml auffüllt wird.

Die Enzymlösung enthielt 1 mg/ml **Trypsin** (m/v,  $\geq 10,000$  BAEE Units/mg Protein) mit geringer Chymotrypsinaktivität (TPCK behandelt,  $\geq 0,1$  BTEE Units/mg Protein) und wurde mit Tris-Acetat-Puffer hergestellt.

Die **1,4-Dithiotreithol-Lösung** (DTT-Lösung, 100 mg/ml) in Tris-Acetat-Puffer diente zur Spaltung der Disulfidbrücken.

##### Hydrolyse und Reduktion

Jeweils 1 mg gefriergetrocknetes HEWL, alpha-Lactalbumin bzw. Proteinpräparat wurden in 1 ml Tris-Acetat-Puffer gelöst. Die Proben wurden mit 10  $\mu$ l Trypsinlösung versetzt (Enzym-Substrat-Verhältnis: ca. 1:100). Anschließend wurden die Proben für 4 h bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch ein 5 minütiges Erhitzen auf 85°C im Wasserbad. Nach der Abkühlung wurde die Probe mit 10  $\mu$ l DTT-Lösung versetzt und diese dann über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

#### 3.7.5.2 RP-HPLC/ESI-TOF-MS-Messung

Die Methode zur Trennung und Identifizierung tryptischer Spaltpeptide wurde von *Henle et al. (1991)* übernommen und leicht modifiziert durch *Partschefeld et al. (2007a)*. Die tryptisch hydrolysierten und DTT-behandelten Proben wurden vor der Vermessung noch membranfiltriert (0,45  $\mu$ m).

Anlage:	Agilent 1100 series, Agilent Technologies, siehe Geräteliste
Säule:	Agilent Zorbax 300 Extend-C18, 2,1 mm x 150 mm, 3,5 Micron
Eluent A:	10 mM Ammoniumacetat, pH 5,5 (0,77 g Ammoniumacetat in 800 ml bidest. Wasser lösen, pH-Wert mit 3%iger Essigsäure auf pH 5,5 einstellen, auf 1 L auffüllen, membranfiltrieren (0,45 $\mu$ m), entgasen)
Eluent B:	84% Acetonitril, 10 mM Ammoniumacetat (840 ml Acetonitril, 160 ml bidest. Wasser mit 0,77 g Ammoniumacetat und 3%iger Essigsäure wie in Eluent A, membranfiltrieren (0,45 $\mu$ m), entgasen)
Fluss:	0,25 ml/min

### 3 Experimenteller Teil

---

Gradient:	Zeit t [min]	Anteil B [%]
	0	0
	2	0
	11	25
	25	50
	40	75
	41	100
	49	100
	53	0
	71	0

Probenkonzentration: 0,1%ige Peptidlösung (m/v)

Injektion: Autosampler, 100 µl (Probenschleife)

Säulentemperatur: 45 °C

Detektion: 220 nm und 280 nm

MS Massebereich 100 bis 2500 Da (ESI, positive Ionisierung), TIC-Modus

Kalibration: Proteinmix mit Bradykinin, Angiotensin I und Neurotensin (Sigma-Aldrich)

Auswertung: Data Explorer 4.0.0.1

## 3.7.6 Aktivitätsbestimmung für HEWL und HEWL-haltige Proben

### 3.7.6.1 Klassische Methode - Trübungsassay

Bei diesem Test wurde die lytische Aktivität des Lysozyms gegenüber Zellwänden grampositiver Bakterien genutzt. Die photometrisch zu ermittelnde Trübung einer Zellsuspension des *Micrococcus lysodeikticus* (ML) nahm je nach Aktivität des Lysozyms unterschiedlich schnell ab.

#### Benötigte Reagenzien

Für den 66 mM **Kaliumphosphatpuffer** (pH 6,24 bei 25 °C) wurden 1,796 g monobasisches Kaliumphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in ca. 150 ml dest. Wasser gelöst, mit 1 M KOH auf pH 6,2 eingestellt und auf 200 ml aufgefüllt.

Die 0,015%ige *Micrococcus lysodeikticus* **Zellsuspension** entsprach 15 mg in 100 ml Kaliumphosphatpuffer.

#### Probenvorbereitung

Die **Probelösungen** sollten eine Aktivität von 200 - 400 Units/ml Kaliumphosphatpuffer besitzen und wurden kurz vor der Untersuchung hergestellt. Dazu wurde etwa 1 mg lyophilisierte, lysozymhaltige Probe bzw. unbehandeltes Lysozym (Sigma) genau eingewogen und in 1 ml Kaliumphosphatpuffer gelöst. Davon wurden 10 µl abgenommen und mit Puffer zu 2 ml aufgefüllt. Die gut homogenisierten Lösungen wurden zur Messung eingesetzt.

## Kinetische Messung

Zur photometrischen Messung wurden 2,5 ml Zellsuspension in eine Küvette gegeben, mit 100 µl Probelösung (entspricht 20 - 40 U/ml) versetzt und die Extinktion bei 450 nm nach 0, 1, 2, 3, 4, 5 min abgelesen. Für den Blindwert wurden 100 µl Puffer zu den 2,5 ml Zellsuspension pipettiert und wie beschrieben die Extinktionsänderung verfolgt.

## Berechnung der Enzymaktivität

$$U/ml = \frac{\Delta A_{450nm}/min Probe - \Delta A_{450nm}/min BW}{(0,001 \cdot 0,1)} \cdot (df) \quad (3-3)$$

U/ml	Aktivität in Unit pro Milliliter [U/ml]
ΔA/min	Durchschnittlicher Anstieg der Geraden (Extinktion gegen Zeit)
df	Verdünnungsfaktor von 200
0,001	Absorptionsänderung bei 450 nm pro Unit und min laut Definition
0,1	Volumen der Lysozymlösung im Reaktionsansatz [ml]

$$Units/mg = \frac{Unit/ml Enzymlösung}{mg Lysozym/ml Enzymlösung} \quad (3-4)$$

**Unit-Definition:** Eine Unit Lysozym verändert die Absorption einer Suspension von *Micrococcus lysodeikticus* bei pH 6,24 und 25°C in einem Reaktionsvolumen von 2,6 ml um 0,001/min (ΔA<sub>450</sub>) (Sigma Quality Control Procedure).

### 3.7.6.2 Modifizierte Methode der Aktivitätsermittlung mit Blue-ML

Wie im vorherigen Kapitel 3.7.6.1, basierte diese zweite Möglichkeit der Lysozymaktivitätsbestimmung ebenfalls auf der photometrischen Messung einer Absorptionsänderung. Dazu wurden Zellwände des *Micrococcus lysodeikticus* (ML) mit dem Farbstoff Remazolbrilliant Blau R (RBB-R) markiert, welcher mit Lysozymzugabe freigesetzt wurde. Für den Einbau des Farbstoffes RBB-R wurde die nahezu unveränderte Methode von *Ito et al. (1992)* zugrunde gelegt.

#### Benötigte Reagenzien

Mit Remazolbrilliant Blau R eingefärbte Zellwände des *Micrococcus luteus* (**Blue-ML**) konnten bei -20°C gelagert und direkt für die Messung eingewogen werden. Die Suspension war stets frisch herzustellen.

Für den **Saccharose-Puffer** (pH 7,0) wurden 3,402 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,844 g NaCl, und 85,574 g Saccharose mit ca. 450 ml bidest. Wasser versetzt, pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,0 eingestellt und mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 N **NaOH** eingesetzt.

### Probenvorbereitung

Da sich die Absorption des Lysozyms während einer 30minütigen Inkubation über einen Konzentrationsbereich von 1 - 70 µg/ml konstant verhielt, wurden 1 mg Probe in einem 10-ml-Maßkolben mit Saccharose-Puffer gelöst. Diese Lösung wurde abermals im Verhältnis 1:10 mit Saccharose-Puffer verdünnt, so dass eine Konzentration von 10 µg/ml resultierte.

### Absorptionsmessung

Es wurden 16 mg Blue-ML in 10 ml Saccharose-Puffer suspendiert. Davon wurden je 700 µl in ein Eppendorf-Tube überführt und ca. 10 min im temperierten Wasserbad bei 40°C erwärmt. Dem Tube wurden 100 µl Probelösung bzw. der Saccharose-Puffer (Blindwert) zugeben, kurz homogenisiert und exakt für 30 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion war mit 50 µl 1N NaOH abzustoppen, worauf die Proben für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert wurden. Die Messung der Absorption des Überstandes erfolgte anschließend bei 600 nm.

### Berechnung der relativen Enzymaktivität

$$\text{relative Aktivität}[\%] = \frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{HEWL}}} \cdot 100 \quad (3-5)$$

$A_{\text{Probe}}$	Absorption der Probe bei 600 nm
$A_{\text{HEWL}}$	Absorption des unbehandelten HEWL bei 600 nm
[%]	prozentualer Anteil an der Ausgangsaktivität

### 3.7.7 Methode zur Oberflächenhydrophobitätsermittlung

Mittels Fluoreszenzmessung erfolgte die Bestimmung der Oberflächenhydrophobität (Hayakawa und Nakai, 1985). Es wurden bei dieser Methode die Volumina modifiziert, wobei die Verhältnisse gewahrt blieben. Dabei ging 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Aminosäuren an der Proteinoberfläche der Proben ein und verstärkte somit deren natürliche Fluoreszenz.

### Benötigte Reagenzien

Der 0,01 M **Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer** ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) wurde aus 0,142 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  gelöst in 100 ml bidest. Wasser hergestellt.

0,12 g Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) wurden bei Lösung in 100 ml bidest. Wasser für einen 0,1 M **Natriumdihydrogenphosphat-Puffer** benötigt.

Für den **Natriumphosphat-Puffer** wurde Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer vorgelegt und mit Natriumdihydrogenphosphat-Puffer der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Zur Fluoreszenzverstärkung wurde 2,4 mg 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) in 10 ml Natriumphosphat-Puffer gelöst. Das entsprach einer 0,8 mM **ANS-Lösung**, diese war stets frisch herzustellen und bis zur ihrer Verwendung im Kühlschrank aufzubewahren.

**Messparameter**

Gerät:	TECAN M200 infinite
Modus:	Fluorescence Top Reading
Mehrfach Messung pro Well (Square (filled)):	2 x 2
Mehrfach Messung pro Well (Border):	550 $\mu\text{m}$
Anregungs-Wellenlänge:	370 nm
Emissions-Wellenlänge:	470 nm
Anregungs-Bandenbreite:	9 nm
Emissions-Bandenbreite:	20 nm
Gain:	100 Manual
Anzahl der Messungen:	25
Integrations-Zeit:	20 $\mu\text{s}$
Lag Time/Settle Time:	0 $\mu\text{s}$ /0 ms
Shaking (Linear) Dauer:	60 s
Shaking (Linear) Amplitude:	1 mm
Wartezeit:	10 s
Platte:	Nunclon 96 Flat bottom Black, Polystyrol

**Probenvorbereitung**

Exakt 1,5 mg Probe wurden in ein Eppendorf-Tube eingewogen und in 1 ml Natriumphosphat-Puffer gelöst. Die Konzentration entsprach 100  $\mu\text{M}$ .

**Fluoreszenzmessung**

Direkt in einer schwarzen 96-Well-Platte wurde durch Verdünnen mit Natriumphosphat-Puffer von jeder Probe eine Konzentrationsreihe 5 bis 20  $\mu\text{M}$  nach Tabelle 3-19 hergestellt. Die Probelösungen in den Zellen A - D (Tabelle 3-19) wurden unmittelbar vor Messung mit 10  $\mu\text{l}$  kalter ANS-Lösung versetzt und in den Zellen E - H mit 10  $\mu\text{l}$  Natriumphosphat-Puffer, sie dienten als Blindwerte.

Die Messung der Fluoreszenzintensität (FI) erfolgte mittels des Mikroplattenlesers TECAN M200 infinite. Die Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{Ex}}$  betrug 370 nm und die Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{Em}}$  470 nm. Die FI der Wells A - D, abzüglich der zugehörigen Blindwerte E - H wurden gegen die Proteinkonzentration [ $\mu\text{M}$ ] aufgetragen und der Anstieg mittels linearer Regression ermittelt. Dieser Anstieg diente als ein Maß für die Oberflächenhydrophobität.

**Tabelle 3-19:** Pipettierschema der Hydrophobitätsbestimmung

Zelle	Natriumphosphat-Puffer [ $\mu$ l]	Probelösung [ $\mu$ l]	Konzentration Probelösung [ $\mu$ M]	ANS-Lösung [ $\mu$ l]	Puffer-Lösung [ $\mu$ l]
<b>A</b>	190	10	5	10	-
<b>B</b>	180	20	10	10	-
<b>C</b>	170	30	15	10	-
<b>D</b>	160	40	20	10	-
<b>E</b>	190	10	5	-	10
<b>F</b>	180	20	10	-	10
<b>G</b>	170	30	15	-	10
<b>H</b>	160	40	20	-	10

### 3.7.8 Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur mittels Zirkulardichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Die hier angewandte Methode orientierte sich an *Menéndez et al. (2006)*. Die Messungen konnten an der Universität Potsdam am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie unter Leitung von Prof. Dr. H. Rawel durchgeführt werden.

#### Benötigte Reagenzien

Der 0,01 M **Natriumphosphat-Puffer** (pH 7,0) wurde aus 0,01 M Dinatriumhydrogenphosphat, pH 9,1 (1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  auf 1 L bidest. Wasser) und 0,01 M Natriumdihydrogenphosphat, pH 4,3 (1,20 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  auf 1 L bidest. Wasser) hergestellt, indem beide Lösungen gemischt wurden bis der gewünschte pH-Wert von 7,0 erreicht war.

#### Messparameter

Gerät:	Jasco J 710 Spektropolarimeter
Messbereich:	178 - 260 nm, 250 - 320 nm
Temperatur:	RT
Solvent:	10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0
Messzelle:	0,1 cm und 0,5 cm
Schrittweite Auflösung:	0,5 nm, 1 nm
Geschwindigkeit:	50 nm/min
Bandbreite:	1 nm
Response:	4 s
Sensitivität:	100 mdeg, 200 mdeg
Auswertung:	Fern-UV-Bereich: J-700 for Windows Standard Analysis, Version 1.35.01. und Nah-UV-Spektren: CDPro

## Messung

Für die Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstrukturen wurden in 10 ml Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) 1 mg der gefriergetrockneten lysozymhaltigen Proben genau eingewogen und gelöst, so dass eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml (6,99  $\mu$ M) resultierte. Die gelösten Proben konnten in eine der beiden Küvetten überführt und direkt zur CD-Messung eingesetzt werden. Für die Bestimmung der Sekundärstruktur wurde mit einer zylindrischen Quarzküvette, 0,1 cm Schichtdicke das Spektrum im Fern-UV-Bereich von 178 - 260 nm aufgenommen. Die Nah-UV-Spektren zur Ermittlung der Tertiärstruktur wurden im Bereich 250 - 320 nm in einer Küvette mit 0,5 cm Schichtdicke gemessen.

### 3.7.9 Charakterisierung der HEWL-Fibrillen

Der Einfluss auf die Fibrillbildung allgemein und die Art der Fibrillen im Besonderen sollte wichtige Hinweise auf die enzymatische Behandlung und Vernetzung der HEWL-Proben ermöglichen. Die nachfolgenden Methoden wurden im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von *Kießling (2011)* entwickelt bzw. modifiziert.

#### 3.7.9.1 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure-Assay (ANS-Assay)

Der Test beruhte darauf, dass hydrophobe Strukturen, die bei der Bildung amyloider Fibrillen entstanden, verstärkt mit 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) wechselwirkten und ähnlich wie bei der Oberflächenhydrophobität (Kapitel 3.7.7) die Fluoreszenz erhöhten (*Scheuermann, 2003*). Die hier eingesetzte phosphatgepufferte Salzlösung (kurz **PBS**, englisch: phosphate buffered saline) wich nur geringfügig von dem in der Dissertation genannten System ab.

#### Benötigte Reagenzien

Für den **PBS-Puffer** wurden 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,86 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) auf 1 L mit bidest. Wasser aufgefüllt. Der resultierende pH-Wert betrug 7,0.

250  $\mu$ M 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure-Lösung (**ANS-Lösung**) wurden aus 3,7 mg ANS im 50-ml-Maßkolben mit PBS-Puffer hergestellt.

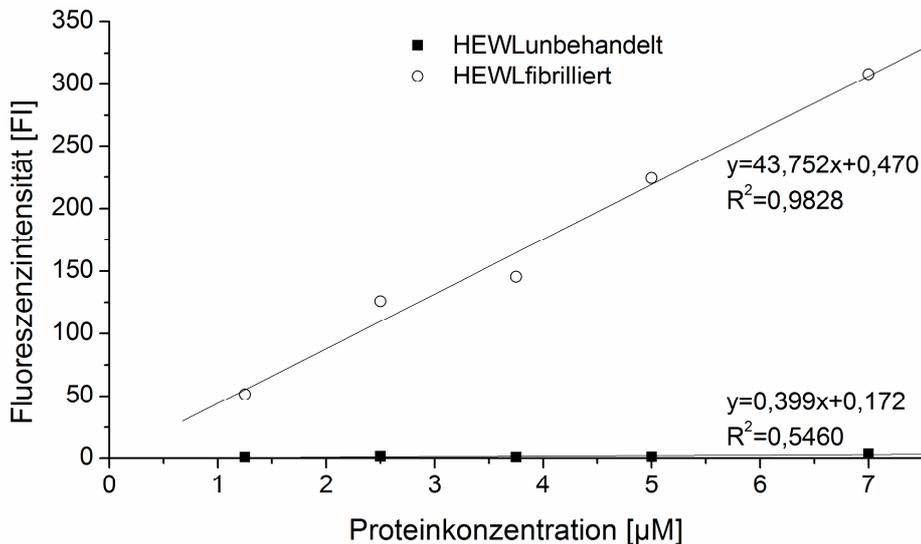
#### Fluoreszenz-Spektroskopie

Nach Zugabe von 100  $\mu$ l 0,05%iger Probelösung (w/v) zu 1900  $\mu$ l ANS-Lösung, wurde bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 370$  nm die Emission am F-4500 Fluoreszenz Spektrophotometer über den Bereich von 400 bis 600 nm aufgenommen. Für den Blindwert wurde Puffer anstatt der Probelösung eingesetzt. Die Messungen konnten in der Professur für Allgemeine Biochemie der Technischen Universität Dresden angefertigt werden.

**Parameter**

Messung:	Wavelength Scan
Scan Modus:	Emission
Data Modus:	Fluorescence
EX WL:	370 nm
EM Start WL:	400 nm
EM End WL:	600 nm
Scan Speed:	240 nm/min
Delay:	0 s
EX Slit:	5 nm
EM Slit:	5 nm
PMT Voltage:	700 V
Response:	0,01 s

**Kalibrierung**



**Abbildung 3-4:** Fluoreszenzmessung der Kalibrierung des ANS-Assays mit 1900 µl ANS-Lösung (250 µM) und 100 µl Probe,  $\lambda_{ex} = 370$  nm und  $\lambda_{em} = 480$  nm, unbehandeltes HEWL im Vergleich zu HEWL nach Fibrillierung über 96 h (nach Wang et al., 2009b) bei verschiedenen Konzentrationen, blindwertkorrigiert

Der geringfügige Anstieg des Signals bei Zunahme der Konzentration des unbehandelten HEWL basierte auf der Tatsache, dass dem Reagenz etwas mehr hydrophobe Bindungsstellen zur Verfügung standen. In Gegenwart von fibrillierten HEWL war aber eine signifikant stärkere, lineare Zunahme festzustellen (Abbildung 3-4).

**3.7.9.2 Kongorot-Assay**

Dieser UV/VIS-basierte Test detektierte bei Anwesenheit amyloider Fibrillen die Zunahme der Absorption einer Kongorotlösung bei 540 nm (Wang et al., 2009a).

### Benötigte Reagenzien

Eingesetzt wurde der unter Kapitel 3.7.9.1 beschriebene **PBS-Puffer**.

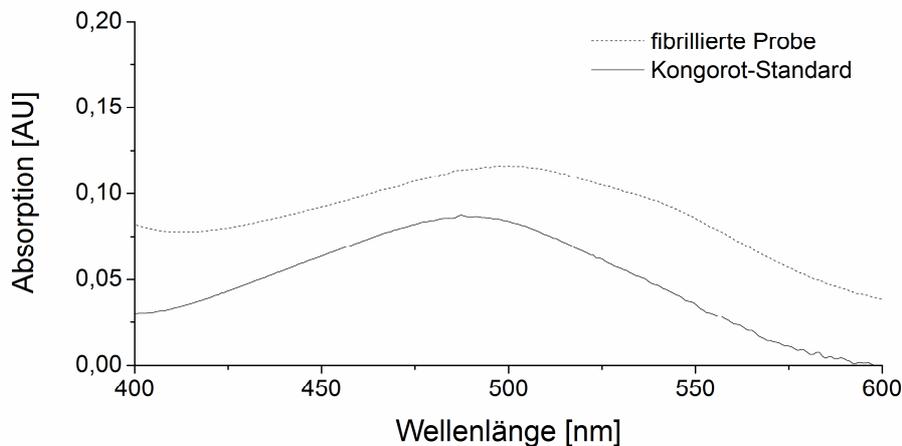
Für die 1 mM Kongorot-Stammlösung wurden 69,7 mg Kongorot in einem 100-ml-Maßkolben mit PBS-Puffer aufgefüllt. Für die 20 mM **Kongorot-Lösung** wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:50 (v/v) mit PBS-Puffer verdünnt.

### UV/VIS-Messung

Zu 1800 µl Kongorot-Lösung wurden 200 µl 0,05%ige Probelösung (w/v) oder pH 2,2 Salzlösung (siehe 3.3) für den Blindwert pipettiert, so dass eine Kongorotkonzentration von 18 µM resultierte. Darauf wurden die Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich die Absorption über 200 - 700 nm gegen PBS-Puffer am UV/VIS-Polychromator SPECORD S 100 aufgenommen.

### Parameter

Messbereich:	200 - 700 nm
Wellenlänge:	540 nm
Integrationszeit:	15,0 ms
Akkumulation:	100
Zyklusart:	einfach
Dunkelmessung:	automatisch



**Abbildung 3-5:** Ausschnitt aus UV-VIS-Spektren, 5 µM Kongorot-Standard (durchgezogene Linie) und fibrilliertes HEWL nach 96 h (nach Wang *et al.*, 2009b, gepunktete Linie) nach Kongorotzugabe, Verschiebung des Maximums von 495 auf 503 nm (Krebs *et al.*, 2000)

### 3.7.9.3 Thioflavin-T-Assay

Thioflavin-T-Mizellen lagerten sich an Fibrillstrukturen an, wodurch es zur Intensitätserhöhung der Fluoreszenz kam (Khurana *et al.*, 2005). Der Thioflavin-T-Assay basierte auf der Veröffentlichung von Wang *et al.* (2009a).

### Benötigte Reagenzien

Der in Abschnitt 3.7.9.1 hergestellte **PBS-Puffer** wurde auch hier eingesetzt.

### 3 Experimenteller Teil

Die 100  $\mu\text{M}$  Thioflavin-T-Stammlösung wurde aus 1,6 mg Thioflavin T (ThT) in 50 ml PBS-Puffer hergestellt. Anschließend wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 (v/v) mit PBS-Puffer verdünnt, um die 10  $\mu\text{M}$  **ThT-Lösung** zu erhalten.

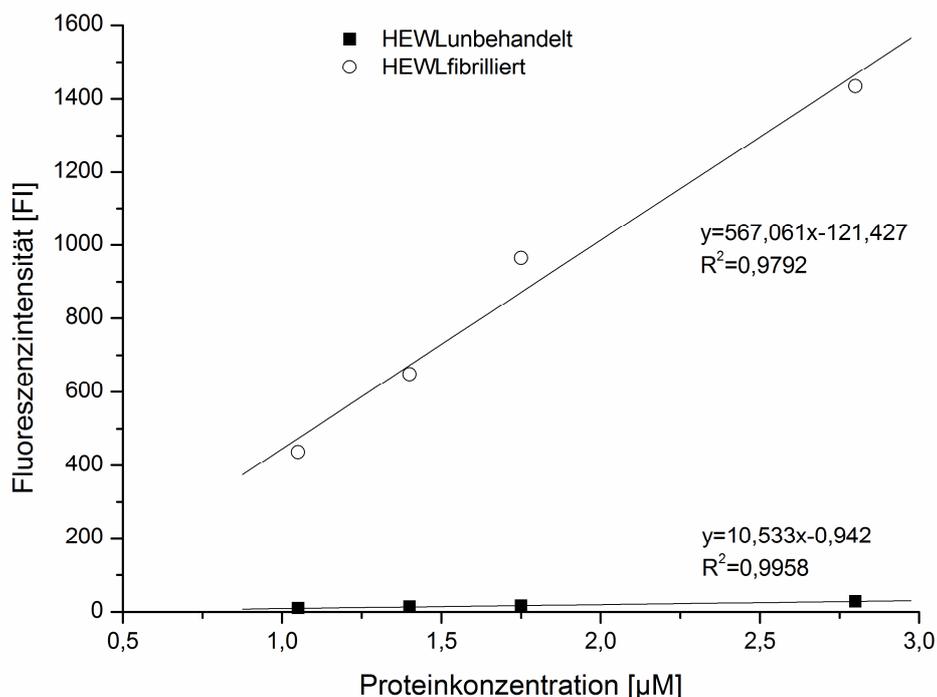
#### Durchführung

80  $\mu\text{l}$  0,05%ige Probelösung (v/v) wurden mit 1920  $\mu\text{l}$  ThT-Lösung versetzt, homogenisiert und direkt zur Fluoreszenzmessung eingesetzt. Bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm wurde das Emissionsspektrum von 450 bis 530 nm am F-4500 Fluoreszenz Spektrophotometer aufgenommen. Zur mathematischen Auswertung diente die Fluoreszenzintensität bei 485 nm. Für die Blindwertermittlung wurden anstelle der 80  $\mu\text{l}$  Probelösung Salzlösung (pH 2,2, siehe 3.3) hinzu gegeben.

#### Parameter

Messung:	Wavelength Scan
Scan Modus:	Emission
Data Modus:	Fluorescence
EX WL:	440 nm
EM Start WL:	450 nm
EM End WL:	530 nm
Scan Speed:	6 nm/min
Delay:	0 s
EX Slit:	5 nm
EM Slit:	5 nm
PMT Voltage:	700 V
Response:	0,01 s

#### Kalibrierung



**Abbildung 3-6:** Kalibrierung des ThT-Assays mit 1920  $\mu\text{l}$  ThT-Lösung (10  $\mu\text{M}$ ) und 80  $\mu\text{l}$  Probe,  $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$ , unbehandeltes HEWL im Vergleich zu HEWL nach Fibrillierung über 96 h (nach Wang *et al.*, 2009b) bei verschiedenen Konzentrationen, blindwertkorrigiert

Aus 0,2%igen fibrillierten und nicht fibrillierten HEWL-Lösungen (*Wang et al., 2009b*) wurden verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt und vermessen. Die Auftragung der Fluoreszenzintensität bei 485 nm gegen die Proteinkonzentration zeigte einen guten linearen Zusammenhang (Abbildung 3-6). Auch das nicht fibrillierte HEWL wies mit zunehmender Proteinkonzentration einen sichtbaren Anstieg auf, welcher auf die steigende Anzahl der fluoreszierenden Aminosäuren zurückzuführen ist. Eine qualitative und semiquantitative Beurteilung der Daten anhand der Intensität war folglich möglich. Es war aber darauf zu achten, dass die Messung direkt nach Mischung der beiden Komponenten erfolgte, da die Fluoreszenz sehr schnell erlosch.

### 3.7.9.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Messungen orientierten sich an der Veröffentlichung von *Krebs et al. (2000)* und wurden von Herrn Dr. Thomas Kurth (Mitarbeiter der Technologieplattform/Services/Imaging für Elektronenmikroskopie, Biotechnologisches Zentrum der Technischen Universität Dresden) durchgeführt.

#### Benötigte Reagenzien

Eine 2%ige **Uranylacetat-Lösung** (w/v) wurde kurz vor Verwendung für 1 min bei 5000 g zentrifugiert. Die Lösung war bei 4 - 6°C lagerfähig.

Die **Probenlösungen** konnten direkt nach Fibrillierung (siehe Kapitel 3.3, 0,5 mg/ml, 0,0347 mM) eingesetzt werden. Lediglich eine Verdünnung von 1:200 (50 µl Probenlösung mit bidest. Wasser auf 1000 µl) war herzustellen.

#### Staining

Es wurden 3 µl Probe auf ein Grit (Probenträger) aufgebracht und anschließend 15 min bei 37°C im Trockenschrank getrocknet. Ein Tropfen der frisch zentrifugierten 2%igen Uranylacetat-Lösung wurde auf das Grit aufgegeben und für 20 s inkubiert. Danach wurde das Grit drei Mal mit je drei Tropfen Wasser (3 x je 1 min) gespült. Das überflüssige Wasser wurde mit einem Filterpapier abgezogen. Die Probenträger wurden nun in eine Gritbox überführt und für 30 min bei 37°C vollständig getrocknet. Die so präparierten Proben wurden direkt am Elektronenmikroskop FEI Morgagni vermessen.

#### Parameter

Mikroskop:	FEI Morgagni 268
Voltage:	79 kV
Grit:	Formar-coated Kupfer, Gold bedampft
Präparation:	„negative Staining“ mit Uranylacetat
Konzentration:	2,5 µg/ml (0,1735 µM)

### 3.7.10 Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit

Die im nachfolgenden beschriebenen mikrobiologischen Untersuchungsmethoden wurden von *Bahr (2012)* in der Professur für Allgemeine Biochemie der Technischen Universität Dresden im Arbeitskreis von Prof. Dr. K. H. van Pee durchgeführt.

#### 3.7.10.1 Agardiffusionstest

Der Test stellte eine einfache und effektive Methode der Abschätzung des antibakteriellen Potentials dar. Dabei wurde die Hemmung des Wachstums der Bakterien, welche mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt kommen, untersucht.

##### Benötigte Reagenzien

Das **Hefenährbouillon-Medium (HNB-Medium)** bestand aus 3 g Fleischextrakt und je 5 g Hefeextrakt, Pepton (aus Fleisch) und Natriumchlorid. Die Bestandteile wurden in ca. 800 ml destilliertem Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 7 eingestellt, auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

Für den **Hefenährbouillon-Agar (HNB-Agar)** wurden 400 ml HNB-Medium mit 6 g Agar gemischt und autoklaviert. Die resultierende Lösung wurde auf 20 Platten (Durchmesser: 8,5 cm) verteilt. Nach dem Abkühlen unter der Sterilbank konnten die Agarnährböden direkt eingesetzt oder umgedreht im Kühlschrank gelagert werden.

Das **Corynebakterium-Medium (CB-Medium)** wurde aus 10 g Caseinpepton (tryptisch verdaut) und je 5 g Hefeextrakt, Natriumchlorid und Glucose gemischt und in ca. 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7 gebracht, auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

Der **Corynebakterium-Agar (CBA-Agar)** wurde analog zum HNB-Agar aus 400 ml CB-Medium mit 6 g Agar hergestellt und autoklaviert. Die sterile Lösung wurde ebenso auf 20 Platten (Durchmesser: 8,5 cm) verteilt und zum Abkühlen stehen gelassen.

Angefertigt wurden zudem **Vorkulturen** von *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* und *Streptococcus lactis*. Dafür wurden je 25 ml HNB-Medium in einen autoklavierten 100ml-Erlenmeyerkolben pipettiert, mit einer Impföse etwas Bakterienmaterial von bei 4 °C gelagerten Kulturplatten abgenommen und in das Medium geben. Die Vorkulturen wurden über Nacht bei 30 °C und 150 rpm inkubiert, außer bei *Streptococcus lactis* dieser benötigte statt HNB-Medium das CB-Medium und etwa 2 Tage um anzuwachsen.

##### Durchführung

50 µl der jeweiligen Bakterienkultur wurden auf einer Agarplatte ausplattiert und mindestens 2 h bei 30 °C im Brutschrank zum Anwachsen gelagert. Löcher (maximal 5 pro Platte) wurden mit einem Durchmesser von 0,6 cm gleichmäßig verteilt in den Agar gestanzt und mit einem Volumen von 20 µl der zu untersuchenden Probenlösung befüllt. Anschließend wurde erneut bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Auswertung erfolgte optisch und ausgebildete Hemmhöfe wurden manuell vermessen.

### 3.7.10.2 Bakterieller Hemmtest

Basierend auf einem Trübungstest (*Shugar, 1952*) wurde das Wachstum von Bakterien in Abhängigkeit von verschiedenen Probenkonzentrationen untersucht. Die durch Bakterien verursachte Trübung wurde photometrisch bestimmt.

#### Benötigte Reagenzien

Das im vorherigen Kapitel 3.7.10.1 beschriebene **HNB-** bzw. **CB-Medium** wurde benötigt.

Zum Lösen nicht relevanter Trübungsbestandteile (aggregierte Proteine, keine Bakterien) wurde eine 15 M **Guanidinhydrochloridlösung** benötigt, dazu wurden 14,33 g des Salzes in 10 ml destilliertem Wasser gelöst.

Die **Probenlösungen** wurden in Konzentrationen von 0,625‰ bis 0,1% (w/v) untersucht. Dafür wurden die mittels *Lowry* (Kapitel 3.7.2) bestimmten Proteingehalte der wässrigen Dialyselösungen mit bidest. Wasser verdünnt.

#### Durchführung

Pro Versuchsreihe wurden sieben 25ml-Erlenmeyerkolben autoklaviert angesetzt. Es wurden die Konzentrationen 0,625‰ bis 0,01% oder 0,00625 bis 0,1% untersucht. Es wurde je 900 µl Medium in ein Eppendorftube pipettiert und variierende Volumina Bakterienvorkultur zugeben. Diese Lösungen wurden photometrisch bei 600 nm gegen das Medium vermessen um eine Mischung mit einer optischen Dichte (OD) von 0,4 zu erhalten, welche dann nach einer weiteren Verdünnung im Verhältnis 1:10 eingesetzt wurde. Nach Zugabe der vorher eingestellten Probelösungen (siehe Pipettierschema in Tabelle 3-20) wurde über Nacht bei 30°C und 125 rpm inkubiert. Die 0%-Probe wurde nicht bei 30°C gelagert, sondern bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Für die photometrische Messung wurde 1 ml der Lösung in eine Einmal-Mikroküvette pipettiert und mit 0,25 ml Guanidinhydrochloridlösung (15 M) versetzt. Die gut homogenisierte Probe wurde bei einer Absorption von 600 nm vermessen. Die 0%-Probe diente als Blindwert.

**Tabelle 3-20:** Pipettierschema des Trübungstestes

Zugabe	Probe	0%- und 100%-Probe
Medium	5 ml	5 ml
Verdünnte Bakterienkultur	200 µl	200 µl
Probelösung (verschiedene Konz.)	5 ml	-
Bidestilliertes Wasser	-	5ml

## 4 Ergebnisse und Diskussion

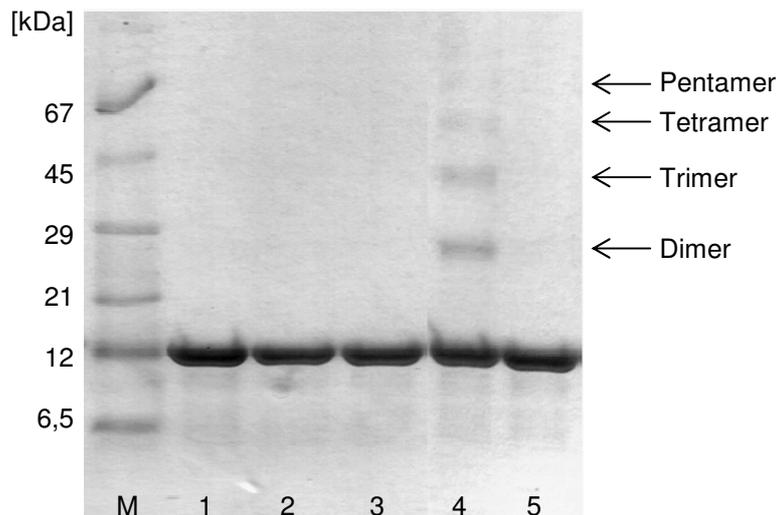
Die mikrobielle Transglutaminase (mTGase) ist ein Enzym zur Katalyse von Acyl-Transfer-Reaktionen zwischen der  $\gamma$ -Carboxamidgruppe des proteingebundenen Glutamins und einer  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrests unter Ausbildung einer oder mehrerer Isopeptidbindungen. Entsprechend intra- und intermolekular modifizierte Proteine werden heute bereits vielfach in der Lebensmittelindustrie z.B. zur Stabilisierung von Joghurtgelen genutzt (*Jaros et al., 2006*). In vorangegangenen Arbeiten wurde sowohl die mTGase (*Menéndez, 2006*) als auch deren Interaktion mit Milchproteinen, vor allem für das Casein (*Partschfeld, 2011*) intensiv analysiert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation von Proteinen mit mTGase unter Hochdruck auch Milchproteine, die unter Normaldruck keine Substrate für mTGase sind, durch das Enzym umgesetzt werden (*Partschfeld et al., 2007a*) bzw. sich deren Affinität zur mTGase verändert (*Menéndez et al., 2009*).

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Hühnereiweißprotein Lysozym (HEWL) ist mit seiner kompakten, globulären Struktur äußerst temperatur- und hochdruckstabil. Es gelang erstmals das hochstrukturierte HEWL, welches unter Atmosphärendruck kein Substrat für mTGase darstellte, unter hohem hydrostatischem Druck zu oligomerisieren. Anschließend wurden, die unter simultaner Druck-/Enzymbehandlung gebildeten Vernetzungsprodukte sowohl strukturell als auch eigenschaftsbezogen charakterisiert. Über diese grundlagenorientierten Analysen können neue Perspektiven zur gezielten Funktionalisierung von Lebensmittelproteinen abgeleitet werden.

Neben HEWL wurden auch andere Proteine, wie  $\beta$ -Casein und aufgrund seiner Homologie zum Lysozym  $\alpha$ -Lactalbumin betrachtet. Jedoch dienten diese Untersuchungen lediglich einer ersten Orientierung. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Wissensgenerierung durch Charakterisierung enzymatisch vernetzter HEWL-Oligomere.

### 4.1 Enzymatische Vernetzung von HEWL mittels mTGase und Einfluss verschiedener Reaktionsparameter

Nach *Murthy et al. (2009)* ist die mikrobielle TGase nicht in der Lage einen der Lysinreste des HEWL anzugreifen, gleichwohl diese Lösungsmitteln gegenüber exponiert sind. Wie in der Abbildung 4-1 (Bahn 2) zu sehen ist, kann auch in dieser Arbeit keine Vernetzung des HEWL nach Inkubation über 30 min unter Atmosphärendruck nachgewiesen werden. Weiterhin führte eine Hochdruckinkubation bei Abwesenheit von mTGase zu keiner Oligomerisierung (Bahn 3). Die Bildung von HEWL-Oligomeren, Dimere bis Pentamere, wurde nur für Proben, welche simultan mit mTGase und hohem hydrostatischem Druck (HD) inkubiert wurden, beobachtet (Bahn 4). Die Tatsache, dass eine mTGase-Behandlung nach HD (Bahn 5) zu keiner Proteinvernetzung führte, deutet auf ein reversibles Auffalten von HEWL während der Hochdruckbehandlung hin.



**Abbildung 4-1:** SDS-Page der mTGase (40 U mTGase/g Protein) und/oder HD behandelten HEWL-Proben nach Reduktion mit DTT

1 - unbehandeltes HEWL (Kontrolle); 2 - HEWL mit mTGase (30 min, 40°C, 0,1 MPa); 3 - HEWL (30 min, 40°C, 600 MPa); 4 - HEWL mit mTGase (30 min, 40°C, 600 MPa); 5 - HEWL (30 min, 40°C, 600 MPa) anschließend mit mTGase (30 min, 40°C, 0,1 MPa); M - Molmassenmarker (Serva).

Das aus dem Hühnereiweiß stammende Lysozym enthält sechs Lysin- und drei Glutaminreste, welche innerhalb des denaturierten, vollständig aufgefalteten Stadiums unter Hochdruck zu Substraten für die mTGase werden können. Die kovalent gebundenen Proteinoligomere waren selbst nach Reduktion der Disulfidbrücken mit Dithiothreitol (DTT) weiterhin über die SDS-PAGE nachweisbar (Abbildung 4-1), was die Bildung von Isopeptiden an ausgewählten Positionen des Proteins bestätigte. Auffallend war zudem, dass die detektierten Molmassen mit den theoretisch ermittelten nicht vollständig übereinstimmten (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1:** Vergleich theoretischer und mittels SDS-PAGE abgeschätzter molarer Massen der HEWL-Oligomere (über SDS-PAGE und Totallab TL 120)

Oligomer	Theoretische molare Masse [kDa]	Ermittelte molare Masse [kDa]
Monomer	14,3	11,6 ± 0,5
Dimer	28,6	26,0 ± 0,8
Trimer	42,9	36,5 ± 0,7
Tetramer	57,2	50,1 ± 1,2
Pentamer	71,5	62,9 ± 1,0
Hexamer	85,8	72,9 ± 2,1
Heptamer	100,1	84,1 ± 2,2
Oktamer	114,4	98,3 ± 4,5

Die ermittelten Massen lagen stets etwas unter den berechneten, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die Markerproteine, welche nicht reduziert wurden, etwas höhere Werte im Elektrophoresegel zeigten. Da diese nicht mit DTT behandelt wurden, war eine

vollständige Anlagerung des Natriumdodecylsulfats (SDS) nicht möglich, wodurch die Markerproteine eine geringere Ladung aufwiesen und weniger weit im Gel liefen, als reduzierte Proben. Das HEWL-Dimer besitzt somit eine abgeschätzte Molmasse von 26 kDa, dem steht die theoretische Molmasse mit 28,6 kDa gegenüber (Tabelle 4-1). Weiterhin wurde mit zunehmender Oligomerisierung die Differenz gegenüber den berechneten molaren Massen größer.

Die Tatsache, dass hohe hydrostatische Drücke zu einer teilweisen bis vollständigen Auffaltung von Proteinen führten, konnte erneut bestätigt werden (*Akasaka et al., 1997* sowie *Katamari et al., 2004*). Lysozym selbst ist als Modellprotein intensiv erforscht worden (*Tedford et al., 1999*; *Refaee et al., 2003* und *McCarthy et al., 2006*). Die Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des HEWL in wässriger Lösung wurden bereits bis zu einem Druck von 1200 MPa beschrieben (*Li et al., 1976*; *Refaee et al., 2003*; *Smeller et al., 2006*). NMR-Messungen von *Refaee et al. (2003)* zufolge erfährt HEWL schon bei einem Druck von 200 MPa strukturelle Veränderungen, wobei die  $\alpha$ -Domäne in einem größeren Ausmaß komprimiert wird als die  $\beta$ -Domäne. Zudem haben FTIR-spektroskopische Messungen gezeigt, dass bei 25 °C hohe Drücke ab 500 MPa zur vollständigen Auffaltung des HEWL führten und es keine irreversible Aggregation während der Inkubation gab (*Smeller et al., 2006*). Dies erklärt, warum die Proben ohne mTGase nach HD bei 600 MPa lediglich als Monomere vorlagen und warum eine der Hochdruckbehandlung nachfolgende Inkubation mit mTGase zu keiner Vernetzung führte (Abbildung 4-1, Bahn 5). Ferner wurde die Ausbildung von Intermediaten postuliert, welche unter Druckabfall bei Rückfaltung zur originären Sekundär- und Tertiärstruktur in einer Art energetischen Trichter nicht mehr den günstigsten Ausgangszustand erreichten (*Smeller et al., 2006*). Die zuvor über den Druck eingetragene Gibbssche freie Energie (freie Enthalpie) wurde nach Druckreduktion wieder an das System abgegeben (*Menéndez et al., 2006*). Allerdings war die Renaturierung nach einer Druckbehandlung über 1200 MPa unvollständig. Es wurde vermutet, dass die Druckdenaturierung von HEWL nicht einstufig, sondern über die Bildung eines „molten globule“-Zustandes verläuft. Dieser kann als dritter Zustand oder eine Variante des ungefalteten Proteins betrachtet werden.

Die Ergebnisse der Kristallstrukturanalyse bei etwa 100 MPa (*Kundrot und Richards, 1987*) zeigten zudem uneinheitliche Kontraktionen auf. Der  $\beta$ -Faltblattbereich mit den Aminosäureresten 40 - 88 war vornehmlich inkompressibel, wohingegen die Zwischenraumregionen und die  $\alpha$ -Domänen (Reste 1 - 39 und 89 - 129) bis  $0,57 \text{ MPa}^{-1}$  komprimiert werden konnten. Die Ergebnisse stimmen mit denen von *Li et al. (1976)*, die mittels Fluoreszenzmessungen eine Denaturierung bei einem Druck von etwa 800 MPa beobachteten, annähernd überein. Neueste Erkenntnisse zeigen außerdem, dass aufgrund von Druck Proteine während eines Übergangszustandes kurz an Volumen zunehmen können (*Rouget et al., 2011* sowie *Royer und Roland, 2011*). Anschließend gelangt das Lösungsmittel, zum Beispiel Wasser, in die Hohlräume der Proteine, wodurch die nicht-kovalenten Bindungen geschwächt und durch Protein-Wasser-Wechselwirkungen ersetzt werden, so dass die Moleküle dann ein geringeres Volumen einnehmen ( $\Delta V$  wird kleiner). *McCarthy und Grigera (2006)* beobachteten mittels Computersimulation bei 300 MPa eine erhöhte Oberflächenhydrophobität. Verglichen mit den Verhältnissen unter Atmosphärendruck deutete dies auf eine Abnahme hydrophober Wechselwirkungen von HEWL unter Druck hin. Als Konsequenz wurden die Ausrichtungen

hydrophober Aminosäuren im Molekül verändert. Diese Tatsache und dass alle drei Glutamin- und fünf der sechs Lysin-Reste des HEWL neben bzw. zwischen hydrophoben Aminosäuren lokalisiert sind, ermöglichen unter HD eine veränderte, bessere Zugänglichkeit für das Enzym mTGase. Diese geht einher mit einer Schwächung der hydrophoben Wechselwirkungen in Umgebung der zu vernetzenden Aminosäuren.

#### 4.1.1 Geeignete Puffersysteme und pH-Werte

Zur Untersuchung von Proteinsystemen unter hohen hydrostatischen Drücken in wässrigem Milieu wurden Puffer eingesetzt, da die Dissoziation von Wassermolekülen sonst zu einer schrittweisen Absenkung des pH-Wertes geführt hätte. Auch drucksensitive Puffersysteme wie Citrat- und Phosphatpuffer könnten zu einem Ansäuern des Mediums führen. Es sollte daher mit den druckstabilen Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris) oder 1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propanal (Bis-Tris-Propan) gearbeitet werden (*Damodaran und Paraf, 1997*).

Ausgehend von *Partschefeld et al. (2007a)* sowie *Menéndez et al. (2006)* wurden Tris und Bis-Tris in Konzentrationen von 50 und 200 mM untersucht. Beide Autoren hatten Tris in den genannten Konzentrationen in ihren Arbeiten unter HD eingesetzt. Für 1%ige HEWL-Lösungen mit einer Enzymaktivität von 40 mTGase/g Protein wurden simultane Inkubationen über 30 min bei 40 °C und 600 MPa durchgeführt. Dabei wurden die Proteine in den verschiedenen Puffern gelöst (Tabelle 4-2) und der pH-Wert vor und nach Inkubation erfasst.

**Tabelle 4-2:** Übersicht der getesteten Puffer mit Ausgangs-pH 7,5, 2% HEWL als Proteinzusatz; unterstrichen der optimale und final eingesetzte Puffer

Puffersystem	Konzentration [mM]	pH-Wert-Einstellung	pH-Wert nach HD ohne Proteinzusatz	pH-Wert nach HD mit Proteinzusatz
<u>Tris</u>	50	HCl	7,38	7,16
Tris	200	Acetat	7,41	7,37
Tris	200	HCl	7,30	7,37
Bis-Tris	50	HCl	7,43	7,28
Bis-Tris	200	Acetat	7,42	7,44
Bis-Tris	200	HCl	7,43	7,44

Alle Puffer zeichneten sich dabei durch eine geringe Veränderung des pH im Vergleich zum Ausgangswert von 7,5 aus. Für die 50-mM-Puffer mit Proteinzugabe sank der pH-Wert nach Hochdruckinkubation durchschnittlich um weniger als 0,2 pH-Einheiten. Für die 200 mM Puffersysteme war ein stabiler oder schwach ansteigender pH-Wert zu beobachten. Ursache hierfür war unter anderem die höhere Pufferkapazität. Interessanterweise konnte für die Proben mit stabilerem pH-Wert (200 mM Bis-Tris-HCl, 200 mM Bis-Tris-Acetat und 200 mM Tris-Acetat) keine Oligomerisierung detektiert werden, während dies bei sinkenden pH-Wert der Fall war. Geringe Vernetzungen bis zum Dimer zeigten sich im 200 mM Tris-HCl-Puffer. In Bezug auf die

Vernetzung schnitten die 50 mM Puffer am besten ab, wobei im Bis-Tris-Puffer Trimere und im Tris-System noch Spuren an Tetrameren nachgewiesen wurden. Denkbar wäre auch, dass der im 50 mM Tris-HCl-Puffer zu beobachtende, leicht erhöhte pH-Abfall ein erstes Indiz für die gute Vernetzung darstellte. Als Ursache für die pH-Abnahme als Konsequenz der Vernetzung kam die Tatsache in Betracht, dass einige basische Aminosäurereste nach Ausbildung der Isopeptidbindung nicht mehr lösungsmittelzugänglich waren. Eine Diskussion der beteiligten Lysin- und Glutaminreste, sowie deren Umgebung folgt im Kapitel 4.2.3.

Basierend auf den Ergebnissen der verschiedenen Puffersysteme hatte sich für den 50 mM-Tris-HCl-Puffer die höchste Vernetzung von HEWL mit mTGase detektieren lassen, so dass dieser gewählt wurde. Damit waren generell mit auf Tris-basierenden Puffersystemen pH-Werte von 7,2 bis 9,0 realisierbar, da der genannte Puffer innerhalb dieser Grenzen stabil ist (*Good et al., 1966*).

Weiterhin sollte der gewählte pH-Wert für die vorgesehenen Versuche geeignet sein. Lysozym hat einen isoelektrischen Punkt (pI) von ~11 (*Tomita et al., 2011*),  $\alpha$ -Lactalbumin von 4,2 - 4,5 und  $\beta$ -Casein von 5,35 - 5,85 (*Belitz et al., 2001*). Das pH-Optimum der mTGase wird mit einem Bereich von 5 - 8 zwischen dem pI des  $\beta$ -Caseins und des HEWL angegeben (*Ajinomoto, 2011*). Somit ergibt sich eine schmale Schnittmenge zwischen den Tris-Pufferbereich und dem pH-Optimum von pH 7,2 bis 8. Um nicht zu nah an den Grenzen dieses Bereiches zu arbeiten, wurde bei einem pH von 7,5 gearbeitet.

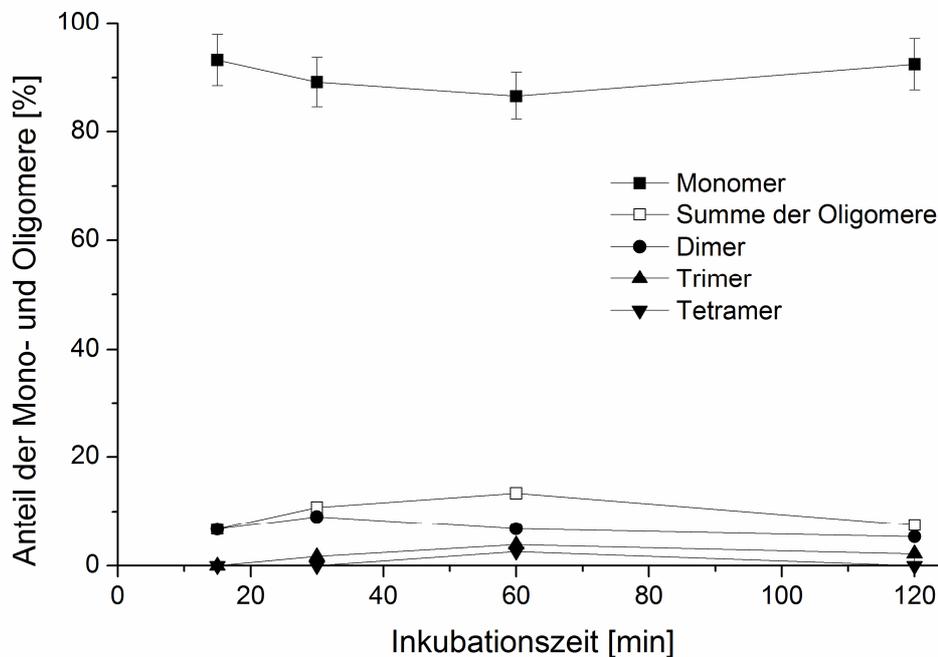
### 4.1.2 Einfluss variierender Inkubationsdauer und unterschiedlicher Drücke

Basierend auf der Arbeit von *Menéndez (2006)* handelt es sich bei mTGase um ein vergleichsweise hochdruckstabiles Enzym, das bei Drücken von bis zu 600 MPa nach 15 min seine Halbwertszeit erreicht. Im Gegensatz dazu reichen bei dem verwandten Enzym Faktor XIII<sub>a</sub> schon weniger als 10% des Druckes (50 MPa) und 20% der Zeit (2 bis 3 min) zur Reduzierung der Aktivität um 50% aus.

Aufgrund vorangegangener Untersuchungen an mTGase (*Menéndez, 2006*) wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Inkubationszeiten untersucht: 15, 30, 60 und 120 min. Da HEWL über sechs Lysin- und drei Glutaminreste verfügt, war davon auszugehen, dass mehrere Isopeptide sowohl inter- als auch intramolekular gebildet werden konnten. Die Zugänglichkeit der potentiell reaktiven Stellen für die mTGase wird allerdings mit steigendem Vernetzungsgrad wieder abnehmen, so dass die Ausbeute möglicherweise über längere Inkubationszeiten nicht signifikant erhöht wird.

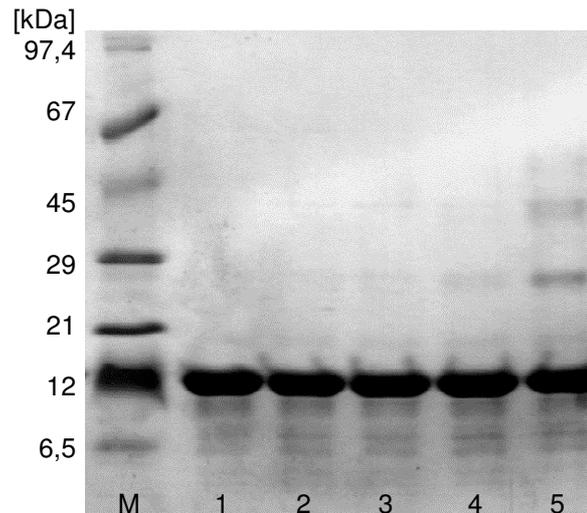
Die Analysen zur Inkubationsdauer wurden mit 2%igen HEWL-Proben und 80 U mTGase/g Protein bei 40 °C und 600 MPa durchgeführt und sind in Abbildung 4-2 dargestellt. Im Rahmen der vier untersuchten Inkubationszeiten waren dabei weder in der Oligomerenzusammensetzung noch für den Summenparameter der Vernetzungsrate größere Unterschiede zu verzeichnen. Die durchschnittliche Oligomerisierung betrug zirka 9 - 11% und setzte sich überwiegend aus Dimeren und geringen Anteilen an Trimeren und Tetrameren zusammen. Für die enzymatische Reaktion der mTGase mit HEWL konnte unter den gewählten Bedingungen daher geschlussfolgert werden, dass die druckinduzierte HEWL-Auffaltung rasch

abläuft und anschließend eine Oligomerisierung nach 30 min nahezu abgeschlossen war. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen zur Aktivität der mTGase überein (*Menéndez, 2006*). Für die folgenden Experimente wurde daraufhin mit 30 min Reaktionszeit gearbeitet, da eine Verlängerung der Inkubation keinen Vorteil brachte.



**Abbildung 4-2:** Mittels SDS-PAGE ermittelte Gehalte an Mono- und Oligomeren nach Inkubation von 2% HEWL mit 80 U mTGase/g Protein bei 40°C und 600 MPa für 15, 30, 60 oder 120 min

Da neben der Zeit die Höhe des hydrostatischen Druckes eine Einflussgröße auf die Oligomerisierung darstellt, sind auf der nachfolgenden SDS-PAGE (Abbildung 4-3) variierenden Drücke (0,1, 200, 400 und 600 MPa) aufgetragen. Es wurden jeweils 2%ige HEWL-Proben mit 40 U mTGase/g Protein bei 40°C inkubiert. Basierend auf den Untersuchungen zur Transglutaminase unter Hochdruck von *Menéndez (2006)* ist bei geringeren Drücken von 200 MPa mehr als eine Verdopplung der Enzymstabilität zu verzeichnen. Damit ist von einer höheren Vernetzung bei moderaten Drücken auszugehen. Im Gegensatz dazu stellt das Hühnereiweißlysozym unter Atmosphärendruck bekanntermaßen kein Substrat für mTGase dar (siehe Kapitel 4.1, und *Murthy et al., 2009*). HEWL muss daher aufgefaltet und für das Enzym als Substrat zugänglich gemacht werden. Da mit einer Temperatur von 40°C am Temperaturoptimum der mTGase gearbeitet wurde, waren 200 MPa zur Auffaltung offenbar nicht ausreichend. Bei diesem Druck müsste HEWL nach Literaturangaben kalt denaturiert werden (*Katamari et al., 2004*). Wie in Abbildung 4-3 zu sehen ist, kann keine Vernetzung für die Drücke von 0,1 und 200 MPa (Bahn 2 und 3) nachgewiesen werden. Bei einem Druck von 400 MPa sind erste Dimere erkennbar (Bahn 4). Für eine signifikante Oligomerisierung sind aber 600 MPa notwendig (Bahn 5). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Untersuchungen von *Smeller et al. (2006)* überein. Die Arbeitsgruppe wies eine reversible Auffaltung des Proteins bei 25°C ab zirka 500 MPa nach.



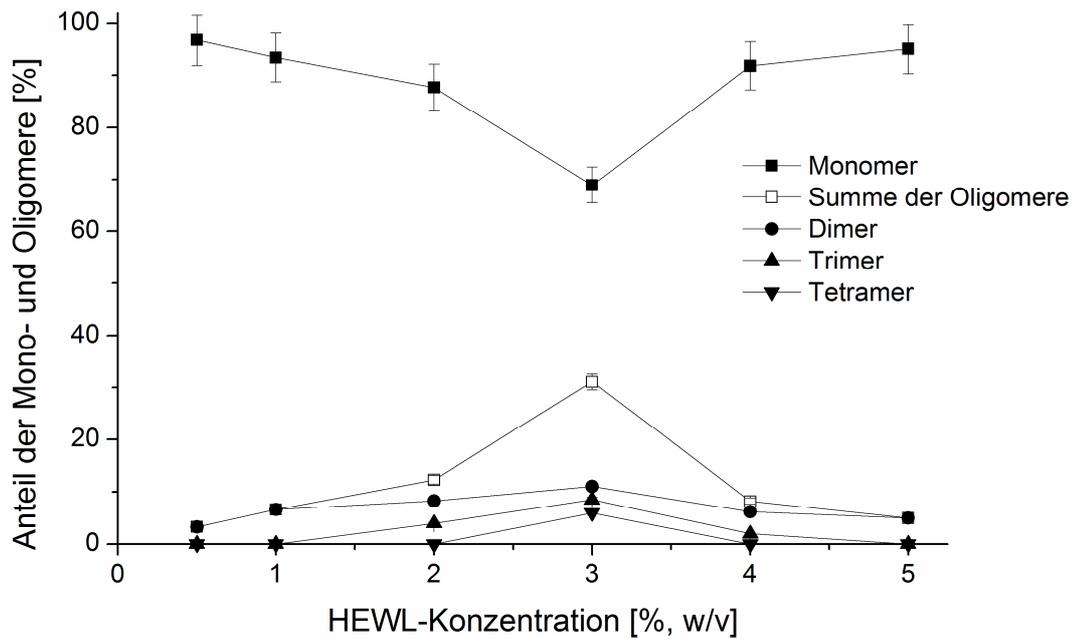
**Abbildung 4-3:** SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen (Acylamid-Gradient von 4 bis 20%)

M - Marker (Serva); 1 - **unbehandeltes** HEWL; 2 - HEWL mit mTGase (40 U/g, 30 min bei 40°C, **0,1MPa**) behandelt; 3 - HEWL mit mTGase unter Druck (40 U/g, 30 min bei 40°C, **200 MPa**); 4 - HEWL mit mTGase unter Hochdruck (40 U/g, 30 min bei 40°C, **400 MPa**) 5 - HEWL mit mTGase unter Hochdruck (40 U/g, 30 min bei 40°C, **600 MPa**)

Höhere Drücke wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da die Stabilität der mTGase bei 600 MPa schon stark abnimmt. Steigende Drücke würden zu einer schnellen Inaktivierung durch Auffaltung des Enzyms führen. Zudem konnte die Hochdruckanlage nur mit maximal 700 MPa betrieben werden. Da die gewählten Parameter zu einer vollständigen reversiblen Auffaltung und Oligomerisierung des Lysozyms führten, wurde im Weiteren mit einem hydrostatischen Druck von 600 MPa gearbeitet.

### 4.1.3 Einfluss der Lysozymkonzentration

In ersten Versuchen zum Konzentrationseinfluss wurden HEWL-Konzentrationen von 0,5, 1, 2, 3, 4, und 5% mit 40 U mTGase/g Protein versetzt und über 30 min bei 600 MPa und 40°C simultan inkubiert. Die resultierenden Präparate wurden nach Dialyse und Lyophilisation mittels SDS-PAGE in ihre einzelnen Oligomeren und verbliebenen Monomere aufgetrennt und mit dem Programm Totallab quantifiziert. In Abbildung 4-4 sind die Anteile der Monomere und der Oligomere als Summenparameter der einzelnen Fraktionen in Prozent dargestellt. Die Grafik zeigt, dass es einen optimalen Bereich zur Vernetzung zwischen 2 und 4% HEWL gibt, wobei das Maximum bei 3% erreicht wird. Hier beträgt die Oligomerisierungsrate unter den angegebenen Bedingungen etwas über 30% (Abbildung 4-4). Das heißt etwa ein Drittel des eingesetzten HEWL konnte demnach unter den gewählten Bedingungen kovalent vernetzt werden.



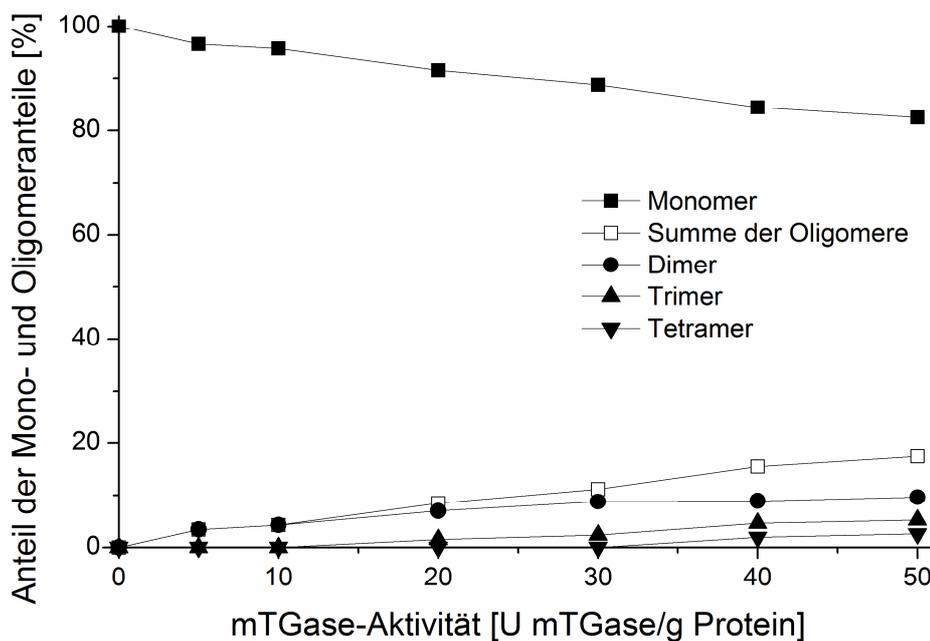
**Abbildung 4-4:** Zusammenhang zwischen Monomergehalt und Oligomerenanteil des HEWL bei verschiedenen Konzentrationen (0,5 bis 5%, w/v) und konstanten 40 U mTGase/g Protein über 30 min bei 600 MPa und 40 °C

Des Weiteren wurden Proben in den Konzentrationen von 2, 4, 6, 8 und 10% HEWL unter gleichen Bedingungen mit 40 und 80 U mTGase/g Protein inkubiert. Diese Analysen bestätigten die bereits oben aufgezeigten Ergebnisse. Die höchste Vernetzung wurde bei 4% HEWL und 80 U mTGase/g Protein ermittelt. 2%ige Proben zeigten eine etwas geringere Vernetzung, wohingegen Konzentrationen über 4% lediglich zu einer minimalen Dimerausbildung neigten. Auch eine weitere Erhöhung der eingesetzten Enzymaktivität auf bis zu 200 U mTGase/g Protein führte bei 5 bis 7%igen HEWL-Lösungen zu keiner Steigerung der Oligomerisierung. Lediglich für Lösungen kleiner oder gleich 4%igen konnten bei allen mTGase-Gehalten Oligomerenbanden nachgewiesen werden. Bei zu geringen Konzentrationen von unter 1% ist es wahrscheinlich, dass die Abstände der einzelnen HEWL-Moleküle zueinander in Lösung zu groß waren, um über mTGase intermolekular in Wechselwirkung zu treten und Isopeptide zu bilden, bevor das Enzym zu stark inaktiviert wurde. Bei zu hohen Konzentrationen (5% und höher) lagen im Gegensatz dazu sehr viele Substratmoleküle vor. Diese nahmen dann, insbesondere während der Auffaltung, einen größeren Raum ein, so dass sie zum einen die mTGase behinderten (unabhängig von deren Konzentration), zum anderen sich selbst sterisch beeinträchtigten und somit eine vollständige Auffaltung erschwert oder verhindert wurde.

#### 4.1.4 Einfluss der mTGase-Aktivität

Die mTGase wurde aufgrund ihres vielfältigen Einsatzes in der Lebensmitteltechnologie gut untersucht. Selbst ihr Verhalten unter Druck wurde bereits ausführlich diskutiert (Menéndez, 2006). Im Rahmen der genannten Dissertation wurden allerdings nur reine mTGase-Pufferlö-

sungen betrachtet, so dass ein Einfluss des Proteinsubstrates HEWL bei simultaner Inkubation auf das Enzym zu untersuchen galt. Erste Versuche im Rahmen dieser Arbeit gingen von relativ niedrigen Enzymaktivitäten aus, da in der Literatur Mengen von 4 U mTGase/g Protein für Casein (Partschefeld et al., 2007b) oder 1,5 U mTGase/g Protein für  $\beta$ -Lactoglobulin (Lauber et al., 2001) angegeben wurden. Diese geringen Mengen zeigten allerdings für HEWL nur wenige Vernetzungsprodukte, weshalb die Konzentrationen der mTGase schrittweise erhöht worden. Es stellte sich heraus, dass mit zunehmender Enzymaktivität die Ausbeute der Oligomere gesteigert werden konnte (Abbildung 4-5). Im Gegensatz zu den HEWL-Konzentrationen, welche ein Optimum aufwiesen, ist für die mTGase-Aktivität ein steter Anstieg zu verzeichnen.



**Abbildung 4-5:** variierende Mengen an mTGase, angegeben in Units mTGase bezogen auf 1 g Protein (HEWL), bei 2% HEWL (w/v) über je 30 min Inkubation bei 600 MPa und 40 °C

In Abbildung 4-5 wird deutlich, dass bei einem Zusatz von bis zu 50 U mTGase/g Protein eine zunehmende Vernetzung und noch kein Maximalwert abzuschätzen ist. Aufgrund dessen wurde der Gehalt und damit verbunden die Aktivität weiter auf 80, 120, 160 und final 200 U mTGase/g Protein erhöht. Für Aktivitäten über 200 U mTGase/g Protein ergaben sich Löslichkeitsprobleme, da in dem mTGase-Pulver von *Ajinomoto* (2011) neben 1% Protein (Enzym) auch 99% Zucker (Maltose und Lactose) enthalten waren. In Tabelle 4-3 sind die entsprechenden Vernetzungsraten bei einem Gehalt von 3% HEWL und 30 min Inkubation bei 40 °C mit 600 MPa abgebildet. Die Oligomerisierung konnte durch Aktivitätserhöhung von 120 auf 200 U mTGase/g Protein nicht mehr signifikant über 25% gesteigert werden. Für Versuche mit maximaler Vernetzungsausbeute wurde daher ein mittlerer Gehalt von 160 U mTGase/g Protein eingesetzt.

**Tabelle 4-3:** Darstellung der Vernetzungsgrade\* von 3% HEWL mit 120, 160 sowie 200 U mTGase/g Protein inkubiert bei 600 MPa und 40 °C für 30 min

HEWL-Konzentration, mTGase-Aktivität	Vernetzungsgrad [%]
3%, 120 U/g	25,9 ± 0,9
3%, 160 U/g	25,0 ± 5,1
3%, 200 U/g	26,6 ± 4,0

\* Daten aus der Wissenschaftlichen Abschlussarbeit von *Kießling (2011)*

Um einen Einfluss der hohen Zuckergehalte in der mTGase auszuschließen, wurden zusätzliche Hochdruck-Versuche mit Lactose- und Maltodextrinzusatz durchgeführt. Simuliert wurden dabei die gleichen Mengenverhältnisse wie bei einem Einsatz von 200 U mTGase/g Protein. Mithilfe der SDS-PAGE konnte keine zuckerinduzierte Vernetzung nachgewiesen werden. Die Bildung von Proteinmodifikationen im Zuge anderer chemischer Reaktionen wie z.B. der Maillard-Reaktion konnte aufgrund der relativ kurzen Inkubationsdauer in wässriger Lösung ausgeschlossen werden.

Neben diesen Betrachtungen wurde eine Reinigung der mTGase zur Steigerung der Löslichkeit bei höheren Aktivitäten durchgeführt. Um die Lactose und das Maltodextrin möglichst schonend aus dem Pulver zu entfernen, wurde es mit wenig Wasser gelöst und dialysiert. Die berechnete, theoretische Auswaage von 1% mTGase im Enzympulver von *Ajinomoto (2011)* wurde um 100% übertroffen, so dass davon auszugehen ist, dass nach der Konzentrierung noch Restwasser und Zucker in dem getrockneten Pulver enthalten sind. Weiterhin konnte nach Lyophilisation eine gräuliche Verfärbung und lediglich eine zehnpromtente Restaktivität im Vergleich zum Ausgangswert des Enzyms verzeichnet werden. Mit dieser konzentrierten mTGase sind Versuche mit je 5 und 7% HEWL, einer Enzymaktivität von 200 U mTGase/g Protein über 30 min bei 600 MPa und 40 °C durchgeführt worden. Störende Effekte durch die Saccharide und Probleme beim Lösen der Ausgangssubstrate konnten somit ausgeschlossen werden. In dem Gel waren nach elektrophoretischer Trennung nur geringe Gehalte an Dimeren für die 5%igen Proben und keine Oligomerisierung für die 7%igen Proben zu detektieren. Die nach Hochdruckinkubation dialysierten und gefriergetrockneten Proben zeichneten sich allerdings durch eine schlechtere Resolvatisierbarkeit aus. Zusammenfassend führte die Reinigung der mTGase zu keiner höheren Vernetzung. Sie bot keinen Vorteil, da davon auszugehen war, dass die mTGase ohne die stabilisierenden Zusätze von Lactose und Maltodextrin in ihrer Aktivität unter anderem bei einer Lagerung (-20 °C) weiter herabsetzt wird.

#### 4.1.5 Temperatur

Das Enzym mTGase ist bei Atmosphärendruck nach Herstellerangaben über einen Bereich von 0 bis 65 °C aktiv (*Ajinomoto, 2001*). HEWL denaturiert in Lösung erst ab einer Temperatur von über 75 °C (*Reategui und Aksan, 2009*). Somit ergaben sich Temperaturrahmenbedingungen über einen weiten Bereich. Die größte Aktivität wies mTGase bei etwa 40 °C auf, so dass ausgehend von dieser Temperatur erste Untersuchungen stattfanden. Zudem konnte mithilfe

des Phasendiagramms von *Maeno et al. (2009)* die Denaturierungsneigung von HEWL abgeschätzt werden (Kapitel 2.4.1). Für Lysozymlösungen mit pH 2 stellten sie eine Denaturierungsneigung sowohl bei tiefen Temperaturen (zirka -30°C bei 0,1 MPa) und für hohen Temperaturen (zirka 55°C bei 0,1 MPa) als auch bei hohen Drücken (zirka 20°C und 450 MPa) fest. Mit dem hier eingesetzten pH von 7,5 und den gegebenen technischen Voraussetzungen (Arbeiten > 0°C) wurden daher im Hinblick auf die Enzymaktivität neben den ausgewählten 40°C auch höhere Temperaturen von 50 und 60°C untersucht. Die Konzentration des Substrates HEWL betrug dabei 4% (w/v). Es wurde mit 80 U mTGase/g Protein über 30 min bei 400 bzw. 600 MPa behandelt.

**Tabelle 4-4:** Vernetzung als Summenparameter der einzelnen Oligomere\*, 4% HEWL, 80 U mTGase/g Protein über 30 min

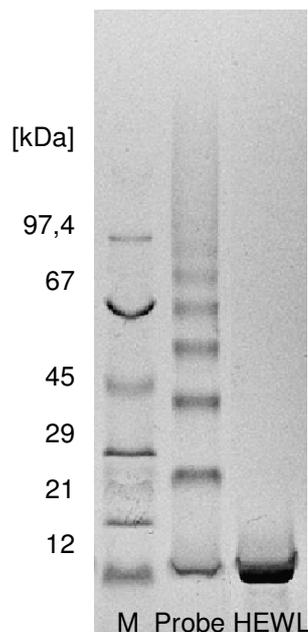
Temperatur [°C], Druck [MPa]	Vernetzung [%]
40°C, 400 MPa	6,1 ± 0,1
40°C, 600 MPa	11,8 ± 3,1
50°C, 400 MPa	12,1 ± 3,2
50°C, 600 MPa	13,4 ± 1,3
60°C, 400 MPa	16,9 ± 1,8
60°C, 600 MPa	25,5 ± 1,7

\* Daten aus der Wissenschaftlichen Abschlussarbeit von *Kießling (2011)*

Neben der bereits diskutierten Druckabhängigkeit (Kapitel 4.1.2) konnte mithilfe der Tabelle 4-4 eine direkte Proportionalität der Oligomerisierung von der Inkubationstemperatur aufgezeigt werden. Je höher diese gewählt wurde, umso stärker stieg der Vernetzungsgrad z.B. bei 600 MPa von 11,8% bei 40°C auf 25,5% bei gleichem Druck und 60°C.

### 4.1.6 Optimierte Parameter für den höchstmöglichen Vernetzungsgrad

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden die Parameter: Puffer, pH-Wert, Inkubationszeit, hydrostatischer Druck, Konzentration des Substrates HEWL, Aktivitätsdosis des Enzyms mTGase, die Temperatur, sowie die Zusammenhänge untereinander analysiert. Für eine maximale Oligomerisierungsrate ergab sich daraus ein pH-Wert von 7,5 im 50 mM Tris-HCl-Puffer, bei 60°C, 600 MPa über 30 min, sowie eine Proteinkonzentration von 3% HEWL (w/v) und eine Transglutaminaseaktivität von 160 U mTGase/g HEWL (Pulver von *Ajinomoto, 2011*) für die Inkubationsbedingungen.



**Abbildung 4-6:** SDS-PAGE der stark vernetzten HEWL-Probe (3% HEWL, 160 U mTGase/g Protein, 30 min bei 60 °C und 600 MPa), 74,4% vernetzt; M - Marker; HEWL - natives Hühnereiweißlysozym

Unter den oben genannten Parametern können im SDS-PAGE-Gel einzelne Banden bis zum Oktamer aufgetrennt und quantifiziert werden (siehe Abbildung 4-6). Höhere Oligo- oder gar Polymere wurden als Summenparameter erfasst, da eine Auftrennung mit der gewählten Methode nicht mehr möglich war. Die Ausbeute an Oligomeren lag über 70%.

Ergänzend sei erwähnt, dass es für simultan inkubierte HEWL-Proben mit exakt gleichen Ausgangsbedingungen und Protein-Konzentrationen zu gerätebasierten Schwankungen des Vernetzungsgrades gekommen ist. Ursache der zuweilen schlechten Reproduzierbarkeit waren Druckschwankungen, welche in einem Bereich von 20 MPa in den zwei unabhängigen Autoklaven der Hochdruckanlage auftraten. Daher wurde der Vernetzungsgrad von jeder Probe gelelektrophoretisch bestimmt und in deren Auswertung und Diskussion mit einbezogen.

#### **Klassifizierung der oligomerisierten HEWL-Proben**

Neben den stark vernetzten HEWL wurden Proben mit geringerem Vernetzungsgrad wie in Kapitel 4.1.4 (Abbildung 4-5) hergestellt. Die so generierten Proben konnten anhand ihrer variierenden Oligomerenanteile charakterisiert werden, um strukturelle Veränderungen nach Hochdruck und mTGase-Behandlung zu verdeutlichen. Die Einteilung der Proben fand wie in Tabelle 4-5 abgebildet statt. Geringe Vernetzungen von 0 - 30% wurden mit LMW (engl. low molecular weight), mittlere Oligomerisierungsraten von 30 - 60% mit MMW (engl. medium molecular weight) und sehr stark vernetzte Proben von 60 - 100% mit HMW (engl. high molecular weight) abgekürzt. Die Kategorisierung diente zur besseren Übersicht und wurde durch konkrete Angaben der Reaktionsbedingungen und die resultierende Vernetzung ergänzt.

**Tabelle 4-5:** Einteilung der enzymatisch vernetzten HEWL-Proben in drei Gruppen (LMW, MMW und HMW) basierend auf ihrem mittels SDS-PAGE und Totallab ermittelten Vernetzungsgrad (relativer Gesamtoligomeregehalt)

Proben-Bezeichnung	Akronym	Bsp. Inkubation	Vernetzungsgrad [%]	Ausbeute (pro Ansatz/ Kryoröhrchen - 5 ml) [g]
geringer Vernetzungsgrad (engl. low molecular weight)	<b>LMW</b>	30 min, 600 mPa, 40 °C, 2% HEWL, 40 U mTGase	0 - 30	≈ 0,08
mittlerer Vernetzungsgrad (engl. medium molecular weight)	<b>MMW</b>	30 min, 600 MPa, 50 °C, 3% HEWL, 120 U mTGase	30 - 60	≈ 0,12
hoher Vernetzungsgrad (engl. high molecular weight)	<b>HMW</b>	30 min, 600 MPa, 60 °C, 3% HEWL, 160 U mTGase	60 - 100	≈ 0,12

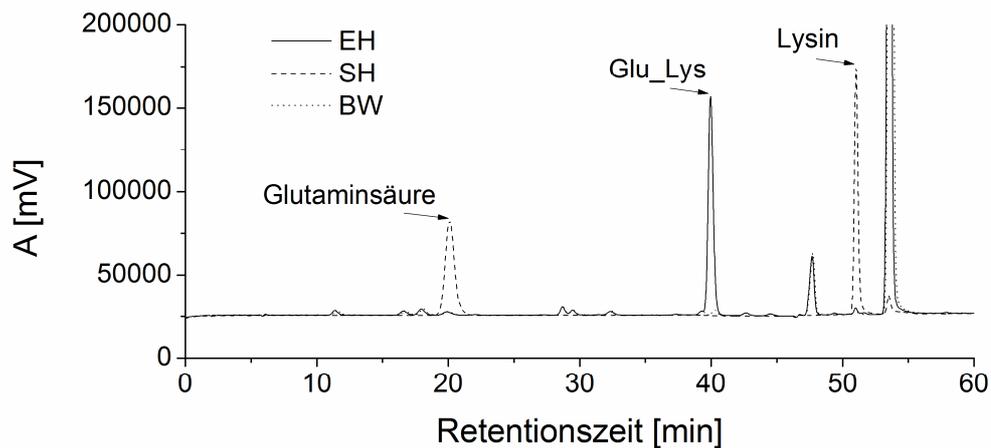
## 4.2 Analytik der Isopeptide

Im Vergleich zu dem mittels Gelelektrophorese erbrachten Beweis, dass es sich bei der enzymatischen Vernetzung um nicht reduzierbare, kovalente Verknüpfungen handelt, steht der eindeutige Nachweis des Isopeptids N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin (Glu\_Lys) noch aus. Dieser erfolgte mittels Aminosäureanalytik (ASA) nach enzymatischer Hydrolyse im Vergleich zur klassischen Säurehydrolyse.

Die Analyse der reaktiven, an der Oligomerisierung beteiligten Glutamin- und Lysinreste fand über die Identifikation der Spaltpeptide mittels Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatografie (RP-HPLC) mit Detektion durch Elektronensprayionisierung-Massenspektrometrie (ESI-TOF-MS) nach tryptischem Verdau statt. In enzymatisch vernetzten HEWL-Proben wurden neue Peptidbruchstücke mit diskreten Massen detektiert.

### 4.2.1 Identifizierung des N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin-Isopeptids (Glu\_Lys)

Mithilfe des kommerziell erhältlichen Standards N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin (Glu\_Lys) wurde die Aminosäureanalyse nach klassischer Säurehydrolyse (SH) sowie nach enzymatischer Analyse (EH) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-7 dargestellt. Bestätigt werden konnte, dass das zu identifizierende Isopeptid säurelabil ist, wohingegen es bei enzymatischer Hydrolyse keine Spaltung in seine Aminosäurebestandteile Glutamin (Glu) und Lysin (Lys) erfährt.



**Abbildung 4-7:** Chromatogramm des Isopeptidstandards N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin (Glu\_Lys) nach enzymatischer Hydrolyse (EH) und saurer Hydrolyse (SH), sowie Blindwert der EH (BW) mit anschließender Ionenaustauscher-Analytik und Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin (ASA, Glutamin wird nach SH in seine Säure umgewandelt)

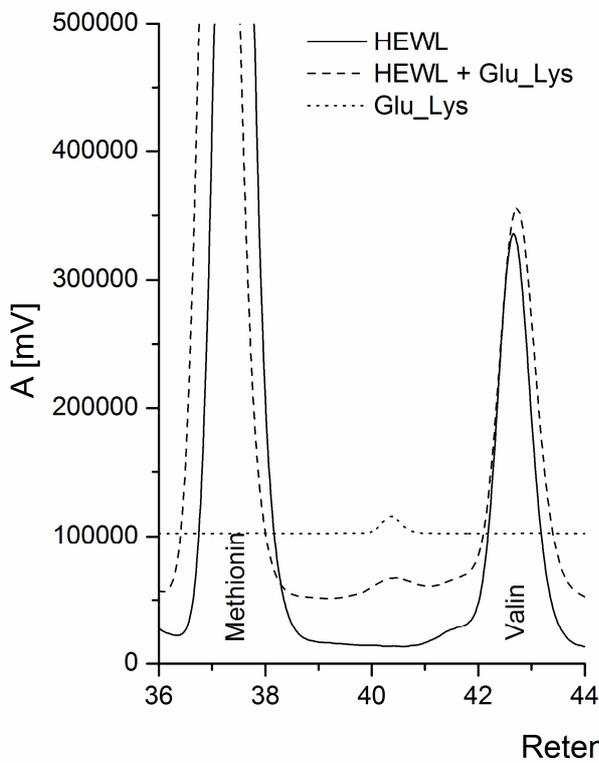
Ein Nachweis des Isopeptids Glu\_Lys in mittels mikrobieller Transglutaminase oligomerisierten HEWL-Proben war folglich in enzymatisch hydrolysierten Proben möglich. Zuvor ist die EH auf ihre Vollständigkeit hin untersucht worden. In Tabelle 4-6 sind für ausgewählte Aminosäuren des HEWL die theoretischen Gehalte den real ermittelten Werten aus der SH und der EH gegenüber gestellt.

**Tabelle 4-6:** Übersicht über ausgewählte Aminosäuren (AS) in unbehandeltem HEWL; nach enzymatischer Hydrolyse (EH) und saurer Hydrolyse (SH) im Vergleich zu den theoretischen Gehalten

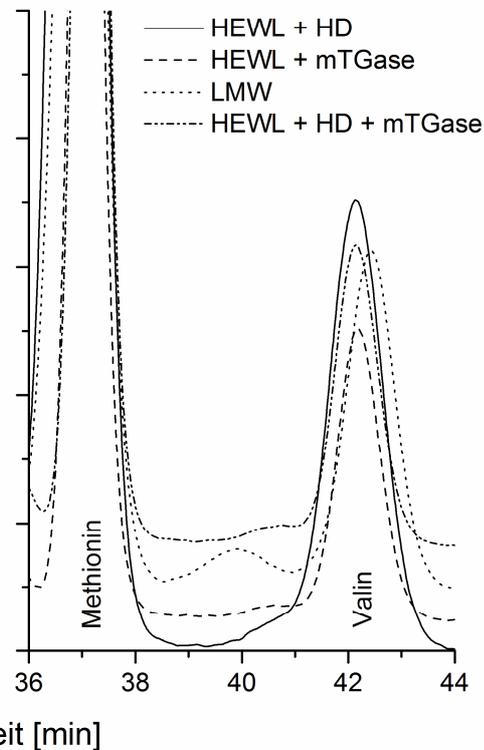
Aminosäure	Verhältnis AS/HEWL	Gehalt (theor.)	Nach EH	Nach SH	Quotient EH/SH
			[mmol/ 100 g HEWL]		
Asparaginsäure*	8	55,2	32,77	146,81	0,22
Threonin	7	48,3	35,48	48,23	0,74
Serin	10	69,0	49,14	65,11	0,75
Glutaminsäure*	2	13,8	73,02	37,66	1,94
Alanin	12	82,8	57,28	86,58	0,66
Glycin	12	82,8	61,09	86,24	0,71
Cystin*	8	55,2	38,56	62,12	0,62
Valin	6	41,4	33,41	40,75	0,82
Methionin*	2	13,8	9,25	9,22	1,00
Isoleucin	6	41,4	28,37	35,63	0,80
Leucin	8	55,2	43,65	59,25	0,74
Tyrosin	3	20,7	16,98	20,99	0,81
Phenylalanin	3	20,7	16,79	22,21	0,76
Histidin	1	6,9	5,16	5,89	0,88
Lysin	6	41,4	31,31	43,60	0,72
Arginin	11	75,9	50,97	73,78	0,69

\* Aminosäuren gehen verschiedene Nebenreaktionen ein und können nicht stimmig erfasst werden

Die Wiederfindung der Aminosäuren in den sauren Proben (SH) war im Vergleich zu den theoretisch bestimmten Gehalten je nach Aminosäure mit 85 bis 113% recht gut. Der Quotient aus EH gegen SH war mit 0,66 - 0,88 im Durchschnitt etwas niedriger, lag aber unter Berücksichtigung der Enzym/Zeit-Optimierung durchaus in einem zufriedenstellenden Bereich. Lediglich bei den Aminosäuren (AS) Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystein waren stark abweichende Werte sowohl von den theoretischen Daten als auch im Quotient EH/SH erkennbar. Dies wurde im Wesentlichen auf die Oxidationsanfälligkeit der AS zurückgeführt. So werden beispielsweise Cysteinsäure und Asparaginsäure aus Cystein und Asparagin gebildet. Auch der Nachweis von Glu in der SH war nur als Glutaminsäure möglich (Abbildung 4-7). Letztendlich konnte mithilfe der EH, welche nahezu vollständig ablief, eine Quantifizierung des N-ε-(γ-L-Glutamyl)-L-Lysins in den verschiedenen behandelten Hühnereiweiß-Lysozymproben erfolgen, da dieses aus dem Proteinverband freigesetzt und nicht abgebaut wurde.



**Abbildung 4-8:** ASA-Chromatogrammausschnitt des HEWL-Standards; unbehandeltes HEWL mit dem Isopeptid-Standard (Glu\_Lys) und das reine Isopeptid (Glu\_Lys)



**Abbildung 4-9:** Chromatogrammausschnitt des enzymatisch hydrolysierten HEWL nach HD; mit mTGase; LMW (Vernetzungsgrad 12,3%) und HEWL mit mTGase nach HD

In Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9 sind Ausschnitte ausgewählter Chromatogramme der Aminosäureanalytik zu sehen. In der linken Abbildung sind der N-ε-(γ-L-Glutamyl)-L-Lysins-Standard, das unbehandelte HEWL, sowie das HEWL mit Isopeptidstandard (0,5 nmol) versetzt, dargestellt. Zu erkennen ist, dass Glu\_Lys als Standard und in der Mischung mit einer Retentionszeit von zirka 40,5 min eluiert. Bei der Lysozymprobe, die mit dem Standard dotiert wurde, wird der Peak zwischen den Aminosäuren Valin (Val,  $R_t \sim 37,5$  min) und Methionin (Met,  $R_t \sim 43$  min) nahezu Basislinien getrennt detektiert. In dem nativen HEWL ist an dieser Stelle

kein Peak zu erkennen. Folglich konnte sowohl eine Identifizierung als auch eine Quantifizierung in den zu untersuchten Proben erfolgen. Es kam zum Teil zu gerätebedingten Retentionszeitschwankungen, die aber keinen Einfluss auf die Elutionsreihenfolge hatten, wobei für eine Zuordnung der Signale das Peptidprofil genutzt wurde. Met wies dabei stets einen hohen Peak vor dem etwa um zwei Drittel kleineren Val-Peak auf.

Abbildung 4-9 zeigt die Überlagerung von Lysozym bei 600 MPa (+HD), mit Enzymzugabe (+mTGase), beide Parameter simultan (LMW) sowie mTGase-Zusatz nach HD-Behandlung (+HD+mTGase). Während im Blindwert (nur HEWL, Abbildung 4-8) kein Glu\_Lys nachweisbar ist, weist die unter Hochdruck mit mTGase inkubierte Probe (LMW) und einem Vernetzungsgrad von 12,3% einen Isopeptidpeak auf. Auf diese Weise kann eindeutig gezeigt werden, dass die mittels SDS-Page nachgewiesene Vernetzung (vgl. Abbildung 4-1) auf die Bildung des Isopeptids Glu\_Lys zurückzuführen ist.

#### 4.2.2 Beurteilung einer intra- und intermolekularen Vernetzung

Basierend auf der Arbeit von *Lauber (2001b)* sollte mithilfe der Ergebnisse der ASA neben der vorangegangenen Identifizierung eine Zuordnung der Vernetzungsart zu inter- oder intramolekular erfolgen. Es wurden dabei die ermittelten Isopeptidgehalte der Anzahl an zur Bildung der Oligomere theoretisch mindestens notwendigen Proteinvernetzungen gegenübergestellt. Die Konzentration an minimal gebildeten Cross-Link-Aminosäuren,  $[CLAA]_{\min}$  wurde nach Berechnungsformel 4-1 ermittelt. Mithilfe der  $[CLAA]_{\min}$  ist eine Bewertung hinsichtlich inter- oder intramolekularer Vernetzungen möglich. Unterschreitet die gemessene Menge an Isopeptid die theoretisch notwendige ist von vorrangig intermolekularen Vernetzungen auszugehen. Überschreitet die tatsächliche die theoretische nötige Menge wurden mehrfach intermolekulare oder auch intramolekulare Bindungen geknüpft.

$$[CLAA]_{\min} \approx (0,9 \times [\text{Oligomer}]) + (0,67 \times [\text{Trimer}]) + (0,5 \times [\text{Dimer}]) \quad (4-1)$$

$[CLAA]_{\min}$	Mindestkonzentration an quervernetzenden AS in mol/mol Proteinmonomer
$[\text{Oligomer}], [\text{Trimer}], [\text{Dimer}]$	relative Flächeneinheiten (SDS-Page, Abschätzung mittels „Totallab TL 120“)

Betrachtet wurden zunächst wieder die unvernetzten Proben, HEWL mit/ohne mTGase und mit/ohne HD. Für diese war in guter Korrelation zur Abwesenheit jeglicher Oligomere in Abbildung 4-1 kein Glu\_Lys in den ASA-Chromatogramm zu detektieren. Für alle enzymatisch unter HD behandelten HEWL-Proben konnte die Anwesenheit des Isopeptids Glu\_Lys bestätigt werden. Die bestimmten Gehalte ausgewählter LMW-Proben sind in Tabelle 4-7 den theoretisch benötigten  $CLAA_{\min}$  gegenübergestellt.

**Tabelle 4-7:** Vergleich der berechneten Gehalte an Cross-Links aus den ASA-Daten mit den über die SDS-PAGE ermittelten  $[CLAA]_{min}$  der LMW-Proben (jeweils bei 40 °C und 30 min bei 600 MPa inkubiert)

Probe	Enzym [U mTGase/g Protein]	Vernetzungsgrad [%]	$[CLAA]_{min}$ [mmol/100g HEWL]	Glu_Lys
2% HEWL (w/v)	-	-	-	-
2% HEWL (w/v)	40	12,3	0,48	0,64
3% HEWL (w/v)	120	25,9	0,71	1,26
4% HEWL (w/v)	80	14,3	0,53	0,17

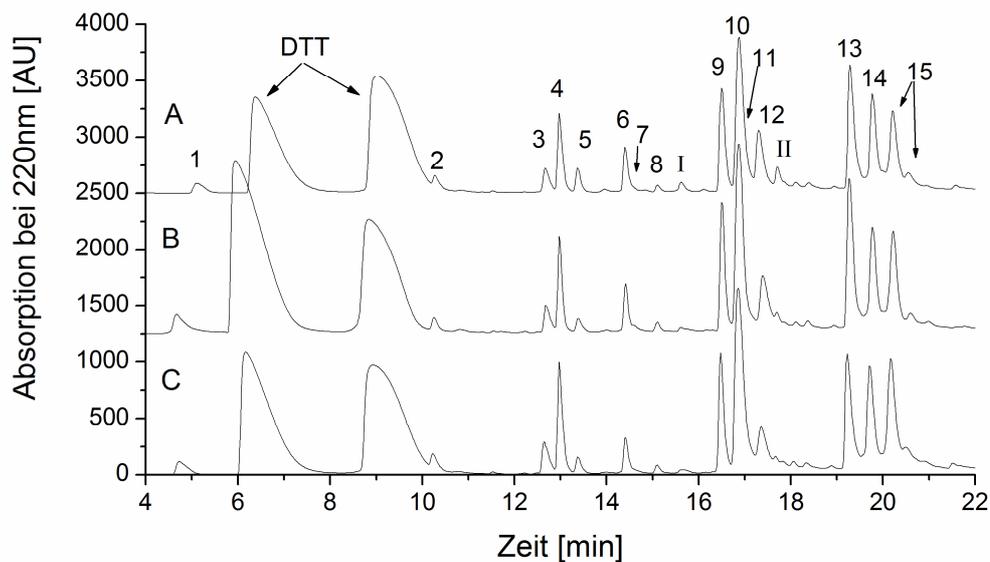
Anhand der Daten wird ersichtlich, dass ein direkter Zusammenhang zwischen den  $CLAA_{min}$  und dem Vernetzungsgrad besteht. Maximale Gehalte werden bei 3% HEWL erreicht. Dabei entspricht beispielsweise der relativ hohe Gehalt von 1,26 mmol Isopeptid pro 100 g Protein einer Lysinblockierung von etwa 3%. Die tatsächlich bestimmten Mengen an Isopeptid waren bis zu einer Konzentration von 3% HEWL größer als die berechnete Konzentration der  $CLAA_{min}$ . Mit steigenden Proteingehalten wurden jedoch auch geringere Gehalte an Glu\_Lys im Vergleich zur  $CLAA_{min}$  bestimmt. Eine Ursache für die geringen Isopeptidgehalte liegt vermutlich in der Effizienz der enzymatischen Hydrolyse. Bereits bei nativem HEWL wurde Lysin lediglich zu zirka 72% wiedergefunden, dies bedeutet, dass etwa 2 der 6 Lysinreste nicht erfasst wurden. Ob dies direkt auf das Isopeptid Glu\_Lys übertragbar ist, konnte anhand der Daten nicht sicher geschlussfolgert werden. Für die Kalibration der ASA wurde der reine Glu\_Lys-Standard eingesetzt. Da die Einwaage für die EH unabhängig vom vorrausgegangenem Reaktionsansatz und dessen Lysozymkonzentration erfolgte, sollte der Effekt aber für alle Proben gleich sein. Folglich muss es bei den Hochdruckinkubationen mit hohem Proteinanteil ( $\geq 3\%$ ) zu weiteren kovalenten Vernetzungen gekommen sein, welche nicht auf das untersuchte Isopeptid zurückzuführen sind.

Eine eindeutige Zuordnung ob inter- und/oder intramolekulare Vernetzung kann mithilfe der Daten nicht erfolgen. Es handelt sich lediglich um eine Abschätzung. Es ist davon auszugehen, dass beide Vernetzungsarten in den enzymatisch oligomerisierten Proben auftreten.

### 4.2.3 Lokalisierung der reaktiven Lysin- und Glutaminreste mittels HPLC/MS

Die mTGase-reaktiven AS wurden mittels Peptidmapping identifiziert. Tryptisch freigesetzte Peptide des HEWL wurden über RP-HPLC mit ESI-TOF-MS-UV-Detektion analysiert (Abbildung 4-10). Ein Chromatogramm des Peptidmusters einer unbehandelten HEWL-Probe ist in Abbildung 4-10 A dargestellt.

Für 15 Peaks wurden die tryptischen Peptide, welche sich bei C-terminaler Spaltung nach Lysin- und Argininresten aus der Primärstruktur ergeben, mit den Massenspektrometriedaten der theoretischen tryptischen Peptide des HEWL verglichen (Tabelle 4-8). So konnte 81,4% der Sequenz des HEWL (104 von 129 Aminosäuren) identifiziert werden, welche fünf der sechs Lysine (Lys<sub>1</sub>, Lys<sub>13</sub>, Lys<sub>33</sub>, Lys<sub>97</sub>, und Lys<sub>116</sub>) und alle drei Glutaminreste (Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub>, und Gln<sub>121</sub>) als potentielle Substrate für mTGase beinhaltet.



**Abbildung 4-10:** RP-HPLC des tryptisch verdauten HEWL: A - unbehandeltes HEWL; B - HEWL mit mTGase über 30 min bei 40°C und Atmosphärendruck behandelt; C - HEWL mit mTGase über 30 min bei 40°C und 600 MPa (LMW)

**Tabelle 4-8:** Identifikation der tryptischen Peptide aus nativem HEWL durch RP-HPLC mit ESI-TOF-MS

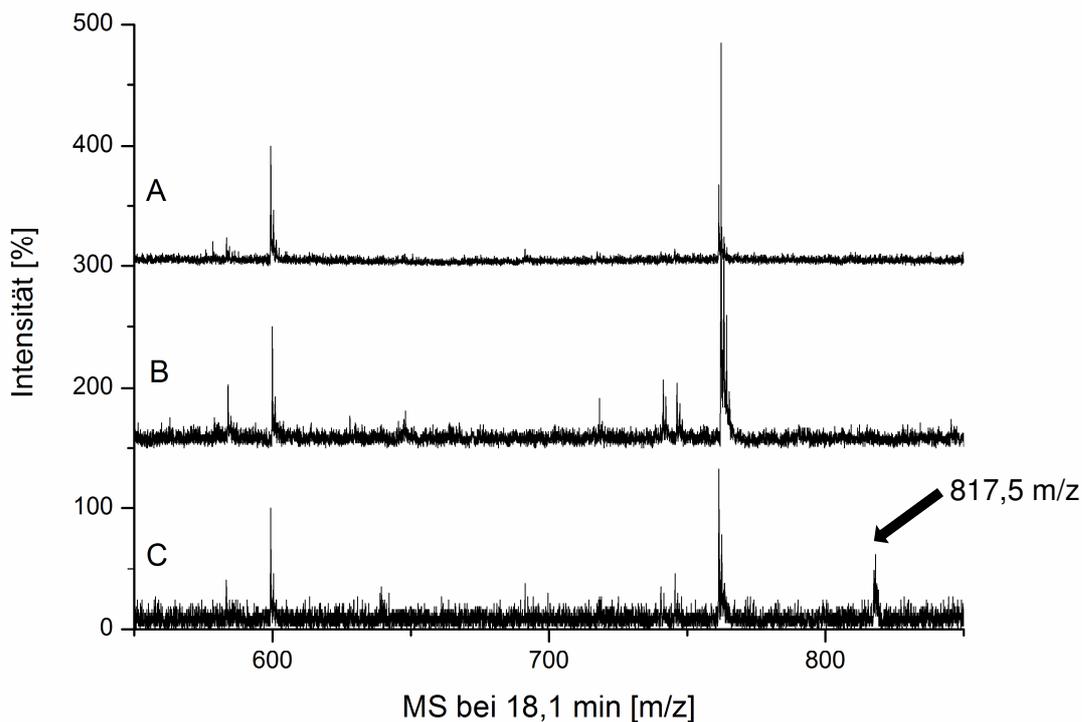
Peak	Zeit [min]	m/z		Tryptische Peptide	Theoretische Peptidmasse
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+2H] <sup>2+</sup>		
1	5,1	517,3	-	69-73	516,27
2	10,3	448,3	-	126-129	447,23
3	12,8	606,4	-	1-5	605,36
4	13,0	874,5	437,7	15-21	873,41
5	13,5	776,4	-	117-123	775,35
6	14,5	1428,9	714,9	34-45	1427,64
7	14,7	836,5	-	6-13	835,39
8	15,1	992,7	496,8	6-14	991,49
9	16,5	1045,7	523,3	117-125	1044,53
10	16,9	936,5	468,7	62-68	935,37
11	17,0	1276,7	638,9	115-125	1275,64
12	17,4	1754,6	877,5	46-61	1752,83
13	19,3	1268,7	634,9	22-33	1267,60
14	19,8	1805,1	902,6	97-112	1802,89
15	20,3	1676,4	838,5	98-112	1674,79
15	20,6	1676,4	838,5	98-112	1674,79
I	15,7	497,3	Unbekanntes Artefakt		
II	17,75	1288,9	Unbekanntes Artefakt		

Die Peptidmuster, welche bei einer Wellenlänge von 220 nm detektiert wurden, zeigten keine Unterschiede für natives Lysozym (Abbildung 4-10 A) und HEWL mit mTGase über 30 min bei 40°C unter Atmosphärendruck oder hohem hydrostatischem Druck (Abbildung 4-10 B und C) behandelt. Dies war ein Hinweis darauf, dass die, zur Behandlung von HEWL genutzten

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Bedingungen, keinen signifikanten Einfluss auf die Verdaubarkeit durch Trypsin besaßen und die geringen Gehalte neuer Peptidfragmente (Abbildung 4-10 C, LMW-Probe) mit der UV-Detektion nicht nachweisbar waren. Zur Identifizierung der reaktiven Stellen wurde angenommen, dass mTGase sechs mögliche Lysin- und drei mögliche Glutaminseitenketten des HEWL unter Hochdruck zur Verfügung stehen. Daher gab es unter Berücksichtigung, dass C-terminale Peptidbindungen für beteiligte Lysinreste nicht als Substrat für die tryptische Spaltung zur Verfügung stehen, theoretisch eine begrenzte Anzahl von 18 tryptischen Peptiden, welche durch N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin-Isopeptide vernetzt sein konnten.

Nach Berechnung der zugehörigen monoisotopischen Massen aller theoretisch möglichen tryptischen, isopeptidhaltigen Spaltpeptide wurden diese mit den massenspektrometrischen Daten verglichen. Mithilfe dieser Herangehensweise wurden keine relevanten Massenpeaks in den tryptischen Hydrolysaten des unbehandelten HEWL und dem ohne HD mit mTGase behandelten HEWL nachgewiesen. Dies bestätigte erneut, dass Lysozym unter Normaldruck für mTGase nicht zugänglich ist (*Murthy et al., 2009*). Im Gegensatz dazu wurde im unter Hochdruck vernetzten HEWL (2% HEWL mit 40 U mTGase/g Protein über 30 min bei 40°C und 600 MPa) bei einer Retentionszeit von 18,1 min ein spezifischer Peak detektiert (Abbildung 4-11).



**Abbildung 4-11:** Massenspektren bei einer Retentionszeit von 18,1 min (in Zusammenhang mit Abbildung 4-10 - 2% HEWL mit 40 U mTGase/g Protein über 30 min bei 40°C und 600 MPa)

Das Signal mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis von 817,49 ( $z = 2$ ) korreliert mit einer monoisotopischen Masse von 1633,0 Da. Diese konnte den über Glu\_Lys kovalent verknüpften HEWL-Peptidsegmenten 1-5 (monoisotopische Masse von 605,4 Da) und 117-125 (1044,5 Da) abzüglich der molaren Masse des Ammoniums (17,0 Da) zugeordnet werden. Die berechnete theoretisch resultierende Masse betrug 1632,9 Da. Die analytisch erfasste und die berechnete Masse stimmten unter Berücksichtigung der Messungengenauigkeit, welche bei  $\pm 0,02\%$  oder  $\pm 0,3$  82

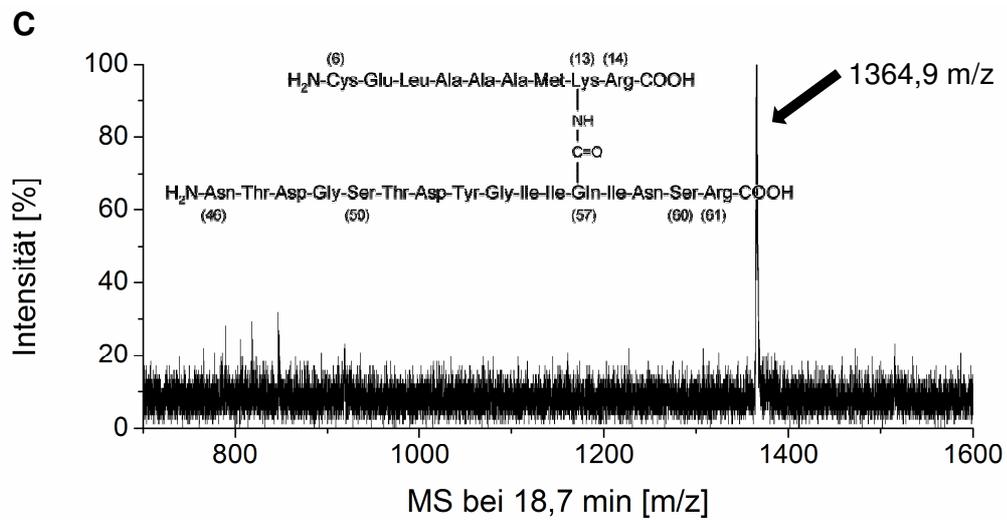
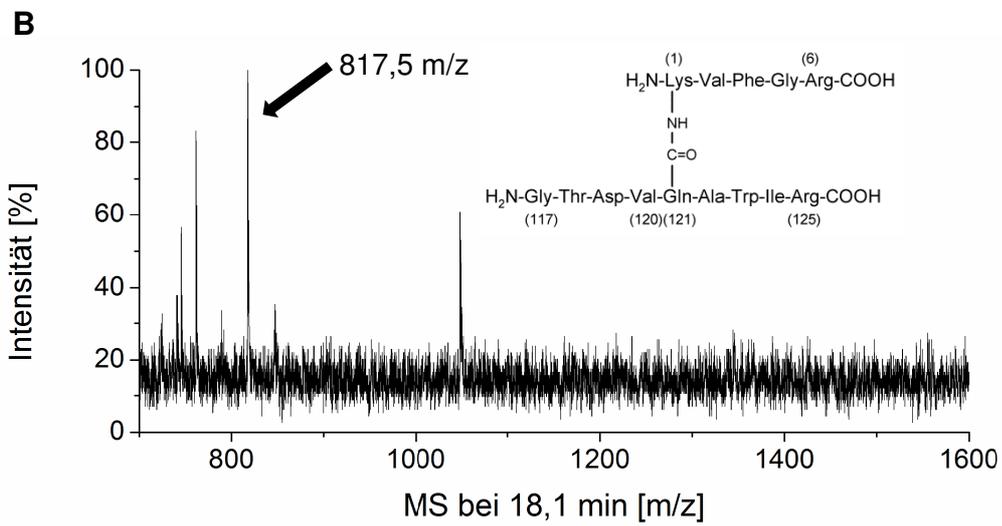
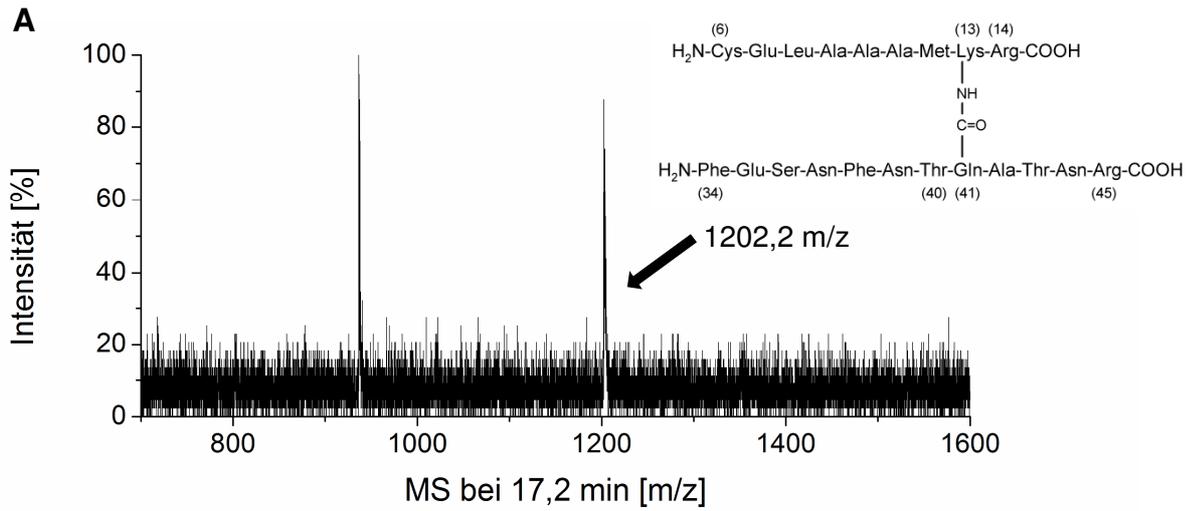
Da lag, sehr gut überein. Auf Basis dieser Ergebnisse konnte geschlussfolgert werden, dass mTGase unter Druck eine selektive Vernetzung über die N-terminale Seite oder den  $\epsilon$ -Terminus des Lysinrestes (Lys<sub>1</sub>) und die  $\gamma$ -terminale Seite des Glutamins an Position 121 (Gln<sub>121</sub>) des Lysozyms eingeht.

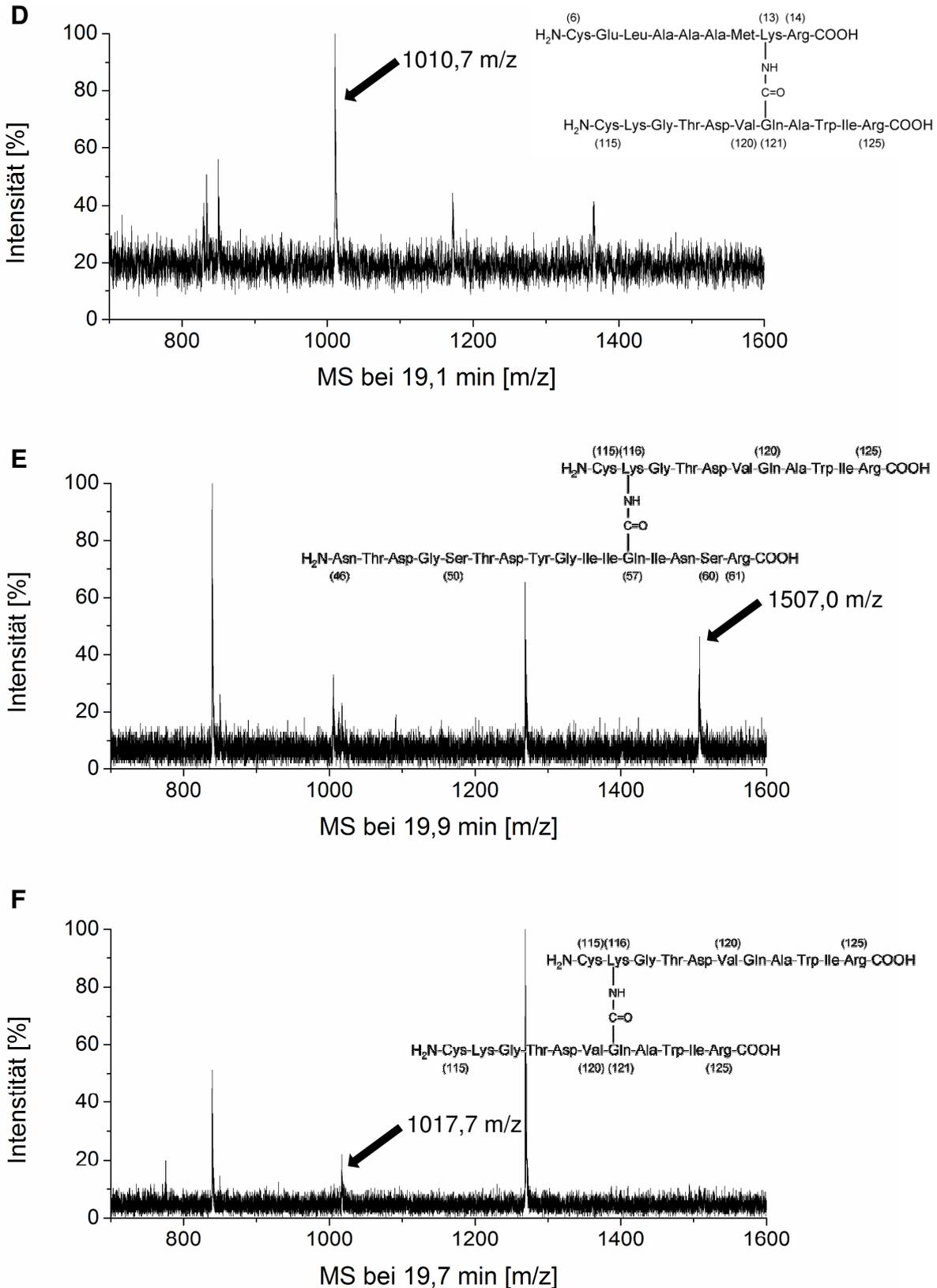
Nachfolgend wurden analoge RP-HPLC und ESI-TOF-MS-Untersuchungen höher vernetzter Proben (MMW und HMW) bezüglich potentieller, weiterer Isopeptide, welche eventuell aufgrund der geringen Vernetzungsraten zuvor nicht detektiert und identifiziert wurden, angefertigt. So konnten in der MMW-Probe vier weitere Peptidsegmente, die mit zuvor rechnerisch ermittelten Isopeptidmustern übereinstimmen, ermittelt werden (Tabelle 4-9).

**Tabelle 4-9:** Identifizierte Isopeptide in den Probenkategorien LMW, MMW und HMW

Probe (30 min, 600 MPa) [Vernetzungsgrad]	Zeit [min]	Abb. 4-13	Identifiziertes Isopeptid (tryptische Peptide)	Glu-Lys	m/z [M+2H] <sup>2+</sup>	Theor. Peptidmasse
2% HEWL, 40 U mTGase, bei 40°C	18,1	B	1-5 & 117-125	121-1	817,6	1633,0
- <b>LMW</b> [7 - 9%]						
3% HEWL, 50 U mTGase, bei 60°C	17,1	A	6-14 & 34-45	41-13	1202,3	2402,4
	18,1	B	1-5 & 117-125	121-1	817,6	1633,0
- <b>MMW</b> [52 - 54%]	18,6	C	6-14 & 46-61	57-13	1364,9	2727,2
	19,1	D	6-14 & 115-125	121-13	1010,7	2019,1
	19,9	E	115-125 & 46-61	57-116	1507,0	3011,9
3% HEWL, 160 U mTGase, bei 60°C	17,1	A	6-14 & 34-45	41-13	1202,3	2402,4
	18,1	B	1-5 & 117-125	121-1	817,6	1633,0
- <b>HWM</b> [79 - 82%]	18,7	C	6-14 & 46-61	57-13	1364,9	2727,2
	19,1	D	6-14 & 115-125	121-13	1010,7	2019,1
	19,7	F	115-125 & 115-125	121-116	1017,7	2034,0
	19,9	E	115-125 & 46-61	57-116	1507,0	3011,9

In der HMW-Probe konnte zudem ein sechstes Fragment nachgewiesen werden, allerdings in wesentlich geringerer Intensität. Neben den bereits genannten reaktiven Aminosäuren (Lys<sub>1</sub> und Gln<sub>121</sub>) waren somit sowohl die Lysinreste Lys<sub>13</sub> und Lys<sub>116</sub> als auch die Glutaminenden Gln<sub>41</sub> und Gln<sub>57</sub> an der Oligomerisierung beteiligt. In der Abbildung 4-12 wird dies mit den Massenspektren der Isopeptidsegmente und den Fragmentstrukturen aller sechs bei der Analyse identifizierten Sequenzen veranschaulicht.





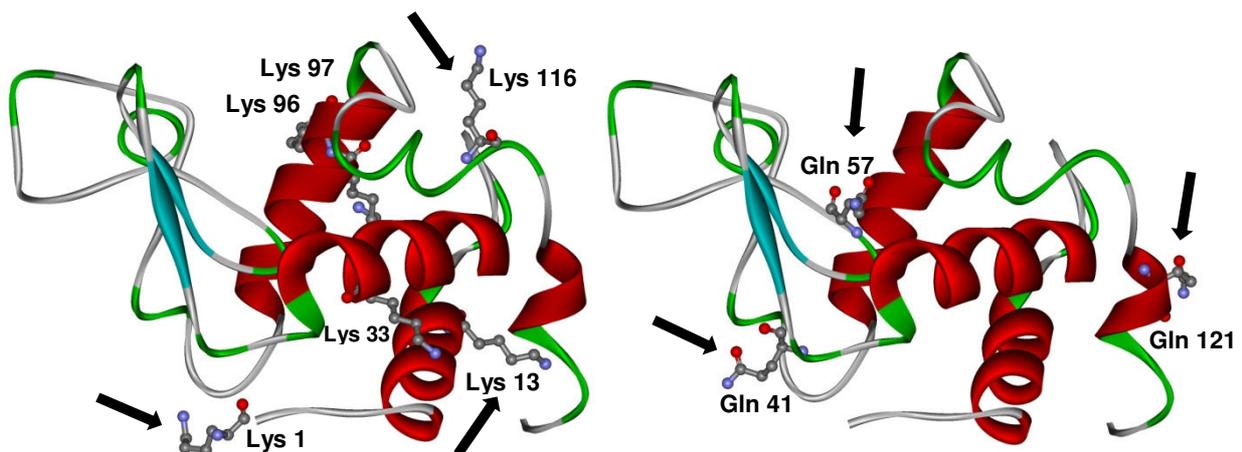
**Abbildung 4-12:** Massenspektren der sechs identifizierte Isopeptidsequenzen (A - F) nach tryptischem Verdau bei verschiedenen Retentionszeiten (vgl. Tabelle 4-9, mit mTGase für 30 min bei 600 MPa und 40 bzw. 60°C behandelt) und deren Isopeptidfragmente (Zahlen beziehen sich auf die Positionen der AS in der HEWL-Sequenz)

Wie zuvor in Abbildung 4-11 für die LMW-Probe dargestellt, konnte keines der in MMW- oder HMW-Proben detektierten Isopeptide im unbehandelten HEWL oder den bei 0,1 MPa inkubierten Proben identifiziert werden. Dabei wurden exakt gleiche Bedingungen gewählt um ein falschpositives Peptidfragment, das beispielsweise aus Artefakten der mTGase stammen könnte, auszuschließen.

Erste quantitative Abschätzungen wurden auf Basis der Signalintensitäten der Massenspektren vorgenommen (Abbildung 4-12). Demnach sind die Peptide A bis C (Tabelle 4-9) am häufigsten vertreten. Diese enthalten Lys<sub>1</sub> und Lys<sub>13</sub>, sowie je einen der drei Glutaminreste (Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub> und Gln<sub>125</sub>). Für eine belastbare Quantifizierung müsste mit entsprechenden Peptidfragmenten kalibriert werden. Diese lagen jedoch nicht als Standards vor.

Es scheint damit genügend Potential vorhanden, dass die resultierenden Isopeptide sowohl inter- als auch intramolekular gebildet werden und zu der beobachteten Oligomerisierung führen. Diese Erkenntnis bestätigen zudem die im vorangegangenen Kapitel 4.2.2 angefertigten CLAA<sub>min</sub>-Abschätzungen.

In Abbildung 4-13 ist zu sehen, dass unter den angewandten Bedingungen alle drei Glutaminreste (Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub> und Gln<sub>121</sub>) und drei der sechs Lysinreste (Lys<sub>1</sub>, Lys<sub>13</sub> und Lys<sub>116</sub>) für die mTGase bei 600 MPa zugänglich werden.



**Abbildung 4-13:** Lysin und Glutaminreste innerhalb der Tertiärstruktur des HEWL (pdb-File 1e8l); Lys<sub>1</sub>, Lys<sub>13</sub> und Lys<sub>116</sub> sowie Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub> und Gln<sub>121</sub> wurden identifiziert als für mTGase unter hohem hydrostatischem Druck zugängliche Stellen;  $\alpha$ -Helices sind in rot,  $\beta$ -Faltblätter in blau, Turns in grün, und ungeordnete Strukturen (Random coils) in hellgrau dargestellt (Discovery Studio Visualizer, v2.5, Accelrys Software Inc., San Diego, CA)

Interessanterweise konnte für die LMW-Probe nur ein Peptidfragment identifiziert werden. Unter schwach oligomerisierenden Bedingungen waren damit nur einer der drei Glutaminreste (Gln<sub>121</sub>) und einer der sechs Lysinenden (Lys<sub>1</sub>) für die mTGase zugänglich. Innerhalb der HEWL-Struktur sind vier Lysinreste (Lys<sub>13</sub>, Lys<sub>33</sub>, Lys<sub>96</sub>, und Lys<sub>97</sub>) in helikalen Regionen des Proteins angeordnet (Abbildung 4-13). *Murthy et al. (2009)* zeigten, dass Transglutaminase 2, ein Enzym vorkommend in vielen Zellen und in extrazellulärer Matrix, HEWL unter Normaldruck nicht modifiziert, gleichwohl ein Großteil der Seitenketten zum Lösungsmittel hin exponiert sind. Auch diskutierten sie die multidimensionale Bedeutung der Sequenzreihenfolge, der dreidimensionalen Struktur oder einer flexiblen und unstrukturierten Umgebung, welche oftmals

in N- oder C-terminalen Domänen gefunden werden. Es wurde spekuliert, dass die Position der Lysinseitenketten in stark flexiblen, durch Hochdruck aufgefalteten Regionen eine große Rolle für die Zugänglichkeit der Transglutaminase spielt. Lys<sub>1</sub> und Lys<sub>116</sub> befinden sich in ungeordneten Strukturen, wobei Lys<sub>1</sub> möglicherweise zu Beginn der partiellen Auffaltung unter Hochdruck exponiert wird. Lys<sub>116</sub>, welches sich neben einer Disulfidbrücken (Cys<sub>115</sub> und Cys<sub>30</sub>) befindet, ist vermutlich eher fixiert und daher weniger flexibel. Somit konnte Lys<sub>1</sub> als favorisierte Position für niedrig vernetzte HEWL-Proben identifiziert werden, da nur dieses in einem Isopeptid nachgewiesen werden konnte (Tabelle 4-9).

Bei Vergleich der drei Glutaminreste wird ersichtlich, dass Gln<sub>57</sub> in der Tertiärstruktur des Proteins begraben ist, wohingegen Gln<sub>41</sub> und Gln<sub>121</sub> an der Oberfläche des Proteins zu finden sind (Abbildung 4-13). Daher könnten sterische Effekte das innen liegenden Gln<sub>57</sub> für die mTGase-Vernetzung blockieren. Im Hinblick auf die Sequenz um die Glutaminenden (Tabelle 4-10) ist es interessant zu sehen, dass Gln<sub>41</sub> N-terminal Threonin (Thr<sub>40</sub>) und C-terminal Alanin (Ala<sub>42</sub>) aufweist, wohingegen Gln<sub>121</sub> in Nachbarschaft von Valin (Val<sub>120</sub>) und Alanin (Ala<sub>122</sub>) und Gln<sub>57</sub> von Leucin (Leu<sub>56</sub>) und Isoleucin (Ile<sub>58</sub>) umgeben ist. Über den Einfluss benachbarter Aminosäuren auf die Reaktivität der Glutaminenden gibt es bisher nur begrenzte Informationen. Studien von *Ohtsuka et al. (2000)* deuten darauf hin, dass hydrophobe Aminosäuren sowie Valin und Leucin auf der N-terminalen Seite die Zugänglichkeit zu den Glutaminresten für TG zu erhöhen scheinen. Dies könnte ein Aspekt für die Bevorzugung der Modifikation an Gln<sub>121</sub> verglichen mit Gln<sub>41</sub> sein. Weiterhin haben Studien von *Refaee et al. (2003)* gezeigt, dass helikale Regionen des HEWL rund um Gln<sub>121</sub> bei 200 MPa in flexible ungeordnete Strukturen übergehen. Obwohl die Experimente in dieser Arbeit bei deutlich höheren Drücken durchgeführt wurden, könnten diese Beobachtungen die Theorie der reversiblen druckinduzierten Entfaltung, welche zu erhöhter mTGase-Zugänglichkeit in ausgewählten Regionen des HEWL führt, unterstreichen.

**Tabelle 4-10:** Partielle Aminosäuresequenz der vier AS rund um Lysin- und Glutaminreste aus Lysozym

Reste	Aminosäuresequenz-Ausschnitt
Lys <sub>1</sub>	<b>K</b> V F G R
Lys <sub>13</sub>	A A A M <b>K</b> R H G L
Lys <sub>33</sub>	V C A A <b>K</b> F E S N
Lys <sub>96</sub>	V N C A <b>K</b> K I V S
Lys <sub>97</sub>	N C A K <b>K</b> I V S D
Lys <sub>116</sub>	R N R C <b>K</b> G T D V

Reste	Aminosäuresequenz-Ausschnitt
Gln <sub>41</sub>	N F N T <b>Q</b> A T N R
Gln <sub>57</sub>	Y G I L <b>Q</b> I N S R
Gln <sub>121</sub>	G T D V <b>Q</b> A W I R

Neben dem Isopeptid aus Lys<sub>1</sub> und Gln<sub>121</sub> konnten in den MMW- und HMW-Proben bis zu fünf weitere Peptidfragmente identifiziert werden, welche auf kovalente Isopeptide zurückzuführen

sind. Dabei geht der Lysinrest (Lys<sub>13</sub>), mit allen drei Glutaminenden (Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub> und Gln<sub>121</sub>) Verknüpfungen ein und ist somit an drei der sechs identifizierten Isopeptide beteiligt. Er ist in einer  $\alpha$ -Helix lokalisiert. Diese ist jedoch im Vergleich zu denen des restlichen Enzyms deutlich kürzer (Abbildung 4-13). Das dritte reaktive Lysinende befindet sich, wie bereits erwähnt, in einer Kehre (Lys<sub>116</sub>) neben einer der vier Disulfidbrücken und ging dennoch bei hoher Enzymzugabe und erhöhter Temperatur von 60°C mit zwei Glutaminresten (Gln<sub>57</sub> und Gln<sub>121</sub>) kovalente Bindungen ein.

Die Vernetzung unter Normaldruck scheinbar sterisch abgeschirmter Aminosäuren war auch für die Glutaminenden zu beobachten. Die sekundären und tertiären Gegebenheiten traten unter den gewählten Hochdruckinkubationen in den Hintergrund. Zudem spielte hier wahrscheinlich auch der für LMW-Proben bereits diskutierte, ausgeprägte hydrophobe Charakter der benachbarten Aminosäuren von Gln<sub>121</sub> und Gln<sub>57</sub> eine Rolle (*Ohtsuka et al., 2000*) (Tabelle 4-10). Es scheint folglich die hydrophile Umgebung von Gln<sub>41</sub> auf die mTGase-Reaktion hemmend zu wirken. So wurden drei Isopeptide mit Gln<sub>121</sub> (Aminosäuresequenzen: 1-5 mit 117-125, 6-14 mit 115-125 und 115-125 mit 115-125), zwei Verknüpfungen mit Gln<sub>57</sub> (6-14 mit 46-61 und 115-125 mit 46-61) und lediglich eine unter Beteiligung von Gln<sub>41</sub> (6-14 mit 34-45) gebildet.

Weiterhin konnte die mutmaßliche Korrelation zwischen schwacher pH-Abnahme der Pufferlösung unter HD und realisierter Vernetzung, wie in Kapitel 4.1.1 beobachtet, auf Basis der ermittelten Isopeptide nicht bestätigt werden, da neben Lys (positiv geladen) und Glu (hydrophil) auch überwiegend hydrophobe oder ungeladene Aminosäuren aufgrund ihrer Nähe zu den oligomerisierten AS blockiert wurden. Zudem wurde in Spuren Ammoniak frei, welcher aufgrund seiner Gleichgewichtsreaktion in Wasser (zu Ammonium- und Hydroxidion) zu einer geringfügigen pH-Wert-Erhöhung beitrug. Bei ansteigender Oligomerisierung wäre daher mit einer pH-Wert-Zunahme und nicht wie beobachtet mit einem minimalen Absinken des pH-Wertes zu rechnen. Die Kapazität des Puffers fängt diese geringen Schwankungen allerdings ab, so dass die beobachteten minimalen pH-Wert-Schwankungen nur Artefakte darstellten.

### 4.2.4 Strukturvorschlag

Basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Abschnitte (4.2.1 bis 4.2.3) kamen bei der Bildung eines Dimers bis zu sechs mögliche Isopeptidbindungen in Frage. Dabei ist es wahrscheinlich, dass vor allem bei den MMW- und HMW-Proben mehrere kovalente Verknüpfungen zwischen den beteiligten Proteinmolekülen oder intramolekulare Vernetzungen ausgebildet wurden.

Schlussfolgernd führt mTGase bei HEWL unter hohem hydrostatischen Druck und geringen mTGase-Konzentrationen (40 U mTGase/g Protein) sowie relativ niedrigeren Temperaturen (40°C) zu einer gerichteten Oligomerisierung. Bei höheren Proteinkonzentrationen (3%, w/v) in Kombination mit höheren Inkubationstemperaturen von 60°C können jedoch mehrere Isopeptidlinks ausgebildet werden, so dass von einer geordneten Oligomerisierung nicht mehr ausgegangen werden kann. Die Bildung stark strukturierter Oligomere ist aufgrund der Isopeptidvielfalt bei höheren Vernetzungsraten (MMW und HMW) statistisch betrachtet eher unwahrscheinlich. Es ist davon auszugehen, dass die Abschirmung ausgewählter

Proteinbereiche und die nach hochdruckinduzierter Auffaltung mit anschließender Isopeptidbildung resultierende, strukturelle Veränderung des Proteins sehr wahrscheinlich deutlich veränderte Funktionseigenschaften nach sich ziehen.

### 4.3 Isolierung und Konzentrierung enzymatisch vernetzter Lysozym-Oligomere

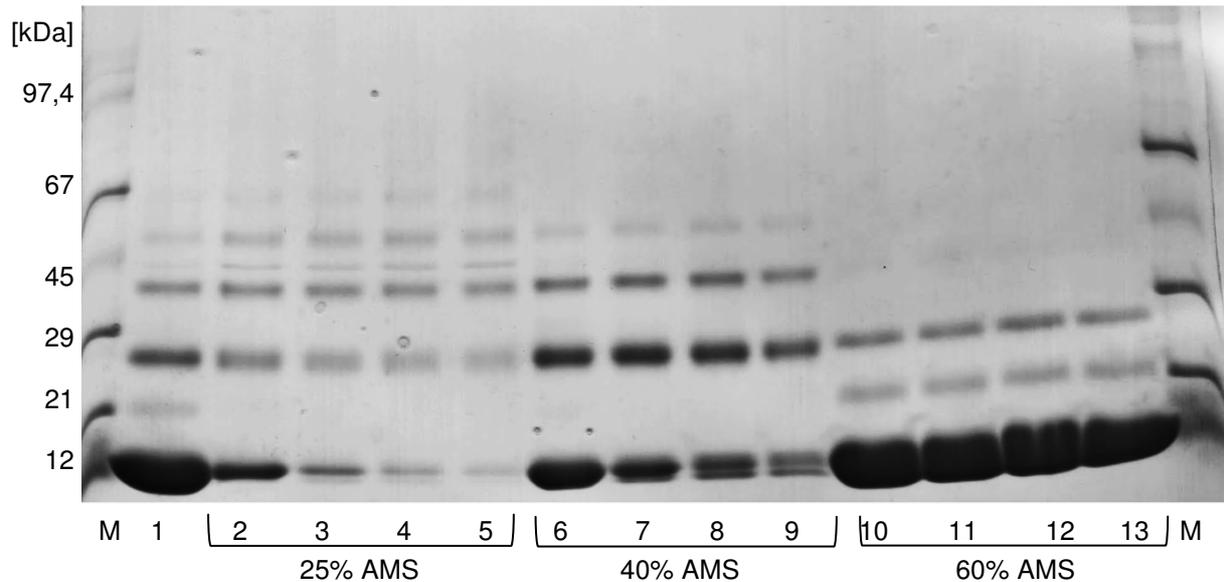
Die mithilfe der enzymatischen Vernetzung gewonnenen Oligomere sollten für nachfolgende strukturelle und funktionelle Untersuchungen konzentriert werden. Hierfür musste eine geeignete Isolierungsstrategie etabliert werden. Einer der ersten angewandten Schritte für diese Art der Proteinreinigung war dabei die Fällung mit Ammoniumsulfat (AMS).

#### 4.3.1 Ammoniumsulfatfällung

Unter der Annahme, dass die Oligomerisierung zu einer Veränderung der Oberflächenhydrophobität durch zusätzlich abgedeckte Proteinsequenzen des HEWL führt, wurde die Ammoniumsulfatfällung eingesetzt. *Englard und Seifert (1990)* beschrieben eine Methode zur fraktionierten Fällung von Proteingemischen mittels steigender Ammoniumsulfat-Konzentrationen (0 bis 100%). Da die Löslichkeit von Proteinen mit der Oberflächenhydrophobität indirekt korreliert, aggregierten bei niedrigen Konzentrationen zunächst die hydrophoberen Verbindungen (*Rosenberg, 1998*). Die Wahl der Temperatur fiel auf 4°C, da Versuche von *Ereth (2009)* bei Raumtemperatur keine zufriedenstellenden Separierungen der Oligomeren lieferten. In der Kälte dagegen wurden hydrophobe Wechselwirkungen geschwächt.

In Abbildung 4-14 ist neben dem Marker (Bahnen M) die elektrophoretische Trennung der erhaltenen Fraktionen aus dem in Lösung gebrachten Präzipitat (Bahnen 2 - 13) sowie die Ausgangsprobe (Bahn 1) dargestellt.

Die Monomerbande der Ausgangsprobe ist völlig überladen ( $8,5 \pm 1,5\%$  Oligomeranteil, bestimmt über vorausgegangene SDS-PAGE). Der auffällig hohe Monomeranteil verblieb jedoch bereits im ersten Fällungsschritt bei 25% AMS-Sättigung in Lösung und wurde deutlich reduziert (Abbildung 4-14, Bahn 2). Um eventuell mit gefälltete Moleküle auszuwaschen, wurden die Präzipitate drei Mal erneut gelöst und gefällt. Dies trug neben einer Abnahme des Dimers zu einer zusätzlichen Reduktion des Monomeranteils bei (Bahn 3, 4 und 5). Die salzinduzierte Schwächung der Hydrathülle ließ demnach vor allem höhere Oligomere präzipitieren (*Ereth, 2008*). Fällungen mit 40%igem Salzgehalt (Bahn 6 bis 9) zeigen ein vergleichbares Bild. Deutlich wird zudem, dass bei dieser Salzkonzentration die Dimere nicht mehr in Lösung gebracht wurden. Ein Aussalzen mit einem Ammoniumsalzgehalt von 60% führte dagegen zu keiner Zusammensetzungsveränderung mehr. Die Bahn 10 bis 13 zeigen überladene Monomergehalte mit Dimeren und Spuren an Trimeren. Auch wird eine zusätzliche Bande auf der Höhe von 22 kDa registriert, welche in der Ausgangsprobe, sowie bei den niedrigen Salzkonzentrationen nicht auftrat und keinem Oligomer zuzuordnen ist.



**Abbildung 4-14:** SDS-PAGE der resolubilisierten Präzipitate nach Fällung mit 25%iger (Bande 2 - 5), 40%iger (Bande 6 - 9) und 60%iger gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung (Bande 10 - 13), von enzymatisch vernetztem HEWL (Bande 1, LMW - 2% HEWL, 40 U mTGase/g Protein bei 40°C über 30 min und 600 MPa, Vernetzungsgrad:  $8,5 \pm 1,5\%$ ); M - Molmassenmarker (die Banden 3 - 5, 7 - 9, 11 - 13 stellen jeweils die Präzipitate nach wiederholter Fällung dar - Waschschrifte)

Aufgrund der in Abbildung 4-14 aufgezeigten Ergebnisse, wurde im Folgenden mit einer 40%igen AMS-Lösung gearbeitet. Die Abtrennung der im Präzipitat enthaltenen restlichen Salze sollte klassisch mittels Dialyse erfolgen, ungewöhnlich schwache Proteinbanden der lyophilisierten Proben in der Gelelektrophorese bei gleicher Einwaage wiesen dagegen auf Diskrepanzen hin. Daher wurde der Proteingehalt in der Ausgangsprobe und den gefällten Mischungen über die ASA nach Erfassung säurestabiler AS berechnet. Der Anteil HEWL-fremder Proteine (mTGase) am Gesamtproteingehalt ist sehr gering ( $< 2\%$ ) und kann durch die Wahl einer geeigneten AS (Isoleucin, Ile) zusätzlich verringert werden.

**Tabelle 4-11:** Protein- und Wassergehalt ausgewählter HEWL-Proben  $\pm$  Standardabweichung; enzymatische Oligomerisierung erfolgte mit 4% HEWL und 80 U mTGase/g Protein bei 60°C über 30 min und 600 MPa (Vernetzungsgrad:  $25 \pm 2\%$ ), die Ammoniumsulfatfällung mit 40%iger-Lösung

Probe	Proteingehalt (ASA über Ile)	Wassergehalt (Karl-Fischer-Titration)
HEWL, unbehandelt	$83,4 \pm 2,6 \%$	$6,40 \pm 0,26 \%$
HEWL, dialysiert, gefriergetrocknet	$88,5 \pm 3,8 \%$	$7,46 \pm 0,27 \%$
HEWL vernetzt, dialysiert, gefriergetrocknet	$82,8 \pm 3,9 \%$	$8,58 \pm 1,80 \%$
HEWL vernetzt, Ammoniumsulfat-gefällt, einfach dialysiert, gefriergetrocknet	$59,4 \pm 1,0 \%$	7,8%*
HEWL vernetzt, Ammoniumsulfat-gefällt, zweifach dialysiert, gefriergetrocknet	$62,3 \pm 3,0 \%$	- **

\* Einfachbestimmung; \*\* keine Bestimmung aufgrund unzureichendem Probenmaterial

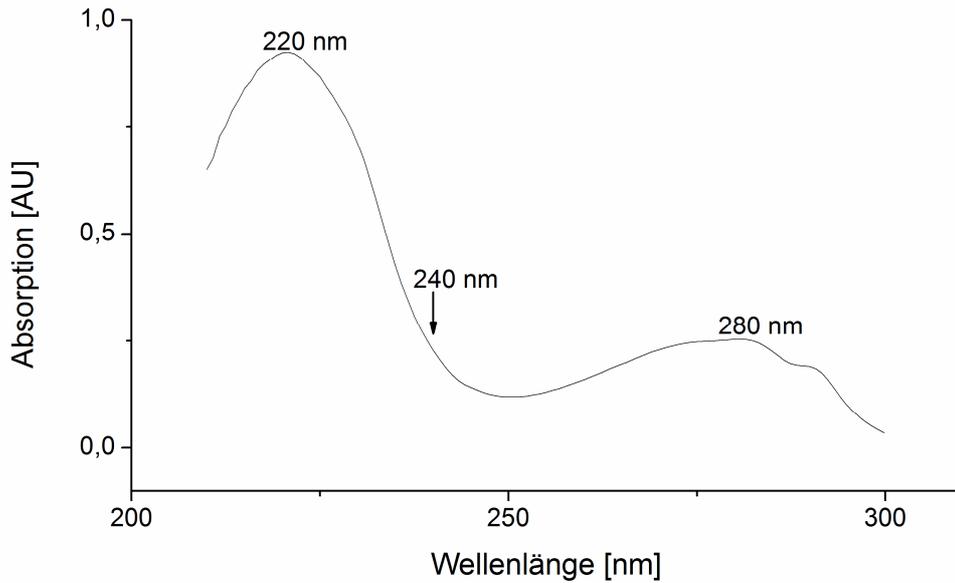
Neben Spuren an mTGase sollten in den dialysierten und gefriergetrockneten Proben nur HEWL-haltige Mono- und Oligomere mit einer Masse größer 12 kDa und etwas Restwasser enthalten sein. Die Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte mittels Karl-Fischer-Titration. Die Daten der Proteingehalte als auch der Wasserbestimmung sind in Tabelle 4-11 dargestellt und basieren auf der Arbeit von *Kieβling (2011)*. Die ermittelten Werte des unbehandelten und dialysierten sowie lyophilisierten HEWL unterscheiden sich in ihren Protein- und Wassergehalten nur geringfügig. Der etwas höhere Proteingehalt des dialysierten HEWL (88,5%) deutet auf eine Reinigung des unbehandelten HEWL (83,4%) von beigemengten Stabilisierungszusätzen hin. Die geringfügig erhöhte Feuchte war auf die sehr kleinen Chargen von wenigen hundert Milligramm zurückzuführen, da im Vergleich zur 25 g HEWL-Vorratsflasche das Verhältnis Luftvolumen zu Protein größer war. Ein nicht signifikant erhöhter Wassergehalt für vernetzte HEWL-Proben ist zu beobachten (8,6 statt 7,5%). Der Feuchtegehalt der AMS-gefällten Proben ist mit 7,8% vergleichbar. Die Analyseergebnisse der Tabelle 4-11 bestätigen, dass nach AMS-Fällung das Salz teilweise in der Probe verblieb. Der Proteingehalt blieb mit  $59,4 \pm 1,0\%$  deutlich hinter den Werten des nicht gefällten HEWL zurück. Selbst die wiederholte Dialyse mit Zwischentrocknen erhöhte den Anteil an HEWL nur marginal auf 62,3%. Orientierend am Einzelmesswert der gefällten Probe nach Salzfällung (7,8%) war die Feuchtigkeit des zweifach dialysierten HEWL mutmaßlich nicht wesentlich verschieden von den anderen Proben.

Somit stellte das fraktionierte Aussalzen der Oligomere eine praktikable Methode dar, um Monomere und niedere Oligomere des HEWL gut abzutrennen. Die weitere Verwendung der Proben gestaltete sich jedoch schwierig, da der Gehalt an Protein in den Proben bestimmt werden musste und der Einfluss des verbleibenden Salzes auf ausstehende Versuche nicht abgeschätzt werden konnte.

### 4.3.2 Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie

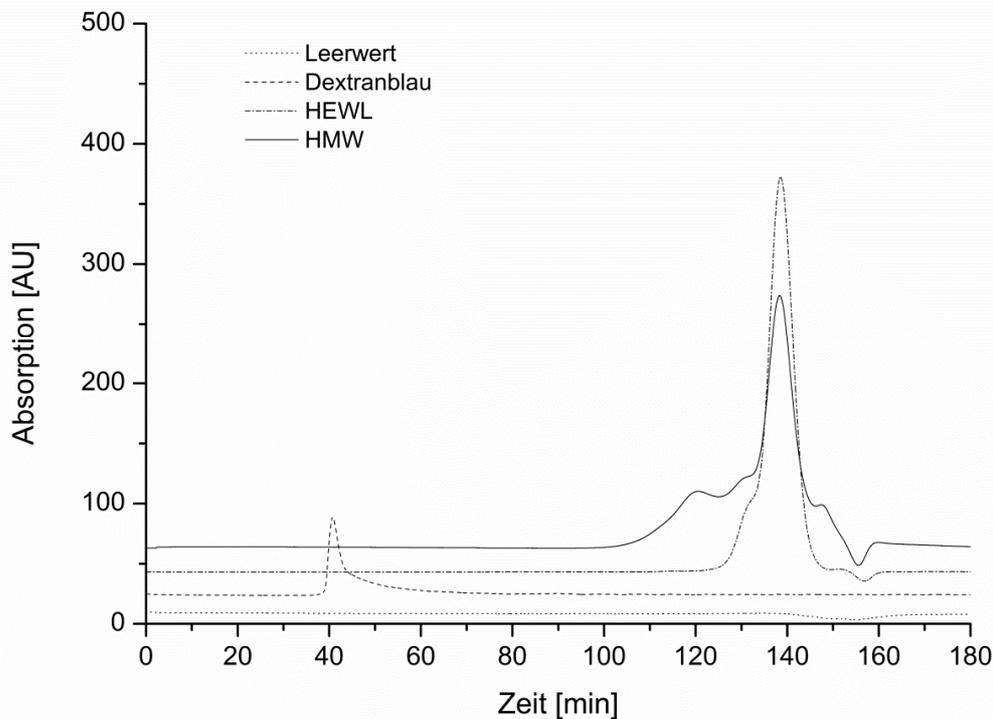
Um den Einfluss der De- und Renaturierung beim Aussalzen zu umgehen wurde eine weitere Fraktionierungsmethode untersucht. Die chromatographische Auftrennung mittels Gelpermeation (GPC) und UV-spektrometrischer Detektion wurde an nativem HEWL und enzymatisch stark vernetzten Proben (HMW) untersucht. Die Wahl der Messwellenlänge fiel dabei auf 240 nm (Abbildung 4-15).

Das Spektrum einer 0,5%igen HEWL-Lösung zeigt die für Proteine typischen zwei Absorptionsmaxima bei 220 nm für die Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren und bei 280 nm für enthaltene aromatische Aminosäuren. Dabei wurde bewusst bei einer Wellenlänge neben dem UV-Maxima von 220 nm gemessen, da für eine quantitative Separation die aufgebrauchte Probemenge sehr hoch gewählt und gleichzeitig der Detektor nicht überlastet wurde.



**Abbildung 4-15:** UV-Spektrum einer 0,5%igen unbehandelten HEWL-Probe, gelöst in 50 mM Tris-HCl-Puffer (Referenzmessung gegen den Puffer ist zugrunde gelegt)

In Abbildung 4-16 sind neben dem Chromatogramm der unbehandelten Probe (HEWL), die stark vernetzte Probe (HMW) sowie Dextranblau (2000 kDa, Totvolumen) und der Pufferleerwert zu sehen.

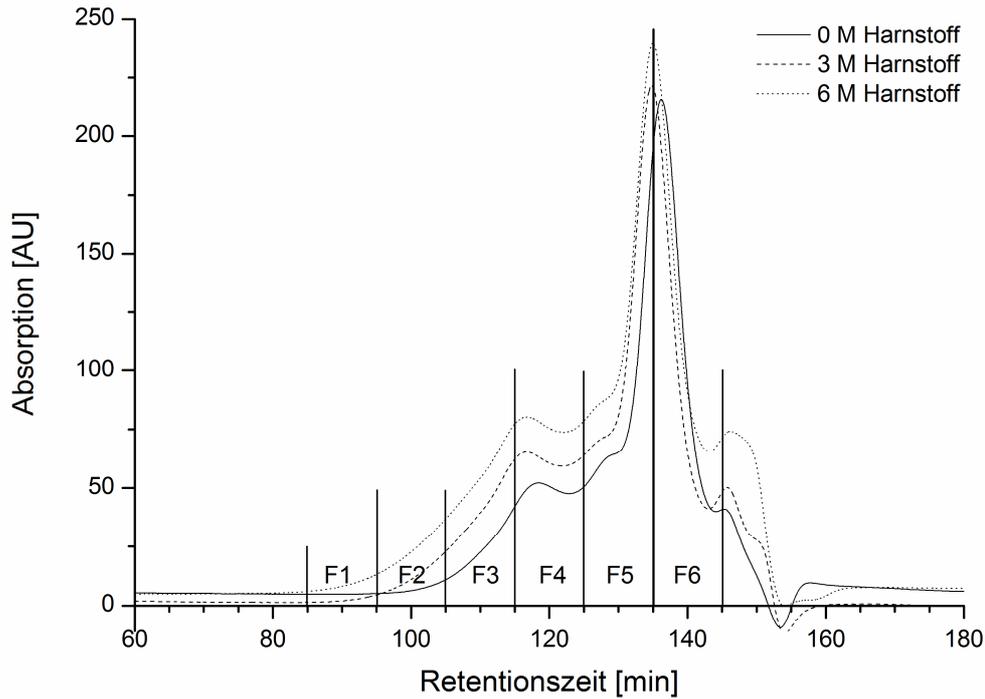


**Abbildung 4-16:** Gelpermeationschromatographie (GPC) bei 240 nm, Chromatogramm vom Leerwert - nur Tris-HCl-Puffer, Dextranblau-Totvolumen (2000 kDa), unbehandeltes HEWL (1%, w/v) und HMW (0,8%, w/v, Vernetzungsrate:  $74,3 \pm 13,5\%$  aus 3% HEWL mit 160 U mTGase/g Protein bei 60°C über 30 min und 600 MPa)

Für die unbehandelte Ausgangsprobe (HEWL, 14,3 kDa) ist eine Schulter bei 131 min erkennbar, die auf einen Anteil an Dimer (theoretische molare Masse von 28,6 kDa) rückschließen lässt. Ursache war der lagerungsbedingte Thiol-Disulfidaustausch zwischen den acht Cysteinen, welcher zu einer geringen Vernetzung der Ausgangsprobe führte, da die Proben für die GPC-Auftrennung nicht reduziert wurden. Ein Abgleich des unbehandelten HEWL in der Elektrophorese zeigte jedoch, dass die schwache Dimerbande der nicht reduzierten Probe bei Zugabe von Dithiothreitol (DTT) und Jodacetamid (Reduktionsbedingungen) nicht mehr nachweisbar war. Dies unterstützt die vorangegangene Theorie. Für die HMW-Probe ist zunächst ein schwacher Anstieg mit einem Maximum bei ca. 115 min (Abbildung 4-17) zu verzeichnen. Die Schulter ( $t_R = 128$  min) vor dem Monomerpeak bei 135 min ist deutlich ausgeprägter als im Lauf mit dem unbehandelten Lysozym und konnte bereits dem Dimer zugeordnet werden. Für die HMW-Proben kann somit davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem ersten Peak um das Trimer und/oder weitere höhere Oligomere handelt. Eine Auftrennung in einzelne Peaks konnte nicht erreicht werden.

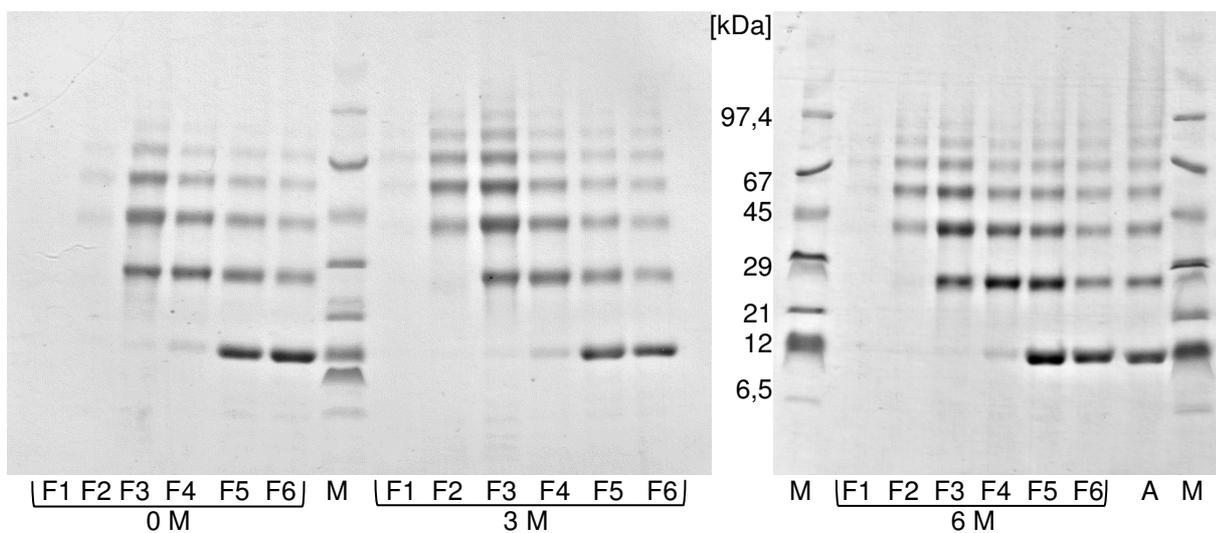
Eine Separation der Oligomere in unterschiedlich stark vernetzte Gruppen und die Trennung vom Monomer des Lysozyms wurde mit der nachfolgenden Fraktionierung angestrebt. Es wurden Ausgangsproben mit einem sehr hohen Vernetzungsgrad (HMW) eingesetzt, da hier die Anteile der höher vernetzten Moleküle in größeren Mengen vorlagen. Für die Proben ergab sich dabei das Problem, dass diese nach Lyophilisation schwer, bzw. nicht mehr vollständig resolubilisiert werden konnten. Insbesondere die stark vernetzte Probe (HMW, Vernetzungsgrad:  $74,3 \pm 13,5\%$ ) löste sich nicht vollständig in der für eine semipräparative Trennung notwendigen Konzentration von 8 mg/ml im Tris-HCl-Puffer. Da sich unbehandeltes HEWL hervorragend löste, blieben vermutlich vor allem hoch vernetzte Oligomere und/oder Polymere im Niederschlag zurück und gelangten so nicht auf die Säule. Die Löslichkeit wurde nach der Methode von *Kießling (2011)* erhöht indem dem Puffer Harnstoff (0, 3 und 6 M) zugesetzt wurde, welcher als chaotropes Reagenz hydrophobe Interaktionen beeinflusst und Wasserstoffbrücken aufbricht. Schon optisch war eine deutlich bessere Löslichkeit im harnstoffhaltigen Puffer zu verzeichnen, wobei die Probe in der am stärksten konzentrierten Harnstofflösung (6 M) annähernd klar war, so dass von einer nahezu vollständigen Aufbringung der Probe auf die GPC-Säule ausgegangen werden konnte.

Abbildung 4-17 gibt die GPC-Chromatogramme der stark vernetzten Probe (HMW) nach Lösen in Tris-HCl-Puffer ohne sowie mit 3 und 6 M Harnstoff wieder. Die einzelnen Chromatogramme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Intensität der mutmaßlichen Oligomerbanden sowie im zeitlichen Beginn des Signalanstieges. Die Monomerbanden hingegen erscheinen unverändert, was belegt, dass das Monomer bereits in harnstofffreier Lösung gut löslich ist, während sich der Anteil an Oligomeren steigern lässt. Zudem ist noch ein Peak nach 144 min zu sehen. Dieser ist auf Puffersalze und den ansteigenden Harnstoffgehalt zurückzuführen.



**Abbildung 4-17:** Gelpermeationschromatographie (GPC) Chromatogramm einer HMW-Probe (Vernetzungsrate:  $74,3 \pm 13,5\%$  aus 3% HEWL mit 160 U mTGase/g Protein bei 60 °C über 30 min und 600 MPa), 20 mg Probe in 2,5 ml Tris-HCl-Puffer ohne bzw. mit 3 M oder 6 M Harnstoff, F1 bis F6 geben die gesammelten Fraktionen (F) an

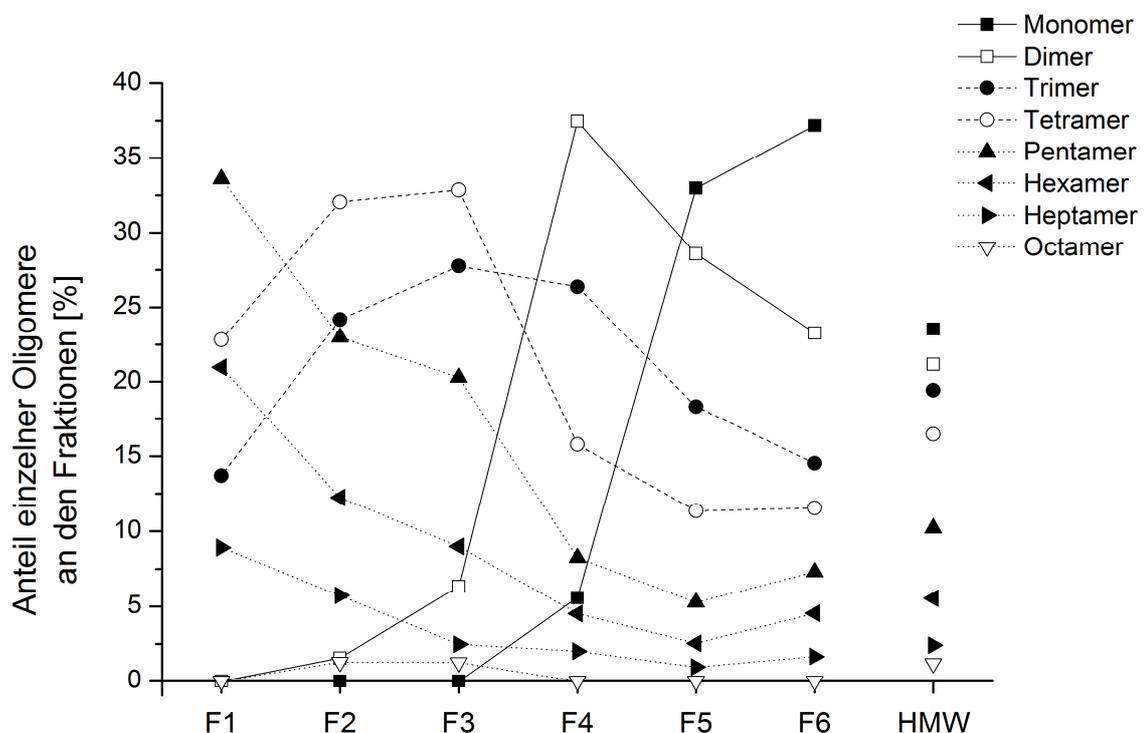
Für die Proben mit variierenden Harnstoffkonzentrationen wurden von der 85. Minute an in je 10 Minuten-Intervallen sechs Fraktionen (F) bis Minute 145 gesammelt. Nach Dialyse und Lyophilisation der Fraktionen wurden diese elektrophoretisch mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 4-18) und anschließend densitometrisch ausgewertet (Abbildung 4-19).



**Abbildung 4-18:** SDS-Page der GPC-Fraktionen F1 - F6 nach Lösen der HMW-Probe (Vernetzungsrate:  $74,3 \pm 13,5\%$ ) in Tris-HCl-Puffer mit 0, 3 oder 6 M Harnstoff; M - Marker; A - Ausgangsprobe (Auftragsvolumen: je 10  $\mu$ l, reduziert)

Es ist zu sehen, dass beim Suspendieren der HMW-Probe (Ausgangsprobe, Abbildung 4-18, Bahn A) in Tris-HCl-Puffer ohne Harnstoff höher vernetzte Oligomere (Hexamer und größer) nach Filtration (0,45 µm) und GPC-Trennung nicht mehr wiederzufinden sind (Bahnen F1 bis F6 bei 0 M Harnstoff). Es ist maximal das Pentamer sicher zu identifizieren. Bei Zugabe von Harnstoff hingegen sind alle Oligomere, die in der Ausgangsprobe (Bahn A) zu erkennen waren, weiterhin nachweisbar. Die Intensität der ‚Proteinschlieren‘ (höhere Oligomere und Polymere) ist unabhängig vom Harnstoffgehalt niedrig. Dies erklärt die immer später einsetzende Elution in den Proben mit wenig (3 M) bzw. ohne Harnstoff (Abbildung 4-18). Während in der ersten Fraktion (F1) der harnstofffreien Probe kein Protein nachgewiesen werden konnte, sind in F1 der 6-M-Probe bereits Spuren von Tetra- bis Oktameren erkennbar. In der zweiten Fraktion (F2) der 3-M- und 6-M-Probe sind zum Teil deutliche Mengen hoch vernetzten HEWL erkennbar. Demgegenüber sind in der harnstofffreien zweiten Fraktion (F2) erst geringste Gehalte mit beginnender Elution detektierbar. Die Zugabe von Harnstoff zum Puffer erweist sich somit nachweislich als eine effiziente Methode zur Lösungsverbesserung höher vernetzter Oligomere. Allerdings war die Ausbeute in den Fraktionen unter Anbetracht der absoluten Aufgabemenge von 20 mg, insbesondere in den ersten (F1 und F2) mit weniger als 1 mg sehr gering.

Die Darstellung in Abbildung 4-19 gibt einen Überblick über den prozentualen Anteil einzelner Oligomere nach GPC-Trennung der 6 M Harnstoff-HMW-Probe. In den Fraktionen F5 und F6 wird dabei das Monomer im Vergleich zur Ausgangsprobe stärker angereichert, da es aufgrund seiner relativ geringen Größe in die Poren des Trenngel wandert und so einen längeren Weg zurücklegen muss.



**Abbildung 4-19:** Einzelne Oligomerenanteile in den GPC-Fraktionen (F1 - F6) in der HMW-Probe (Vernetzungsrate:  $74,3 \pm 13,5\%$ ), welche zuvor in Tris-HCl-Puffer mit 6 M Harnstoff gelöst wurde (densitometrisch ausgewertet)

Zudem zeigt der Blick auf die Anteile der einzelnen Oligomere in Abbildung 4-19, dass die vollständige Abtrennung von Monomer und teilweise Dimer in Fraktion zwei und eins (F2 und F1) realisierbar ist, welches mit einer Zunahme der höher vernetzten Oligomere in den späten Fraktionen einhergeht. Jedoch können die Hexa- bis Oktamere, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität, in allen Fraktionen nachgewiesen werden.

Die Ursache hierfür können starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Molekülen variierender Größe sein, welche die Elution diskret vernetzter HEWL-Oligomere verzögern. Möglicherweise interagieren die Oligomere und zwar alle ab Dimer, derart miteinander, dass sie wie ineinander ‚verhakt‘ eluieren. Eine Ausbildung mehrerer ungeordneter Isopeptidbindungen spräche für diese Theorie. Die kovalenten Bindungen wurden in Abschnitt 4.2.3 bereits bestätigt und diskutiert (Ergebnisse der ESI-TOF-MS-Messungen). Die Abtrennung des Monomers erfolgt noch relativ gut (Abbildung 4-17). Mit zunehmendem Vernetzungsgrad aber ist eine harnstoffunabhängige verschlechterte Separation festzustellen. Im Gegensatz zur Elektrophorese, wo aufgrund der unterschiedlichen Ladungen nach Reduktion eine Trennung der Oligomere entsprechend ihrer Mobilität im elektrischen Feld möglich ist, beruht die GPC auf der Trennung nach scheinbarem Molekülradius. Die basisliniengetrennte Separation, deren Ziel es war, möglichst renaturierbare Fraktionen zu gewinnen, ist daher mit der gewählten Methode nicht möglich.

Zusammenfassend ist zu vermerken, dass auch mit der GPC keine selektive Isolierung, definierter Oligomere möglich war, da stets ein Gemisch eluierte. Eine Abtrennung von Monomer und Dimer war jedoch realisierbar und das ohne verbleibende Salzreste wie es bei der AMS-Fällung der Fall war. Weiterhin konnte die stark quervernetzte Probe (HMW) durch Zugabe von Harnstoff in Lösung gebracht und damit eine nahezu vollständige Auftragung und Elution aller Oligomere auf bzw. von der GPC-Säule gewährleistet werden. Aufgrund der geringen Ausbeuten wurden zur weiteren Charakterisierung neben den einzelnen Fraktionen F6 bis F3, die monomerfreien Fraktionen F2 und F1 vereint. Die Methode war daher zur hier angestrebten Fraktionierung nur bedingt geeignet.

### **4.4 Funktionelle Charakterisierung der LMW-, MMW- und HMW-Proben des HEWL**

Durch mTGase und Hochdruck modifizierte HEWL-Proben wurden hinsichtlich ihrer Funktionalität auf Ebene der enzymatischen Wirkung und der Oberflächeneigenschaften untersucht. Die strukturellen Veränderungen wurden mittels Zirkulardichroismus zur Klärung der Sekundärstruktur sowie dem Assoziationsverhalten unter ausgewählten Bedingungen analysiert.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde unterschiedlich behandeltes HEWL unter Variation von Druck, Temperatur, Protein- und Enzymkonzentration, welche in den Kapiteln 4.1.2 bis 4.1.6 bereits beschrieben wurden, ohne Konzentrierung direkt untersucht, um eine möglichst große Bandbreite an variierenden Vernetzungsgraden der Proben abzubilden. Der Oligomeranteil

diente hierbei als Richtgröße für eine Einteilung in die drei Gruppen: LMW, MMW oder HMW (siehe Tabelle 4-5). Neben diesem unmittelbar nach der enzymatischen Vernetzung verfügbaren Untersuchungsmaterial wurden konzentrierte Fraktionen der Oligomere aus dem Kapitel 4.3.2 eingesetzt.

#### 4.4.1 Vergleichende Untersuchungen der verbleibenden Enzymaktivität

Die enzymatische Aktivität der Lysozymproben wurde mithilfe zweier Tests ermittelt. Dabei stand der klassische Trübungsassay dem ML-Blue-Test gegenüber, wobei beide Testsysteme auf der Lyse isolierter Zellwände des *Micrococcus lysodeikticus* (*ML*) basieren. Der seit den 50er Jahren eingesetzte Trübungsassay (*Shugar, 1952*) beruht auf der UV-spektrometrisch ermittelten Abnahme der Trübung einer Zellwandsuspension. Bei dem ML-Blue-Test wird die Freisetzung des Farbstoffes Remazol Brilliant Blue-R, aus diesen kommerziell verfügbaren Zellwänden (*ML*), welche zuvor angefärbt wurden, erfasst (*Ito et al., 1992*).

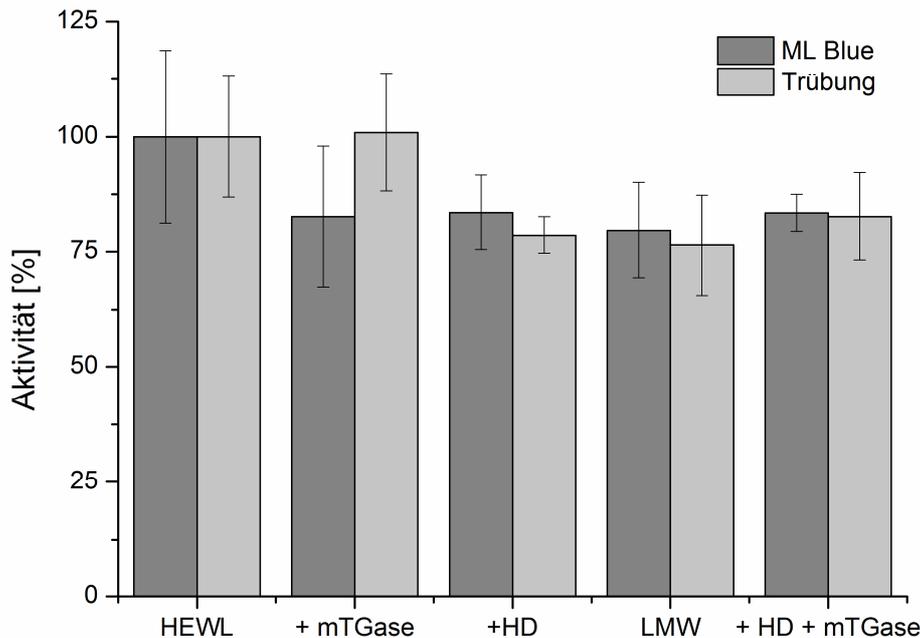
Basierend auf der Unit-Definition des Herstellers entspricht in einer Suspension von *ML* bei 25°C, pH 6,24, einem Reaktionsvolumen von 2,6 ml und einer Messwellenlänge von 450 nm, eine Aktivität von 1 U/min der Absorptionsänderung von 0,001/min ( $\Delta A_{450}$ ). Unter den gegebenen Testbedingungen sind die gemessenen Aktivitäten in Tabelle 4-12 zusammengestellt. Die ermittelte Aktivität des unbehandelten Lysozyms (HEWL) lag chargenunabhängig über einen Zeitraum von drei Jahren bei zirka 36.500 U/mg und damit um den Faktor 2 niedriger, als die vom Hersteller deklarierten ~70.000 Units/mg. Auffallend sind die hohen Standardabweichungen, welche mitunter über 10% betragen und auf eine empfindliche Methode mit einflussreichen Störfaktoren hinweisen. Größtes Problem stellt die zu untersuchende Zellsuspension dar, da die Zellwände bereits nach kurzer Zeit sedimentierten und so keine homogene Verteilung der Trubstoffe gewährleistete war.

**Tabelle 4-12:** Mittels Trübungstest nach *Shugar (1952)* ermittelte Enzymaktivität, Proben stammten aus Untersuchungen mit 2%igen HEWL-Lösungen, inkubiert mit 40 U mTGase/g Protein, 30 min bei 40°C, zum Teil HD über 600 MPa

Probe	Aktivität [Unit/mg]
HEWL, unbehandelt (Sigma)	36584 ± 4794
HEWL + mTGase	36944 ± 4667
HEWL + HD	28779 ± 1478
HEWL + mTGase + HD (LMW)	27959 ± 3981
HEWL + HD, dann mTGase	30249 ± 3472

Daher wurde eine zweite Methode gesucht, bei welcher die Lyse der Zellwände abgestoppt werden kann und die Messung weniger fehlerbehaftet ist. Mithilfe des ML-Blue-Tests wurde kein kinetischer Verlauf aufgenommen, sondern der freigesetzte Farbstoff zu einem festen Zeitpunkt vermessen. Bei einem Vergleich der Proben bzw. der Methoden untereinander wurde die Aktivität des unbehandelten HEWL als Standard festgelegt und auf 100% normiert. In

Abbildung 4-20 sind die Ergebnisse der beiden Methoden anhand der vier Ausgangsproben des HEWL (mit mTGase, HD, simultaner Inkubation (LMW) und mTGase nach HD) abgebildet. Zu sehen ist, dass mithilfe beider Methoden vergleichbare Ergebnisse erzielt werden und dass die Schwankung der Werte beim ML-Blue-Test nur geringfügig kleiner als beim Trübungsassay ist. Die Ursache dafür kann mit der hohen Reaktivität des Lysozyms begründet werden, welches in sehr geringen Mengen eingesetzt wurde, wodurch sich Wägeungenauigkeiten und Verdünnungsfehler verstärkt auswirkten. Davon unabhängig wurde bei beiden Methoden mit dem Zellwandmaterial des *Micrococcus lysodeikticus* gearbeitet. Dieser natürlich gewonnene Rohstoff verursachte bereits geringe Schwankungen innerhalb der UV-Messungen.

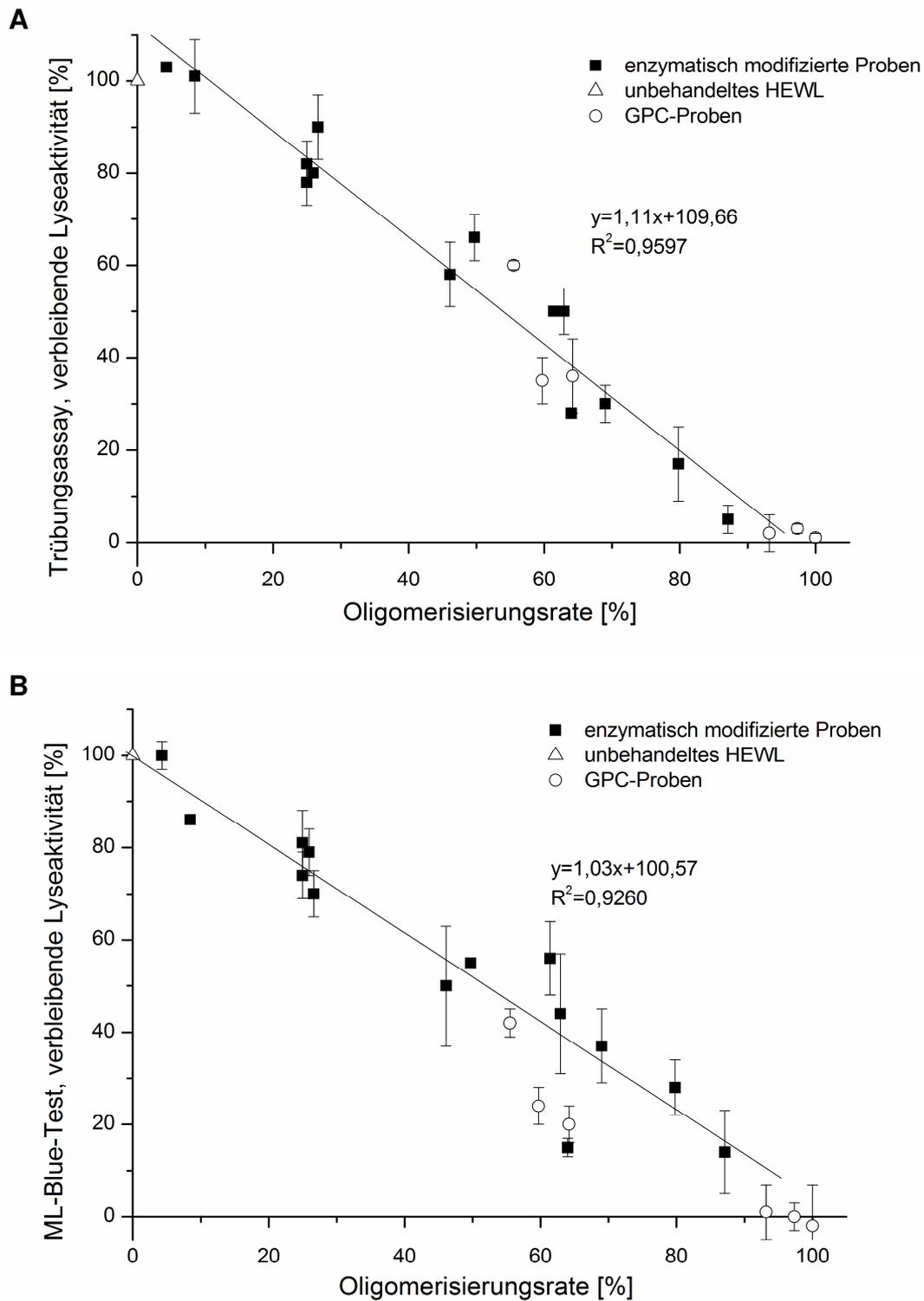


**Abbildung 4-20:** Vergleich von ML-Blue und Trübungsassay zur Bestimmung der Lyseaktivität

HEWL - Kontrolle (unbehandelt); HEWL + mTGase - mit mTGase über 30 min, 40°C und 0,1 MPa; HEWL + HD - 30 min, 40°C bei 600 MPa; LMW - 30 min, 40°C und 600 MPa; HEWL + HD + mTGase - 30 min, 40°C bei 600 MPa, anschließende Inkubation mit mTGase über 30 min, 40°C und 0,1 MPa

Im Vergleich zum unbehandelten Lysozym sinken die Aktivitäten nach enzymatischer Behandlung unter Atmosphärendruck oder alleiniger Hochdruckinkubation auf etwa 80% des Ausgangswerts. Auch die Aktivität der unter Hochdruck zu 8,5% enzymatisch vernetzten Probe unterscheidet sich nicht von den anderen. Es kann geschlussfolgert werden, dass der geringe Oligomerenanteil keinen signifikanten Einfluss auf die verbleibende Aktivität des HEWL besitzt. Der im Vergleich zur Ausgangsprobe für alle Proben resultierende Aktivitätsverlust ist vermutlich auf den Schritt zur Inaktivierung der mTGase zurückzuführen. Dieser findet über 5 min bei 85°C statt und führt bei HEWL zu einer schwachen und unvollständigen Denaturierung.

Nachfolgend sind Proben mit zunehmendem Vernetzungsgrad von 0 - 100% (LMW, MMW und HMW) untersucht worden. Die Oligomerisierung ist in Abbildung 4-21 A der Enzymaktivität des Trübungsassays und in Abbildung 4-21 B dem ML-Blue-Test gegenübergestellt.



**Abbildung 4-21:** A - Trübungssassay; B - ML Blue Aktivitätstest; ○ : vernetzte und über GPC fraktionierte Proben, ■ : vernetzte Proben (nicht GPC-gereinigt), schwarze Trendlinie der enzymatisch modifizierten Proben (ohne GPC-Proben), △ : unbehandeltes HEWL (Ausgangssprobe)

Zu sehen ist, dass der bei niedrigen Oligomerisierungsraten noch beobachtete Effekt der Hitzedenaturierung des HEWL verschwindet und für beide Methoden ein indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen der Aktivität und einer steigenden Vernetzungsrate besteht. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für eine lineare Korrelation ist für beide Methoden mit jeweils über 0,9

sehr gut. Unter Einbeziehung der mittels GPC konzentrierten Proben (offene Kreise, Abbildung 4-21A/B) kann dieses Maß noch verbessert werden. Die zum Teil monomerfreien Proben (GPC-Fraktionen) fügen sich in das Bild ein und ergänzen den Befund entscheidend. Somit kann unabhängig von der Zusammensetzung der Oligomere ein Rückgang der Aktivität direkt mit der Abnahme des Monomers in Beziehung gebracht werden. Die Oligomere besitzen demnach keine hydrolytische Wirkung auf die Zellwände des grampositiven Mikroorganismus *ML*. Damit übereinstimmend beschrieben *Cegielska-Radziejewska et al. (2010)* thermo-chemisch mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) vernetztes HEWL, dessen Aktivität gegenüber *ML* mit zunehmendem Vernetzungsgrad sinkt. Dagegen wurde die antimikrobielle Aktivität gegen gramnegative Bakterien durch einen hohen Dimergehalt (34,0 - 37,6%) gesteigert (*Cegielska-Radziejewska et al., 2009*).

Wahrscheinlich wurde die Umgebung des aktiven Zentrums der einzelnen HEWL-Moleküle durch die Ausbildung der Isopeptide nach hochdruckinduzierter Auffaltung an einer vollständigen Rückfaltung und damit einer Regenerierung gehindert. Die an der Reaktion mit der mTGase beteiligten Aminosäuren stehen unter Normaldruck nicht als Substrat zur Verfügung, so dass davon auszugehen ist, dass sie sich nicht ausreichend freiliegend an der Proteinoberfläche befinden. Durch die Oligomerisierung könnten diese nicht mehr ihre ursprüngliche Position in der Sekundär- oder Tertiärstruktur einnehmen und so zugänglich werden (Kapitel 4.4.3).

Möglich ist ferner, dass das Reaktionszentrum durch die kovalent verknüpften Proteinmoleküle abgeschirmt wird. Die Untersuchung der Oberflächeneigenschaften der Proteine schloss sich daher unmittelbar an.

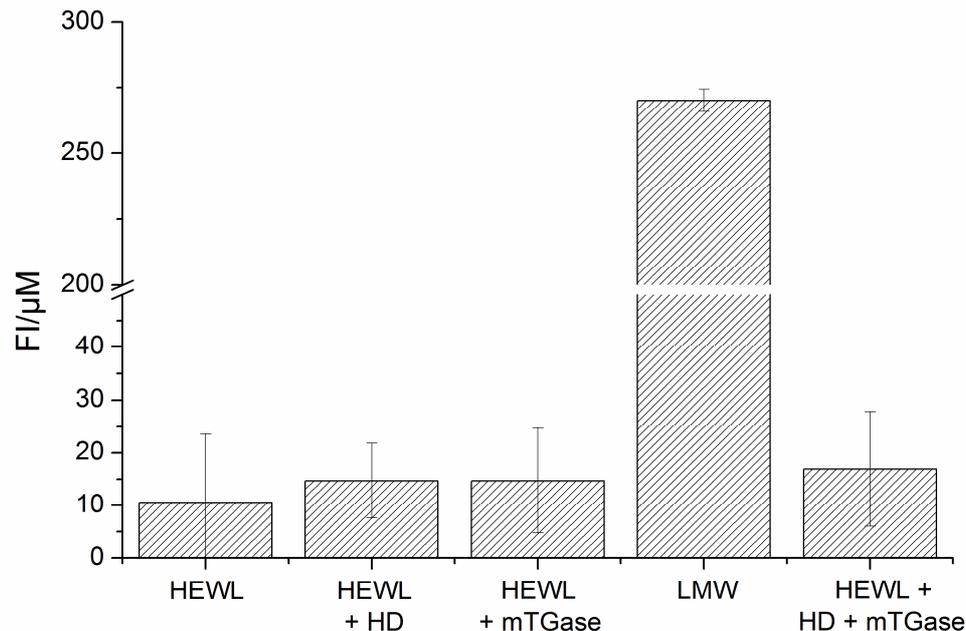
### 4.4.2 Beurteilung der Oberflächenhydrophobität

Hydrophobe Seitenketten an der Proteinoberfläche wechselwirken mit 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) und erhöhen die Quantenausbeute des Fluorophors, was zu einer signifikanten Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt. Nach *Hayakawa und Nakai (1985)* korreliert die mittels ANS-Fluoreszenz bestimmte Hydrophobität gut mit der abnehmenden Löslichkeit von Proteinen und damit der Oberflächenhydrophobität. Als mögliche Fluorophore eignen sich neben ANS auch cis-Parinarate (CPA), ungeladenes 6-Propionyl-2-(*N,N*-Dimethylamino)-Naphthalen (PRODAN) und 1,6-Diphenyl-Hexatrien (DPH). ANS hat allerdings den Vorteil, dass es eine geringe Sensitivität gegenüber (Foto-)Oxidation aufweist (*Gerbanowski et al., 1999*).

Erste Hinweise auf eine veränderte Hydrophobität der Oberfläche waren aufgrund der zunehmend schlechteren Löslichkeit der enzymatisch vernetzten Proben gegeben (GPC, Abschnitt 4.3.2). Dieser Effekt korrelierte mit dem Oligomerisierungsgrad. Während die Pufferlösung mit den hohen HEWL- und mTGase-Anteilen für die HMW-Proben vor der Hochdruckbehandlung (unvernetzt) klar war, wurde nach erfolgter Vernetzung eine Trübung bis hin zu einem voluminösen Niederschlag erkennbar. Denkbar ist, dass es lediglich zur Aggregation thermisch inaktivierter mTGase kommt, dies wurde von *Menéndez (2006)* bereits beschrieben. Andererseits könnte es aber auch auf eine gestiegene Hydrophobität hindeuten,

so dass HEWL in dem wässrigen Puffer nicht mehr vollständig löslich blieb. Für die Analyse wurde aggregiertes Protein stets abzentrifugiert und die wässrigen Überstände gefriergetrocknet oder flüssig nach Proteinbestimmung mittels *Lowry* eingesetzt. Der Messwert wird in Fluoreszenzintensität pro  $\mu\text{M}$  ( $\text{FI}/\mu\text{M}$ ) angegeben.

Die überwiegend im Molekülinneren lokalisierten hydrophoben Aminosäuren bieten keine Bindungsmöglichkeiten für ANS, weshalb der Fluoreszenzanstieg bei nativem HEWL mit  $10,6 \pm 13,0 \text{ FI}/\mu\text{M}$  sehr gering ist (Abbildung 4-22).



**Abbildung 4-22:** Oberflächenhydrophobität; Proben analog zu Abbildung 4-1

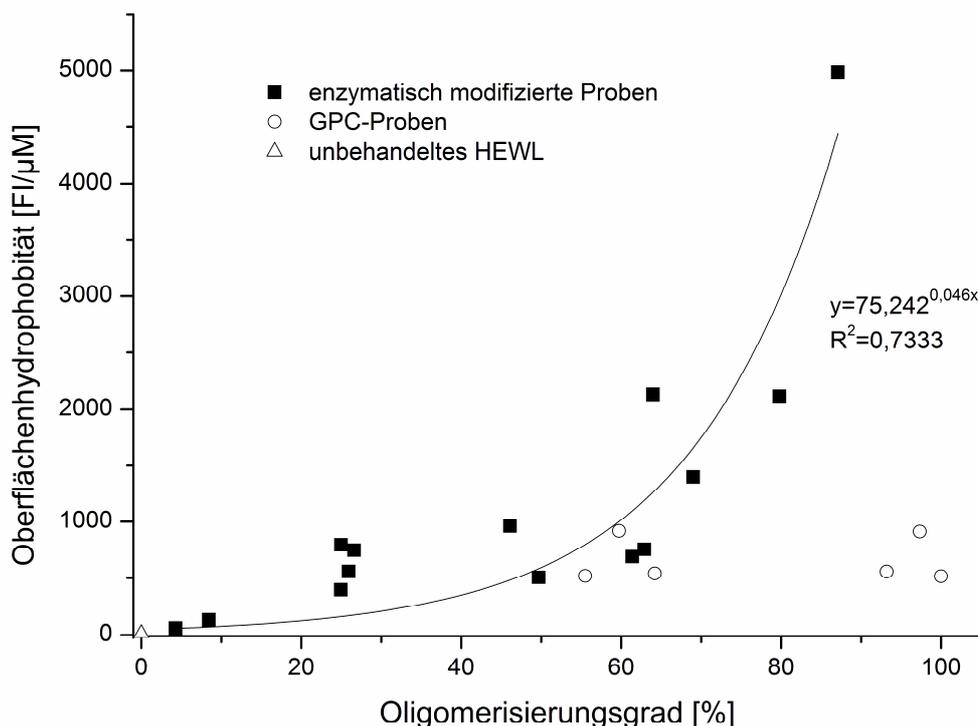
HEWL - Kontrolle (unbehandelt); HEWL + mTGase - mit mTGase, über 30 min,  $40^\circ\text{C}$  und  $0,1 \text{ MPa}$ ; HEWL + HD - 30 min,  $40^\circ\text{C}$  bei  $600 \text{ MPa}$ ; LMW - mit mTGase, 30 min,  $40^\circ\text{C}$  und  $600 \text{ MPa}$ ; HEWL + HD + mTGase, 30 min,  $40^\circ\text{C}$  bei  $600 \text{ MPa}$ , anschließende mit mTGase, 30 min,  $40^\circ\text{C}$  und  $0,1 \text{ MPa}$

Vergleichbar niedrige Werte können in der Literatur wiedergefunden werden (*Alizadeh-Pasdar et al., 2004*). So bestimmte diese Arbeitsgruppe die Oberflächenhydrophobität von verschiedenen nativen Proteinen mittels ANS. HEWL wies die kleinsten Fluoreszenzintensitätssteigerungen auf. Die Oberflächenhydrophobität des HEWL wurde weder durch einfache Hochdruckbehandlung noch durch Dialysieren und Gefrier-trocknen beeinflusst, da sich die Werte im Vergleich zum nativen HEWL nicht signifikant erhöhen ( $14,6 \pm 7,1 \text{ FI}/\mu\text{M}$ , HEWL + HD, Abbildung 4-22). Aufgrund dieser Behandlung werden also keine zusätzlichen hydrophoben Aminosäurereste freigelegt, was die Publikationen und Theorie der reversiblen Rückfaltung des HEWL nach HD abermals bestätigt (*Smeller et al., 2006*, vgl. Abschnitt 4.1). Der minimale Zusatz des Enzyms mTGase ( $40 \text{ U mTGase/g Protein}$ ) resultierte ebenfalls in keiner signifikanten Erhöhung ( $14,7 \pm 9,9 \text{ FI}/\mu\text{M}$ ) und auch die enzymatische Inkubation nach HD weicht mit einem Wert von  $16,9 \pm 10,9 \text{ FI}/\mu\text{M}$  nicht nennenswert vom unbehandelten HEWL ab. Jedoch sind im Gegensatz zur Lyseaktivität (Kapitel 4.4.1) bei der Oberflächenhydrophobität deutliche Unterschiede zwischen den unvernetzten Proben und den

oligomerisierten HEWL-Proben zu erkennen. Die Oberflächenhydrophobität nimmt mit der Ausbildung der Isopeptidbindungen schon bei geringen Vernetzungsgraden (LMW, Vernetzungsgrad:  $8,5 \pm 1,5\%$ ) um ein Vielfaches auf  $270,0 \pm 4,3 \text{ FI}/\mu\text{M}$  zu.

Gleichwohl haben Messungen von HEWL mit ANS unter HD ergeben, dass die relativen Fluoreszenzintensitäten bei kontinuierlicher Druckerhöhung erst ab etwa 600 MPa langsam ansteigen und zuvor nahezu konstant bleiben (Li et al., 1976). Ursache des Hydrophobitätssprungs ist zum einen die stattfindende Konformationsänderung des Proteins unter hohem hydrostatischem Druck. Vor allem hydrophobe AS aus dem Kern des Moleküls gelangen dabei an die Oberfläche. Zum anderen kommt es zur stückweisen Stabilisierung der Auffaltung durch Ausbildung der Isopeptide. Diese neu geknüpften, kovalenten Bindungen inhibieren eine Rückfaltung der HEWL-Oligomere in ihre Ausgangskonformation, was anhand der Änderung der Sekundärstruktur in Abschnitt 4.4.3 diskutiert und belegt wird. Demzufolge liegen anschließend auch bei Normaldruck mehr Bindungsmöglichkeiten für das Fluorophor ANS vor. Nicht ausgeschlossen sind ferner Protein-Protein-Wechselwirkungen, die zum Anstieg der Fluoreszenz beitragen können.

In Abbildung 4-23 sind die Oberflächenhydrophobitäten in Abhängigkeit vom Vernetzungsgrad dargestellt.



**Abbildung 4-23:** Oberflächenhydrophobität ermittelt über den Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Interaktion mit 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS) aufgetragen gegenüber dem Vernetzungsgrad, ■ : enzymatisch modifizierte Proben, ○ : vernetzte und über GPC fraktionierte Proben, △ : unbehandeltes HEWL, Ausgleichsfunktion ohne Einbeziehung der GPC-fraktionierten Proben

Der Anstieg der Messwerte gegenüber den Oligomerisierungsraten verläuft deutlich steiler als für die Lyseaktivität beobachtet (Abbildung 4-21). Bereits bei einem Vernetzungsgrad von 4,3% steigt die Oberflächenhydrophobität von  $10,6 \text{ FI}/\mu\text{M}$  für unbehandeltes HEWL um den Faktor

fünf an (56,6 FI/ $\mu$ M). Das Maximum wird mit über 4980,0 FI/ $\mu$ M bei etwa 87% Vernetzung erreicht. Unter Vernachlässigung der gereinigten GPC-Proben scheint es sich im Gegensatz zur Lyseaktivität nicht um einen linearen Zusammenhang zu handeln. Der Kurvenverlauf beschreibt vielmehr eine Exponentialfunktion. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  ist mit etwas über 0,7 akzeptabel. Offensichtlich spielen hier aber neben dem Oligomerenanteil andere Einflussgrößen eine gravierende Rolle, zu erkennen anhand der GPC-Proben und deren Gehalt der Oligomere (Abbildung 4-19). Die GPC-Proben lassen sich nicht in die theoretische Exponentialfunktion eingliedern. Da sich der Vernetzungsgrad in Abbildung 4-23 ausschließlich aus der Summe des vernetzten HEWL errechnet, bleibt der Einfluss einzelner Di-, Tri- und Tetramere unbeachtet.

So unterstützen die Messwerte die Theorie, dass höher vernetzte Proteine auch deutlich größere Hydrophobitäten aufweisen, was aufgrund der vermehrt ausgebildeten Isopeptide nachvollziehbar ist und sich durch die sinkende Löslichkeit mit steigendem Vernetzungsgrad bereits angedeutet hat. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen von *Cegielska-Radziejewska et al. (2010)* überein, wonach die Zunahme des Oligomerenanteils mit einer Zunahme der Oberflächenhydrophobität einhergeht. Die HEWL-Monomere wurden dort jedoch chemisch und thermochemisch vernetzt und können sich aufgrund der beteiligten Aminosäuren in ihren Eigenschaften von den hier dargestellten Proben unterscheiden. Ein Abschirmen von hydrophilen Aminosäuren während der Oligomerisierung scheint für derart große Hydrophobitätsanstiege um das bis zu 500fache nicht ausreichend.

Weiterhin könnte die Zunahme der Oberflächenhydrophobität durch intermolekulare Vernetzung ein Grund für die Abnahme der Aktivität gegen *ML* sein, da die stark hydrophoben HEWL-Moleküle nicht mehr die hydrophile NAM-NAG-Schicht der grampositiven Bakterien angreifen können.

Die über eine GPC-Säule konzentrierten Proben weichen in ihren Werten von dem diskutierten Trend ab (Abbildung 4-23). Möglicherweise aufgrund der vorherigen Denaturierung in 6 M Harnstoff und dem anschließenden Trennlauf sind die Werte mit 515 bis 918 FI/ $\mu$ M trotz der sehr unterschiedlichen Vernetzungsgrade von 55 bis ~ 100% nicht in dem Maße verschieden, wie es nach dem exponentiellen Kurvenverlauf zu erwarten wäre. Zur Klärung des Harnstoff/Puffer-Einflusses wurden über Nacht in Tris-HCl-Puffer mit 6 M Harnstoff gerührtes, anschließend dialysiertes und lyophilisiertes HEWL, sowie eine HMW-Probe auf Hydrophobitätsveränderungen untersucht. Die Gegenüberstellung der Proben vor und nach der Harnstoff-Denaturierung zeigte, dass die Proben sich weder anhand der SDS-PAGE, noch der Aktivität oder Oberflächenhydrophobität wesentlich unterscheiden. Die bei der Hydrophobität beobachtbare Aberration der GPC-Proben findet ihre Ursache daher nicht im Lösen in der Harnstofflösung, sondern während der Auftrennung über die Säule. Die mutmaßlich zu einer weiteren Umfaltung und damit einhergehenden Veränderung der Oberflächenhydrophobität führende Modifizierung hatte jedoch auf die lytische Aktivität keinen Einfluss (vgl. Abbildung 4-21). Ähnliche Effekte sind in der Literatur für Komplexe aus humanem  $\alpha$ -Lactalbumin oder Pferde-Lysozym mit Ölsäure bekannt (englisch: HAMLET und Equine (Pferde)-Lysozyme mit Ölsäure: ELOA), wobei hier die Proteine teilweise aufgefaltet vorliegen und durch den Lauf des nativen oder denaturierten Proteins über eine Ionenaustauschersäule miteinander in

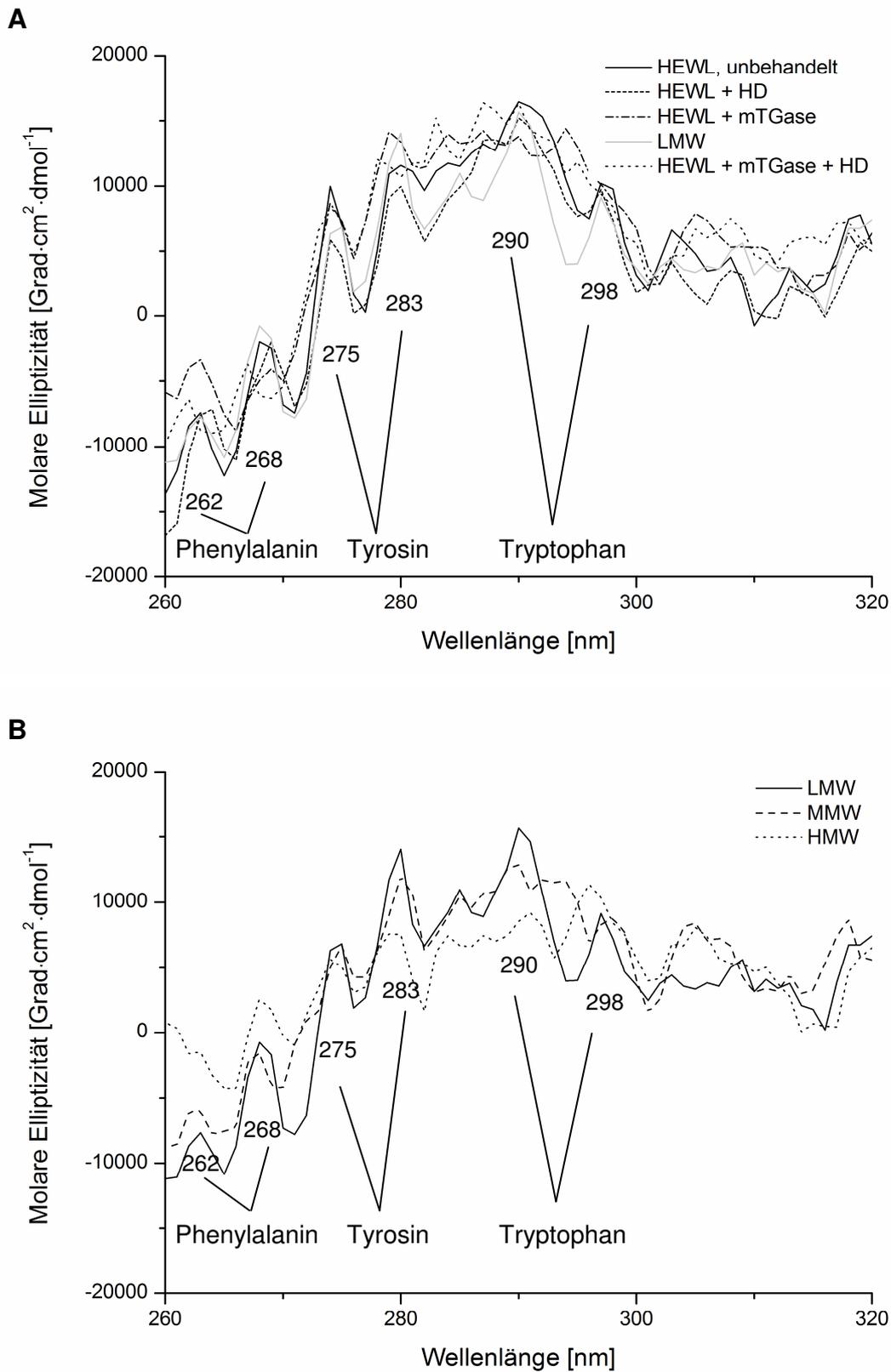
Wechselwirkung gebracht werden (*Mossberg et al., 2010*). Eine chromatographisch induzierte Veränderung ist daher durchaus im Rahmen des Möglichen.

Zusammenfassend kann ausgesagt werden, dass Proben mit einer sehr hohen Oberflächenhydrophobität eine niedrigere Lysozymaktivität aufweisen. Die Hydrophobität nimmt dabei in stärkerem Maße zu als die Lysozymaktivität abnimmt, was anwendungsbezogen für einen Einsatz des modifizierten HEWL als antimikrobielles Reagenz gegen gramnegative Bakterien sprechen könnte. Die durch Hochdruckbehandlung exponierten hydrophoben Bereiche aus dem Inneren des Proteins werden mittels Vernetzung in dieser Position fixiert, so dass einer Interaktion mit der ebenfalls hydrophoben Zellmembran gramnegativer Bakterien lediglich die zunehmende Größe der Moleküle entgegensteht. Die hydrophile Oberfläche grampositiver Bakterien steht entsprechend der beiden Tests mit *ML* dagegen nicht mehr als Substrat zur Verfügung. Eine Deaktivierung des aktiven Zentrums, welches zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne liegt, oder die Modifizierung dessen Umgebung schließt den klassischen lytischen Mechanismus aus.

### 4.4.3 Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur

Das Zirkular-Dichroismus-Spektrum (CD-Spektrum) eines Proteins im Wellenlängenbereich des nahen UV-Lichtes (260 - 320 nm) gibt die Orientierung der aromatischen Aminosäuren wieder und wird zur Bestimmung der Tertiärstruktur genutzt. Die Spektren liefern keine quantitativen Aussagen, stellen jedoch ein sehr sensitives Kriterium für das native Stadium eines Proteins dar und ermöglichen somit allgemeine Aussagen zur Konformation. Änderungen der Tertiärstruktur von unbehandeltem HEWL, nach Behandlung bei 40 °C über 30 min mit 0,1 oder 600 MPa (HD) sowie mit und ohne Enzymzusatz (40 U mTGase/g Protein) wurden über den Wellenlängenbereich von 260 bis 320 nm untersucht (Abbildung 4-24 A). Das CD-Spektrum der aromatischen Bereiche kann unterteilt werden in die Banden bei 262 und 268 nm für Phenylalanin, bei zirka 275 und 283 nm für Tyrosin und bei etwa 290 und 298 nm für Tryptophan (*Mulkerrin, 1996*). *Bhattacharjya und Balaram (1997)* postulieren nach experimentellen Studien für Tryptophanübergänge Signale bei 287 und 291 nm, sowie einen vollständigen Verlust des nahen UV-CD-Signals für komplett aufgefaltetes HEWL nach DMSO-Zusatz.

Zur Ermittlung der CD-Spektren wurden die Lysozymproben in Natriumphosphat-Puffer gelöst, so dass eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml resultierte. Anschließend wurden die gelösten Proben in eine Küvette überführt und direkt zur CD-Messung eingesetzt. Die Messungen wurden an der Universität Potsdam am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie unter Leitung von Prof. Dr. H. Rawel durchgeführt. Der Einfluss des nach simultaner Hochdruckbehandlung thermisch inaktivierten Enzyms mTGase auf die HEWL-Spektren wird als gering eingeschätzt. Da der mTGase-Anteil abhängig von den eingesetzten Units maximal 2% des Gesamtproteingehaltes betrug. Der bereits für LMW (40 U mTGase/g Protein) und MMW (50 U mTGase/g Protein) zu beobachtende Unterschied trotz annähernd gleicher Enzymkonzentrationen bestätigt diese Annahme (Abbildung 4-24 B; Abbildung 4-25 B).



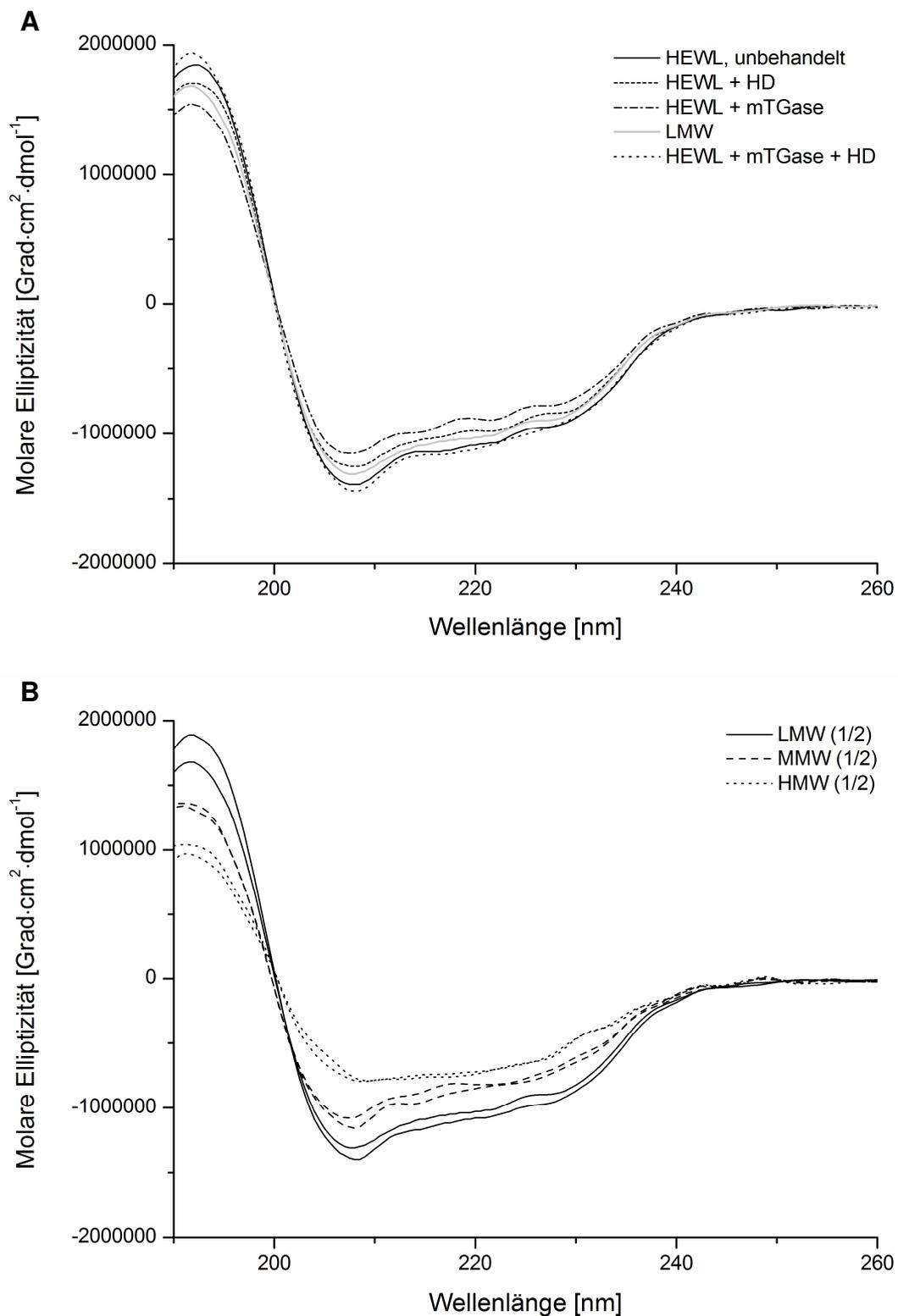
**Abbildung 4-24:** CD-Spektren im Nah-UV-Bereich von 260 bis 320 nm; A - HEWL-Proben, mit/ohne Enzym mTGase, mit/ohne hohem hydrostatischen Druck (HD) sowie simultaner Inkubation (LMW); B - enzymatisch oligomerisierte HEWL-Proben, LMW mit 8,5%, MMW mit 46,1% und HMW mit 87,1% Vernetzungsrate

In der oberen Grafik der Abbildung 4-24 A ist für die aromatischen Aminosäuren kein klarer Trend zu erkennen. Die Behandlung mit Hochdruck, dem Enzym mTGase oder beiden führt zu keiner tendenziellen Veränderung der Orientierung einzelner Aminosäuren. Selbst die LMW-Probe (Vernetzung von 8,5%) weicht nicht signifikant ab. Grafik 4-24 B vergleicht drei Proben mit stark voneinander abweichenden Vernetzungsgraden. Neben der erneut abgebildeten LMW-Probe, sind die MMW-Probe mit 46,1% und die HMW-Probe mit 87,1% Oligomerisierung dargestellt. Hier fallen die Veränderungen etwas deutlicher aus.

Die Positionen der einzelnen Aminosäuren im nativen Lysozymolekül werden zur Erklärung herangezogen (pdb-File: 1e8l). Die beiden Phenylalaninbanden bei 262 und 268 nm nehmen mit zunehmender Vernetzung an Intensität leicht zu, wohingegen die Tyrosinbande bei 283 nm und die Tryptophanbande bei 290 nm zurückgehen (Abbildung 4-24 B). Möglicherweise zeigen die drei außen, in ungeordneten und  $\alpha$ -helikalen Bereichen vorliegenden Phenylalaninreste (Phe<sub>3</sub>, Phe<sub>34</sub> und Phe<sub>38</sub>) aufgrund der HD induzierten Auffaltung eine verbesserte Zugänglichkeit und nach der enzymatischen Oligomerisierung leicht erhöhte Messwerte. Für Tyrosin, welches in ungeordneten Strukturen vorliegt, sind nur zwei der drei Aminosäuren (Tyr<sub>20</sub> und Tyr<sub>23</sub>) zugänglich. Die dritte ist neben dem  $\beta$ -Faltblatt positioniert (Tyr<sub>53</sub>). Bei den sechs Tryptophanresten sind bis auf einen (Trp<sub>123</sub>) alle zum Inneren des Moleküls ausgerichtet (Trp<sub>28</sub>, Trp<sub>62</sub>, Trp<sub>63</sub>, Trp<sub>108</sub> und Trp<sub>111</sub>). Eine Hochdruckinkubation bei 600 MPa führt jedoch nachweislich zur vollständigen Auffaltung des HEWL (*Smeller et al., 2006*). Es sollten somit alle Reste zum Signal beitragen. Daher liefert allein die Position im Molekül keine ausreichende Begründung für eine Signalabnahme. Folglich müssen nach starker Vernetzung (MMW oder HMW) einzelne Aminosäuren aufgrund vermehrt ausgebildeter Isopeptidbindungen fixiert und verdeckt werden, wobei ihre Signalintensitäten abnehmen. Die an der Oligomerisierung beteiligten Lysin- (Lys<sub>1</sub>, Lys<sub>13</sub> und Lys<sub>116</sub>) und Glutaminreste (Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub> und Gln<sub>121</sub>) verdecken mit großer Wahrscheinlichkeit Phe<sub>3</sub>, Tyr<sub>53</sub> und Trp<sub>123</sub>. Eine druckinduzierte Veränderung einzelner Aminosäuren ist von 1 bis 200 MPa mittels NMR untersucht worden (*Akasaka et al., 1997*). Seine Arbeitsgruppe bestätigt die unter HD für Tryptophanreste beobachtete abnehmende molare Elliptizität in Form einer Kompression im Bereich von 0,01 bis 0,06 ppm.

Das CD-Spektrum im Wellenlängenbereich des fernen UV (190 bis 260 nm), welches die Amine abbildet, wurde zur Charakterisierung der sekundären HEWL-Struktur genutzt (Abbildung 4-25). Unbehandeltes HEWL zeigt ein typisches Spektrum mit dem für  $\alpha$ -Helices negativen  $\eta$ - $\pi^*$ -Übergang bei 222 nm und einem  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang. Dieser wird aufgespaltet in einen positiven, senkrecht polarisierten  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang bei 191 nm und einen negativen, parallel polarisierten  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang bei 208 nm (*Sarkar und Doty, 1966; Mulkerrin, 1996*). Der negative Abfall des CD-Signals bei 222 nm passt zum  $\eta$ - $\pi^*$ -Übergang des Peptidrückgrades und spiegelt die Änderung der Sekundärstruktur, besonders den  $\alpha$ -helikalen Bereich innerhalb des HEWL wieder (*Gratzer et al., 1961; Mulkerrin, 1996*).

Für die LMW-Probe und die unvernetzten Proben, welche bereits hinsichtlich ihrer Tertiärstruktur untersucht wurden, kann für die Sekundärstruktur keine signifikante Änderung festgestellt werden (Abbildung 4-25 A). Es zeigen sich nur marginale Unterschiede. Weiterhin konnte bei keiner der untersuchten Proben ein vollständiger Verlust der Ausgangsstruktur beobachtet werden.



**Abbildung 4-25:** Ferne UV-VIS Spektren von 190 bis 260 nm; A - HEWL-Proben, mit/ohne Enzym mTGase, mit/ohne HD sowie simultaner Inkubation (LMW); B - Doppelbestimmung (1/2) enzymatisch oligomerisierter HEWL-Proben, LMW mit 8,5%, MMW mit 46,1% und HMW mit 87,1% Vernetzungsgrad

Für höher vernetzte Proben (HMW) nimmt der senkrecht polarisierte  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang bei 191 nm und der negative Cotton-Effekt bei 222 nm leicht ab und lässt vermuten, dass eine simultane Hochdruck-Enzym-Behandlung zu einer Abnahme der  $\alpha$ -Helices in der HEWL-Konformation führt (Abbildung 4-25 B). Es ist aber kein vollständiger Verlust der Ausgangsstruktur zu verzeichnen. Die Tendenz einer stärkeren Auffaltung, welche mit den bereits diskutierten Umwandlungen der  $\alpha$ -Helices unter hohem hydrostatischen Druck in ungeordnete Bereiche und der enzymatischen Fixierung über kovalente Verknüpfungen übereinstimmt, besteht jedoch nachweislich (Kapitel 4.1).

Vorhersagen zur Sekundärstruktur von Proteinen erfolgten mithilfe des fernen UV-Spektrums aufgrund von charakteristischen Signalen jedes sekundären Elementes eines Moleküls (Greenfield und Fasman, 1969). Um die Sekundärstruktur der Lysozymproben zu berechnen, wurde für diese Arbeit der mathematische Algorithmus CONTIN II mit 48 Protein-Basispektrern eingesetzt. Jedes Spektrum entsprach dabei einem Sekundärstrukturelement (Provencher und Gloeckner, 1981; Sreerama und Woody, 2000).

**Tabelle 4-13:** Übersicht der mithilfe des Programms CONTIN II errechneten Anteile der Sekundärstrukturen [%], HD entspricht 600 MPa, mTGase mit 40 U mTGase/g Protein bei 40 °C über 30 min, MMW- und HMW-Proben weichen davon ab (60 °C, 50 bzw. 160 U mTGase/g Protein)

Nr.	Probe	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Turn	ungeordnet
1	HEWL, theoretisch*	36,0	9,0	32,0	23,0
2	HEWL, dialysiert	34,2 $\pm$ 2,6	14,9 $\pm$ 3,5	21,2 $\pm$ 1,1	29,8 $\pm$ 0,3
3	HEWL + HD	32,7 $\pm$ 4,7	15,7 $\pm$ 5,3	20,1 $\pm$ 1,8	31,6 $\pm$ 1,3
4	HEWL + mTGase	26,3 $\pm$ 1,5	21,9 $\pm$ 2,0	17,9 $\pm$ 0,8	34,0 $\pm$ 0,2
5	HEWL + mTGase + HD	29,6 $\pm$ 4,0	19,6 $\pm$ 3,7	19,4 $\pm$ 1,0	31,4 $\pm$ 1,2
6	LMW (8,5% vernetzt)	30,7 $\pm$ 2,8	18,2 $\pm$ 1,8	20,5 $\pm$ 0,7	30,7 $\pm$ 0,4
7	MMW (46,1% vernetzt)	24,3 $\pm$ 1,0	22,7 $\pm$ 0,4	17,7 $\pm$ 0,2	35,7 $\pm$ 1,6
8	HMW (87,1% vernetzt)	16,2 $\pm$ 4,2	28,1 $\pm$ 4,1	19,3 $\pm$ 0,2	36,4 $\pm$ 0,1

\* Protein-Datenbank der Universität Potsdam am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

Die Berechnungen sind durch Prof. Dr. H. Rawel an der Universität in Potsdam erfolgt. Anhand der Ergebnisse in Tabelle 4-13 ist zu erkennen, dass bereits die dialysierte und lyophilisierte HEWL-Probe geringfügig von den theoretischen Werten abweicht.

Mit 34,2%  $\alpha$ -Helices, 14,9%  $\beta$ -Faltblatt, 21,2%  $\beta$ -Turn und 29,8% ungeordneten Strukturbereichen besitzt das prozessierte Lysozym mehr ungeordnete Strukturen und etwas weniger  $\beta$ -Turns als theoretisch errechnet (Tabelle 4-13). Dies kann bereits durch die Aufarbeitung und die Reinigung der Firma Sigma verursacht worden sein. Daher werden alle folgenden Proben mit dem dialysierten HEWL verglichen. Die unvernetzten Proben (Tabelle 4-13, Nr. 1 bis 4 und 6) sowie die schwach vernetzte Probe (LMW, 8,5% Oligomerisierung, Nr. 5) zeigen in Übereinstimmung mit Abbildung 4-25 A vergleichbare Gehalte der einzelnen Elemente der Sekundärstrukturen. Lediglich die Probe mit mTGase ohne HD (Nr. 4) zeigt leicht abweichende Daten, gleichwohl die graphische Darstellung (Abbildung 4-25 A) keine

Unterschiede aufweist. Allein durch den Zusatz des Enzyms mTGase ist die Abweichung nicht zu begründen, da der Gehalt kaum 1% der Probe ausmacht und andere Proben bei gleichen Gehalten (Nr. 5 und 6) keine Änderung erfahren.

Für die enzymatisch vernetzten Proben ist analog zur Abbildung 4-25 B mit zunehmender Oligomerisierung ein Verlust der  $\alpha$ -helikalen Bereiche von anfangs 34,2 auf 16,2% unter Zunahme des geordneten  $\beta$ -Faltblatts von 14,9 auf bis zu 28,1% und der ungeordneten Abschnitte von 29,8 auf 36,4% zu beobachten. Dies steht in guter Übereinstimmung mit *Tauscher (1995)* und *Refaee et al. (2003)*, welche unter anderem berichten, dass  $\beta$ -Faltblätter nahezu inkompressibel und deutlich stabiler gegen Druck im Vergleich zu  $\alpha$ -Helices sind. Damit werden die reaktiven Aminosäuren Lysin und Glutamin in ungeordneten Strukturen oder kurzen  $\alpha$ -Helices bestätigt. Eine druckinduzierte Deformation der Konformation findet primär in den  $\alpha$ -helikalen Regionen statt und führt zu einer Änderung der Tertiärstruktur, welche ferner mit Konsequenzen für die Substratbindung verbunden ist. Die aktive Seite des HEWL befindet sich zwischen den  $\alpha$ -Helices und der  $\beta$ -Faltblattstruktur (Kapitel 2.1). Basierend auf den Daten in Tabelle 4-13 ist ein Aktivitätsverlust des oligomerisierten HEWL indirekt proportional zur Vernetzungsrate, abhängig von der  $\alpha$ -Helix-Stabilität denkbar. Wie in den Untersuchungen von *Menéndez (2006)* konnte zudem festgestellt werden, dass unter Abnahme der  $\alpha$ -Helices die Gehalte der  $\beta$ -Faltblätter leicht ansteigen. Die Auf- bzw. Umfaltung des HEWL und anschließende enzymatische Fixierung über kovalente Isopeptide muss somit Konsequenzen für die Oberflächeneigenschaften der Oligomere aufweisen. Dies konnte nachweislich im Kapitel 4.4.2 gezeigt werden.

Weiterhin stellt das HEWL im Vergleich zur mTGase das stabilere Protein gegenüber hohen hydrostatischen Drücken dar. Das HD-inkubierte Lysozym (600 MPa, 30 min bei 40°C, Tabelle 4-13, Nr. 3) weist im Vergleich zum dialysierten Ausgangsprodukt kaum Veränderungen in der Sekundärstruktur auf. Bei Abwesenheit der isopeptidausbildenden mTGase ist es in der Lage sich vollständig reversibel zurück zu falten. Dies bestätigt die Arbeit von mehreren Arbeitsgruppen (*Li et al., 1976; Refaee et al., 2003; Smeller et al., 2006*). Das Enzym mTGase verliert im Gegensatz dazu bei 600 MPa über 30 min und 40°C etwa 50% seiner Aktivität gegenüber dem unbehandelten Ausgangsprodukt (*Menéndez, 2006*).

Die Auswirkungen von HD und enzymatischer Vernetzung konnten bereits in den beiden vorangegangenen Kapiteln (4.4.1 und 4.4.2) im Hinblick auf funktionelle Charakteristiken der HEWL-Proben bestätigt werden.

#### 4.4.4 Fibrillbildung und -eigenschaften von HEWL

Mithilfe der Fibrillierungsuntersuchungen sollten weiter Erkenntnisse zum strukturellen Aufbau der enzymatisch vernetzten Lysozymoligomere gewonnen werden. Dabei soll der Vergleich des Assoziations- und Aggregationsverhaltens unter ausgewählten Bedingungen mit unbehandeltem HEWL weitere Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur, den Aufbau der Oligomere und deren Funktionalität ermöglichen.

Für Lysozym existierten bereits Methoden zur *in-vitro*-Erzeugung fibrillärer Strukturen. Die gebräuchlichste Vorgehensweise zur Bildung von Fibrillen aus HEWL ist die Inkubation bei

niedrigen pH-Werten und erhöhten Temperaturen über einen längeren Zeitraum (*Arnaudov und de Vries, 2005* bei pH 2.0, 57 - 80°C über 48 h oder *Frare et al., 2004* mit pH 2,0 und 65°C bis 10 Tage). Alle Analysenparameter der vorliegenden Arbeit sind von *Wang et al. (2009a)* und *Wang et al. (2009b)* übernommen worden (Kapitel 3.3). Teile der Daten wurden in der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von *Kießling (2011)* erarbeitet.

Als schwierig erwies sich zu Beginn vor allem die Suche nach einem geeigneten Inkubationsgefäß. Als ideal zeigten sich Kryoröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 5 ml, die zur Hälfte befüllt (2,5 ml), fest verschlossen und horizontal eingespannt im Wasserbad geschüttelt wurden. Der pH-Wert der Lösung betrug 2,2 und die Inkubationstemperatur 55°C. Konzentrationen von 2 mg HEWL/ml und 0,5 mg HEWL/ml der unbehandelten als auch leicht vernetzten HEWL-Proben (LMW - 2% HEWL, 40 mTGase U/g Protein über 30 min bei 40°C und 600 MPa, Vernetzungsgrad:  $8,5 \pm 1,5\%$ ) wurden getestet. Bei einer Konzentration von 2 mg/ml (*Wang et al., 2009a*) entstand bereits nach 2 h ein intensiver, voluminöser Niederschlag in den unvernetzten Proben. Geringer konzentriertes HEWL (0,5 mg/ml nach *Wang et al., 2009b*) aggregierte nach 6 h sichtbar, weshalb im Folgenden mit einer Konzentration von 0,5 mg HEWL/ml gearbeitet wurde. Die Aggregate dieser Lösungen waren feiner verteilt, so dass stabilere Messwerte resultierten.

### 4.4.4.1 Etablierung der Charakterisierungsmethoden für HEWL-Fibrillen

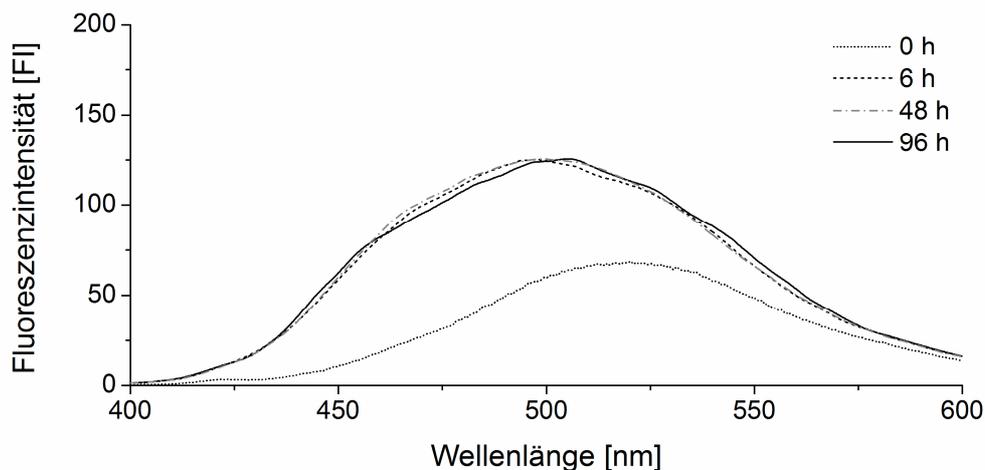
Die stark strukturierten Bereiche der generierten Fibrillen eines Proteins oder Proteinverbandes sind *in vitro* sehr gut optisch charakterisierbar. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurden diese mithilfe dreier Testsysteme, dem 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure-Assay (ANS-Assay), dem Kongorot- und dem Thioflavin-T-Assay dargestellt. Dabei lag in diesem Abschnitt das Hauptaugenmerk vor allem auf den nicht oligomerisierten Ausgangsproben des HEWL (Vergleich mit Abbildung 4-1), welche zum einem unbehandelt, nur dem Enzym mTGase oder hydrostatischem Hochdruck ausgesetzt als auch aufeinander folgend mit Druck und dann enzymatisch inkubiert wurden.

#### ANS-Assay

Bei ANS handelt es sich um ein bereits zur Bestimmung der Oberflächenhydrophobität eingesetztes Agens (Kapitel 4.5.3). Die aromatische und ionische Reagenz besitzt eine geringe Eigenfluoreszenz in wässriger Lösung und es ist anzunehmen, dass nach saurer und thermischer Fibrillinduzierung hydrophobe Bereiche aus dem Molekülinneren für ANS zugänglich werden. Auch wenn dieser Test nicht spezifisch für amyloide Fibrillen ist, da sich ANS aufgrund hydrophober und ionischer Wechselwirkungen (*Matulis und Lovrien, 1998*) an alle zugänglichen hydrophoben Proteinstrukturen anlagert, handelt es sich doch um eine gute erste Abschätzung des Fibrillbildungspotentials. Er wird folglich in der Literatur eingesetzt (*Booth et al., 1997; Morshedi et al., 2007* und *Wang et al., 2009a/2009b*). Für einige Peptide erwies sich ANS zudem empfindlicher als beispielsweise Thioflavin T (*Scheuermann, 2003*).

Die Auswirkungen der Fibrillierungsdauer auf die Fluoreszenzintensität sind für das unbehandelte HEWL in Abbildung 4-26 abgebildet. Bei Zugabe von HEWL zu einer 250 µM

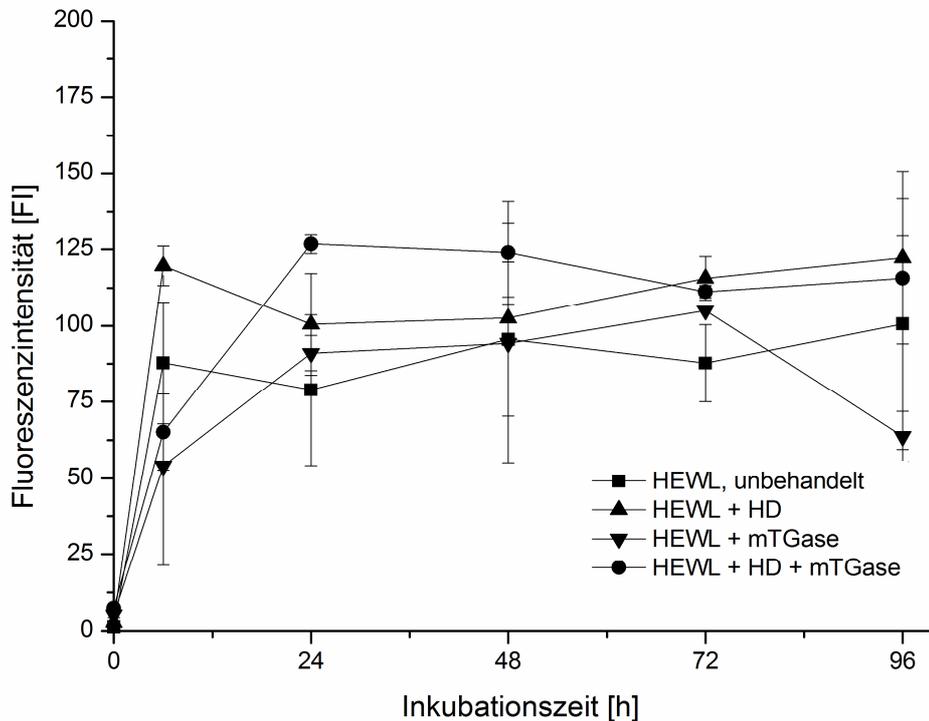
ANS-Lösung tritt praktisch keine Änderung der Fluoreszenz im Vergleich zum Blindwert (BW) auf, welcher nur Puffer enthält. Auf der Oberfläche des Proteins befinden sich, wie unter Abschnitt 4.5.3 dargelegt, kaum hydrophobe Aminosäuren. Bei Inkubation des HEWL (pH 2,2 und 55°C) ist hingegen nach 6 Stunden bereits eine deutliche Zunahme des Signals und eine Verschiebung des Maximums von 520 nm auf 495 nm zu erkennen. Allerdings wird die Fluoreszenzintensität auch nach längerer Inkubation (48 h) nicht weiter erhöht, so dass bei HEWL bereits nach 6 Stunden von einer abgeschlossenen Denaturierung und Umfaltung in fibrilläre Strukturen ausgegangen werden kann (Abbildung 4-26). Zumindest jedoch werden mit zunehmender Inkubationsdauer keine weiteren hydrophoben Bindungsstellen freigelegt.



**Abbildung 4-26:** ANS-Fluoreszenzintensität von HEWL, unbehandelt (0,5 mg/ml), über verschiedene Zeiträume inkubiert bei pH 2,2 und 55°C unter Zusatz der ANS-Lösung bei  $\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$

In Abbildung 4-27 ist der zeitliche Verlauf der zur Fibrillierung angeregten Ausgangsproben (unbehandeltes HEWL, nur mTGase oder HD inkubiert und aufeinander folgend mit Druck und dann enzymatisch inkubiert) nach ANS-Zugabe abgebildet. Zu sehen ist, dass die anfänglich relativ kleinen Werte mit einer Fluoreszenzintensität (FI) von etwa 10 (vergleichbar mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.1) bei allen Proben bis zum Ende der Inkubation (96 h) auf etwa 100 FI ansteigen. Weiterhin scheint bei der zweiten Probenahme nach 6 h, mit Ausnahme der mTGasehaltigen Proben, die Fibrillierung bereits vollständig abgeschlossen zu sein, da die Messwerte der folgenden Analysen keinen weiteren Anstieg des Signals mehr aufwiesen. Der Gleichgewichtszustand des Proteins war zu dieser Zeit schon auf Seite der Fibrillen verschoben und blieb über den gesamten gemessenen Zeitraum konstant. Lediglich die Proben, welche mTGase beinhalteten (nur mTGase und Enzym nach HD) wiesen zunächst nach 6 h einen etwas flacheren Kurvenverlauf auf. Optisch konnte bei allen unvernetzten Proben, vor allem an den Grenzflächen, bereits nach 2 h die Bildung erster, weißer Aggregate beobachtet werden. Insbesondere bei unbehandeltem HEWL und druckinkubiertem HEWL war dies sehr ausgeprägt. Offenbar setzt gerade bei diesen Proben das Wachstum der Fibrillen sehr früh ( $\leq 2 \text{ h}$ ) ein. Interessanterweise zeigten die zwei Proben, die mTGase enthalten einen leicht verzögerten Fluoreszenzanstieg, in beiden Proben lag das Enzym mit 40 U mTGase/g Protein zirka im Verhältnis 1:200 (mTGase : HEWL) vor. Der minimale Enzymzusatz scheint die Keimbildung der Fibrillogeneese dennoch zu verzögern. Da bis dato keine Literatur zu diesem

Thema publiziert wurde, kann auf Fakten über die fibrillbildenden Eigenschaften der mTGase bei Anfertigung der Arbeit nicht zurückgegriffen werden.



**Abbildung 4-27:** Ergebnisse des ANS-Assays mit nicht vernetztem HEWL nach Inkubation bei pH 2,2, 55°C über 96 h, ± Standardabweichung, gemittelter Blindwert (ANS in Puffer) von 36,4 FI subtrahiert

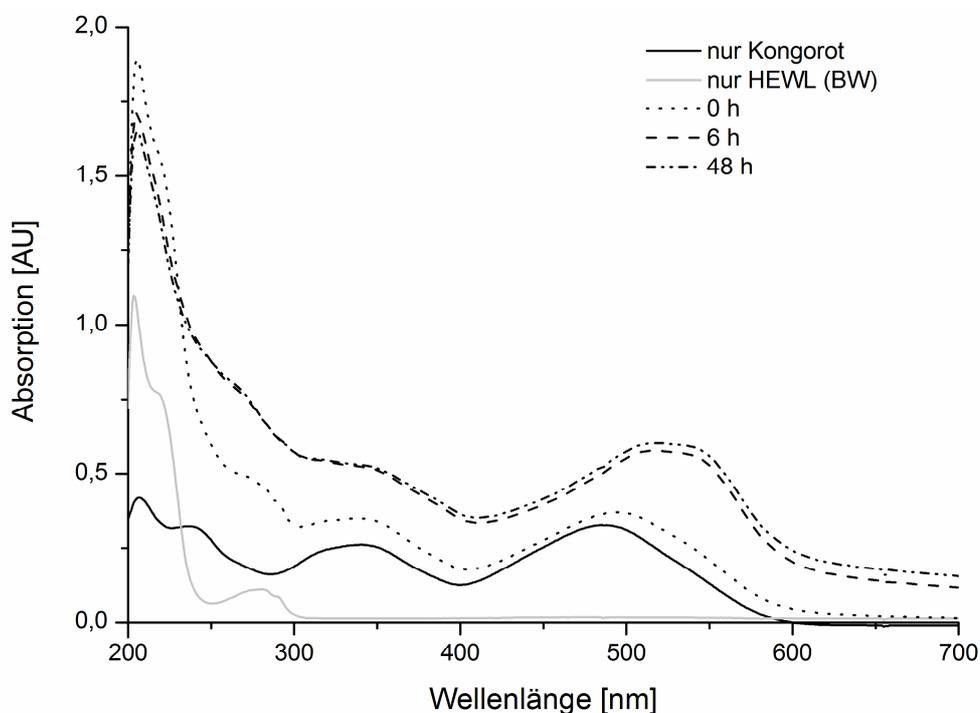
Diese ersten Ergebnisse ließen noch keine eindeutige Aussage über die Fibrillierung zu und sollten im Anschluss mit dem Kongorot- und Thioflavin-T-Assay verifiziert werden.

### Kongorot

Die 1927 von *Divry und Florkin* beobachtete charakteristische grüne Doppelbrechung des Farbstoffes im polarisierten Licht wird bis heute als Standard zur Diagnose einer Amyloidose in Gewebeschnitten eingesetzt. Zum Nachweis amyloider Fibrillen *in vitro* wird die Erhöhung der Absorption bei 540 nm (*Wang et al., 2009a*) oder eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 495 auf 503 nm genutzt (*Klunk et al., 1989a/1989b* sowie *Krebs et al., 2000*). Falsch positive Nachweise durch Bindung von Kongorot an native und teilweise gefaltete Proteine, wie beispielsweise für Elastin oder die RNA-Polymerase bekannt, können allerdings mitunter Probleme verursachen (*Khurana et al., 2001*).

In Abbildung 4-28 sind die Absorptionsverläufe über den gesamten Bereich des gemessenen Spektrums von 200 bis 700 nm dargestellt. Die proteinfreie Kongorotlösung dient als Blindwert und zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 340 und 495 nm. Die Grafik 4-28 weist zudem das Spektrum der farbstofffreien HEWL-Lösung in PBS-Puffer auf (BW). Wie bereits im Kapitel 4.3.2 in Tris-HCl-Puffer beobachtet, zeigt sich das für Proteine charakteristische Absorptionsspektrum zum einen mit der Absorption der Peptidbindung bei etwa 220 nm und zum anderen durch die  $\pi$ - $\pi^*$ -Absorption aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm. Weitere Absorptionen über 300 nm

treten nicht auf. In zur Fibrillogenese angesetzten Proteinproben detektierbare Maxima bei 340 und etwa 500 nm sind daher vollständig auf Kongorot bzw. auf dessen Anlagerung an fibrilläre Strukturen zurückzuführen. Die Aufnahme der Signale im kurzwelligen UV-Bereich (200 - 300 nm) diente der Kontrolle des Lysozymgehaltes. Da sich eine homogene Probenahme aufgrund der erwähnten Aggregation mitunter schwierig gestaltete, wurden Proteingehalte anhand der charakteristischen Absorption von Peptidbindungen und aromatischen Aminosäuren abgeschätzt. Der Zusatz des nichtfibrillierten HEWL zur Kongorotlösung ging mit einer marginalen Verschiebung der Absorptionsmaxima zu höheren Wellenlängen einher (0 h). Sind hingegen nach 6- oder 48-stündiger Inkubation fibrilläre Strukturen vorhanden, ist einerseits eine Zunahme der Absorption beider Maxima und andererseits eine deutliche, bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 495 auf etwa 510 nm in guter Übereinstimmung mit den Literaturangaben zu detektieren (*Klunk et al., 1989; Krebs et al., 2000*).

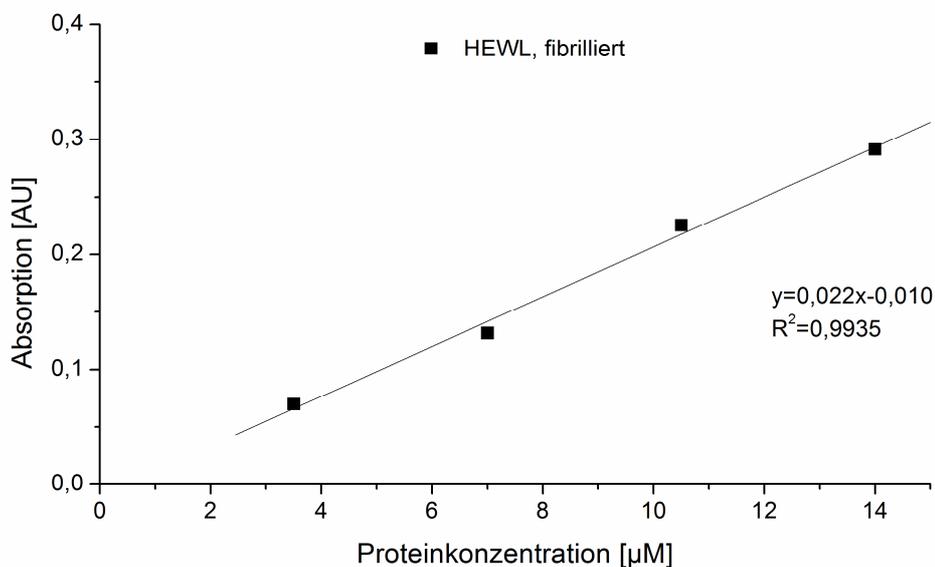


**Abbildung 4-28:** Absorptionsspektren von 200 bis 700 nm des HEWL ( $c = 0,5 \text{ mg/ml}$ ) inkubiert mit Kongorot bei pH 2,2 und  $55^\circ\text{C}$  über verschiedene Inkubationszeiten, sowie unbehandeltes HEWL (BW) und Kongorot ( $18 \mu\text{M}$ ) in PBS gelöst

Die von *Khurana et al. (2001)* berichtete Bildung roter Präzipitate bei höheren Konzentrationen an Fibrillen konnte im Rahmen dieser Versuche insbesondere bei länger inkubierten HEWL-Proben bestätigt werden. Dabei wird Kongorot in solchem Maß an fibrilläre Strukturen gebunden, dass es nicht mehr gelöst vorliegt. Aufgrund der daraus resultierenden geringeren Kongorotkonzentration in Lösung wird dann im Überstand vermutlich eine niedrigere Absorption gemessen. Um die Abhängigkeit der Proteinkonzentration von den zum Teil bereits optisch unterscheidbaren Präzipitaten zu untersuchen, wurde eine HEWL-Lösung mit  $2 \text{ mg/ml}$  über 96 h inkubiert. Aus der Lösung (maximaler Gehalt an Fibrillen unter gegebenen Bedingungen) wurden bei pH 2,2 verschiedene Verdünnungen hergestellt. Trotz der visuell

wahrgenommenen, variierenden Absorption an den Aggregaten korreliert das Meßsignal bei 540 nm wie in Abbildung 4-29 dargestellt, sehr gut mit der Proteinkonzentration.

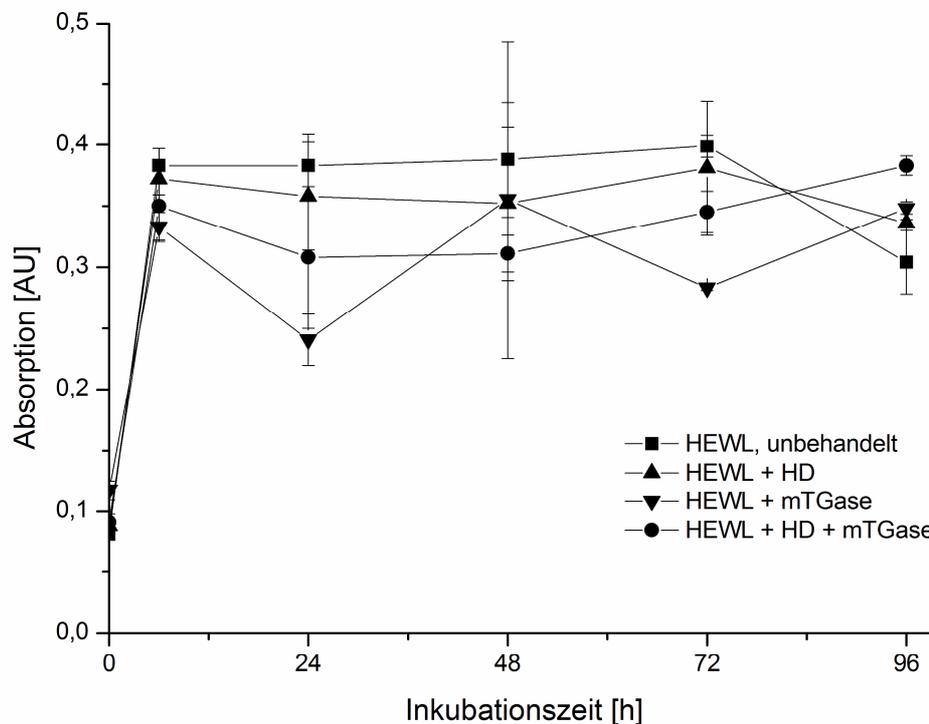
Somit kann im Folgenden aus den fibrillierten Proben mit 0,5 mg/ml eine zeitabhängige Messung erfolgen. Dass das Protein vollständig zu Fibrillen aggregierte, wurde dabei nicht eindeutig nachgewiesen. Die Bestimmung der absoluten Menge an fibrilliertem Protein könnte indirekt durch Zentrifugation und Ermittlung der Konzentration unfibrillierten Proteins im Überstand durch UV geschehen (*Humblet-Hua et al., 2008*). Es ist jedoch nicht bewiesen, dass sich auch kleine Fibrillen oder Keimzellen mittels Zentrifugation abtrennen lassen. Eine einfache Proteinrestbestimmung in Lösung nach *Lowry* ist aufgrund des Restfarbstoffgehaltes von Kongorot nicht möglich.



**Abbildung 4-29:** Kalibrierung des Kongorot-Assays, UV-VIS-Messung bei  $\lambda = 540$  nm, Probe: 2 mg/ml HEWL nach Fibrillierung über 96 h (nach *Wang et al., 2009b*) verdünnt zu verschiedenen Proteinkonzentrationen an HEWL

Die Werte der unvernetzten HEWL-Proben des in Abbildung 4-30 wiedergegebenen Kongorot-Assays unterscheiden sich nur geringfügig voneinander. Der Absorptionsverlauf ähnelt zudem den Ergebnissen des ANS-Assays (Abbildung 4-27). Nach 6-stündiger Inkubation wurde ein sprunghafter Anstieg dokumentiert, welcher sich in den nachfolgenden Untersuchungen bei einem Absorptionswert von zirka 0,35 einpendelte. Der für mTGase-haltige Proben zuvor im ANS-Assay bei 6 Stunden beobachtete, flachere Kurvenverlauf ist hier jedoch nicht in gleicher Weise ausgeprägt. Eine Übersättigung des Azofarbstoffes ausgehend von der HEWL-Fibrillmenge kann aufgrund der vorangegangenen Kalibrierung (Abbildung 4-29) ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist der Kongorot-Assay jedoch etwas sensitiver, detektiert damit etwas empfindlicher und resultiert in höheren Werten als der ANS-Assay. Die Proben zeigen im Allgemeinen eine gute Übereinstimmung untereinander. Lediglich die mit mTGase bei Atmosphärendruck inkubierte, unvernetzte Messreihe weicht bei 24 und 72 h ab. Ursachen hierfür lagen vermutlich im Versuchsaufbau und der Fibrillinduktion, welche je nach Oberflächenbeschaffenheit der Innenseite des Kryoröhrchens einen großen Einfluss auf die Bildung der Fibrillen und deren Wachstum besaß. Der höchste Anstieg im Messverlauf ist

erneut für unbehandeltes und druckinkubiertes HEWL nach 6 h detektierbar. Zusammen mit einem äußerst groben Niederschlag, welcher die Probenahme erschwerte, war der Unterschied bereits visuell nachweisbar.



**Abbildung 4-30:** Ergebnisse des Kongorot-Assays mit nicht vernetztem HEWL nach Inkubation bei pH 2,2, 55 °C über 96 h,  $\pm$  Standardabweichung, Messwellenlänge bei  $\lambda = 540$  nm

In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen des ANS-Tests ist festzuhalten, dass die Behandlung mit HD, mTGase oder beiden Parametern nacheinander ohne Vernetzung, keinen signifikanten Einfluss auf die fibrillbildenden Eigenschaften des HEWL hat.

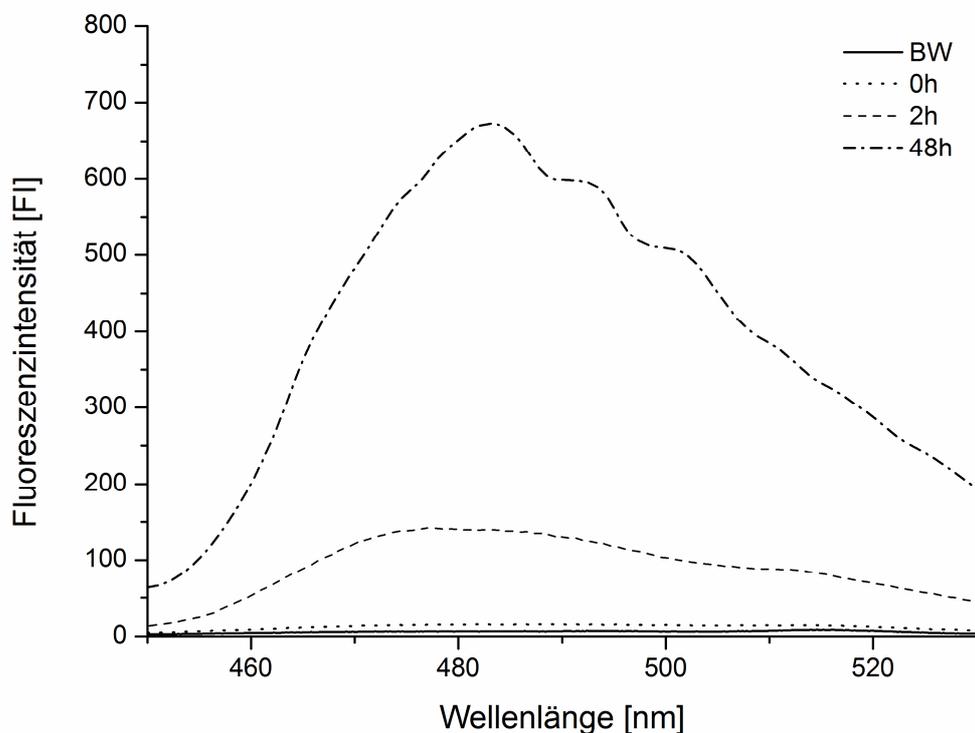
### ThioflavinT-Assay

Vassar und Culling haben 1959 die Verwendung des kationischen, benzothiazol-haltigen Fluoreszenzfarbstoffes ThioflavinT (ThT) erstmals publiziert. Der Assay gleicht dem Nachweis mit ANS, da auch hier die Anlagerung des Farbstoffes an hydrophobe Bereiche des Proteins zu einer Fluoreszenzintensivierung bei  $\lambda_{\text{ex}} = 440$  nm /  $\lambda_{\text{em}} = 485$  nm führt (Wang et al., 2009a). Aufgrund der geringen Größe des ThT mit einem Durchmesser von 4,1 Å ist es vorstellbar, dass sich das Molekül zwischen die amyloiden  $\beta$ -Faltblätter einlagert, von den Seitenketten der Aminosäuren umschlossen wird und mit diesen in Wechselwirkung tritt. Der Farbstoff gilt als spezifisch für die Anwesenheit amyloider Fibrillen (Krebs et al., 2005). ThT bindet zudem geringfügig an  $\beta$ -Faltblattstrukturen nativer Proteine, welche ungeordneter sind und wenige Einzelstränge aufweisen. Eine weitere Theorie besagt, dass sich keine einzelnen Moleküle, sondern ThT-Mizellen an die Fibrillen anlagern (Khurana et al., 2005). Mit der Dimethylamino- und der Benzothiazolgruppe besitzt der Farbstoff ein hydrophobes und ein hydrophiles Ende. Erst oberhalb der kritischen Mizellbildungs-Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  ThT wird eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Fibrillen messbar. Die Anlagerung vom

ThioflavinT/-mizellen an das Protein erfolgt mutmaßlich über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen (*Khurana et al., 2005*).

Im Gegensatz zu Kongorot ist ThioflavinT ungiftig und es wurden zum Nachweis der Fibrillbildung geringere Mengen Protein benötigt, was eine gute Probenhomogenität voraussetzte und bei den hier stark aggregierten Proben in höheren Standardabweichungen resultierte.

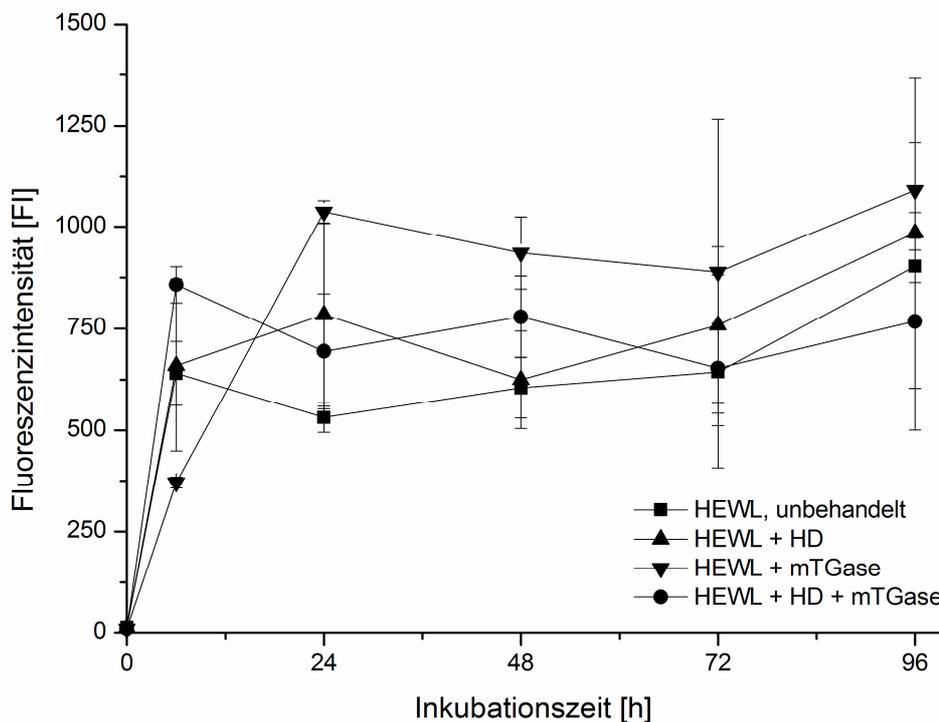
Der ThT-Assay von *Wang et al. (2009a)* konnte auf die zu untersuchenden Proben übertragen werden. Im Kapitel 3.7.9.3 wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der fibrillierten HEWL-Proteinmenge mit guter linearer Korrelation dargestellt. Erste Ergebnisse sind in Abbildung 4-31 zu sehen. Das Absorptionsmaximum liegt bei zirka 485 nm und die Intensität bei dieser Wellenlänge wird zum semiquantitativen Vergleich verschiedener Proben herangezogen. Dabei sind die Fluoreszenzintensitäten ohne Inkubation (0 h) bei den proteinhaltigen Proben (HEWL, unfibrilliert) drei- bis viermal höher als die reine Thioflavin-Pufferlösung (BW). Fluoreszenzierende Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) des HEWL tragen zur Intensitätserhöhung des Signals bei. Beide Werte sind jedoch vernachlässigbar gegenüber der Intensität, die bei Anwesenheit von Fibrillen in der ThT-Lösung zu messen ist. Eine signifikante Zunahme um das Vielfache ( $FI > 100$ ) ist bereits nach zweistündiger Inkubation (2 h) zu erkennen und korreliert optisch mit der zu beobachtenden Aggregatbildung. Nach 48 h hat sich die Fluoreszenz nahezu versechsfacht.



**Abbildung 4-31:** ThT-Fluoreszenzintensitäten bei  $\lambda_{ex} = 440$  nm von HEWL (0,5 mg/ml) inkubiert über variierende Zeiträume bei pH 2,2 und 55 °C, sowie der proteinfreie Blindwert (BW)

Die in Abbildung 4-31 beobachtete Zunahme des Signals mit fortschreitender Fibrillierungsdauer lässt auf eine direkte Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration der Fibrillen schließen. Dagegen ist diese Tendenz in Abbildung 4-32 nur

innerhalb der ersten 24 h zu erkennen. Nach 24 h hat sich die Fluoreszenz auf etwa das 30 bis 40fache erhöht und erreicht ein Plateau vergleichbar mit den beiden vorangegangenen Testsystemen. Lediglich der letzte Messwert bei 96 h weicht von den bisherigen Ergebnissen ab, da er nochmals einen geringen Anstieg aufweist (Abbildung 4-32). Begründet liegt dies in der schon erwähnten Inhomogenität der Proben und der geringen Probenmenge, so dass die hier maximal fibrillierten Lysozym-Proben als Suspensionen mit grobem Niederschlag vermessen wurden, welche mitunter zu Spektren mit starken Schwankungen führen. Ein Messwert um  $\pm 3$  nm vor oder nach der gewählten Wellenlänge (485 nm) resultiert dabei bereits in einer Änderung der Fluoreszenzintensität von  $\pm 100$  FI. Der geringe Anstieg am Ende der Inkubationszeit (96 h) ist daher als Artefakt zu interpretieren.



**Abbildung 4-32:** Ergebnisse des ThT-Assays mit nicht vernetztem HEWL nach Inkubation bei pH 2,2, 55°C über 96 h,  $\pm$  Standardabweichung,  $\lambda_{\text{ex}} = 440$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 485$  nm

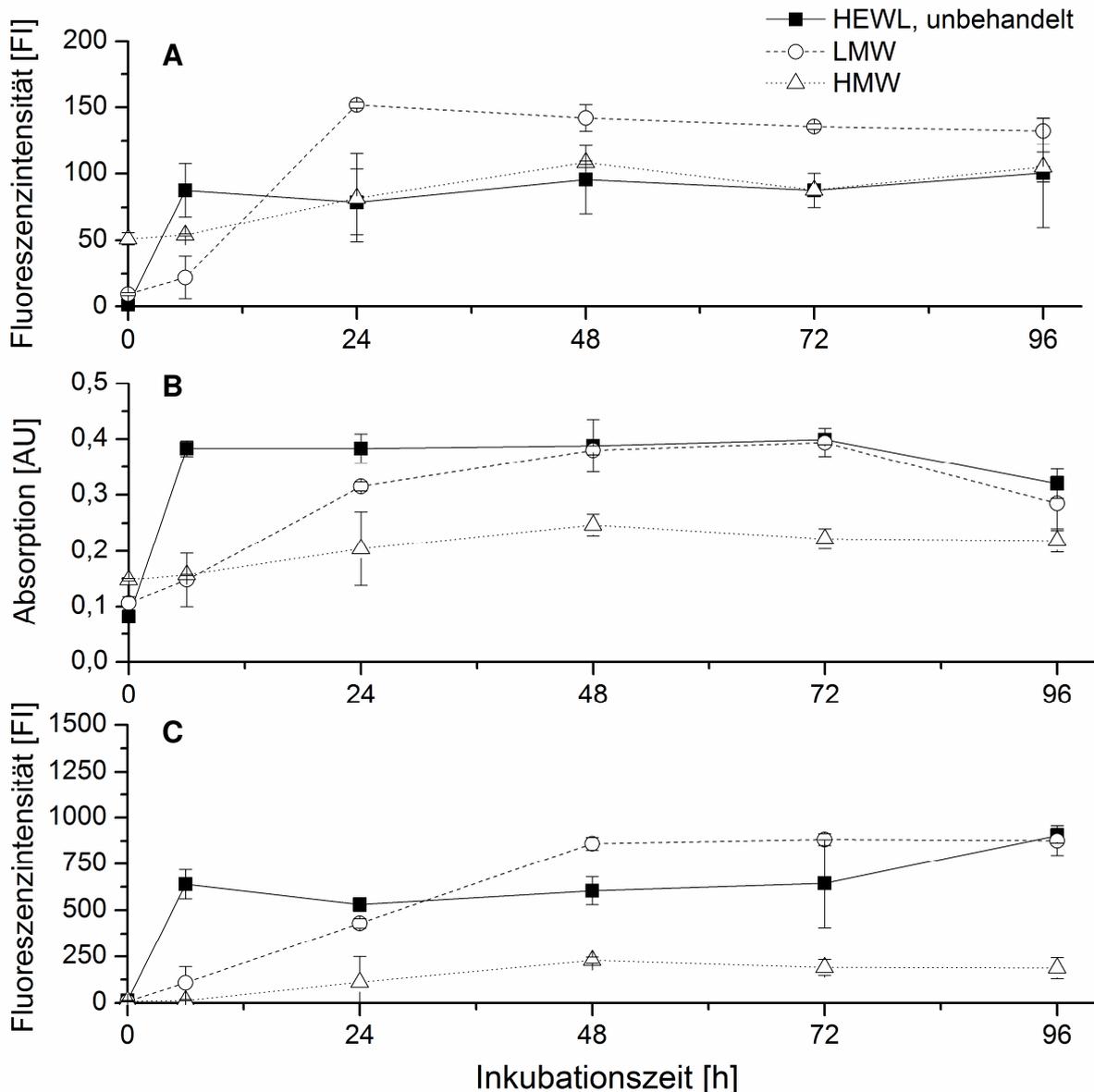
Die Anwesenheit von Fibrillen wurde durch alle drei ausgewählten Assays bestätigt. Damit ist ThioflavinT, wie auch Kongorot und ANS, zur vergleichenden Abschätzung des Gehaltes amyloider Fibrillen geeignet. Der Nachweis am Fluoreszenzfarbstoff ThT ist für HEWL-haltige Proben am empfindlichsten, da hier die Steigung der Kalibriergeraden um ein Vielfaches höher ist (Abschnitt 3.7.9.3). Der Einfluss verschiedener untersuchter Parameter (Hochdruckbehandlung und Enzymzugabe) auf den Fibrillierungsprozess nicht oligomerisierter Proben ist als gering einzuschätzen und auch nach längerer Inkubation ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zum unbehandelten HEWL.

### 4.4.4.2 Fibrillinduktion an HEWL-Präparaten ausgewählter Vernetzungsgrade

Eine kritische Menge von zumindest teilweise aufgefalteten Molekülen ist eine Voraussetzung sowohl für den initialen Keimbildungsschritt als auch das Wachstum und die Verlängerung von Lysozymfibrillen (Johnson *et al.*, 2005). Nach Niraula *et al.* (2004), welche Untersuchungen an Disulfid-freien Variationen des Lysozyms unter HD angefertigt haben, bilden sich reversible Übergangsformationen (U) aus nativem Protein aus. Diese können dann mit anderen aufgefalteten Proteinen einen weiteren Übergangszustand (U') einnehmen, der immer noch zur Rückfaltung in der Lage ist, sich aber irreversibel zu Fibrillen umsetzen kann und damit das Gleichgewicht Richtung Fibrillierung verschiebt. Auf Basis dieser beiden Beobachtungen gibt es zwei gegensätzliche Theorien bezüglich der Fibrillierung oligomerisierter HEWL-Proben. Zum einen wäre es möglich, dass die unter HD aufgefalteten Proteine bereits eine Art Protofibrillen bilden, welche mithilfe des Enzyms mTGase fixiert werden. Bei einer Inkubation im sauren Milieu (pH 2,2 bei 55°C) könnte die Fibrillbildung nunmehr deutlich katalysiert ablaufen. Dafür spricht der in Kapitel 4.5.2 diskutierte Anstieg der Oberflächenhydrophobität als Hinweis auf die Auffaltung des Proteins. Der Fakt, dass von sehr voluminösen und komprimierbaren Protofibrillen (Akasaka *et al.*, 2007) berichtet wird, welche bei Bedingungen von 600 MPa nicht zu erwarten sind, führt jedoch zu einer zweiten Theorie. Hierbei resultiert die enzymatische Vernetzung unter hohem hydrostatischem Druck, trotz der nachgewiesenen Freilegung innerer hydrophober Bereiche, in einer Stabilisierung der Moleküle. Die gebildeten Oligomere werden bei Inkubation unter Fibrillierungskonditionen (pH 2,2 bei 55°C) an ihrer Denaturierung, Auffaltung und Hydrolyse gehindert, bzw. findet diese stark verzögert statt. Die für Keimbildung und Fibrillbildung essentiell kritische Menge an entfaltetem Protein (Johnson *et al.*, 2005 und Booth *et al.*, 1997) wird so abhängig vom Vernetzungsgrad höchstwahrscheinlich zeitlich verzögert erreicht.

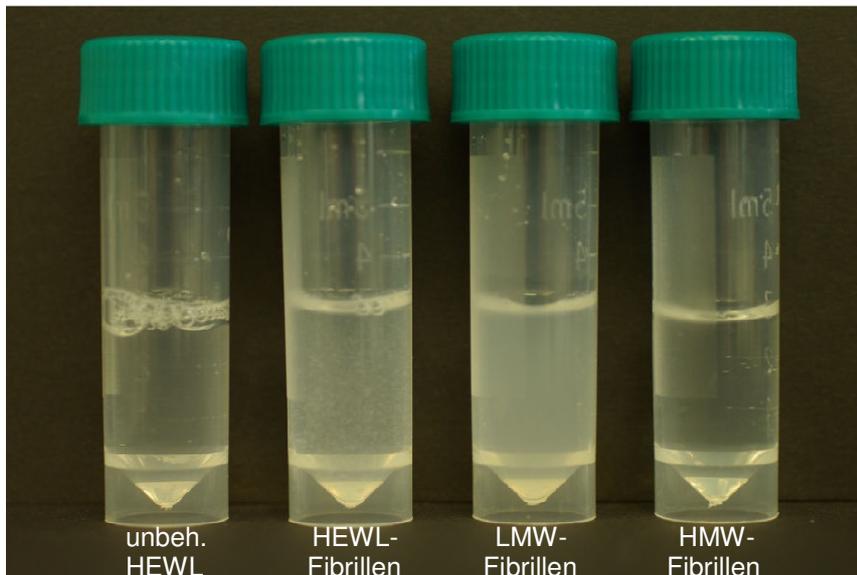
Im Vergleich zum unbehandelten HEWL sind hier am Beispiel einer LMW- (2% HEWL, 40 U mTGase/g Protein bei 40°C, Vernetzungsgrad: 8,5%) und einer HMW-Probe (3% HEWL, 160 U mTGase/g Protein bei 60°C, Vernetzungsgrad: 65%) die drei Fibrillierungstests mit ANS, Kongorot und ThT einander gegenübergestellt (Abbildung 4-33). Generell ist festzustellen, dass sich die Kurvenverläufe der jeweiligen Probe unabhängig vom Testsystem ähneln. Wie zuvor diskutiert weist unbehandeltes HEWL bereits nach 6 h einen maximalen Gehalt an Fibrillen auf. Die Signale der leicht vernetzten Probe (LMW) steigen zu diesem Zeitpunkt noch schwach und erreichen ihr Maximum erst nach 24 h, wobei diese sich dann den unbehandelten Probenwerten des HEWL angleichen oder diese leicht übersteigen. Für die HMW-Probe kann nach 6 Stunden noch keine Fibrillierung beobachtet werden, erst nach 24 h erhöhen sich die Werte leicht und stagnieren nach 48 h auf einem vergleichsweise niedrigen Niveau. Für den auf ANS basierenden Assay wird dieser Unterschied nicht so deutlich (Abbildung 4-33 A), wie für die beiden anderen Testsysteme. Grund hierfür ist die bereits zur Bestimmung der Oberflächenhydrophobität (Abschnitt 3.7.7) ausgenutzte Fähigkeit des ANS auch an hydrophobe Aminosäuren zu binden. Somit befinden sich die Werte der stark und leicht vernetzten Proben (HMW und LMW) zu Beginn der Fibrillierung (0 h) bereits deutlich über denen des nativen HEWL. Der Anstieg wird daher zur Einschätzung der drei Proben dem Absolutwert vorgezogen. Innerhalb der HMW-Probe wurden geringe Gehalte von fibrilliertem Protein detektiert. Die Differenz zwischen Anfangs- und Maximalwert entspricht dabei jeweils

etwa der Hälfte des unbehandelten HEWL. Der zunehmende Vernetzungsgrad verzögert somit einerseits die Keimbildung (flacher Anstieg) und andererseits das Fibrillenwachstum (niedriger Maximalwert). Die Untersuchungen zum Fibrillierungspotential bestätigen die zuvor geäußerten Erwartungen der zweiten Theorie (*Johnson et al., 2005* und *Booth et al., 1997*) einer gehemmten Fibrillierungsneigung.



**Abbildung 4-33:** Ergebnisse des ANS-, Kongorot und ThT-Assays (A - C) mit unbehandeltem und vernetztem HEWL (LMW - 2% HEWL, 40 U mTGase/g Protein bei 40 °C, Vernetzungsgrad: 8,5% und HMW - 3% HEWL, 160 U mTGase/g Protein bei 60 °C, Vernetzungsgrad: 65%) nach Inkubation bei pH 2,2, 55 °C über 96 h

Neben der dargestellten Messung mit verschiedenen Farbstoffsystemen konnte auch visuell festgestellt werden, dass HEWL im leicht vernetzten Zustand (LMW) zu einem feinen, trüben Niederschlag ausfällt, während unbehandeltes HEWL grobe Aggregate bildet (Abbildung 4-34). In der Lösung des hoch vernetzten HEWL (HMW) war trotz leicht ansteigender Signale zu keinem Zeitpunkt eine Präzipitation sichtbar, vermutlich wurde die zur Ausfällung nötige Fibrillkonzentration nicht erreicht.

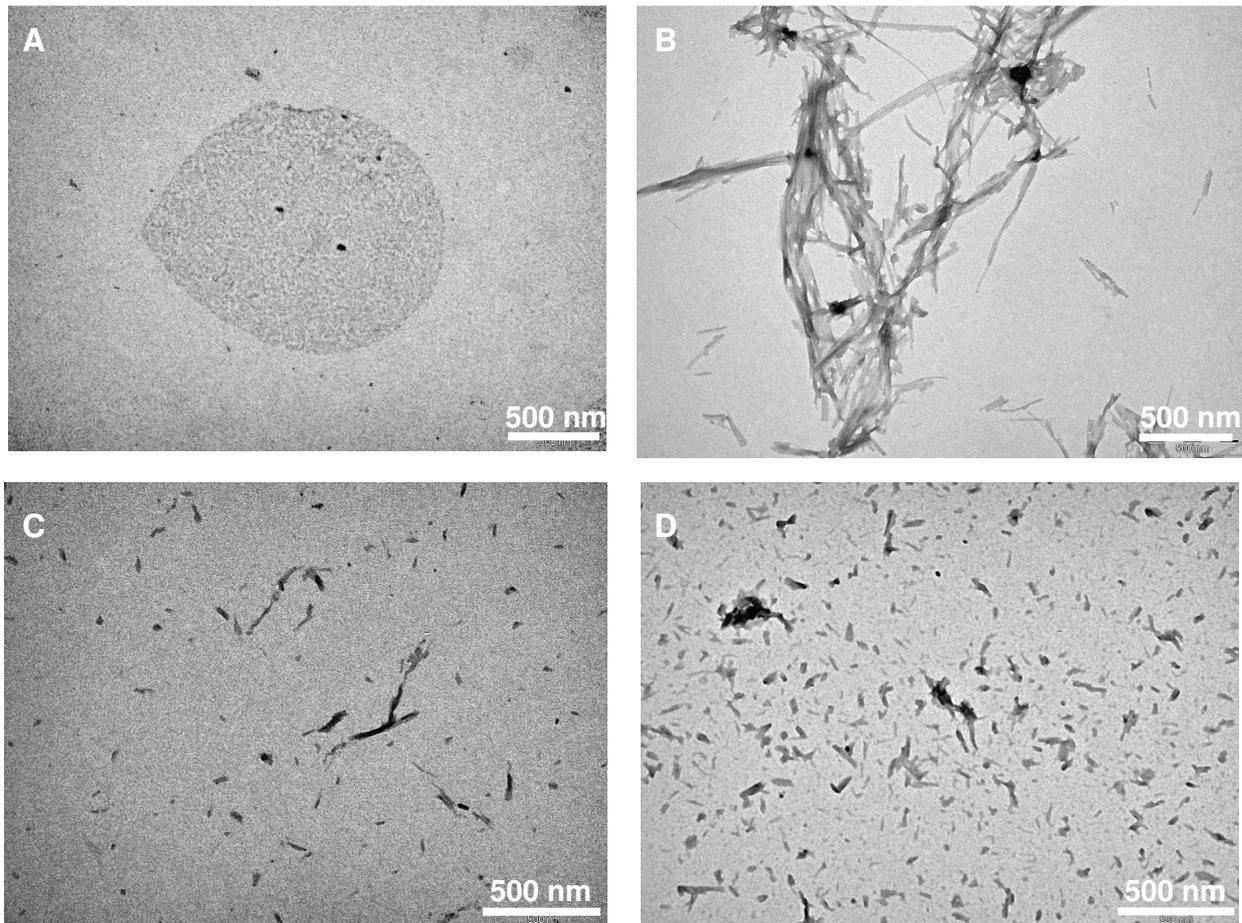


**Abbildung 4-34:** Lösungen der unbehandelten HEWL-Probe und die nach 96 h bei pH 2,2 und 55°C inkubierten HEWL-, LMW- und HMW-Fibrillierungen (v.l.n.r.)

Aufgrund dessen, dass sich die Fibrillen in Erscheinungsform und Wechselwirkungen sowohl mit den angewendeten Agenzien als auch optisch mit bloßem Auge unterschieden, wurden die Proben mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit höherer Auflösung optisch untersucht.

Die TEM-Aufnahme der unbehandelten HEWL-Probe in saurer Lösung (pH 2,2) ohne Inkubation (0 h) zeigt eine amorphe Struktur (Abbildung 4-35 A). Nach 96stündiger Lagerung im Schüttelwasserbad bei 55°C bilden sich hingegen lange, geordnete, unverzweigte Fäden, die Fibrillen (Abbildung 4-35 B), welche sich zum Teil überlagern. Einzelne besitzen einen Durchmesser von 15 bis 20 nm und eine Länge von 100 nm bis zu mehreren Mikrometern, was mit publizierten Abmessungen (*Wang et al., 2009a; Arnaudov und de Vries, 2005* sowie *Frare et al., 2004*) sehr gut übereinstimmt. Weiterhin ist zu erkennen, dass sich die einzelnen Fibrillen umeinander winden und zu Anhäufungen zusammenlagern. Diese sind ab einer gewissen Größe mit dem bloßen Auge als Niederschlag zu erkennen. Diskrete Fibrillstränge lagen in Minderheit vor, was auf die starke Neigung des fibrillierten Lysozyms zur Aggregation zurückzuführen ist.

Die in der LMW-Probe mit bloßem Auge sichtbare, feinverteilte Trübung lässt sich durch die in Abbildung 4-35 C abgebildeten kürzeren und weniger aggregierten Fibrillstrukturen belegen. Ihr Durchmesser ist mit dem des fibrillierten HEWL vergleichbar (20 nm). Ihre Länge ist dagegen mit zwei- bis dreihundert Nanometer begrenzt. Die Ausbildung größerer Komplexe ist verringert, oftmals liegen viele einzelne Fibrillen vor, die daher mit dem bloßen Auge schlechter erkennbar sind. Für die in Abbildung 4-35 D abgebildete HMW-Probe sind sehr kleine Aggregate und fast keine fibrillären Strukturen mehr zu detektieren. Die Ablagerungen mit einer Länge von 40 bis 200 nm und einem Durchmesser von etwa 20 nm liegen feinverteilt vor. Diese Mikrofibrillen können scheinbar noch gut hydratisiert werden, da optisch keine Trübung festgestellt wurde. Dies ist insofern unerwartet, als das lyophilisierte Ausgangsprodukt sehr hydrophob und schlecht wasserlöslich war.



**Abbildung 4-35:** Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen (TEM) von unbehandeltem HEWL und Proben nach Fibrillierung bei pH 2,2, 55°C über 96 h, Probenkonzentration: 2,5 µg/ml

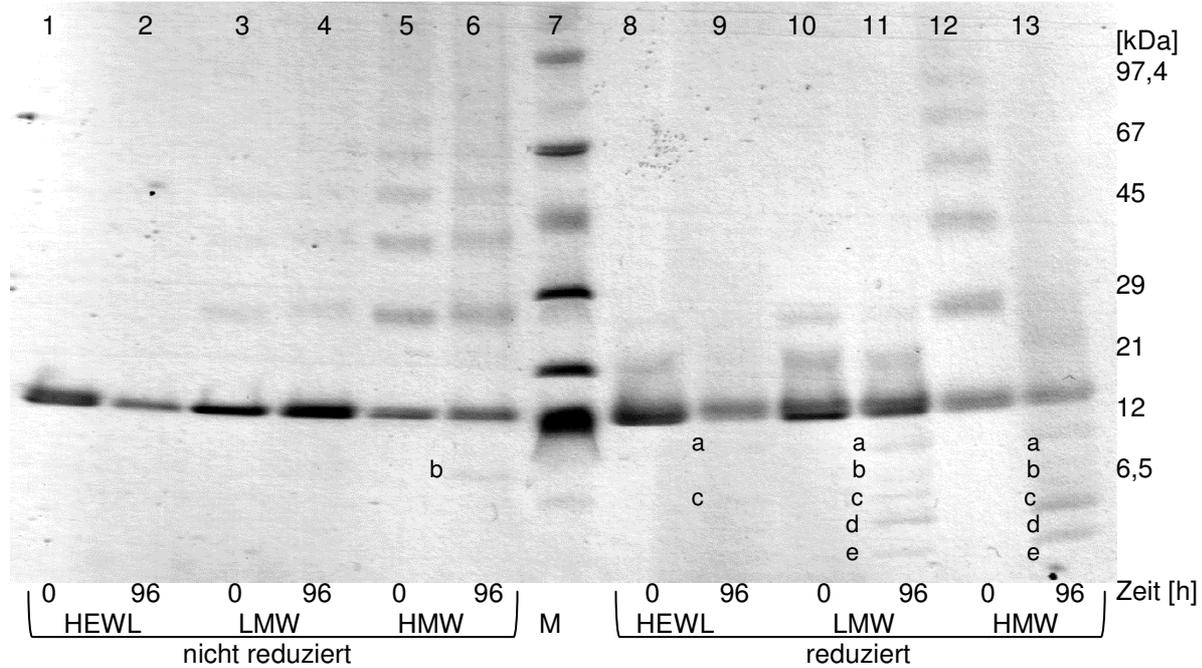
A - unbehandeltes HEWL; B - fibrilliertes HEWL;

C - fibrilliertes LMW (2% HEWL, 40 U mTGase/g Protein bei 40°C, Vernetzungsgrad: 8,5%);

D - fibrilliertes HMW (3% HEWL, 160 U mTGase/g Protein bei 60°C, Vernetzungsgrad: 65%)

Demnach führt eine steigende Vernetzung zu einer geringeren Fibrillierung und die anfangs formulierte These der schlechteren Fibrillierung kann abermals belegt werden. Vermutlich werden potentiell amyloidogene Regionen durch Ausbildung der Isopeptide während der Oligomerisierung stabilisiert und abgeschirmt, so dass die Auffaltung zur Protofibrille beeinträchtigt wird (*Akasaka et al., 2007*). Vergleichbar mit der für Insulin postulierten Bildung von Intermediaten, Nucleus und Fibrillen ausschließlich aus dem Monomer (*Nielsen et al., 2001*). Damit steht in höher vernetztem HEWL (HMW) weniger potentiell amyloidogenes Protein zur Verfügung, so dass aus dem verbleibenden Monomeranteil kürzere Fibrillen entstehen. Oder aber es können bei geringerem Vernetzungsanteil (LMW) die niederen Oligomere mit ihren Isopeptidbindungen umgesetzt aber nicht Säure-katalytisch gespalten werden, wodurch sich die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 4-36:** SDS-PAGE von unbehandeltem HEWL sowie LMW- und HMW-Proben vor (0 h) und nach (96 h) Inkubation im sauren Milieu pH 2,2 bei 55 °C, Probe reduziert und nicht reduziert aufgetragen, Bruchstücke sind mit a bis e markiert (siehe Text)

Wie im Theorieteil angesprochen stellt die partielle Säurehydrolyse und die damit einhergehende Bildung charakteristischer Bruchstücke während des Fibrillierungsprozesses eine Voraussetzung für den Ablauf der Fibrillierung dar (Abschnitt 2.1.3.1). Zu diesem Zweck wurden Vernetzungsprodukte und Fragmente der vorliegenden Proben vor (0 h) und nach 96-stündiger Fibrillierung mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 4-36). Die intensive Bande mit einer molekularen Masse bei zirka 12,5 kDa entspricht jeweils dem monomeren Lysozym. Nicht inkubiertes HEWL (0 h, Bahn 1 und 8) zeigt erwartungsgemäß als reduzierte und nicht reduzierte Probe keine weiteren Banden. Alle reduziert aufgetragenen Proben weisen vor der Fibrillierung ebenfalls keine Fragmentierung des HEWL-Monomers auf. Nur das stark vernetzte HEWL (HMW) enthält eine einzelne Bande (b) bei etwa 8 kDa. *Mishra et al. (2007)* berichten hingegen bei fibrilliertem nativen HEWL von einer zeitlich abhängigen Zunahme der Bruchstücke, verwendeten jedoch extremere Fibrillierungsbedingungen (0,715 mg Protein/ml, pH 1,6 bei 65 °C über 0 bis 140 h). Möglicherweise würde bei längerer Inkubation oder Erhöhung der Temperatur auch bei den hier durchgeführten Experimenten eine Hydrolyse des nativen und schwach vernetzten HEWL (LMW) sichtbar werden. Nach Reduktion mit DTT und Jodacetamid sind bei der unbehandelten HEWL-Probe (Bahn 8) und der LMW-Probe ohne und nach Inkubation (Bande 10 und 11) Schlieren bei der Monomerbande bis hin zu 21 kDa zu beobachten. Zurückzuführen ist diese Tatsache sowohl auf die relativ hohen Gehalte an Monomer, als auch auf die milden Reduktionsbedingungen (vgl. *Partschfeld, 2011* mit Abschnitt 3.7.3), welche die Proteinmonomere nicht vollständig reduzieren und somit zu einer Verschiebung einzelner Moleküle im Gel führen kann. Weiterhin fällt eine Abnahme der Intensität bis hin zum Verschwinden der Oligomerbanden für die vernetzten, fibrillierten Proben auf. Eindeutig zu sehen ist dies bei der HMW-Probe nach Fibrillierung auf der letzten Bahn des Gels (Bahn 13), für welche keine diskreten Banden oberhalb des Monomers mehr zu

identifizieren sind. Demnach werden bei den vernetzten Proben vor allem die Oligomere bei saurer Inkubation stärker angegriffen.

Aufgrund der hochdruckinduzierten Auffaltung und anschließenden enzymatischen Fixierung über die Isopeptide kommt es zur Freilegung anderer Spaltstellen und einer besseren Zugänglichkeit. Die entstehenden Peptidbruchstücke bleiben jedoch über die vier Disulfidbrücken verbunden und werden dadurch als intakte Moleküle in der SDS-PAGE ohne Reduktion (Bahn 6) detektiert. Es zeigt sich, dass die Lysozymproben mit zunehmendem Vernetzungsgrad offensichtlich sensibler gegenüber Säurehydrolyse reagieren, da die Anzahl kleinerer Fragmente hier nach Reduktion zunimmt (Bahn 11 und 13). Diese charakteristischen Banden unterhalb der Molmasse des Monomers sind allen fibrillierten Proben gemein (Abbildung 4-36). Eine Bande bei etwa 10 kDa (a) und eine weitere bei 6 kDa (c), welche beim unbehandelten HEWL äußerst schwach ausgeprägt sind, werden sichtbar. Die schwach oligomerisierte Probe und HMW zeigen darüber hinaus weitere Banden (b, d und e). Eine exakte Zuordnung der molaren Massen im niedermolekularen Bereich des Elektropherogramms ist schwierig, da der kleinste vergleichbare Molmassenmarker eine Masse von 6,5 kDa aufweist. Aus diesem Grund ist die nachfolgende Zuordnung der Bruchstücke als Abschätzung zu verstehen. Zur genaueren Bestimmung der molaren Massen wären neben kleineren Markerpeptiden und einem höheren Acrylamidanteil im Gel ebenso die Wahl einer empfindlicheren Methode wie der MALDI-TOF (*Mishra et al., 2007*) oder ESI-MS (*Frare et al., 2004*) möglich.

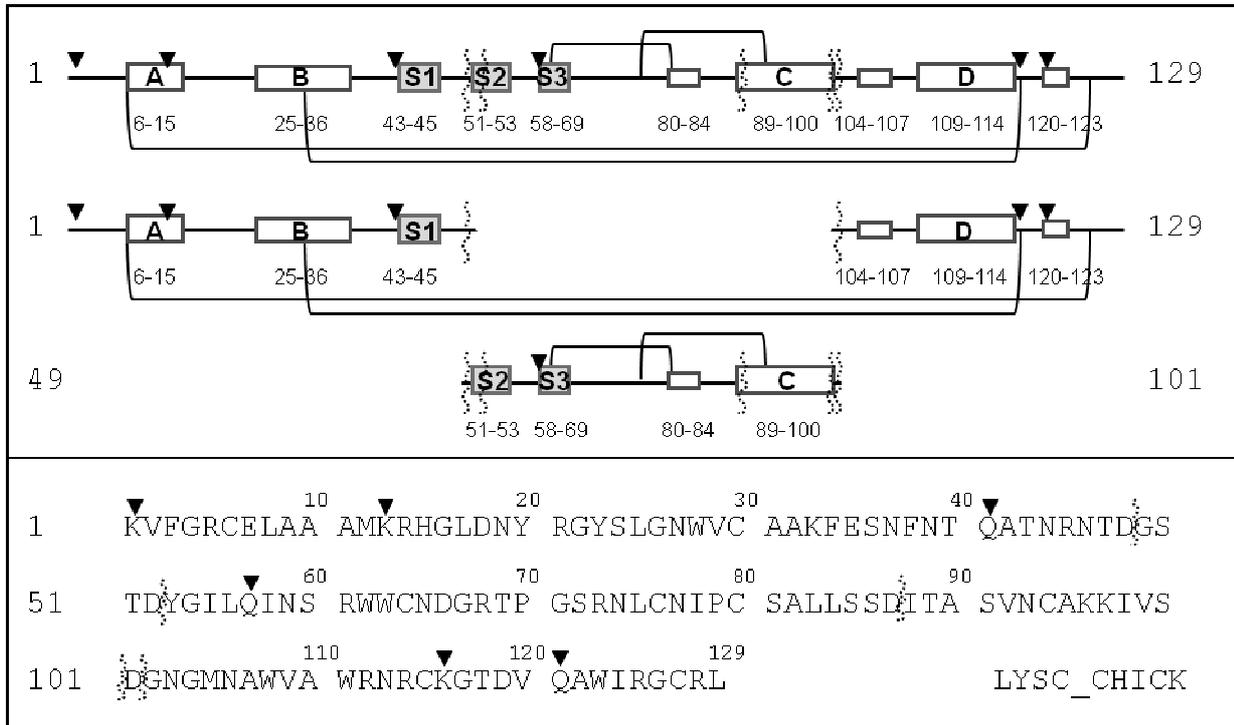
So identifizierte die Arbeitsgruppe um *Frare et al. (2004)* im Aggregat des amyloiden HEWL mittels ESI-MS Molmassen von 5207-5717 Da, welche sie den Peptidfragmenten 49-100, 49-101, 53-100 und 53-101 zuordneten. Entsprechende Spaltungen erfolgen an den Peptidbindungen Asp<sub>48</sub>-Gly<sub>49</sub>, Asp<sub>52</sub>-Tyr<sub>53</sub>, Ser<sub>100</sub>-Asp<sub>101</sub> sowie Asp<sub>101</sub>-Gly<sub>102</sub> (Abbildung 4-37). Über das Fragmentierungsmuster enzymatisch vernetzter HEWL-Moleküle ist nichts bekannt. Daher wird die Fragmentierung des nativen HEWL unter Berücksichtigung der enzymatisch gebildeten Isopeptide (Kapitel 4.2.3) zugrunde gelegt. Das mittels HD und mTGase modifizierte HEWL wird wie in Kapitel 4.2.3 gezeigt durch sechs mögliche Isopeptidbindungen zwischen Lys<sub>1</sub>, Lys<sub>33</sub> und Lys<sub>116</sub> mit Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub> sowie Gln<sub>121</sub> vernetzt (vgl. Tabelle 4-9 und Abbildung 4-13).

Die genannten Fragmente beinhalten einen Teil der  $\beta$ -Domäne (S1 - S3, Abbildung 4-37) sowie die Helix C und sind intramolekular durch zwei Disulfidbrücken verbunden. Innerhalb der Reste kommt es zu einer weiteren Spaltung zwischen Asp<sub>87</sub>-Ile<sub>88</sub>, so dass die Bruchstücke 49-87/88-101, 49-87/88-101, 53-87/88-100 und 53-87/88-101 entstehen müssten. Diese sind über die Disulfidbrücken Cys<sub>64</sub>/Cys<sub>80</sub> und Cys<sub>76</sub>/Cys<sub>94</sub> verknüpft, die unter reduzierenden Bedingungen gespalten werden. Es entstehen mehrere kleine Bruchstücke.

Der von *Frare et al. (2004)* abgetrennte, inkubierte Lösungsüberstand enthielt keine Fibrillen. Die in Lösung detektierten Molmassen von 14400, etwa 8500 und 3000 Da wurden auf intaktes HEWL sowie die Fragmente 1-17/120-129 und 1-18/19-47/120-129 mit Disulfidbrücken zwischen Cys<sub>6</sub>/Cys<sub>127</sub> und die Fragmente 1-47/102-129 und 1-18/19-47/102-129 mit Disulfidbrücken zwischen Cys<sub>6</sub>/Cys<sub>127</sub> und Cys<sub>30</sub>/Cys<sub>115</sub> zurückgeführt. Im Überstand waren damit die Sekundärstrukturen der Helices A, B und D und das ungespaltene HEWL enthalten,

## 4 Ergebnisse und Diskussion

welche nicht zur Fibrillierung neigten (Abbildung 4-37 und Tabelle 4-14). Postuliert wurde zudem die Spaltung der Peptidbindungen Leu<sub>17</sub>-Asp<sub>18</sub> und Asp<sub>119</sub>-Val<sub>120</sub>.



**Abbildung 4-37:** Oben - schematische Sekundärstruktur von HEWL und beispielhaft zwei der möglichen Spaltpeptide,  $\alpha$ -Helices A-D,  $\beta$ -Faltblatt S1-S3, vier Disulfidbrücken als durchgängige Linie; Unten - Aminosäuresequenz von HEWL; die Wellenlinie stellt bevorzugte Hydrolysespaltstellen bei pH 2,0 und 65°C über 10 Tage dar,  $\blacktriangledown$  sind Verknüpfungsstellen bei enzymatischer Oligomerisierung (nach *Frare et al., 2004*)

Die Proben für die SDS-PAGE (Abbildung 4-36) wurden direkt aus der aggregierten Lösung entnommen, es lag daher eine Mischung aller beschriebenen Fragmente und intaktes HEWL vor. Tabelle 4-14 gibt die von *Frare et al. (2004)* identifizierten Fragmente, welche teilweise über Disulfidbrücken verknüpft sind, wieder. Indes konnten nur Bruchstücke mit Molmassen über 6,5 kDa in der hier angewandten Gelelektrophorese detektiert werden.

**Tabelle 4-14:** Fragmente und zugehörige theoretische molare Massen nach SH des monomeren HEWL von *Frare et al. (2004)* identifiziert; „/“ Disulfidbrücken

Monomeres HEWL (mit Disulfidbrücken)			
Fragment	Molmasse [kDa]	Fragment	Molmasse [kDa]
(1-129)	(14,3)	49-100	5,6
1-17 / 120-129	3,1	49-101, 49-87 / 88-101	5,7
1-18 / 120-129	3,2	53-100, 53-87 / 88-100	5,2
1-47 / 102-129	8,5	53-101, 53-87 / 88-101	5,4
1-18 / 19-47 / 102-129	8,5		

Diese bekannten Spaltstellen wurden im Folgenden auf vernetztes HEWL übertragen. In der Tabelle 4-15 sind mögliche Isopeptide nach Reduktion aufgelistet. Zur Vereinfachung wurde angenommen, dass nur je ein intermolekulares Isopeptid pro Peptidfragment gebildet wird. Aufgrund der sechs möglichen Isopeptide ist jedoch davon auszugehen, dass sowohl inter- als auch intramolekular mehr als eine Verknüpfungsstelle zugänglich ist (siehe 4.2.2). Nach Reduktion ergibt sich somit eine Vielzahl kleiner und größerer Bruchstücke beginnend bei zirka 3 kDa. Diese theoretische Variabilität der Molmassen konnte bislang nur mithilfe der SDS-PAGE (Abbildung 4-36) belegt werden und ist dennoch ein sicheres Argument für die in Bande 13 besonders auffälligen Schlieren oberhalb der Molmassenbande des HEWL.

**Tabelle 4-15:** Fragmente und zugehörige molare Massen des enzymatisch verknüpften HEWL nach Säurehydrolyse und Reduktion, zur Vereinfachung unter der theoretischen Annahme das nur ein intermolekulares Isopeptid gebildet wird; „†“ Isopeptidbindungen; angelehnt an *Frare et al. (2004)*

Enzymatisch vernetztes HEWL (reduziert)					
Fragment	[kDa]	Fragment	[kDa]	Fragment	[kDa]
1-17 † 120-129	3,2	102-129 † 102-129	6,4	1-18 † 49-100	7,7
1-18 † 120-129	3,3	102-129 † 120-129	4,4	1-18 † 49-101	7,8
1-17 † 102-129	5,2	1-17 † 49-87	5,7	1-18 † 53-100	7,3
1-18 † 102-129	5,3	1-17 † 53-87	5,3	1-18 † 53-101	7,5
1-47 † 120-129	3,9	1-17 † 49-100	7,6	102-129 † 49-87	7,0
1-47 † 102-129	5,9	1-17 † 49-101	7,7	102-129 † 53-87	6,6
1-17 † 19-47	5,3	1-17 † 53-100	7,2	102-129 † 49-100	8,8
1-18 † 19-47	5,4	1-17 † 53-101	7,4	102-129 † 49-101	8,9
1-47 † 19-47	6,0	1-18 † 49-87	5,8	102-129 † 53-100	8,4
1-47 † 1-47	5,3	1-18 † 53-87	5,5	102-129 † 53-101	8,6

Auch ist interessant, dass die über Isopeptide vernetzten Fragmente überwiegend im nicht amyloidogenen Teil des Proteins positioniert sind. Lediglich ein Glutaminrest (Gln<sub>57</sub>) liegt im fibrillären Bereich. Dieses Glutaminende kann jedoch mit Lys<sub>13</sub> oder Lys<sub>116</sub> vernetzt werden, so dass die Aggregationsneigung unter Bildung dieser Isopeptide mit steigender Oligomerisierung abnimmt. Diese Hypothese korreliert gut mit den Beobachtungen und den mittels TEM verifizierten Messungen. Außerdem zeigt das Elektropherogramm, dass bestimmte kleinere Peptide (<14,3 kDa) bevorzugt gebildet werden, da diskrete Banden detektiert werden konnten. Eine exakte Zuordnung allein basierend auf der mittels SDS-PAGE ermittelten Molmasse, ist aufgrund der Vielzahl der möglichen Kombinationen jedoch nicht möglich.

Die erste Hypothese, dass die Vorbehandlung mit Hochdruck zur Ausbildung amyloider oder präamyloider Strukturen führt, konnte aufgrund der dargestellten Ergebnisse nicht bestätigt werden. Auch direkt nach Hochdruckbehandlung wurden keine Fibrillen identifiziert. Weiterhin zeigten vernetzte Proben zum Zeitpunkt Null (0 h), vor saurer Inkubation keine amyloiden Eigenschaften. Die angesprochene Auffaltung bei Hochdruckeinwirkung, welche enzymatisch über kovalente Bindungen stabilisiert wird, beruht auf einem anderen Mechanismus als die

partielle, saure Auffaltung, die der Fibrillierung vorausgeht. Durch Hemmung des partiell aufgefalteten Intermediates oder sterischer Abdeckung amyloidogener Bereiche wurde die Fibrillierung nachweislich verzögert. Es konnte daher die zweite, gegensätzliche Theorie experimentell bestätigt werden.

Fibrillen sind hoch geordnete Strukturen bestehend aus unverzweigten Strängen. Die Beobachtung, dass HEWL-Oligomere nicht zu Protofibrillen oder fibrillären Fragmenten umgesetzt werden, bestätigt, dass die Tertiärstruktur der Vernetzungsprodukte keinen derart organisierten Aufbau aufweist. Abhängig vom Vernetzungsgrad ist eine Fibrillierung jedoch nicht grundsätzlich auszuschließen. Mit ausreichendem Monomeranteil und nur geringfügig oligomerisierten Proben (LMW) kann zum Beispiel das mittels saurer Hydrolyse freigesetzte Peptidfragment (49-100 oder 53-101, siehe Tabelle 4-14a, *Frare et al., 2004*) fibrilliert werden. Die Fibrillen von enzymatisch oligomerisiertem und nicht-vernetztem HEWL unterscheiden sich aber in ihrer Form (TEM-Aufnahmen, Abbildung 4-35). Mit zunehmendem Vernetzungsgrad werden die Fibrillen kürzer und interagieren weniger. Wechselwirkungen zwischen den kurzen Fibrillen der hoch vernetzten Probe (HMW) scheinen nicht zu bestehen. Die aus unbehandeltem Lysozym gebildeten Fibrillen hingegen assoziieren zu größeren Aggregaten. Die größere Oberfläche der Fibrillen könnte stärkere hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Strängen ermöglichen, vergleichbar mit den Eigenschaften der homologen Reihe der Fettsäuren.

Außerdem scheint trotz zunehmender Hydrolyse-Empfindlichkeit der HMW-Proben die Isopeptidbindung selbst von der sauren Inkubation nicht angegriffen zu werden. Die Proteinschlieren auf dem Elektrophoresegel (vor allem auf Bahn 13, Abbildung 4-36) sind bis in höher molekulare Regionen detektierbar. Dies wäre nach umfassender Hydrolyse der oligomeren Verknüpfungsstelle nicht mehr der Fall.

### **4.4.5 Antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen**

Natives unbehandeltes Lysozym ist, wie im Kapitel 2.1.1 beschrieben, in der Lage die Zellmembran grampositiver Mikroorganismen lytisch zu spalten. Verschiedene Literaturstellen lassen jedoch auf eine veränderte antimikrobielle Aktivität modifizierter Lysozymmoleküle schließen (Abschnitt 2.1.3, Tabelle 2-2). Zudem deuten die Ergebnisse des Aktivitätstests im Kapitel 4.4.1 auf eine Veränderung der Lysewirkung der enzymatisch oligomerisierten Proben hin. Ferner weisen die Arbeiten im Arbeitskreis von *Lesnierowski* erstmals eine antibakterielle Aktivität für Dimer-haltige Proben (max. 30% Anteil an der Gesamtprobe) aus thermisch modifiziertem Lysozym gegen gramnegative Mikroorganismen nach (*Lesnierowski et al., 2001* und *Cegielska-Radziejewska et al., 2009*). Die in der vorliegenden Arbeit mittels mTGase und simultaner Hochdruckbehandlung vernetzten Lysozymproben (Tabelle 4-16) wurden unter anderem im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von *Bahr (2012)* an insgesamt drei grampositiven (*Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus lactis*) und zwei gramnegativen Bakterienstämmen (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*) getestet, um ihre antibakterielle Wirkung zu untersuchen. Die Auswahl der Bakterien erfolgte hinsichtlich ihres

pathogenen Potentials, ihrer Handhabbarkeit, sowie nicht zuletzt aufgrund ihrer Relevanz für die Lebensmittelproduktion bzw. den -verderb. Es wurden der Agardiffusionsassay (Hemmhoftest) und der bakterielle Hemmtest eingesetzt (Durchführung in Abschnitt: 3.7.10.1 und 3.7.10.2).

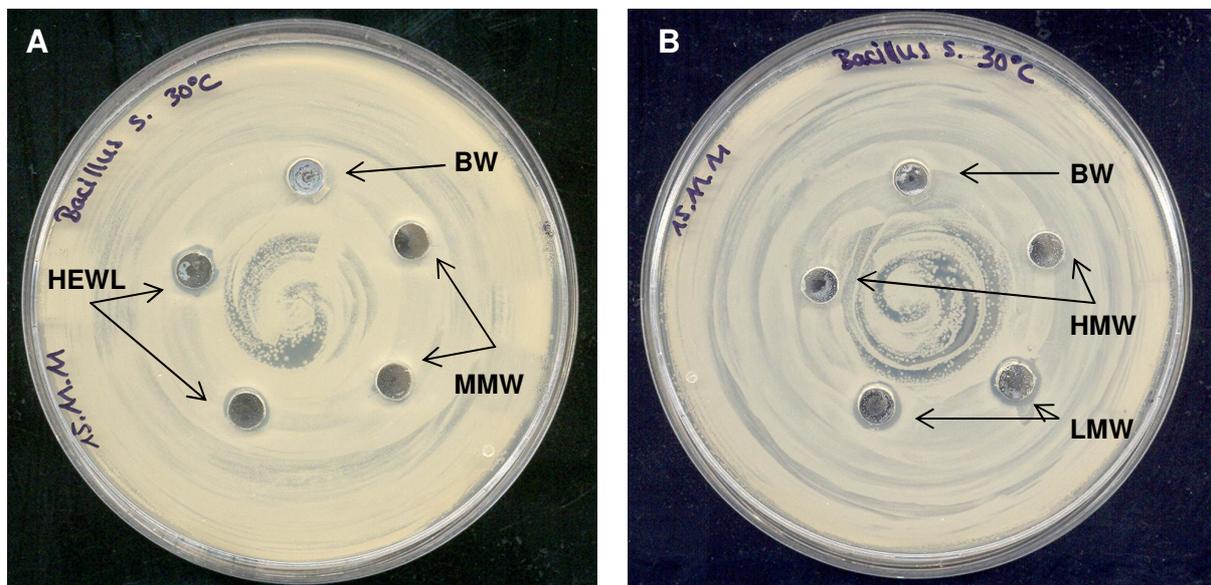
**Tabelle 4-16:** Übersicht der für mikrobiologische Untersuchungen eingesetzten Proben mit dem aufsummierten Oligomergehalt in [%]

Proben	Vernetzungsgrad [%]
unvernetzte Probe (HEWL)	0
geringer Vernetzungsgrad (LMW)	$19,8 \pm 1,6$
mittlerer Vernetzungsgrad (MMW)	$34,9 \pm 3,5$
hoher Vernetzungsgrad (HMW)	$73,7 \pm 2,3$

### Hemmhoftest

Der für ein erstes Screening genutzte Hemmhoftest basiert auf der Diffusionsfähigkeit der zu untersuchenden Proben. Hierfür werden diese in ausgestanzte Löcher eines mit dem Mikroorganismus beimpften Agars überführt und die resultierenden Hemmhöfe nach Inkubation ausgemessen. Die Proben selbst wurden direkt in flüssiger Form eingesetzt. Diffundierten sie dabei in den Agar und hemmten das Wachstum des enthaltenen Mikroorganismus wurde ein Hemmhof sichtbar.

Für das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis* sind Platten der Hemmhoftests in der Abbildung 4-38 dargestellt.



**Abbildung 4-38:** Hemmhoftest exemplarisch an *Bacillus subtilis* (grampositiv) mit je 0,4%igen (w/v) Proben auf HNB-Agar

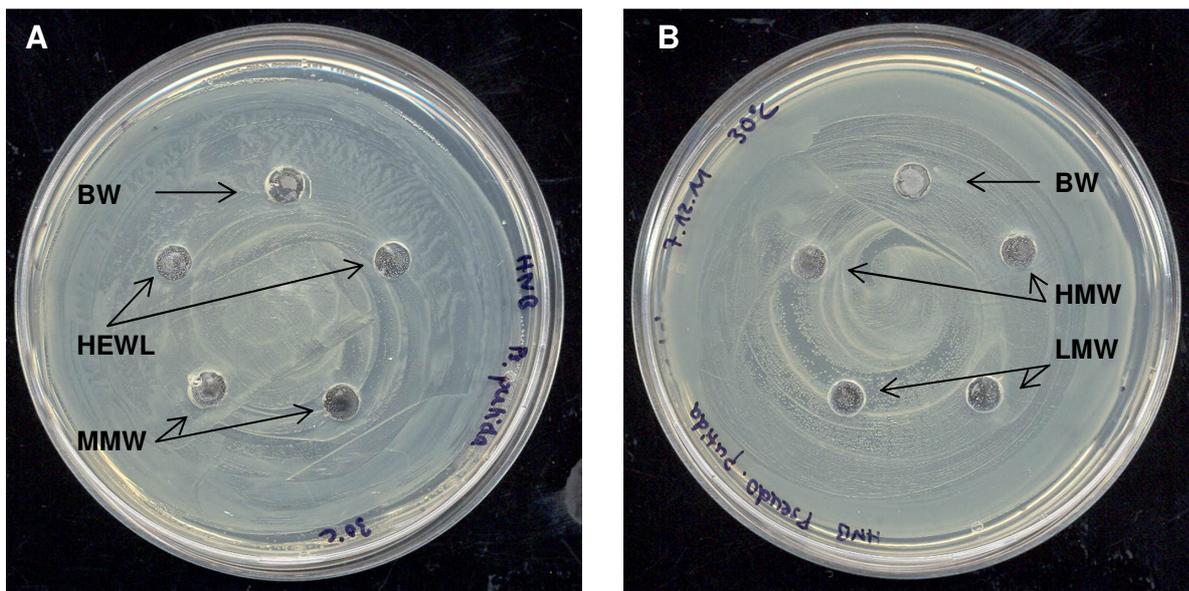
**A** - mit BW (Wasser), HEWL (2x links) und MMW (2x rechts); **B** - mit BW (Wasser), HMW (2x mitte) und LMW (2x unten)

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden 0,4%ige (w/v) Proben auf Hefe-Nähr-Boullion-Agar (HNB-Agar) untersucht. Das HEWL sowie die niedrig vernetzte Probe (LMW) weisen bei der gewählten Konzentration einen Hemmhofradius von 1 mm und somit eine schwache Hemmung auf (Abbildung 4-38 A/B). Der enthaltene Monomergehalt von ca. 80% in der LMW-Probe ist scheinbar ausreichend, um den empfindlichen *Bacillus subtilis* vergleichbar zum HEWL zu hemmen. Die MMW- und HMW-Proben zeigen keine Hemmung.

Weiterhin ist eine Eintrübung des HNB- und CB-Agars rund um die Stanzlöcher für die Proben aufgefallen, gut zu erkennen unter anderem in Abbildung 4-39 A. Diese stimmt zwar nicht mit den gemessenen Hemmhöfen überein, gibt aber Wechselwirkungen der Proben mit den Bestandteilen des Agars wieder und kann somit als Maß für die Fähigkeit zur Diffusion bei der Beurteilung der Proben herangezogen werden. Demnach sind besonders HEWL und niedrig oligomerisierte Proben (LMW) in der Lage, eine Trübung des Agars zu induzieren, welche jedoch etwas weiter als die antimikrobielle Wirkung in den Agar hinein reichen. Die Hemmhöfe des HEWL und der LMW-Probe zeigten bei niedrigeren Konzentrationen von 0,2%, 0,1% und 0,05% eine kontinuierlicher abnehmende Inhibierung des Bakterienwachstums des *Bacillus subtilis*, welche jedoch insgesamt sehr schwach ausfiel. Für den grampositiven *Streptococcus lactis* konnte nach Anzucht auf Corynebakteriumagar-Platten (CBA-Platten) keine Hemmung durch diese Proben beobachtet werden. Das Wachstum des Keims auf CBA verlief zudem langsamer und erschwerte eine reproduzierbare Aussage.

Die gramnegativen Bakterien *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida* zeigten weder für Proben mit hohem Monomergehalt (HEWL oder LMW) noch für die stark oligomerisierten Proben (MMW oder HMW) eine antimikrobielle Aktivität. Es konnten keinerlei Hemmhöfe erfasst werden (Abbildung 4-39 A und B).

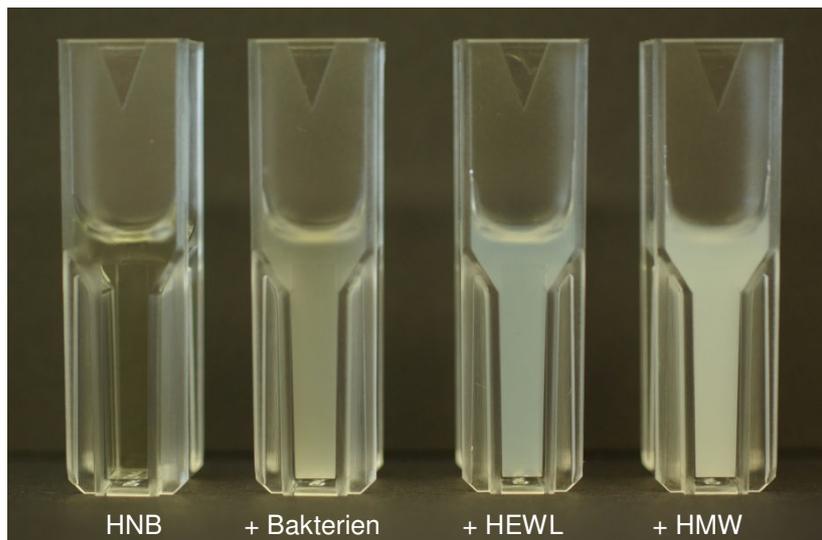


**Abbildung 4-39:** Hemmhoftest exemplarisch an *Pseudomonas putida* (gramnegativ) mit je 0,4%igen (w/v) Proben auf HNB-Agar

**A** - mit BW (Wasser), HEWL (2x mitte) und MMW (2x unten); **B** - mit BW (Wasser), HMW (2x mitte) und LMW (2x unten)

### Bakterieller Hemmtest (Trübungstest)

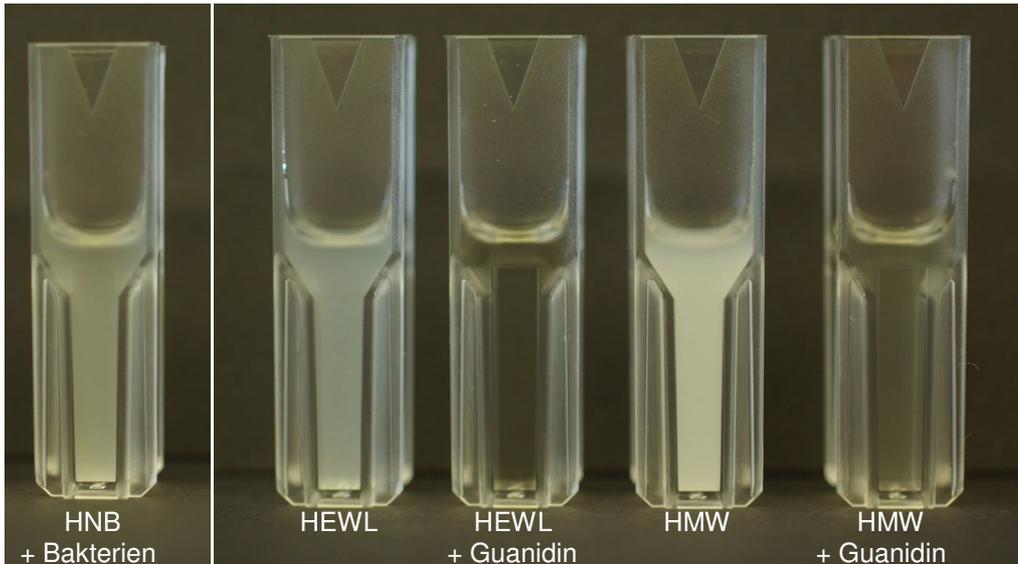
Da die Auswertung der Hemmhofstests visuell erfolgte und die Ergebnisse nur erste, orientierende Daten lieferten, erfolgte im Anschluss der Trübungstest, welcher sich durch eine sensitivere UV-Messung auszeichnet. Hierzu wurden die Absorptions-Konzentrations-Kurvenverläufe der Proben aufgenommen. Nachteilig wirkte sich jedoch der sich bildende Niederschlag nach Probenzugabe aus. Diese Trübungen entstanden bereits nach kurzer Zeit ohne Bakterienzugabe und störten die Messungen erheblich (Abbildung 4-40).



**Abbildung 4-40:** Abgebildet ist reines HNB-Medium nachfolgend mit Bakterienzusatz, nur HEWL- bzw. HMW-Probenzugabe (je 0,1%, w/v) (v.l.n.r)

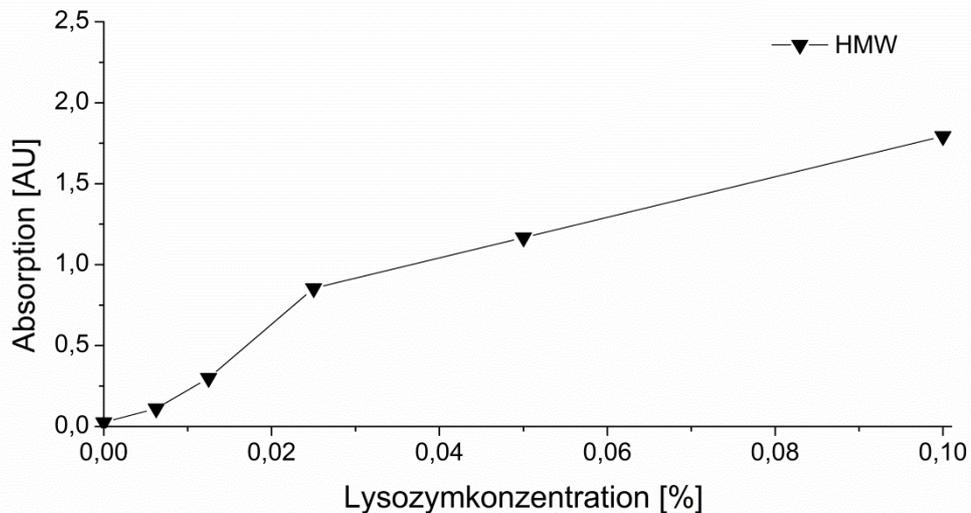
Daher wurde versucht, die Ursache der Ausflockung zu identifizieren und wenn möglich zu umgehen. Der Test unterschiedlichster Medien führte zu der Erkenntnis, dass vor allem die Extrakte (Fleisch- und Hefeextrakt) eine Interaktion mit der Probe verursachen. Mittels SDS-PAGE des abgetrennten Niederschlags konnte gezeigt werden, dass das Lysozym aggregiert und ausflockt. Dies war besonders unerwünscht, da die Probe somit nicht mehr in Lösung vorlag und nicht länger mit den Mikroorganismen interagieren konnte. Es wurden insgesamt 16 Medien untersucht. So zum Beispiel ein Glucosebouillon, eine hydrolysierte Caseinatlösung und das Müller-Hinton-Medium. Keines der getesteten Medien führte jedoch zu einer klaren Lösung. Bei den Minimalmedien verlangsamte sich das Wachstum der Bakterien zudem signifikant.

Folglich wurde den zu untersuchenden Lösungen nach Inkubation mit den Mikroorganismen eine hoch konzentrierte Guanidinhydrochloridlösung (15 mol/l) zugesetzt, um nicht bakterien-assoziierte Trübungen zu lösen. So waren die Proben über einen Zeitraum von 5 min stabil und konnten vermessen werden. Anschließend sank die Absorption aufgrund der antibakteriellen Wirkung des Guanidinhydrochlorids. Ein Zusatz von Beginn an war aufgrund der bakteriziden Wirkung nicht möglich.



**Abbildung 4-41:** HNB-Medium mit Bakterienzusatz und Probelösungen des Trübungsassays nach 16 h Inkubation im Schüttler mit Bakterienzusatz und Proteinzugabe (0,1%), in der zweiten und dritten Küvette ist HEWL in den letzteren beiden Probengefäßen HMW zugegeben, Guanidinhydrochlorid wurde der 3. und 5. Küvette zugefügt (die 2. und 4. Küvette wurde mit Wasser versetzt); Zugabe von Guanidinhydrochlorid zur Bakteriensuspension über 5 min stabil - nicht abgebildet

Gleichwohl die Proben in einem Schüttler über Nacht inkubiert wurden und somit ein Kontakt zwischen den Bakterien und den Proteinen gegeben war, blieb unklar in wieweit die teilweise aggregierte Probe noch einen logarithmischen Hemmverlauf aufwies, oder welchen Einfluss die Denaturierung besaß. Zudem war mit zunehmendem Vernetzungsgrad (HMW) das Guanidinhydrochlorid nicht mehr zur vollständigen Lösung des Niederschlags in der Lage (Abbildung 4-41, 4. Küvette). Dies konnte anhand der zum Teil stark erhöhten Absorptionmesswerte der Blindwertuntersuchungen mit einer HMW-Probe ohne Mikroorganismenzugabe verdeutlicht werden (Abbildung 4-42).

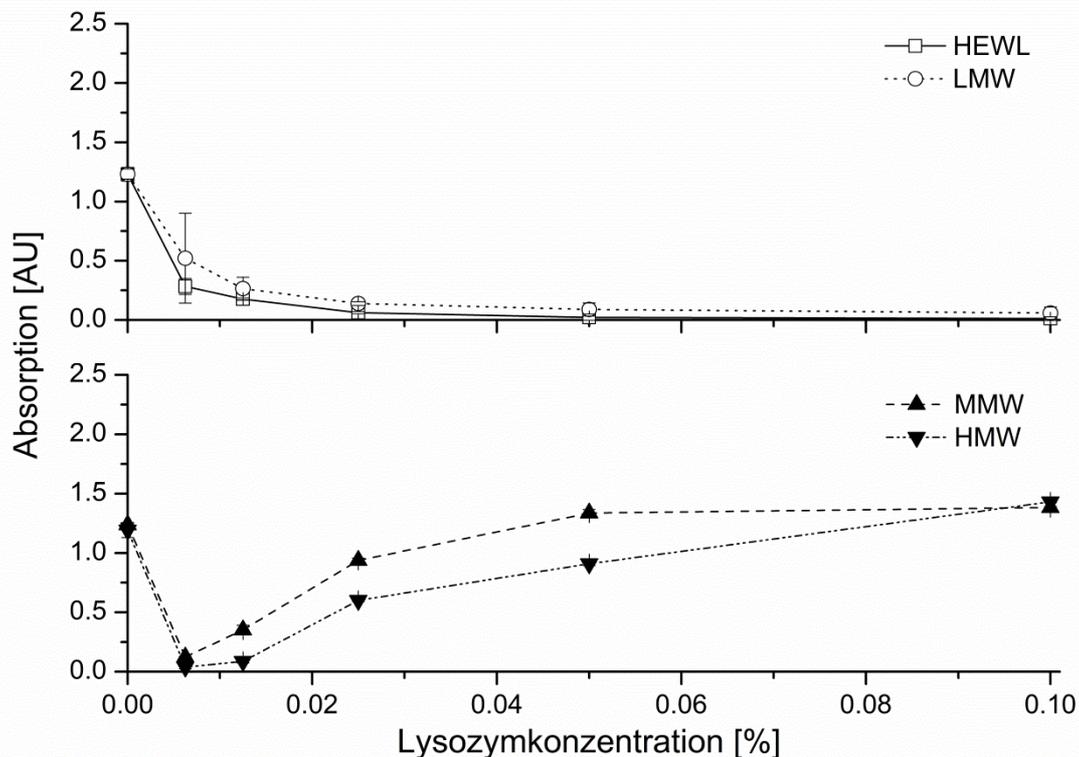


**Abbildung 4-42:** Trübungstest der hoch vernetzten Probe (HMW) in HNB-Medium ohne Bakterienzusatz, Inkubation über Nacht (Trübungsblindwert),  $\lambda = 600 \text{ nm}$ , 14 h bei 30 °C im Schüttler

Die zu Beginn gebildeten Aggregate wurden mit zunehmender Zeit stabilisiert, allerdings wurde diese Beobachtung nur für HMW- und MMW-Proben gemacht. Leicht vernetztes Lysozym (LMW) und unbehandeltes HEWL konnten nach Inkubation mit Guanidinhydrochlorid noch vollständig in Lösung gebracht werden.

Messwerte der Trübungsmessung sind in Abbildung 4-43 und Abbildung 4-44 exemplarisch für *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*, als grampositive und -negative Vertreter abgebildet. Die Ergebnisse des *Streptococcus lactis* (grampositiv) und *Pseudomonas putida* (gramnegativ) zeigen einen vergleichbaren Verlauf und werden daher nicht gesondert dargestellt.

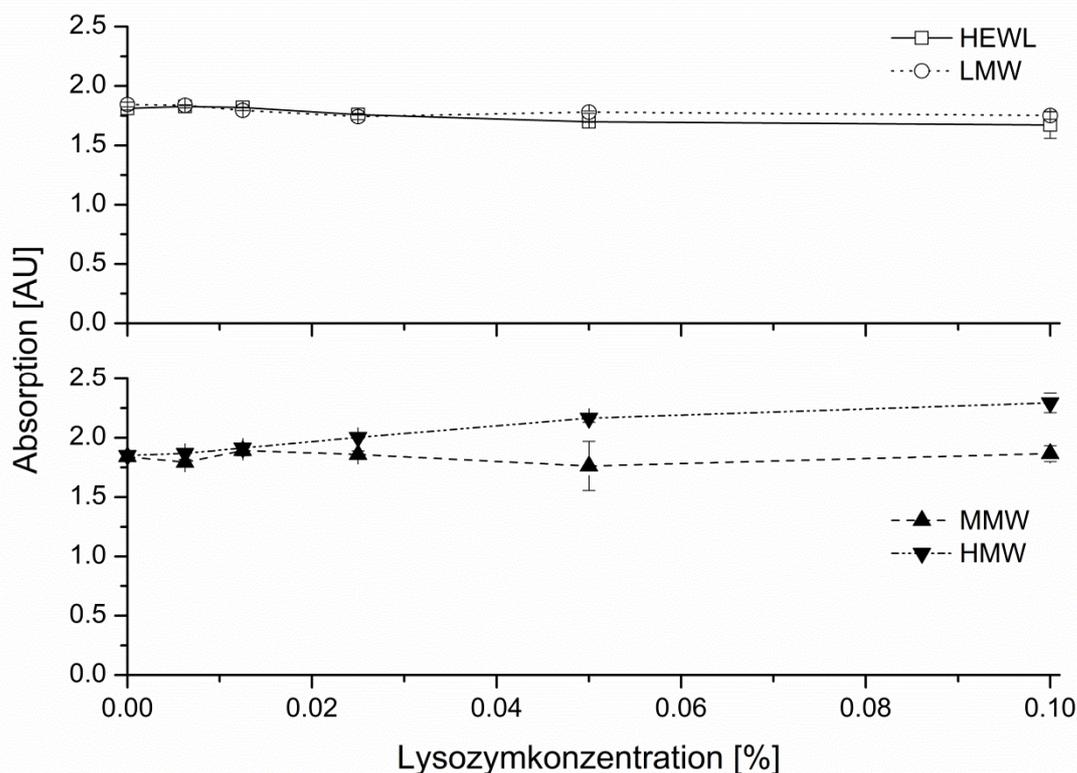
Das unbehandelte HEWL zeigt den für grampositive Vertreter (*Bacillus subtilis* und *Streptococcus lactis*) typischen Hemmungsverlauf eines antimikrobiellen Wirkstoffes. Die durch Bakterien hervorgerufene Absorption sinkt mit steigender Probenkonzentration (Abbildung 4-43, oben). Für *Bacillus subtilis* wird dabei eine etwas höhere Empfindlichkeit als für *Streptococcus lactis* detektiert. Eine vollständige Hemmung für *Bacillus subtilis* ist schon mit einer Konzentration von 0,025% Probe (Absorption:  $0,063 \pm 0,009$ ) erreicht. Im Gegensatz dazu besitzt *Streptococcus lactis* bei dieser Konzentration eine Absorption von  $0,546 \pm 0,007$ , welche dem Ausgangswert bei 0% Proteinzugabe entspricht. Erwartungsgemäß konnte gegenüber *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida* als Vertreter der gramnegativen Bakterien keine Hemmung durch HEWL nachgewiesen werden.



**Abbildung 4-43:** Trübungstest für *Bacillus subtilis* in Konzentrationen von 0,1-0,00625%, gemittelte Werte mit Standardabweichung, über photometrische Messung bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$ , Inkubation: 14h bei  $30^\circ\text{C}$

Die Ergebnisse der schwach oligomerisierten Probe (LMW, Vernetzungsgrad: 19,8%) zeigten für beide grampositive Testorganismen analoge Hemmungsverläufe. Wie beim unbehandelten

HEWL reagierte der Bacillus-Keim sensitiver. Der verbleibende, relativ hohe Monomeranteil des HEWL war offenbar ausreichend für eine Inhibierung, gleichwohl die Kurven etwas schwächer als beim unbehandelten HEWL abfielen (Abbildung 4-43). So ist die Absorption bei 0,025% LMW-Probe noch  $0,139 \pm 0,016$  und damit etwa doppelt so hoch wie beim HEWL. Dies hebt die Sensitivität der Messmethode im Vergleich zum Hemmhoftest hervor. Die von *Cegielska-Radziejewska et al. (2009)* publizierte Wirksamkeit für HEWL-Proben mit einem Dimergehalt von bis zu 37% aus thermisch mit  $H_2O_2$  modifizierten Proben gegenüber *Escherichia coli* konnte für enzymatisch modifizierte LMW-Proben nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4-44). Auch das gramnegative Bakterium *Pseudomonas putida* wurde nicht durch LMW inaktiviert. Begründet wird der Unterschied durch die gewählte Methode der Oligomerisierung und die abweichenden Vernetzungsprodukte. Mithilfe der mTGase entstehen im nieder-oligomerisierten Bereich nicht nur Di- sondern auch Tri- und Tetramere. Diese werden über kovalente Isopeptidbrücken verknüpft und generieren somit andere Proteinoberflächen und -eigenschaften als die thermisch erzeugten HEWL-Dimere von *Cegielska-Radziejewska et al. (2009)*.

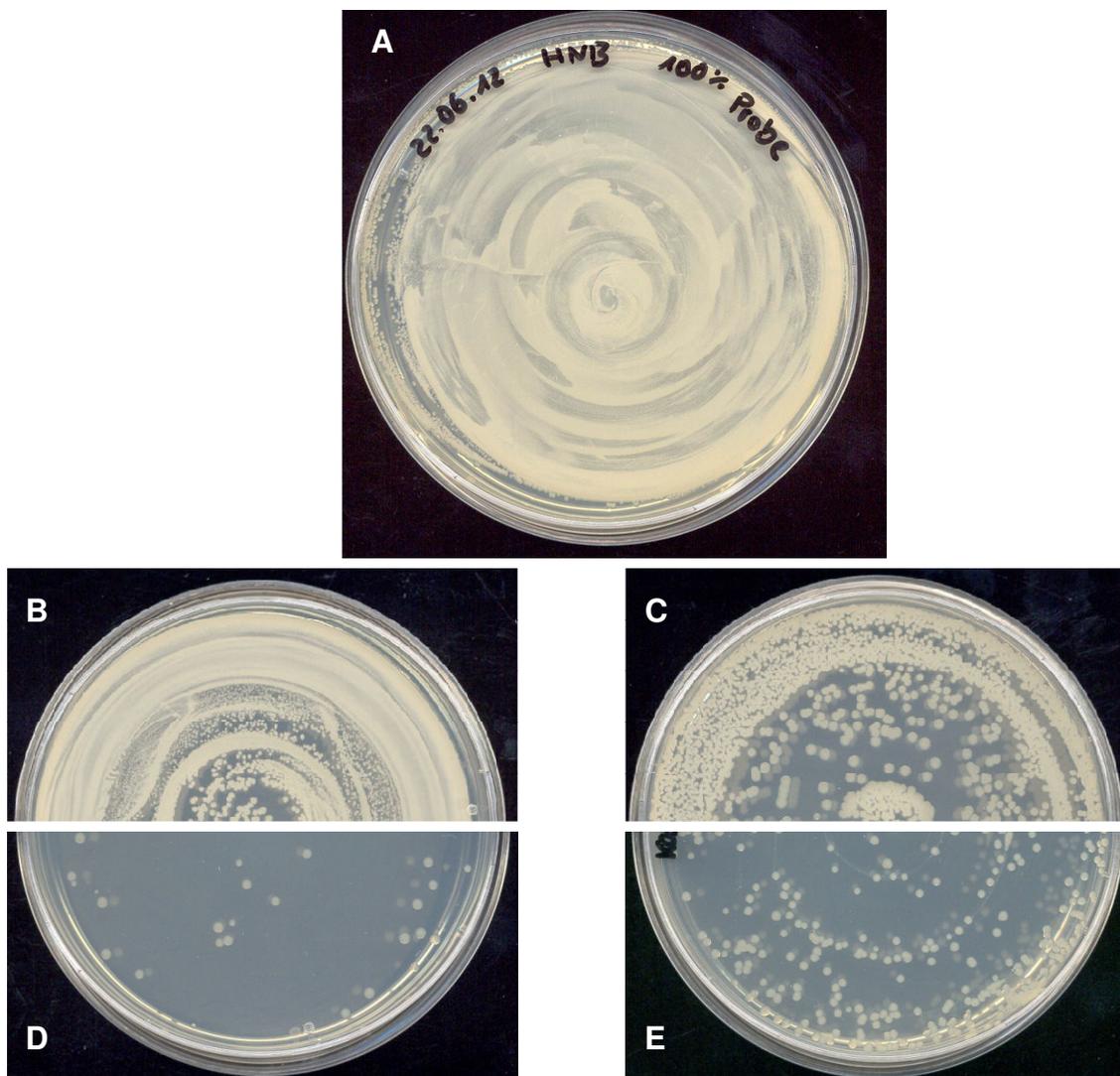


**Abbildung 4-44:** Trübungstest für *Escherichia coli* in Konzentrationen von 0,1-0,00625%, gemittelte Werte mit Standardabweichung, über photometrische Messung bei  $\lambda = 600$  nm, Inkubation: 14h bei  $30^\circ\text{C}$

Die Proben mit höherem Vernetzungsgrad, sowohl die mittel oligomerisierte (MMW, Vernetzungsgrad: 34,9%) als auch die hoch vernetzte Probe (HMW, Vernetzung von 73,7%), weisen hingegen einen ungewöhnlichen Hemmkurvenverlauf für *Bacillus subtilis* auf (Abbildung 4-43, unten).

Bei niedrigen Konzentrationen von 0,00625 und 0,0125% MMW oder HMW sind Hemmungen mit Absorptionen unterhalb der Ausgangs-Bakterientrübung detektierbar, wobei mit steigender

Konzentration die Wechselwirkungen der Probe mit dem Medium und die daraus entstandenen Trübungen die Messwerte dominieren (vgl. Blindwert ohne Bakteriumszusatz: Abbildung 4-42). Visuell unterschieden sich die Trübungen der Probenlösung mit hohen Proteinkonzentrationen jedoch von den Bakterientrübungen, die sehr fein verteilt vorlagen, weshalb auch hier bei sedimentierendem, groben Niederschlag eine antimikrobielle Wirkung denkbar wäre. Bei 0,00625% ist der Einfluss dieser Probenwechselwirkung mit dem HNB-Medium noch sehr gering, so dass eine Absorption von  $0,124 \pm 0,006$  für die MMW-Probe im Vergleich zu  $0,284 \pm 0,067$  des unvernetzten HEWL gemessen werden konnte. Damit zeigten die höher vernetzten Proben (MMW und HMW) eine stärkere antimikrobielle Aktivität bei geringen Konzentrationen als das unbehandelte HEWL. Die These einer antimikrobiellen Wirksamkeit, trotz hoher Absorptionswerte wurde durch das Ausplattieren der beimpften Lösungen mit *Bacillus subtilis* nach erfolgtem Trübungsassay überprüft (Abbildung 4-45).



**Abbildung 4-45:** Ausplattierte *Bacillus-subtilis*-Lösungen auf HNB-Agar nach Inkubation im Trübungsassay ohne und mit Proteinzusatz (100 µl, ohne Guanidinhydrochloridzusatz)

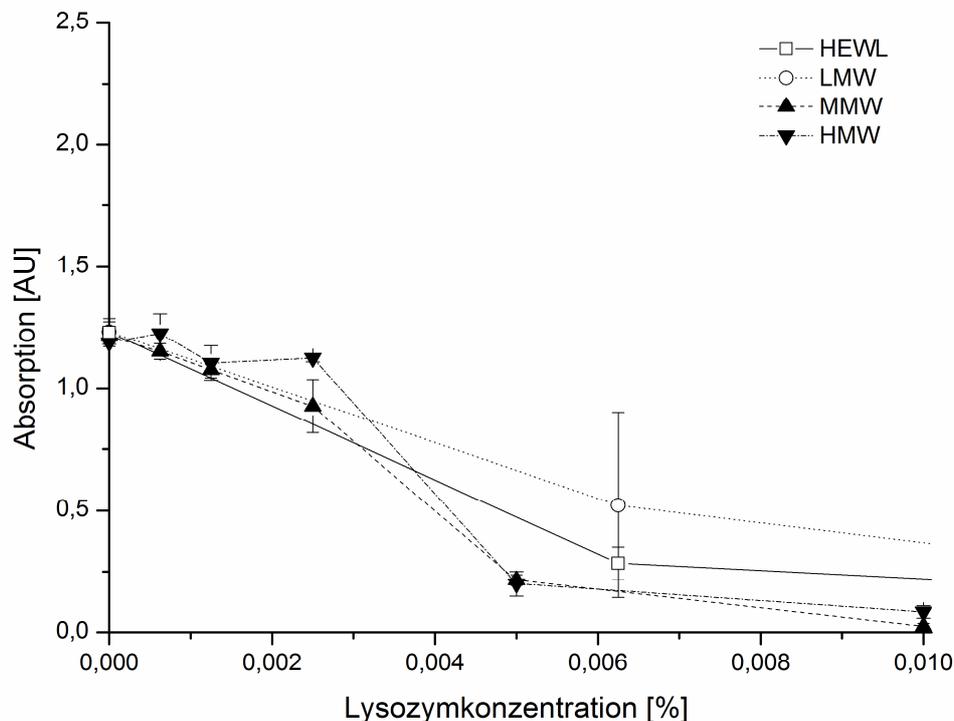
A - Positivkontrolle (kein Lysozymzusatz); B - 0,00625% HEWL; C - 0,00625% HMW; D - 0,1% HEWL; E - 0,1% HMW

Es ist zu sehen, dass die verbleibenden, lebensfähigen Bakterien in der Probenlösung mit HEWL mit zunehmender Proteinkonzentration signifikant abnehmen (Abbildung 4-45 B und D). Dies bestätigt die in Abbildung 4-43 dargestellten Kurvenverläufe. Auch für die HMW-Proben konnte ein solcher Trend gezeigt werden (Abbildung 4-45 C und D), so dass die oligomerisierte Probe einen nachweislich bakteriostatischen Effekt auf *Bacillus subtilis* besitzt und die detektierte Trübung bei 0,1% Proteinanteil nicht von den Bakterien her rührt. Beim Vergleich der vernetzten (HMW) mit der unvernetzten Probe wird zudem deutlich, dass bei niedrigeren Konzentrationen (0,00625%) das enzymatisch modifizierte Protein eine stärkere Hemmung des Bakterienwachstums verursacht. Dieser Unterschied wird mit zunehmender Konzentration schwächer, und bei einer Konzentration von 0,1% ist HEWL das potentere Agens.

Der weniger empfindliche grampositive Keim, *Streptococcus lactis*, sowie die gramnegativen Vertreter *Escherichia coli* (Abbildung 4-44) und *Pseudomonas putida* zeigten im Unterschied dazu keinen derart auffälligen Kurvenverlauf und die Absorptionen verblieben auf einem konstanten Niveau (zirka 1,60 - 1,80 AU) bzw. nahmen aufgrund der verstärkten Aggregation bei höheren Probenzusätzen leicht zu. Die Stagnation oder schwache Zunahme der Absorption entsprach dabei nicht der theoretischen Summe aus Bakterientrübung und Eigenrübung der Probe ohne Bakterienzusatz, sondern blieb wesentlich unter dieser zurück. Am Beispiel einer 0,1%igen HMW-Probe, welche bei der Blindwertmessung eine Absorption von 1,793 aufweist und für *Escherichia coli*, welcher einen 0%-Probe-Bakterienmesswert von 1,850 besitzt, kann nach Inkubation von HMW-Probe mit Bakterienkultur eine Absorption von nur 2,293 ermittelt werden (Diskrepanz von zirka 0,3). Neben den gegebenen, physiologischen Schwankungen eines natürlichen Systems und den erhöhten Absorptionen könnte die fehlende Differenz ein Hinweis auf eine sehr schwache Hemmung der Bakterien sein. Dieses Phänomen war sowohl für MMW- als auch HMW-Proben zu beobachten, jedoch konnte diese Vermutung mit den Trübungstests nicht klar bestätigt werden. Hierfür wurden die inkubierten Proben ohne Guanidinhydrochloridzugabe nach 16stündiger Inkubation wie in Abbildung 4-45 auf HNB-Agar ausplattiert. Die Untersuchung auf lebensfähige Mikroorganismen zeigte sowohl für das unbehandelte HEWL als auch für die HMW-Probe bei den Konzentrationen von 0,00625 und 0,1% keine visuell wahrnehmbaren Unterschiede zur 100% *E.coli*-Probe. Da das gramnegative Bakterium keine diskreten Kolonien wie der *Bacillus-subtilis*-Keim bildet, sondern eher schmiert, konnten zuvor vermutete, geringe Hemmungen so nicht erfasst werden.

Da *Streptococcus lactis* und *Bacillus subtilis* kein einheitliches Bild lieferten wurde neben den erläuterten vier Mikroorganismen zudem *Bacillus sphaericus* (grampositiv) mit den vier Lysozymproben inkubiert. Der *Bacillus sphaericus* verhielt sich bei HEWL und LMW analog zu den bereits untersuchten beiden grampositiven Mikroorganismen. Die MMW-Probe zeigte keine konzentrationsabhängige Absorptionsveränderung, hier verblieben die Messwerte auch nach Probenzugabe auf dem Niveau des Bakterienstartwertes. Doch die stark oligomerisierte Probe wies abermals den zuvor bei *Bacillus subtilis* beobachteten Absorptionsverlauf (Abbildung 4-43, unten) auf. Die Abnahme der Absorptionen bei geringen Konzentrationen unter den Bakterienausgangswert und die anschließende Absorptionserhöhung über den Bakteriennullwert ist folglich den untersuchten *Bacillus*-Arten gemein. Für die Konzentrationen von 0,00625 - 0,0125% HMW ist eine deutliche Hemmung der Bakterien beobachtbar ( $0,040 \pm 0,017$  AU bei 0,00625%), jedoch ist diese nicht so stark ausgeprägt wie bei dem

sensibleren Keim *Bacillus subtilis* ( $0,366 \pm 0,071$  AU bei 0,00625%). Die Wirkung ist folglich nicht nur vom Gramverhalten sondern auch vom Keim an sich abhängig. Um den Verlauf der antimikrobiellen Wirkung der höher oligomerisierten Proben näher zu charakterisieren, wurden im Folgenden Trübungstests der MMW- und HMW-Probe mit dem sensitivsten Keim, *Bacillus subtilis* in geringeren Konzentrationen (0,01 - 0,625‰) durchgeführt (Abbildung 4-46). Zum Vergleich sind HEWL und die LMW-Probe mit eingezeichnet (vgl. Abbildung 4-43).



**Abbildung 4-46:** Trübungstest *Bacillus subtilis* mit HEWL, LMW-, MMW- und HMW-Probe in Konzentrationen von 0,625‰ - 0,01%, nach ca. 14 h Inkubation bei 30 °C, photometrische Bestimmung bei 600 nm

Für beide hochvernetzte Proben (MMW und HMW) kann ein analoger Wirkungsverlauf detektiert werden (Abbildung 4-46). Die Messwerte der beiden hohen Konzentrationen (0,0625 und 0,0125%) gleichen den bereits ermittelten Absorptionen in Abbildung 4-43, unten. Interessanterweise nimmt die Hemmung erst bei Probenkonzentrationen unter 0,005% ab, so dass ein Kurvenverlauf resultiert, welcher einer Inaktivierung entspricht. Trübungen aufgrund von Wechselwirkungen der Proben mit den Extrakten im Medium können bei den geringen Gehalten ausgeschlossen werden. Basierend auf diesen Daten ist davon auszugehen, dass es sich bei den höher oligomerisierten Proben um effektive antibakterielle Wirkstoffe gegen *Bacillus*-Arten handelt, die Aggregation bei höheren Konzentrationen aber keinen klassischen Hemmkurvenverlauf ermöglichen.

Die enzymatisch vernetzten Proben besitzen nachweislich andere Eigenschaften als das unbehandelte HEWL. So ist die Oberflächenhydrophobität stark erhöht (Abschnitt 4.4.2) sowie die lytische Aktivität proportional zum Vernetzungsgrad herabgesetzt (siehe Kapitel 4.4.1). Dennoch vermögen MMW- und HMW-Proben eine starke Inhibierung der *Bacillus*-Bakterien zu induzieren. Daher wird ein alternativer Mechanismus für die Interaktion der Proben mit den

Mikroorganismen gesucht. Aktive Transportsysteme für derart hochmolekulare, globuläre Proteine sind nicht bekannt und allein die Größe der Moleküle schließt eine passive Diffusion ins Innere der Zellen aus, so dass es zu Wechselwirkungen der hydrophoberen Proben mit der Zellmembran oder Zellwand kommen muss. Die erhöhte Interaktion der hoch vernetzten Proben (MMW und HMW) mit proteinhaltigen Stoffen in Lösung im Vergleich zu HEWL oder LMW wurde auch für die bakterienfreien Lösungen beobachtet, hier führte die Zugabe von Guanidinhydrochlorid nach Inkubation im Schüttler zu keiner Auflösung der Aggregate mehr (Abbildung 4-42). Möglich sind chelatierende, komplexbildende, indirekte Effekte, bei denen für die Bakterien essentielle Metallionen abgefangen werden. Zudem ist denkbar, dass die Morphologie des *Bacillus subtilis* als stäbchenförmiges Bakterium mit 2 - 3 µm Größe durch sein Inhalt-Oberflächenverhältnis anfälliger ist, als beispielsweise die des *Streptococcus lactis*, welches ein kugelförmiges Volumen aufweist (Durchmesser: 0,5 - 1 µm).

Im Review von *Masschalck und Michiels (2003)* werden verschiedene Theorien eines Lyse- oder Interaktions-Mechanismus dargelegt. Unter anderem wird eine Hemmung über physikalische Wechselwirkungen mit den Bakterien beschrieben (*Salton, 1957*). Hierbei agglutiniert das Protein aufgrund der negativ geladenen, in der Zellwand des Bakteriums verankerten Seitenketten mit diesem. Die extrazellulär, senkrecht zur Zellwand befindlichen hydrophilen Seitenketten bewirken eine Vergrößerung der Oberfläche (*Birdsell et al., 1975*) und würden ausreichend Angriffsfläche (54% Teichonsäureanteil im Trockengewicht in der Zellwand, *Graham und Beveridge, 1993*) für das Lysozym bieten. Neben schwankenden Gehalten an Teichonsäure bei Milchsäurebakterien (*Miettinen et al., 1996*) enthält die Zellwand von *Streptococcus lactis* auch Lipoteichonsäure (*Bolotin et al., 2001*), so dass eine größere Resistenz gegenüber den Proben im Vergleich zu *Bacillus*, auf sterische Abschirmung und weniger starke Wechselwirkungen zurückzuführen sein könnte. Auch *Ibrahim et al. (2001)* suchte nach alternativen Wirkmechanismen, die nicht mit der lytischen Aktivität zusammenhängen. Versuche mit hitzedenaturiertem und deaktiviertem HEWL (Substitution der aktiven Asparaginsäure im katalytischen Zentrum) weisen auf einen nichtlytischen Mechanismus gegenüber *Bacillus subtilis* hin. Den direkten oder indirekten Einfluss des Lysozyms auf den Zell-Zell-Kontakt des *Streptococcus mutans* untersuchte *Iacono et al. (1985)*. Sie stellten fest, dass die Bakterien von Lysozym in menschlichem Speichel „entkettet“, jedoch nicht gehemmt werden. Dies deutet ebenfalls auf eine oberflächenbasierte Interaktion des Proteins mit dem Bakterium hin. Neuere Studien befassen sich mit der natürlichen antimikrobiellen Wirksamkeit von Peptiden. Diese variieren stark in Struktur und Kettenlänge, besitzen meist eine kationische Ladung und einen hohen Anteil hydrophober Einheiten (*Menzel, 2011* und *Nguyen et al., 2011*). Sie sind in der Lage die Bakterienzellmembran zu stören und stellen so im Körper einen wichtigen, natürlichen Schutzmechanismus gegen Bakterien dar.

Zusammenfassend ist zu vermerken, dass eine antibakterielle Wirksamkeit unabhängig vom lytischen Mechanismus basierend auf den Literaturdaten möglich, der genaue Reaktionsverlauf jedoch nicht untersucht ist. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse lassen eine physikalisch-chemische Wechselwirkung der Probenmoleküle mit den Bakterien vermuten. Diese führt bei ausgewählten Mikroorganismen (Bacillus-Arten) zur vollständigen Inaktivierung. Hierbei weisen die stark vernetzten Lysozymoligomere (MMW und HMW) in niedrigen Konzentrationen eine bessere Wirksamkeit als das unbehandelte Monomer (HEWL) auf.

Weitere Hinweise auf den Interaktionsmechanismus könnte eine genaue Untersuchung der Zusammensetzung des Mediums nach abgeschlossener Inkubation auf vorhandene Stoffwechselprodukte geben. Unterschiede im Nährstoffverbrauch von ungehindert wachsenden oder mit modifiziertem Lysozym versetzten Bakterien sind zu erwarten.

#### 4.5 Vergleichende Untersuchungen an dem strukturanalogen Protein $\alpha$ -Lactalbumin

Neben dem Hühnereiweißlysozym wurden erste orientierende Studien mit dem bovinen  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA) durchgeführt. Untersucht werden sollte der Grad der enzymatischen Oligomerisierung nach Normal- bzw. Hochdruckinkubation unter vergleichbaren Inkubationsbedingungen (Tabelle 4-5). Aufgrund der evolutionsbiologischen Verwandtschaft beider Proteine und ihrem darauf basierendem strukturell vergleichbaren Aufbau war das Verhalten von  $\alpha$ -LA nach enzymatische Inkubation mit mTGase unter Atmosphären- und Hochdruck von Interesse. Hierfür wurde das  $\alpha$ -LA zunächst aus dem Molkenproteinisolat der Firma ARLA isoliert (*Maillart und Ribadeau-Dumas, 1988*).  $\alpha$ -LA ist ein calciumbindendes Protein. Das Metallion beeinflusst die native Konformation des Moleküls (holo-Form) und ist nachweislich für die Stabilität des Proteins verantwortlich (*Hendrix et al., 2000*). Die Isolierung wurde daher ohne und mit Calciumzusatz (0,5%  $\text{CaCl}_2$ , w/v) durchgeführt.

Nach SDS-PAGE wurde der Gehalt von  $\alpha$ -LA im Proteinanteil des Isolates ohne Calciumzusatz (-Ca) zu  $88,0 \pm 1,4\%$  und mit Calciumzusatz (+Ca) zu  $86,1 \pm 2,3\%$  Reinheit bestimmt. Es verblieb ein geringer Teil  $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -LG) im Isolat. Anschließend wurden die Calciumgehalte ermittelt (Tabelle 4-17).

**Tabelle 4-17:** Übersicht der verschieden isolierten  $\alpha$ -Lactalbuminproben; Calciumgehalte  $\pm$  Standardabweichung [%], Anteil des  $\alpha$ -Lactalbumins am Protein [%] ermittelt über SDS-PAGE und abgeschätztes Stoffmengenverhältnis unter Einbezug eines gemittelten Restwassergehaltes von 5% in gefriergetrockneten Proben (Karl-Fischer-Titration, Kapitel 3.7.1)

Probe	Abkürzung	Anteil $\alpha$ -LA am Protein [%]	Calciumgehalt	Stoffmengenverhältnis $\alpha$ -LA : Ca
Molkenproteinisolat	ARLA	50,9	0,5*	1 : 4
$\alpha$ -Lactalbumin-Standard (kommerziell)	$\alpha$ -LA-Standard	100,0	$3,07 \pm 0,03^{**}$	1 : 12
$\alpha$ -Lactalbumin ohne Calciumzusatz	$\alpha$ -LA -Ca	88,0	$0,173 \pm 0,003^{**}$	1 : 0,71
$\alpha$ -Lactalbumin mit Calciumzusatz	$\alpha$ -LA +Ca	86,1	$13,5 \pm 0,3^{***}$	1: 86
$\alpha$ -Lactalbumin ohne Calciumzusatz, 2fach dialysiert	$\alpha$ -LA -Ca, 2x	88,0	$0,068 \pm 0,004^{**}$	1 : 0,28
$\alpha$ -Lactalbumin mit Calciumzusatz, 2fach dialysiert	$\alpha$ -LA +Ca, 2x	86,1	$0,674 \pm 0,013^{**}$	1 : 2,86

\*Datasheet ARLA, \*\*ICP-OES, \*\*\*calciumsensitive Elektrode Cu ISE; Daten aus der Wissenschaftlichen Abschlussarbeit von *Bahr (2012)*

## 4 Ergebnisse und Diskussion

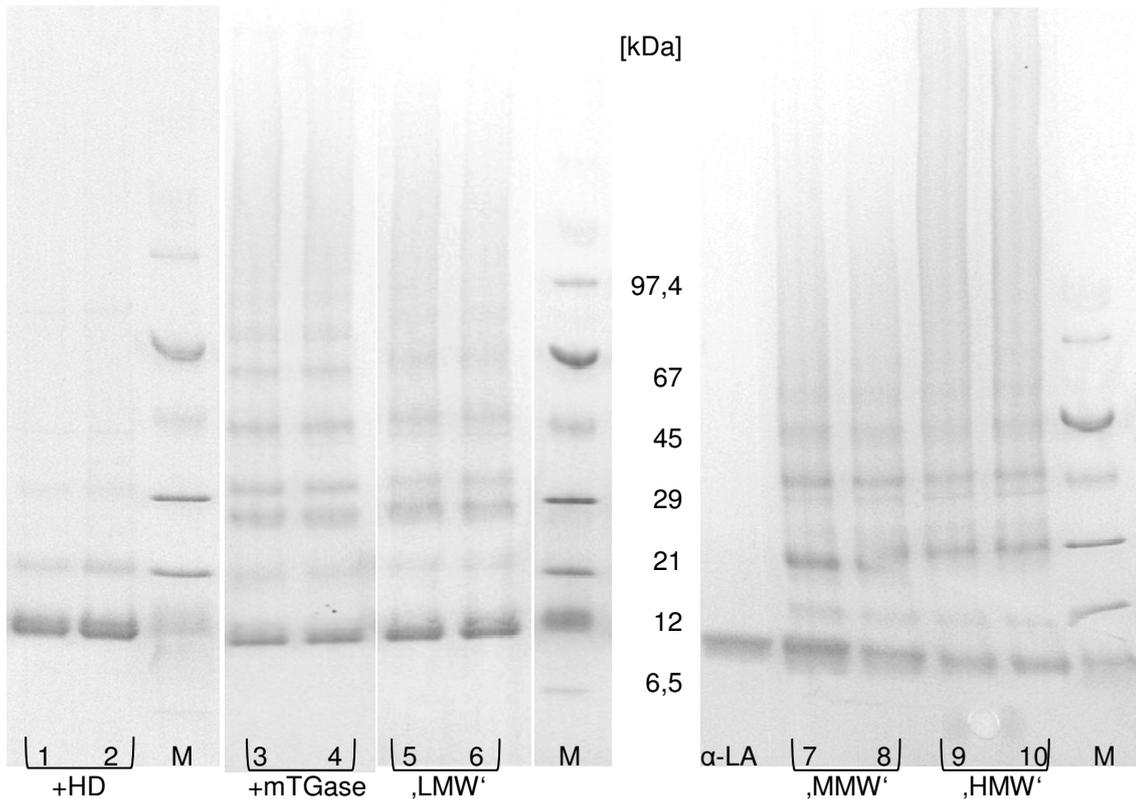
Der Calciumgehalt des Molkenproteinisolats wurde dem Datenblatt der Firma ARLA entnommen. Der kommerziell erworbene  $\alpha$ -Lactalbumin-Standard, das isolierte  $\alpha$ -LA ohne Calciumzusatz ( $\alpha$ -LA -Ca) als auch die zweifach dialysierten Proben (Tabelle 4-17, 2x) wurden von Frau Schulze im Institut für Bioanalytik an der TU Dresden mittels ICP-OES (inductively-coupled-plasma optical-emission-spectroscopy) analysiert. Der hohe Calciumgehalt der isolierten Probe mit Calciumzusatz ( $\alpha$ -LA +Ca) wurde über eine calciumsensitive Elektrode (Cu ISE) ermittelt. Weiterhin aufgeführt ist das, aus der Protein- und Calciumbestimmung abgeschätzte, Stoffmengenverhältnis. Bei einem Stoffmengenverhältnis des  $\alpha$ -LA zu Calcium von 1:1 steht theoretisch jedem Proteinmolekül ein Calciumion zur Verfügung. Das heißt es liegt vollständig in der holo-Form vor. Die Ausgangssubstanz, das Molkenproteinisolat besaß einen geringen Überschuss an Calcium gegenüber dem  $\alpha$ -LA, so dass dieses sich komplett in der stabileren holo-Form befinden sollte.

Nach Dialyse der Isolate gegen destilliertes Wasser sank der Calciumgehalt in den Proben stark ab, und nicht mehr jedem Proteinmolekül stand ein Calciumion zur Verfügung. Die holo-Form geht in die weniger stabile apo-Form (ohne Ca-Bindung) über. Das isolierte  $\alpha$ -LA -Ca (1:0,71) besteht zu etwa einem Drittel aus der apo-Form, wohingegen der Calciumgehalt der zweifach dialysierten Probe auf 0,068% absinkt, was etwa noch einem Drittel holo-Form entspricht (1:0,28). Das nach Calciumzusatz isolierte  $\alpha$ -LA weist aufgrund der Gefriertrocknung und der damit verbundenen Konzentrierung einen sehr hohen Überschuss an Calcium (1:86) auf. Dieses Isolat und die daraus generierten Proben ( $\alpha$ -LA +Ca, 2x, Stoffmengenverhältnis 1:2,86) liegen vollständig in der holo-Form vor.

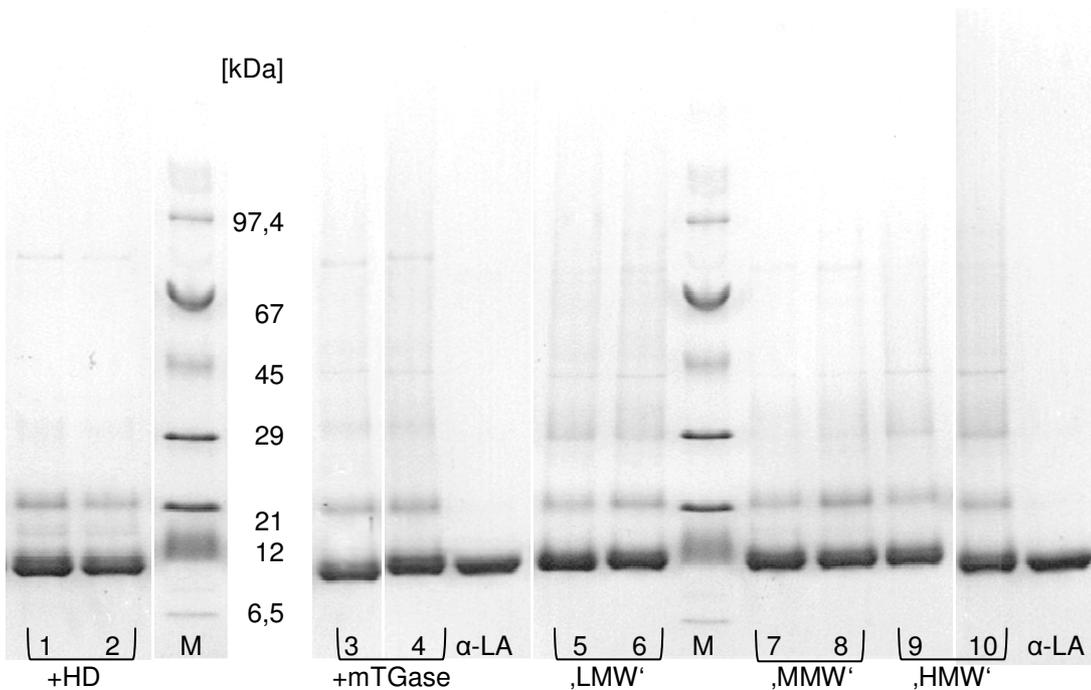
Um das Vernetzungspotential von  $\alpha$ -LA mit dem von HEWL zu vergleichen, wurden die in Tabelle 4-17 dargestellten, nicht zusätzlich dialysierten Präparate mit/ohne Ca-Zusatz analog dem Lysozym in Abbildung 4-1 unter HD mit mTGase behandelt. Tabelle 4-18 fasst die Inkubationsbedingungen und resultierenden Vernetzungsraten zusammen. Abbildung 4-47 und Abbildung 4-48 zeigen die dabei gebildeten Oligomere nach elektrophoretischer Trennung.

**Tabelle 4-18:** Übersicht der  $\alpha$ -Lactalbumin-Vernetzungsparameter für die Proteinisolate ohne und mit Calcium (-/+Ca), siehe auch SDS-PAGE Abbildung 4-47 und Abbildung 4-48, Probenbezeichnung in Anlehnung an HEWL-Proben (vgl. Tabelle 4-5)

Proben-Bezeichnung	$\alpha$ -LA [%]	mTGase-Aktivität [U/g Protein]	Temperatur [°C]	Druck [MPa]	Vernetzungsgrad	
					-Ca [%]	+Ca [%]
$\alpha$ -LA	2	-	40	0,1	6,6 ± 0,5	5,6 ± 0,6
$\alpha$ -LA + HD	2	-	40	600	2,0 ± 0,5	5,2 ± 0,6
$\alpha$ -LA+ mTGase	2	40	40	0,1	72,0 ± 0,6	39,4 ± 1,7
$\alpha$ -LA + mTGase + HD ( $\alpha$ -LA-LMW)	2	40	40	600	67,2 ± 3,5	40,3 ± 4,7
, $\alpha$ -LA-MMW'	3	50	60	600	70,8 ± 0,3	34,5 ± 2,2
, $\alpha$ -LA-HMW'	3	160	60	600	69,0 ± 1,3	40,9 ± 4,7



**Abbildung 4-47:** SDS-PAGE der  $\alpha$ -LA-Proben **ohne** Ca-Zusatz (vgl. Tabelle 4-18, Spuren von  $\beta$ -LG in allen aufgearbeiteten Proben); + HD (Bahn 1/2); + mTGase (Bahn 3/4); ,LMW' (Bahn 5/6, + mTGase + HD, entspricht LMW bei HEWL); ,MMW' (Bahn 7/8, 3%, 50 U, 30 min, 60°C bei 600 MPa) und ,HMW' (Bahn 9/10, 3%, 160 U, 30 min, 60°C bei 600 MPa); M - Marker;  $\alpha$ -LA - Standard, unbehandeltes  $\alpha$ -Lactalbumin



**Abbildung 4-48:** SDS-PAGE der  $\alpha$ -LA-Proben **mit** Ca-Zusatz (vgl. Tabelle 4-18, Spuren von  $\beta$ -LG in allen aufgearbeiteten Proben); + HD (Bahn 1/2); + mTGase (Bahn 3/4); ,LMW' (Bahn 5/6, + mTGase + HD, entspricht LMW bei HEWL); ,MMW' (Bahn 7/8, 3%, 50 U, 30 min, 60°C bei 600 MPa) und ,HMW' (Bahn 9/10, 3%, 160 U, 30 min, 60°C bei 600 MPa); M - Marker;  $\alpha$ -LA - Standard, unbehandeltes  $\alpha$ -Lactalbumin

Das Monomer des  $\alpha$ -LA ist mit einer Molmasse von theoretisch 13,8 kDa bei zirka 11 kDa im SDS-Gel auf vergleichbarer Höhe wie das HEWL zu detektieren. Die  $\alpha$ -LA-Proben, die ohne Zugabe von mikrobieller Transglutaminase bei 40°C mit und ohne Hochdruck untersucht wurden, weisen einen geringen Anteil von vernetztem Protein von 2,0 bis 6,6% auf. Diese geringe Vernetzung trat unabhängig vom Calciumgehalt auf und kann auf die nach der Inkubation stattfindende thermische Deaktivierung der mTGase bei 85°C über der Denaturierungstemperatur des  $\alpha$ -LA zurückgeführt werden (Abbildung 4-47 und Abbildung 4-48, Bahn 1 und 2).

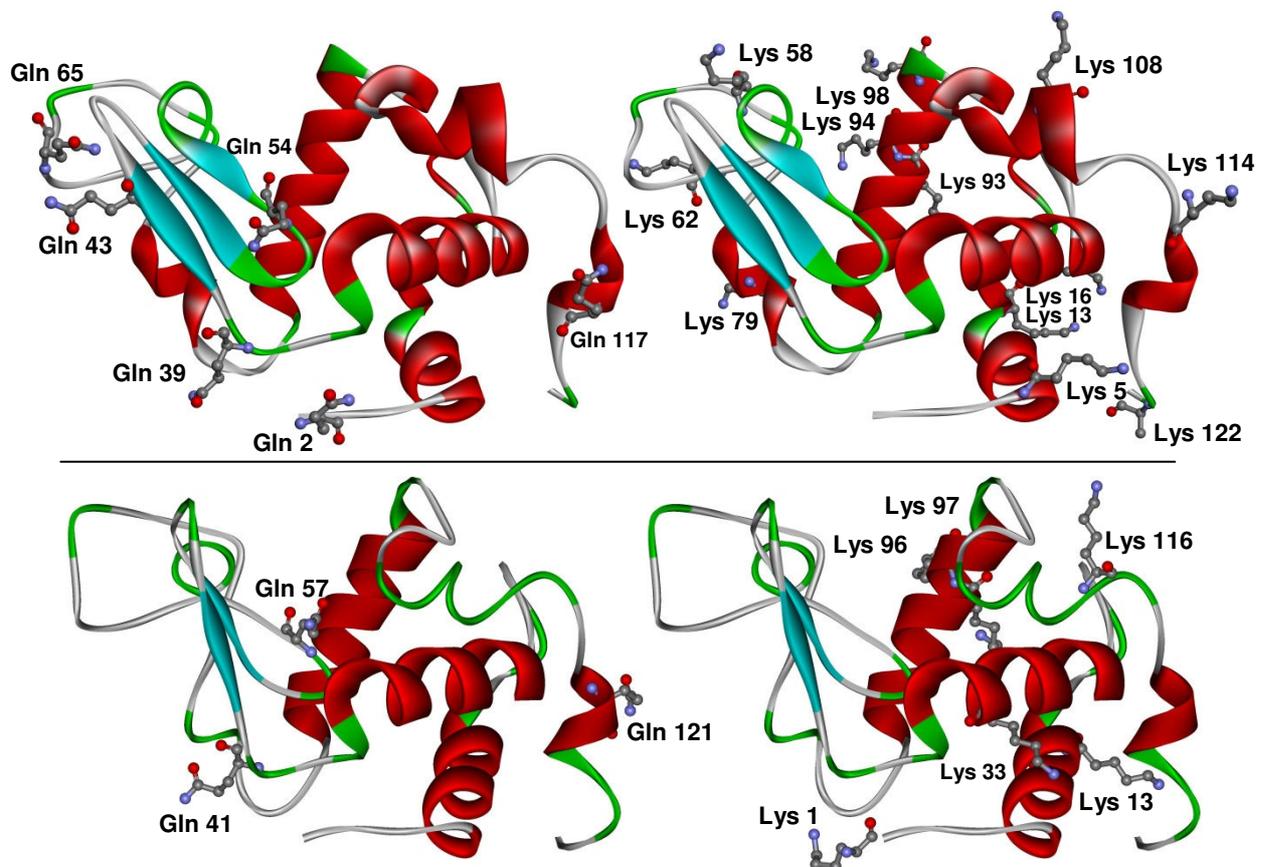
Die Inkubation der Proben ohne Calciumzusatz mit mTGase resultiert in Abhängigkeit von den Inkubationsparametern in Oligomerisierungsraten von 67,2 bis 72,0%. Die entsprechenden Elektropherogramme weisen jeweils fünf Banden auf, welche auf die Vernetzung mit mTGase zurückzuführen sind (Abbildung 4-47, Bahn 3 - 10). Durch die Verunreinigung der Präparate mit  $\beta$ -LG resultieren jedoch nicht nur „reine“  $\alpha$ -LA-Oligomere sondern auch gemischte Isopeptide aus beiden Proteinen. So befinden sich beispielsweise kurz über- und unterhalb der Markerbande bei 29,0 kDa die mutmaßlichen Vernetzungsbanden des  $\alpha$ -LA-Dimers ( $M = 28,4$  kDa) und des Heterooligomers  $\alpha$ -LA/ $\beta$ -LG-Dimers ( $M = 32,2$  kDa). Die tatsächlich ermittelten Molmassen von  $27,7 \pm 0,6$  kDa bzw.  $31,2 \pm 0,2$  kDa sind dabei etwas geringer als die theoretisch berechneten. Dies korreliert jedoch mit den Ergebnissen der Molmassen des Lysozyms (Kapitel 4.1, Tabelle 4-1). Das  $\alpha$ -LA ist somit im Gegensatz zum Lysozym schon bei Atmosphärendruck als Substrat für die mTGase verfügbar. Bestätigende Untersuchungen zur enzymatischen Vernetzung dieses Proteins bei Normaldruck wurden von *Gauche et al. (2008)* publiziert.

Weiterhin ist das im Isolat verbliebene  $\beta$ -LG im Vergleich zum  $\alpha$ -LA resistenter gegenüber der Vernetzung durch mTGase (*Rodriguez-Nogales et al., 2006; Lauber et al., 2001b*) und reagiert enzymatisch nur erhitzt oder unter Hochdruckinkubation zum Homooligomer. Die detektierten Vernetzungsbanden, die durch Einbindung dieses Proteins hervorgerufen wurden, sind hier jedoch auch ohne Hochdruckbehandlung zu sehen. Folglich besitzt das  $\beta$ -LG mindestens eine schon bei Atmosphärendruck zugängliche reaktive Stelle (Lys- oder Gln-Rest) für die mTGase, welche nicht für eine Homooligomerisierung ausreicht, aber mit  $\alpha$ -LA interagieren kann. Die Glutaminreste des  $\beta$ -LG stehen erst unter Hochdruck für eine Vernetzung zur Verfügung (*Partschfeld et al., 2007a*), so dass die Verknüpfung von  $\beta$ -LG mit  $\alpha$ -LA bei Normaldruck über einen Lysinrest des  $\beta$ -LG vollzogen werden muss.  $\alpha$ -LA hingegen besitzt nur einen Glutaminrest in  $\beta$ -Faltblattstruktur (Kapitel 2.1.4, Abbildung 2-6). Die anderen theoretisch zur Reaktion befähigten Aminosäurereste finden sich in  $\alpha$ -Helices oder in ungeordneten Strukturen. Damit sind sie für das Enzym viel besser zugänglich. Die von *Lee et al. (2002)* identifizierten reaktiven Reste des  $\alpha$ -LA liegen an diesen für die mTGase erreichbaren Stellen (Lys<sub>5</sub>:  $\alpha$ -Helix, Gln<sub>54</sub>: turn), damit ist eine Vernetzung zum Homooligomer bei Normaldruck möglich. Neben den diskreten Banden im SDS-Gel treten auch Proteinschlieren oberhalb von 67 kDa auf, welche auf die Anwesenheit von größeren, nicht mehr klar voneinander trennbaren Proteinoligomeren hinweisen.

Einen relativ konstanten, wenngleich niedrigeren Vernetzungsgrad mit 34,5 bis 40,9% weisen auch die  $\alpha$ -LA-Proben mit Calciumzusatz ( $\alpha$ -LA +Ca) und mTGase auf (Tabelle 4-18, Abbildung

4-48). Mutmaßlich besitzt die mTGase hier eine herabgesetzte Affinität, da die reaktiven Aminosäuren des Proteins, welches bei Anwesenheit des Metallions eine kompaktere Konformation (holo-Form) aufweist, erschwert erreichbar sind. So befindet sich nur ein Teil der reaktiven Lysin- und Glutaminreste an der Oberfläche des  $\alpha$ -LA-Moleküls und ein anderer Teil in der Nähe des Calciumions. Ein weiterer Grund, warum die Vernetzung im Vergleich zu HEWL geringer ist, könnte der hohe Calciumgehalt in Lösung sein (Stoffmengenverhältnis: 1:86). Der deutliche Überschuss an Ionen stellt eine Behinderung der mTGase über elektrostatische Wechselwirkungen dar, indem die positiv geladenen Calciumionen mit dem negativ geladenen Cystein an Position 64 im katalytischen Zentrum des Enzyms interagieren und eine Bindung des Substrats verhindern. Weitere Untersuchungen zur Reaktion der Calciumsensitiven TGasen könnten sich an dieser Stelle anschließen.

*Nieuwenhuizen et al.*, (2003) untersuchten die Modifizierung von apo- und holo- $\alpha$ -LA und stellten wie *Hendrix et al.* (2000) fest, dass die apo-Form des Proteins thermisch instabiler ist als die durch Calcium stabilisierte Form. Die Oligomerisierung der 2%-Probe ohne Calciumzusatz mit 40 U mTGase ( $\alpha$ -LA -Ca) beträgt 72,6% bei 40°C und ist ca. ein Drittel höher als die 2%-Probe mit 40 U mTGase ( $\alpha$ -LA +Ca, 39,4% Vernetzung), was den ungefähren Gehalt an apo-Protein von zirka 29% (Molmassenverhältnis 1:0,71, Tabelle 4-17) widerspiegelt. Somit scheinen die reaktiven Stellen bei der apo-Form signifikant besser für das Enzym zugänglich zu sein.



**Abbildung 4-49:** Vergleich der Positionen von Glutamin- (links) und Lysinresten (rechts) in  $\alpha$ -LA (oben, pdb-File 1f6r) und HEWL (unten, pdb-File 1e8l) (Discovery Studio Visualizer, v2.5, Accelrys Software)

Unabhängig von der beinhalteten Menge an Calcium scheint der Einsatz von höheren Protein- und Enzymkonzentrationen (Tabelle 4-18, Proben: ‚ $\alpha$ -LA-MMW‘ und ‚ $\alpha$ -LA-HMW‘) zu keiner Steigerung des Vernetzungsgrades bei 600 MPa zu führen. Die Oligomerisierung des Proteins fand bereits bei 0,1 MPa statt, wobei die Struktur des  $\alpha$ -LA während der zügigen Probenvorbereitung durch Isopeptidausbildungen zum Teil stabilisiert wurde. Bei HD-Inkubation war dann keine komplette Auffaltung des Moleküls mehr gegeben. Dieser Einflussparameter war damit geringer als beim HEWL, welches ausschließlich unter HD ab 400 MPa oligomerisierte.

Die Ursachen für ein derart abweichendes Oligomerisierungsverhalten liegen vor allem in der Anzahl und Position der reaktiven AS begründet (Abbildung 4-49). Mit 12 Lysin- und 6 Glutaminenden besitzt  $\alpha$ -LA doppelt so viele theoretische Reaktionsorte wie das evolutionsbiologisch verwandte HEWL, welches eine analoge Sekundärstruktur und ebenfalls vier Disulfidbrücken aufweist.

Interessanterweise ist  $\alpha$ -LA wie HEWL ebenfalls in der Lage *in vitro* amyloide Fibrillen zu bilden (Trexler und Nilsson, 2007). Dies geschieht mittels Proteolyse im sauren Milieu über einen aufgefalteten Zustand unter Verlust der Ca-Bindung, ähnlichen den Inkubationsbedingungen des HEWL (Goers et al., 2002). So zeigt sich, dass die beiden Proteine viele Eigenschaften teilen. Spannend ist daher die Untersuchung des Einflusses der Oligomerisierung auf die Struktur-Funktions-Beziehung des Proteins  $\alpha$ -LA, welche an dieser Stelle noch aussteht.

### **4.6 Orientierende Untersuchungen zur nicht-enzymatischen In-Vakuo-Thermo-Vernetzung von HEWL und ausgesuchten Proteinen**

Die Richtung der Vernetzung für Proteinstrukturen ist bei enzymatisch katalysierten Reaktionen sehr spezifisch. Abhängig von den zur Verfügung stehenden, potentiell reaktiven Aminosäuren hingegen gilt dies für die In-Vakuo-Thermo-Vernetzungen nicht. Daher dienen die folgenden Ergebnisse einem generellen Vergleich der Eigenschaften der Reaktionspartner über die Vernetzungsintensitäten sowie der Reaktionsorte zwischen enzymatisch und nicht-enzymatisch oligomerisierten Proben.

Die zu untersuchenden Proteine oder Proteinmischungen HEWL,  $\beta$ -Casein ( $\beta$ -CN) und ein Molkenproteinisolat wurden nach der Methode von Simons et al. (2002), Yaghoubi et al. (2007) und Maroufi et al. (2008), welche unter anderem bereits das HEWL untersuchten, vernetzt. Die nicht-enzymatische Oligomerisierung der trockenen Proben erfolgte thermisch bei einer bestimmten Temperatur, einem zuvor in Lösung definierten pH-Wert, evakuiert oder nicht evakuiert und über einen festgelegten Zeitraum. Dieser Reaktionsablauf wurde zyklisch wiederholt. Die optimalen Reaktionsparameter und die Vernetzungen, auch Cross-Links (engl.: Quervernetzung) genannt, wurden mithilfe einer SDS-PAGE detektiert.

Bei der nicht-enzymatischen In-Vakuo-Thermo-Vernetzung werden über Kondensationsreaktionen kovalente Isopeptide gebildet, welche ohne Einbau chemischer Gruppen unter

Abspaltung von Wasser oder Ammoniak entstehen. Es wird daher in der Fachliteratur auch von Zero-Length Cross-Links (ZLCL) gesprochen. Bei den eingesetzten Milchproteinen ist vor allem die Bildung der Isopeptide N- $\epsilon$ -( $\beta$ -Aspartyl-)Lysin (Asp\_Lys) und N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)-Lysin (Glu\_Lys) gut untersucht (*Schmitz et al., 1976*). Für das HEWL werden analog die gleichen Isopeptide vermutet, da bereits die Bildung einer oder mehrerer Amidbindungen von *Simons et al. (2002)* und *Yaghoubi et al. (2007)* postuliert wurden. Der eindeutige Nachweis konkreter Isopeptide stand bislang noch aus.

Ausgewählte Probenansätze wurden mittels der Aminosäureanalyse (ASA) charakterisiert und quantitativ abgeschätzt. Über den elektrophoretischen Vergleich der Vernetzungsprodukte beziehungsweise den ermittelten Gehalt an Isopeptid(en) wurde die Bewertung einer intra- oder intermolekularen Vernetzung ermöglicht. Weiterhin erfolgte ein elektrophoretischer Abgleich der nicht-enzymatisch gebildeten Crosslinks mit den Oligomeren aus enzymatisch generierten HEWL-Oligomerproben.

#### **4.6.1 Einfluss verschiedener Reaktionsparameter auf die Vernetzung von HEWL**

Die Untersuchung der Reaktionsparameter erfolgte exemplarisch an HEWL. Die Ausgangsparameter orientierten sich in erster Linie an den von *Simons et al. (2002)* verwendeten Bedingungen. Laut dem dazugehörigen Patent (*WO 03/018613, 2003*) wurden die Parameter wie pH-Wert und Temperatur speziell auf das jeweils zu untersuchende Protein abgestimmt. Der pH-Wert wurde in der Lösung vor der Lyophilisation eingestellt und sollte im Bereich des pH-Optimums von HEWL liegen, so dass dessen biologische Aktivität nach Inkubation und Rehydratisierung nicht verloren geht. Zudem sollte die gewählte Temperatur zu keiner Denaturierung des Proteins führen und der Einfluss des Vakuums während der Inkubation untersucht werden. Basierend auf diesen Überlegungen wurden von der Arbeitsgruppe um *Simons (2002)* daher die Standardbedingungen für HEWL mit pH 7,0 über 24 h bei 85°C mit 4 bis 7 Wiederholungszyklen unter Vakuum ( $3,3 \times 10^{-6}$  MPa) festgelegt. Die Daten der Versuchsoptimierung stammen aus der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von *Noack (2011)*.

Der Einfluss der Lyophilisation auf verschiedene Proteinproben wurde zu Beginn mit unbehandeltem HEWL bei Raumtemperatur unter Vakuum überprüft. Das Lösen und der Einsatz des Vakuums während der Gefriertrocknung führten für Lysozym zu keiner Vernetzung. Es bedarf demnach höherer Temperaturen um eine Oligomerisierung zu induzieren.

Die mittels Erhitzung im Vakuum postulierte Verschiebung des Gleichgewichtes der Kondensationsreaktion auf die Produktseite (Kapitel 2.3.2) wurde über drei Zyklen an evakuierten und nicht evakuierten HEWL-Proben bei 85°C überprüft. Die evakuierte Probe wies mit zunehmender Zyklenzahl einen intensiver werdenden Dimergehalt auf. Die unter Atmosphärendruck inkubierte Probe hingegen zeigte bereits ab dem ersten Zyklus einen relativ starken Dimeranteil, welche mit steigender Zyklenzahl nicht zunahm. Basierend auf der detektierten zyklen-abhängigen Vernetzung kann die ZLCL-Methode als langsamer und somit schonender beschrieben werden. Dies ist möglicherweise von Nutzen, sollte ein gezieltes

Erreichen von bestimmten Gehalten an Dimeren gewünscht sein. Gleichwohl erreicht die evakuierte Probe nach drei Zyklen lediglich eine vergleichbare Vernetzungsintensität zur Inkubation ohne Vakuumeinsatz. Die von *Simons et al. (2002)* postulierte stärkere Oligomerisierung im Vakuum konnte nicht bestätigt werden. Trotz eines im Vergleich zu deren Arbeit um eine 10er Potenz niedrigeren Drucks, schien die Vernetzung in der nicht evakuierten Probe vergleichbar. Denkbar ist, dass das Reaktionsvolumen nicht ausreichend war, um einen signifikanten Unterschied zwischen den evakuierten und den Proben ohne Vakuum zu erzeugen. Angaben zur Größe Ihres Reaktionsgefäßes machte *Simons et al. (2002)* nicht. Der Einfluss eines kontinuierlich angelegten Vakuums wurde deshalb mithilfe eines Vakuumtrockenschrankes ( $V = 0,5 \text{ m}^3$ ) überprüft. Es konnten hierbei jedoch keine Unterschiede zu den mittels Vakuum-Hydrolyse-Röhrchen generierten Proben detektiert werden. Folglich erwies sich ein Evakuieren der Proben als nicht notwendig.

Weiterhin wurden für die 24 stündige Inkubation der Lyophilisate Temperaturen von 70, 85 und 100°C getestet. Die Versuche wurden nur bei Normaldruck durchgeführt, da der Temperatureinfluss im Vakuum, wie oben diskutiert, gering war. Mittels SDS-PAGE konnte neben der intensiven Monomerbande des Lysozyms (~12 kDa) bei der Inkubationstemperatur von 70°C eine sehr schwache Dimerbande (27 kDa) detektiert werden. Diese Bande trat nach der Inkubation bei 85°C mit höherer Intensität auf. Erst eine Temperatur von 100°C, und damit über der Denaturierungstemperatur des HEWL, führte jedoch zur Ausbildung weiterer Vernetzungsbanden, dem Trimer (~43 kDa) und Tetramer (~57 kDa), so dass eine temperaturabhängige Oligomerisierung bestätigt wurde.

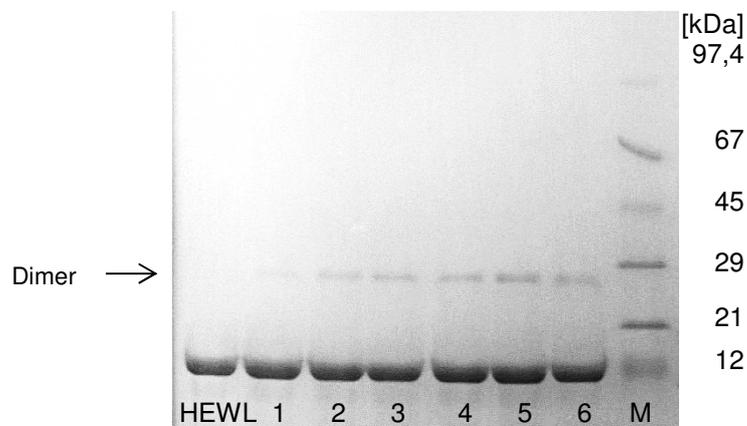
Ursache für eine höhere Vernetzung bei 100°C ist das verbesserte Verdunsten des Kondensationswassers und folglich die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts auf die Produktseite. Weiterhin kann bei 100°C eine (ir-)reversible partielle Denaturierung des HEWL zu einer Freilegung der innen liegenden Aminosäureseitenketten führen. Bei einer irreversiblen Denaturierung unter starker Hitzeeinwirkung werden zusätzlich die Disulfidbrücken gespalten und eine Rekombination mit anderen Proteinen resultiert (*Stauff, 1956*). Dabei wird die vorhandene biologische Aktivität in der Regel verringert. Das HEWL in Lösung weist bereits ab einer Temperatur von 75°C (*Sophianopoulos und Weiss, 1964*) erste Anzeichen einer Denaturierung auf, welche im trockenen Zustand allerdings erst bei sehr viel höheren Temperaturen erfolgt, da es zu keinen Interaktionen mit dem Lösungsmittel Wasser kommen kann (*Mark und Gunsteren, 1992*). Eine unbegrenzte Zunahme der Vernetzung ist aber bei noch höheren Temperaturen nicht zu erwarten, denn ab 150°C (*Simons et al., Patent: WO 03/018613, 2003*) werden die Proteine karbonisiert und schließlich pyrolysiert.

Der pH-Wert wurde über einen Bereich von 7 bis 10 untersucht, die Temperatur wurde auf 70°C festgesetzt. Wässrige HEWL-Lösungen hatten einen niedrigen pH-Wert von 3 - 4, welcher mutmaßlich auf die in der Aufarbeitung verwendeten Säuren zurückzuführen ist. *Simons et al. (2002)* arbeiteten bei pH 7 und eine zunehmende Vernetzung des Lysozyms ist nahe dem isoelektrischen Punkt mit 10,5 bis 11 (*Jollès, 1969*) zu erwarten. Jedoch kann es nahe dem isoelektrischen Punkt zur Proteinausfällung kommen, da Proteine in diesem Bereich die geringste Löslichkeit aufweisen (*Belitz et al., 2001*) und HEWL zudem laugenlabil ist (*Jollès et al., 1966*). Es zeigte sich, dass mit steigendem pH-Wert eine geringe Zunahme des

Dimergehalt es auftritt. Dies Ergebnis bestätigt die Theorie, dass in der Nähe des isoelektrischen Punktes die Ladungsverhältnisse für die Kondensationsreaktion am günstigsten sind.

Zusammenfassend konnte für die beiden Parameter Temperatur (70, 80 und 100°C) und pH-Wert (pH 7 bis 10) ein direkter Zusammenhang zur nicht-enzymatischen Vernetzung der HEWL-Proben hergestellt werden, wobei der Einfluss der Temperatur auf die Proteinproben stärker war. Im Zusammenspiel beider Parameter erfuhr das HEWL allerdings eine sehr hohe Vernetzung und Aggregation von bis zu 90%.

In Anlehnung an den Versuchsaufbau von *Simons et al. (2002)* wurden die Proben im trocknen Zustand über einen Zeitraum von 24 h im Trockenschrank bei 85°C erhitzt, anschließend in Wasser gelöst (pH 7) und erneut lyophilisiert. Dies dient vor allem einer Durchmischung der Probe und ermöglicht statistisch gesehen bei einer nachfolgenden thermischen Inkubation den zuvor möglicherweise verdeckten Aminosäuren die Oligomerisierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bis zu sechs Zyklen (pH 7, 85°C, 24 h, evakuiert) mit einer HEWL-Probe durchgeführt. Diese zeigte bis zum 5. Zyklus auch einen leicht ansteigenden Dimergehalt, nahm dann aber im 6. Zyklus kaum mehr zu (Abbildung 4-50). Eine Behandlung der trockenen Proteinprobe über 144 h ohne erneute Durchmischung stagnierte bereits nach 48 h. Vermutlich waren nach dieser Zeit alle zugänglichen Seitenketten der Aminosäuren abreagiert und die ungünstig liegenden Aminosäuren konnten keine zusätzlichen Vernetzungen mehr ausbilden.



**Abbildung 4-50:** SDS-PAGE von unbehandeltem HEWL und nach Inkubation (evakuiert mit 85°C, pH 7 über 24 h und bis zu sechs Zyklen (1 - 6), vgl. zu *Simons et al. (2002)*); M - Marker

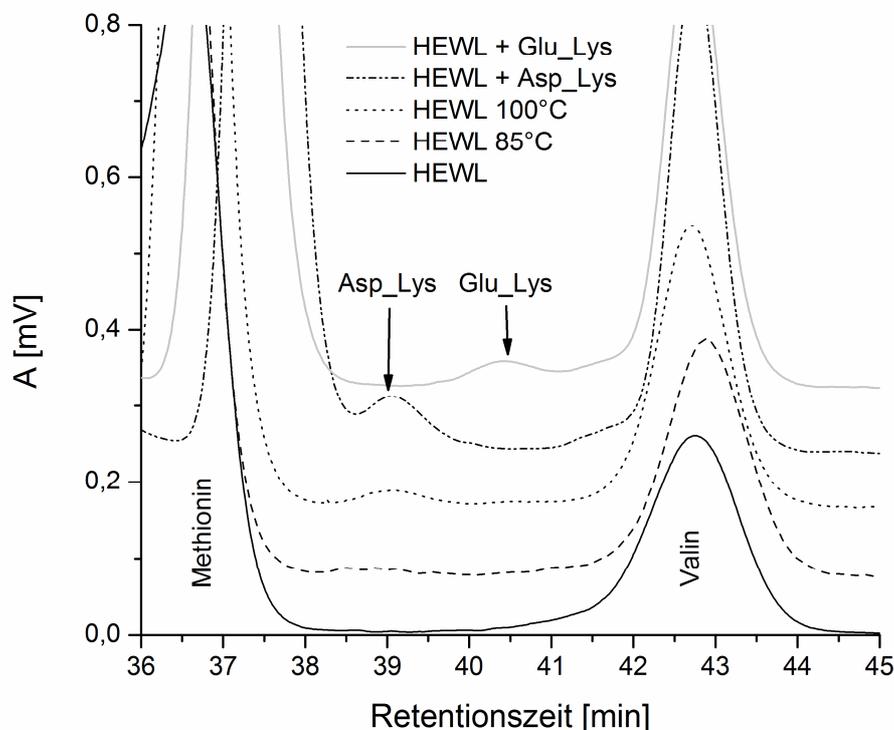
Grundsätzlich konnte eine gute Oligomerisierung (>25%) des HEWL bei hohen Temperaturen über der Denaturierungstemperatur, pH-Werten nahe dem isoelektrischen Punkt (pH ~11) nach vier Zyklen mit oder ohne Vakuum erreicht werden.

#### 4.6.2 Identifizierung der gebildeten Isopeptide

Nach erfolgreicher thermischer Vernetzung mit und ohne Einsatz von Vakuum (ZLCL), sollte die Frage nach den beteiligten Isopeptiden geklärt werden. Wie bereits erwähnt konnten theoretisch zwei verschiedene Dipeptide entstehen (*Simons et al., 2002*). Aus Lysin (Lys) und

Asparagin (Asn) bzw. -säure (Asp) war die Bildung von Asp\_Lys möglich, mit Glutamin (Gln) bzw. -säure (Glu) wurde Glu\_Lys gebildet.

Die über ASA mit Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierung analysierten Isopeptidstandards wurden dem unbehandelten HEWL zudotiert und konnten nach Optimierung der Trennung zwischen den beiden AS Valin und Methionin detektiert werden. In Abbildung 4-51 sind zwei ausgewählte thermisch behandelte HEWL-Proben den relevanten Isopeptidstandards und dem unbehandelten HEWL gegenüber gestellt. Wie eindeutig zu erkennen ist, kann in den Proben ausschließlich Asp\_Lys (~39,0 min) und kein Glu\_Lys (~40,5 min) nachgewiesen werden. Die Peakhöhe und -fläche korreliert zudem mit den Vernetzungsgraden, welche im nachfolgenden Kapitel noch näher besprochen werden. Leichte Retentionszeitverschiebungen werden mithilfe der eluierenden Aminosäuren Methionin und Valin detektiert und in der Auswertung berücksichtigt.



**Abbildung 4-51:** ASA-Chromatogrammausschnitt, HEWL unbehandelt, HEWL bei 85 und 100°C unter Normaldruck, pH 7 nach je 4 Zyklen über 24 h Inkubation, sowie unbehandeltes HEWL mit Isopeptidstandard Asp\_Lys bzw. Glu\_Lys dotiert

Die in Abbildung 4-51 dargestellten Proben enthielten 0,19 (85°C) bzw. 0,40 mmol Asp\_Lys/100 g HEWL (100°C). Neben dem Isopeptid Asp\_Lys konnte das Vernetzungsprodukt Lysinoalanin (LAL) in beiden Proben identifiziert werden, wobei nur sehr geringe Gehalte in der bei pH 7 und 85°C temperierten Probe enthalten waren. Die bei 100°C gelagerte Probe wies dabei einen erhöhten Gehalt auf. Für die HEWL-Proben ist allerdings nicht auszuschließen, dass weitere Crosslinks wie Histidinoalanin oder Lanthionin entstehen, vor allem aufgrund der hohen Temperatureinwirkung von bis zu 100°C über 24 Stunden kann es zu den in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen weiteren nicht-enzymatisch katalysierten

Oligomerisationen kommen. Die Untersuchung weiterer Vernetzungsprodukte war jedoch nicht Bestandteil der Fragestellung.

### 4.6.3 Vergleich der nicht-enzymatischen und enzymatischen Vernetzung von HEWL

Als ein erster Vergleich der beiden Oligomerisierungsmethoden wurden exemplarisch je zwei Proben einer Vernetzungsmethode ausgewählt und miteinander in Beziehung gesetzt. Die Proben wurden so gewählt, dass sie einen ungefähr vergleichbaren Vernetzungsgrad aufwiesen. Da in Vorversuchen unter thermischem ZLCL nur geringe Oligomerisierungsraten realisierbar waren, wurden HEWL-Proben im LMW-Bereich (0-30% Vernetzung) ausgewählt. Die Versuchsparameter und Resultate der vier analysierten Proben sind in Tabelle 4-19 einander gegenübergestellt.

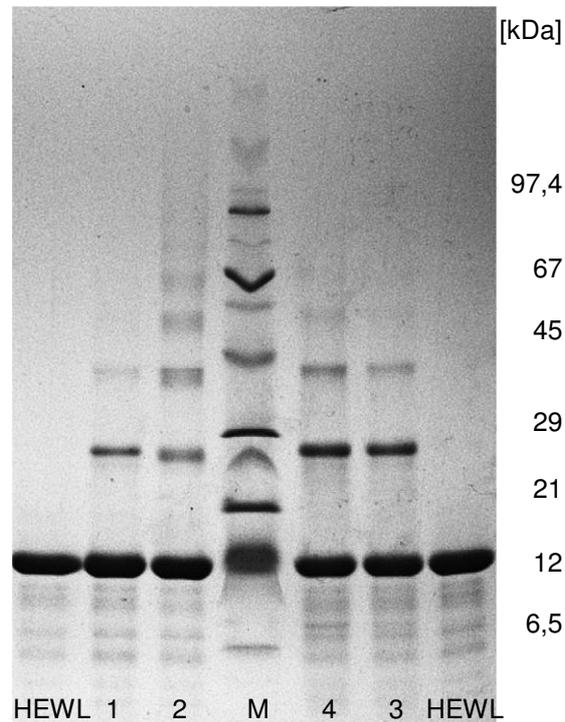
**Tabelle 4-19:** Detaillierte Versuchsparameter und Ergebnisse der enzymatisch inkubierten Proben im Vergleich zu den thermisch oligomerisierten (nicht-enz.) Analysen

Methode	Probe	Vernetzung [%]	Isopeptid	LAL
1 enzymatisch	2% HEWL, pH 7,5, 40 U mTGase, 30 min, 600 MPa, 40°C	12,3	Glu_Lys	-
2 enzymatisch	3% HEWL, pH 7,5, 120 U mTGase, 30 min, 600 MPa, 40°C	25,9	Glu_Lys	-
3 nicht-enz.	10 mg HEWL, pH 7,0, 85°C, je 3 x über 24 h	23,7	Asp_Lys	ja
4 nicht-enz.	10 mg HEWL, pH 7,0, 100°C, je 3 x über 24 h	30,5	Asp_Lys	ja

Besonders deutlich wird der Unterschied zwischen den beiden Inkubationsmethoden zur Oligomerisierung des globulären HEWL in der SDS-PAGE (Abbildung 4-52). Die thermisch bei Normaldruck vernetzten Proben weisen einen hohen Gehalt an Dimeren auf und nur geringe Mengen höher vernetzter Oligomere (Abbildung 4-52, Bahn 3 und 4). Die mit mTGase behandelten Proben zeigen dagegen eine Vernetzung bis hin zu den höheren Oligomeren, welche über die gewählte Gelelektrophorese nicht mehr vollständig in die einzelnen Fraktionen getrennt werden und als Proteinschleier über dem Penta- bzw. Hexamer sichtbar sind (Bahn 2). Die einzelnen Banden nehmen dabei kontinuierlich mit steigendem Vernetzungsgrad zu höheren Oligomeren hin zu.

Der größte Unterschied zwischen den durch mTGase induzierten und den über trockene, thermische Vernetzung gebildeten HEWL liegt jedoch in der Qualität der Vernetzungsprodukte. Bei der enzymatischen Oligomerisierung wurde aufgrund der spezifischen Reaktion der mTGase ausschließlich Glu\_Lys gebildet, wohingegen die nicht-enzymatische Vernetzung zur Bildung von Asp\_Lys und Lysinoalanin (LAL) führte. Die Gehalte von Asp\_Lys liegen bei zirka 0,10 - 0,40 mmol/100 g HEWL und nehmen mit steigender Inkubationstemperatur zu. Die Messwerte liegen damit leicht unter den für die enzymatische Vernetzung detektierten

Isoeptidgehalten (vgl. Tabelle 4-7). Das LAL wurde im direkten Zusammenhang mit Asp\_Lys in trocken, thermisch inkubierten Proben zu 0,2 - 0,4 mmol/100g HEWL bestimmt.



**Abbildung 4-52:** SDS-PAGE des reduzierten, enzymatisch und nicht-enzymatisch vernetzten HEWL

HEWL - unbehandeltes HEWL; 1 - enzymatisch mit 2% HEWL, 40 U mTGase; 2 - enzymatisch mit 3% HEWL, 120 U mTGase; 3 - nicht-enzymatisch bei 85°C und 4 - nicht-enzymatisch bei 100°C aus der Tabelle 4-19; M - Molmassenmarker

Da für beide Untersuchungen HEWL als Protein verwendet wurde, liegen die detektierten Unterschiede in den Parametern der einzelnen Methode begründet, welche eine strukturelle Veränderung des Ausgangsmaterials und eine variierende Zugänglichkeit einzelner AS im Proteinmolekül für die Reaktionen bedingen. Die für die enzymatische Bildung des Isoeptids Glu\_Lys, sowie die nicht-enzymatische Bildung von Asp\_Lys benötigte AS Lysin ist mit 6 mol/mol HEWL (Lys<sub>1</sub>, Lys<sub>13</sub>, Lys<sub>33</sub>, Lys<sub>96</sub>, Lys<sub>97</sub> und Lys<sub>116</sub>) in ausreichender Zahl enthalten, so dass inter- und intramolekulare Vernetzungen gebildet werden konnten. Weiterhin ist die für die enzymatische Oligomerisierung notwendige AS Glutamin nur zu 3 mol/mol HEWL (Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub> und Gln<sub>121</sub>) enthalten. Das geringe Vorkommen von Gln limitiert die enzymatische Reaktion, so dass nur nach hochdruckinduzierter Auffaltung eine intermolekulare Vernetzung nachweisbar ist. Allerdings wird durch die Betrachtung der [CLAA]<sub>min</sub> (Abschnitt 4.2.2) und dem Nachweis der sechs Isoeptide (Kapitel 4.2.3) deutlich, dass eine Mehrfachvernetzung sowohl intra- als auch intermolekular erfolgt.

Für die nicht-enzymatische Vernetzung des HEWL durch Hitzeeinwirkung ist davon auszugehen, dass es sich um eine Kondensationsreaktion zwischen der Asparaginsäure, welche im HEWL zu 7 mol/mol oder dem Asparagin, welche zu 14 mol/mol HEWL im Protein vorkommt und dem Lysin handelt. Allein die zirka vierfach höhere Verfügbarkeit von Asp und Asn ( $\Sigma$  21 mol/mol HEWL) gegenüber Glu und Gln mit insgesamt 5 mol/mol HEWL spricht für

die Ausbildung des Isopeptids Asp\_Lys. Zudem liegen nur etwa 30% der Asp und Asn in stark strukturierten Bereichen ( $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblatt) vor, während es für Glu und Gln über 60% der AS sind. Weiterhin werden mutmaßlich die Asparaginreste den Asparaginsäuren vorgezogen, da die Hydroxide eine durchschnittlich höhere Bindungsenthalpie als die Amine aufweisen. Unter Berücksichtigung der theoretisch zur Verfügung stehenden 97,9 mmol/100 g HEWL Asparagin und dem detektierten Asp\_Lys-Gehalt von 0,10 - 0,40 mmol/100 g HEWL kann davon ausgegangen werden, dass nur ein Asparinrest reaktiv ist. Bei der In-Vakuo-Thermo-Vernetzung des HEWL handelt es sich demnach wie bei der enzymatischen Vernetzung um eine gerichtete Oligomerisierung. In Anbetracht der Positionen und Lösungsmittelzugänglichkeit der AS im Molekül findet die Reaktion vermutlich an Asp<sub>19</sub> statt.

Der bloße Einsatz des Vakuums während der Lyophilisation führte in den vorangegangenen Untersuchungen zu keiner Oligomerisierung. Der Einfluss auf die Struktur von Enzymen, welcher zu einer Proteinauffaltung führen würde, wurde von *Desai et al. (1994)* untersucht. Die von ihm festgestellte partielle und reversible Denaturierung im Vakuum reichte offenbar in den vorliegenden Studien nicht für eine Modifikation. Zudem besteht die Möglichkeit, dass thermisch induziert eine effektivere partielle Auffaltung des Proteins stattfindet und so die unzugänglichen AS erreichbar werden um als potentielle reaktive Stelle zur Verfügung zu stehen. Aufgrund der Hitzestabilität, welche durch die vier Disulfidbrücken hervorgerufen wird (*Jollès et al., 1966*), können vermutlich die neben einem Cystein liegende AS, aufgrund sterischer Hinderung nur bei höherer Temperatur (100°C) zur Isopeptidbildung beitragen. Dies betrifft acht der potentiell reaktiven AS (Glu<sub>7</sub>, Asn<sub>93</sub>, Asn<sub>77</sub>, Asn<sub>65</sub> Asp<sub>66</sub>, Asn<sub>74</sub>, Asn<sub>113</sub> und Lys<sub>116</sub>).

Generell ist die mTGase-Behandlung für das Protein schonender, da die Reaktion im wässrigen Milieu stattfindet. Sie ist aber nachweislich mit weitreichenden Konsequenzen für die Funktionalität verbunden, da das Protein vollständig aufgefaltete und dann vernetzt wird. Dem gegenüber steht die thermische Vernetzung, welche mutmaßlich überwiegend oberflächlich stattfindet und bei welcher das aktive Zentrum des HEWL womöglich unmodifiziert erhalten bleibt. Die Zugänglichkeit der reaktiven AS für eine enzymatische oder thermische Oligomerisierung ist dabei maßgeblich von der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur sowie von der sterischen Hinderung durch eventuelle Disulfidbrücken während der Reaktion abhängig.

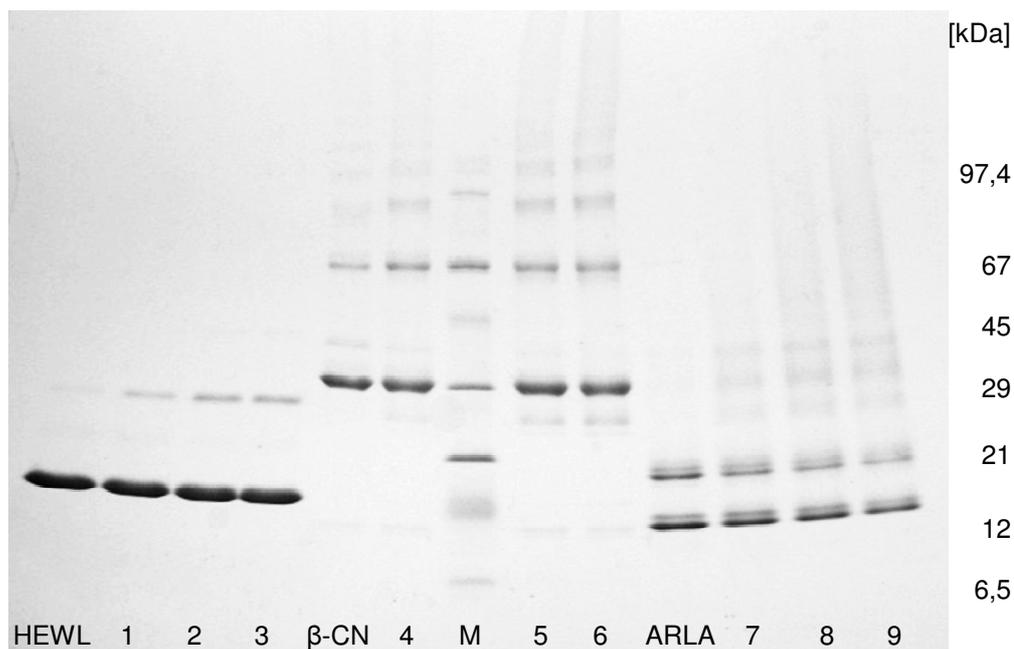
Die enzymatische und nicht-enzymatische Methode unterscheiden sich prinzipiell hinsichtlich ihrer Vernetzungsstellen und der Art, sowie der Menge an intermolekularen Verknüpfungen.

#### **4.6.4 Vergleich der In-Vakuo-Thermo-Vernetzung an HEWL mit $\beta$ -Casein und erste Untersuchungen an einem Molkenproteinisolat**

Neben HEWL wurde das Molkenproteinisolat von ARLA und das Milchprotein  $\beta$ -Casein ( $\beta$ -CN) bezüglich der nicht-enzymatischen Vernetzung unter Standardbedingungen untersucht. Die Analysen weiterer Proteine sollten eine Abschätzung des sekundären und tertiären Struktureinflusses auf die resultierende Oligomerisierung ermöglichen. Im Elektropherogramm sind die drei Ausgangsproben und drei aufeinander folgende Zyklen einander gegenüber gestellt (Abbildung 4-53). Bei dem Protein  $\beta$ -CN handelte es sich um eine über einen längeren Zeitraum gelagerte Probe, die bereits unbehandelt erste Vernetzungen aufwies. Die beiden

anderen Proben (Molkenproteinisolat und HEWL) zeigten unbehandelt hingegen nur die zu erwartenden Banden bei zirka 13 und 16 kDa.

Die für HEWL diskutierte schwache Oligomerisierung zum Dimer wird erneut deutlich (Kapitel 4.6.1). Im Gegensatz dazu kommt es bei  $\beta$ -CN und dem Molkenproteinisolat bereits ab dem ersten Zyklus zu einer starken Vernetzung, welche an Intensität über den zweiten bis zum dritten Zyklus zunimmt. Für die  $\beta$ -CN-Proben wurde die Oligomerisierung nach dem dritten Zyklus so stark, dass einige größere Bestandteile der Probe nicht mehr in das SDS-Gel migrieren konnten und in den Taschen zurückblieben. Strukturelle und biologische Verwandtschaft zugrunde legend ist für  $\alpha$ -LA (45,1% Bestandteil des Molkenproteinisolats) und HEWL eine ähnliche Oligomerisierung zu erwarten. Die Struktur des Molkenproteins wird aber maßgeblich von der Anwesenheit der Metallionen Calcium beeinflusst, welche nach Dialyse des Molkenproteinisolats zum Teil entfernt sind und  $\alpha$ -LA somit nicht die Stabilität wie HEWL aufweist (Abschnitt 4.1, *Hendrix et al., 2000*). Folglich sind um zirka ein Drittel höhere Vernetzungen zu erwarten und auch zu beobachten (vgl. Calciumgehalte in Kapitel 4.5). Die zum Teil calciumfreien Proteine werden vergleichbar mit  $\beta$ -CN, welches natürlicherweise keine Sekundärstruktur aufweist, sehr leicht in-vakuo oligomerisiert. So dass  $\beta$ -Casein vor den Molkenproteinisolat und dann HEWL die stärkste Oligomerisierung aufweist.



**Abbildung 4-53:** SDS-PAGE von HEWL,  $\beta$ -CN und Molkenproteinisolat (ARLA) nach je drei Zyklen (HEWL: 1-3,  $\beta$ -CN: 4-6 und ARLA: 7-9) unter Standardbedingungen mit 85°C über 24 h und pH 7

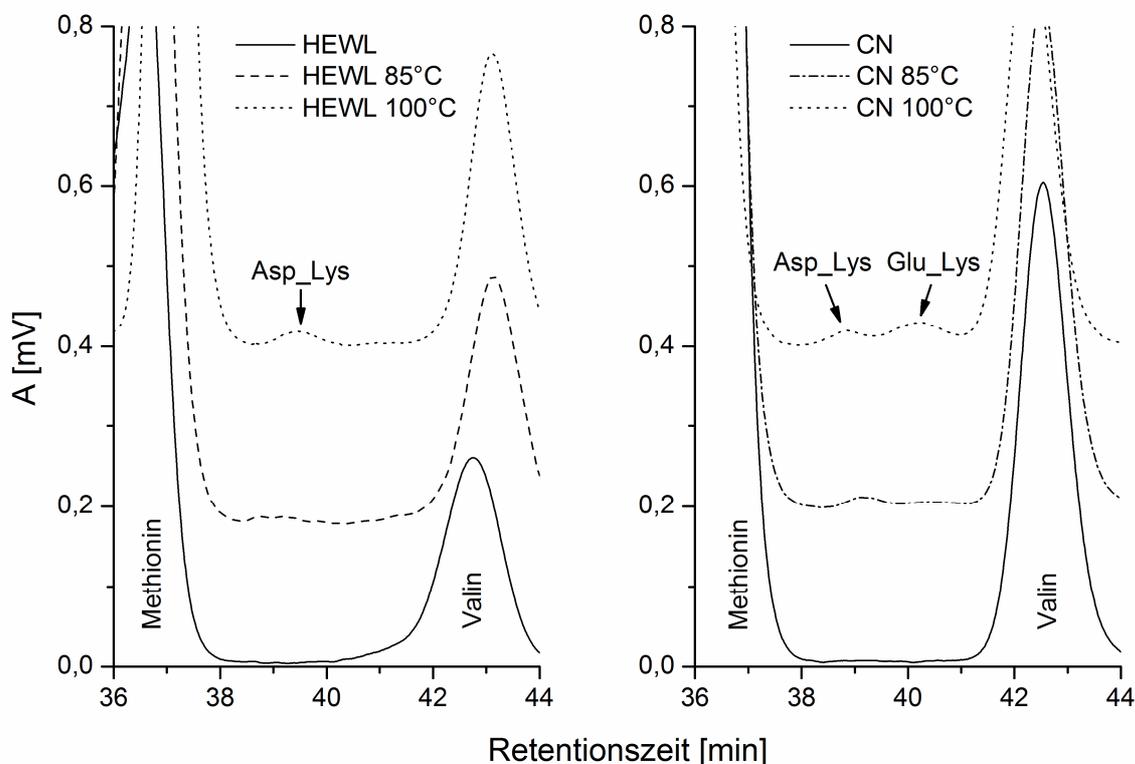
In Tabelle 4-20 sind die Aminosäuregehalte der potentiell reaktiven AS des  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG,  $\beta$ -CN sowie HEWL aufgelistet. Aufgrund des höheren Vorkommens von Glutamin (Gln) und -säure (Glu) im Vergleich zu Asparagin (Asn) und -säure (Asp) in  $\beta$ -CN ist zu vermuten, dass mehr Glu\_Lys als Asp\_Lys während des ZLCL unter Vakuum entsteht. Für HEWL ist das Verhältnis umgekehrt, das Molkenproteinisolat (bestehend aus  $\alpha$ -LA und  $\beta$ -LG) weist ein relativ ausgeglichenes Verhältnis der vier Aminosäuren auf. Trockenem, hitzebehandeltes  $\alpha$ -LA enthält

nachweislich Glu\_Lys und weist über 5% Lysin des Proteins gebunden in Isopeptidbindungen auf (Schmitz *et al.*, 1976).

**Tabelle 4-20:** Vergleich isopeptidbildender Aminosäuren in  $\alpha$ -LA (LALBA\_BOVIN),  $\beta$ -LG (LACB\_BOVIN),  $\beta$ -CN (CASB\_BOVIN) und HEWL (LYSC\_CHICK) (<http://www.uniprot.org/>)

Aminosäure	$\alpha$ -LA	$\beta$ -LG	$\beta$ -CN	HEWL
Asparaginsäure (Asp)	13	10	4	7
Asparagin (Asn)	8	5	5	14
Glutaminsäure (Glu)	7	16	19	2
Glutamin (Gln)	6	9	20	3
Lysin (Lys)	12	15	11	6
Anzahl der AS	123	162	209	129

Alein aufgrund des hohen prozentualen Anteils an Lysin in  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG und  $\beta$ -CN (12, 15 bzw. 11 mol Lys/mol Protein) könnten doppelt so viele Isopeptide als im HEWL (6 mol Lys/mol Protein) gebildet werden. Die höheren Anteile der Aminosäuren Asn und Asp im HEWL im Vergleich zu Gln und Glu führen nach vorangegangenen Untersuchungen nur zur Ausbildung von Asp\_Lys (Abschnitt 4.6.3).



**Abbildung 4-54:** ASA-Chromatogrammausschnitt nach EH von HEWL (links) und  $\beta$ -CN (CN, rechts), unbehandelt und nach thermischer Inkubation (ZLCL) bei 85°C und 100°C über je 4 Zyklen mit 24 h

Für das Molkenproteinisolat oder das isolierte  $\alpha$ -LA stehen die ASA-Untersuchungen noch aus. Es ist jedoch zu vermuten, dass in beiden Proben aufgrund der strukturellen Gegebenheiten sowohl Glu\_Lys als auch Asp\_Lys entsteht. Eine Vernetzung über die Bildung von LAL ist zudem nicht ausgeschlossen, da zum Beispiel das  $\alpha$ -LA im Gegensatz zum  $\beta$ -CN zwar keine Phosphoserin-Reste, aber 8 mol Cys/mol Protein enthält, welches auch zur Bildung von LAL führen kann. In den Proben des  $\beta$ -CN konnten neben LAL beide Isopeptide nachgewiesen werden (Abbildung 4-54). Die Gehalte an LAL sind mit 0,5 - 1,9 mmol/100 g  $\beta$ -CN deutlich gegenüber dem im Lysozym identifizierten LAL (0,2 - 0,4 mmol/100g) erhöht. Die offene Struktur des Caseins scheint eine Umsetzung der fünf Phosphoserinreste zu Dehydroalanin (DHA) als Vorstufe des LAL zu begünstigen (*Kleyn und Klostermeyer, 1980*), wohingegen die  $\beta$ -Eliminierung über die Abspaltung von Schwefelwasserstoff der Cysteine des Lysozyms aufgrund der stabilen Disulfidbrücken im HEWL verzögert abläuft. Weiterhin zu sehen ist, dass sowohl Glu\_Lys als auch Asp\_Lys in  $\beta$ -CN gebildet werden (Abbildung 4-54), obwohl nur geringe Anteile an Asn und Asp im Molekül vorhanden sind (Tabelle 4-20). Dies beweist abschließend wie essentiell die strukturellen Voraussetzungen der eingesetzten Proteine für eine vielfältige Oligomerisierung sind und dass nicht allein die bloße Häufigkeit der Aminosäuren sondern ihre Lage im Molekül maßgeblich die Vernetzung beeinflusst.

### **4.7 Fazit der Untersuchungen zur enzymatischen und der nicht-enzymatischen Vernetzung verschiedener Proteine**

Es konnte dargelegt werden, dass Lysozym aus Hühnereiweiß durch mikrobielle Transglutaminase nur bei gleichzeitiger Applikation von hohem hydrostatischem Druck vernetzbar ist. Nach Bildung definierter Produkte bei gerichteter Oligomerisierung wurden mit zunehmender Enzymaktivität und Inkubationstemperatur weitere Vernetzungsprodukte detektiert. Die sich daraus ergebenden funktionellen Konsequenzen und die resultierenden strukturelle Informationen wurden in den Kapiteln 4.4.1 bis 4.4.5 für HEWL aufgezeigt.

Das evolutionsbiologisch verwandte und strukturell sehr ähnlich aufgebaute  $\alpha$ -Lactalbumin konnte in ersten Untersuchungen bereits unter Atmosphärendruck enzymatisch bis zu 72% oligomerisiert werden. Die Anwesenheit von Calciumionen sorgte jedoch unabhängig von den gewählten Reaktionsparametern (Temperatur, Druck, Protein- und Enzymkonzentration) für eine etwa 30%ig geringere Vernetzung. Für weitere Milchproteine wie das  $\beta$ -Casein wurde bereits in der Literatur gezeigt, dass schon geringe Enzymaktivitäten der mTGase unter Normaldruck für eine intensive Vernetzung ausreichen (*Partschefeld et al., 2007b*).

Über die mTGase-induzierten Vernetzungen hinaus wurden ausgewählte nicht-enzymatische Inkubationen unter erhöhter Temperatur und Vakuum analysiert. Neben HEWL, welches unter nicht denaturierenden Bedingungen nur bis zum Dimer oligomerisierte, wurde  $\beta$ -Casein und das Molkenproteinisolat von ARLA untersucht. Die Milchproteine vernetzten stärker und bildeten höhere Oligomere. Die räumliche Struktur und thermische Stabilität der Proteine war dabei für den Grad der Vernetzung ausschlaggebend. Außerdem war die Anzahl der potentiellen reaktiven Aminosäuren im Protein und deren Zugänglichkeit im Molekül für die Ausbildung der

kovalenten Verknüpfungen von Bedeutung. So konnte bei der In-Vakuo-Thermo-Vernetzung (ZLCL) neben dem bereits in den enzymatisch behandelten Proben nachgewiesenen Isopeptid Glu\_Lys auch das Asp\_Lys gebildet werden.

Trotz der geringeren Anzahl an möglichen Reaktionspartnern war die Oligomeren-Ausbeute für HEWL bei der enzymatischen mit zirka 75% höher als bei der nicht-enzymatischen Vernetzung unter nicht denaturierenden Bedingungen (moderate Temperaturen von 85°C, 25% oligomerisiert). Allein aufgrund der Primärstruktur ist keine verallgemeinernde Aussage bezüglich der Oligomerisierung durch Hochdruck- oder Vakuumbehandlung möglich. Abhängig von den gewählten Inkubationsbedingungen lassen sich aber mit beiden Methoden kovalent verknüpfte Proteine erzeugen. Eine funktionelle Charakterisierung der mittels ZLCL erzeugten HEWL-Proben steht noch aus.

## 5 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Reaktion von Proteinen während einer Hochdruckbehandlung (HD) ermöglichen ein besseres Verständnis der Reaktivität und Struktur auf molekularer Ebene. In der vorliegenden Arbeit wurde die enzymatische Oligomerisierung von Hühnereiweißlysozym (HEWL) mithilfe der druckstabilen mikrobiellen Transglutaminase (mTGase) unter HD untersucht. Die resultierenden Oligomere wurden anschließend hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften charakterisiert. Vergleichende Untersuchungen wurden mit dem evolutionsbiologisch verwandten Protein, dem  $\alpha$ -Lactalbumin durchgeführt. Abschließend erfolgten orientierende Studien zur nicht-enzymatischen Vernetzung von HEWL und ausgewählten Milchproteinen, bei welchen eine kovalente Verknüpfung über vergleichbare Isopeptide nachgewiesen werden konnte.

Kompakte, globuläre Proteine, wie das untersuchte HEWL stellten unter Normaldruck keine Substrate für die mTGase dar. Auch war eine enzymatische Vernetzung nach erfolgter Hochdruckbehandlung aufgrund der Reversibilität der druckinduzierten Auffaltung nicht möglich. So wurde HEWL nur bei simultaner Behandlung mit mTGase und hohem hydrostatischem Druck zu Homooligomeren vernetzt. Neben einem geeigneten Puffersystem wurden der pH-Wert, die Inkubationszeit, die Temperatur, der hydrostatische Druck, die Enzymaktivität der mTGase und die Proteinkonzentration des Lysozyms verändert. Abhängig von den Reaktionsbedingungen wurden Produkte mit stark variierenden Vernetzungsgraden erhalten, wobei eine maximale Oligomerisierung von zirka 75% aus einer 3%igen HEWL-Probe in Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 mit 160 U mTGase/g Protein über 30 min, 600 MPa und 40°C erreicht wurde. Zudem erfolgte eine Kategorisierung aller resultierenden Proben anhand ihres mittels Gelelektrophorese bestimmten Vernetzungsgrades in drei Untergruppen: LMW (niedrig vernetzt, 0 - 30%), MMW (mittel vernetzt, 30 - 60%) und HMW (hoch vernetzt, 60 - 100%).

In den so vernetzten Proben wurden das reaktionsspezifisch gebildete Isopeptid N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Lysin (Glu\_Lys) nachgewiesen und die beteiligten reaktiven Aminosäuren identifiziert. Die Bestimmung von Glu\_Lys, welches für die kovalenten Verknüpfungen verantwortlich ist, erfolgte nach enzymatischer Hydrolyse am Aminosäureanalysator mit Ninhydrin-Nachsäulen-Derivatisierung. Eine erste Abschätzung des Isopeptidgehaltes zeigte zudem, dass es bei der Oligomerisierung sowohl zu inter- als auch intramolekularer Vernetzung kam. Der minimal notwendige Gehalt an Cross-Link-Aminosäuren, [CLAA]<sub>min</sub> lag zum Teil um den Faktor zwei unter dem Gehalt des quantifizierten Glu\_Lys.

Anschließend konnte nach tryptischem Verdau über die RP-HPLC/ESI-TOF-MS für die gering vernetzten Proben (LMW) genau eine definierte kovalente Verknüpfungsstelle ermittelt werden. Für die MMW- und HMW-Proben wurden fünf bzw. sechs Peptidfragmente detektiert. Bei den LMW-Proben wurde Lys<sub>1</sub> mit Gln<sub>121</sub> vernetzt. Den höher oligomerisierten Proben konnten die Lysinreste Lys<sub>1</sub>, Lys<sub>13</sub>, Lys<sub>116</sub> und die Glutaminreste Gln<sub>41</sub>, Gln<sub>57</sub>, Gln<sub>121</sub> zugeordnet werden. Somit gelang eine erste strukturelle Aufklärung der Vernetzungsprodukte. Der Aufbau der Oligomere läuft demnach zuerst gerichtet und linear ab. Insbesondere bei höheren Temperaturen und Enzymaktivitäten werden jedoch ungeordnete Strukturen gebildet. Die

einzelnen Vernetzungsprodukte scheinen aufgrund der Lage der reaktiven Aminosäuren im HEWL-Molekül über mehrere intermolekulare Bindungen eine variierende Struktur auszubilden. Eine Quantifizierung der einzelnen Isopeptide erfolgte nicht, orientierende MS-Untersuchungen lassen aber vermuten, dass auch hier bevorzugte Reaktionsorte existieren.

Die vernetzten Proben wurden nachfolgend über Ammoniumsulfatfällung konzentriert und mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) fraktioniert. Die Ausbeuten der GPC waren sehr gering. Eine Fraktionierung in einzelne, selektiv verknüpfte Oligomere wurde nicht erreicht. Die enzymatisch oligomerisierten Proben sowie ausgewählte GPC-Fractionen mit höheren Oligomeren wurden hinsichtlich funktioneller und struktureller Konsequenzen untersucht. Begonnen wurde dabei mit der lytischen Enzymaktivität des HEWL gegen Zellwände des *Micrococcus lysodeikticus*. Eine abnehmende bzw. verbleibende Lyseaktivität korrelierte mit einer zunehmenden Oberflächenhydrophobität der Oligomeregemische. Beide Größen verhielten sich indirekt proportional zueinander. Während der hydrophobe Kern des Moleküls mit steigender Oligomerisierungsrate freigelegt wurde, senkte sich die Lyseaktivität bis auf null ab. Eine räumliche Deformation oder Barriere entstand mutmaßlich im oder in der Nähe des reaktiven Zentrums (Glu<sub>35</sub> und Asp<sub>52</sub>) des Lysozyms, so dass der Enzym-Substrat-Komplex nicht mehr ausgebildet werden konnte.

Die Untersuchung der Veränderung sekundärer und tertiärer Strukturbestandteile erfolgte mithilfe der Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie. Gleichwohl für die Tertiärstruktur keine großen Veränderungen aufgezeigt wurden, ist für die Sekundärstruktur mit zunehmendem Vernetzungsgrad eine Abnahme der  $\alpha$ -Helices und eine Zunahme von ungeordneten und  $\beta$ -Faltblatt-Bereichen detektiert worden. Es konnte daher die unter Hochdruck bekannte Auffaltung des HEWL über die enzymatische Vernetzung derart stabilisiert werden, dass eine vollständige Rückfaltung nicht mehr gegeben war.

Das Fibrillierungsverhalten der oligomerisierten Proben im Sauren im Vergleich zum unbehandelten HEWL stellte eine weitere Charakterisierungsmöglichkeit dar. Die Analyse der inkubierten Proben erfolgte mithilfe dreier photometrischer Methoden (Umsetzung mit den Reagenzien 8-Anilino-1-naphtalinsulfonsäure, Kongorot oder Thioflavin T). Die fibrillierten Proben wurden zudem transmissionselektronenmikroskopisch (TEM) untersucht. Mit zunehmender Vernetzung war dabei eine abnehmende Fibrillierungsneigung zu beobachten, welche gut strukturell zu erklären ist, da die zusätzlichen, kovalenten Isopeptidbindungen die Proteinmoleküle gegen eine saure Auffaltung stabilisieren. Eine Auffaltung ist jedoch die Grundvoraussetzung für eine Assoziation und Bildung *in-vitro*-induzierter, amyloider Strukturen.

Ferner wurde das antimikrobielle Verhalten der Präparate gegen grampositive und -negative Mikroorganismen getestet. Unbehandeltes Lysozym zeigt grundsätzlich gegenüber grampositiven Mikroorganismen eine gute antimikrobielle Aktivität. Eingesetzt wurden der Agardiffusions- und der bakterielle Hemmtest (Trübungsassay). Hierbei zeigten alle geprüften Proben keine Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien. Die antimikrobielle Wirkung gegenüber den grampositiven Mikroorganismen variierte stark. Das Phänomen der erhöhten Sensibilität gegenüber ausgewählten Bakterienstämmen im niederkonzentrierten Bereich wurde

für *Bacillus subtilis* (grampositiv) und die mittel- bzw. hochvernetzten Proben im Vergleich zu unbehandelten HEWL (je 0,00625% Probe, w/v) reproduzierbar nachgewiesen.

Auf die umfassende Charakterisierung der enzymatisch vernetzten HEWL-Proben folgten orientierende Vergleichsstudien mit dem evolutionsbiologisch verwandten  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -LA). Die enzymatische Oligomerisierung konnte für das Molkenprotein dabei im Gegensatz zum HEWL bereits unter Atmosphärendruck erzielt werden. Die Vernetzungsraten betragen, unabhängig von den untersuchten Rahmenparametern aber abhängig vom Calciumgehalt, zirka 35% (mit Ca) bis 72% (ohne Ca). Das  $\alpha$ -LA als Calcium-bindendes Protein wurde somit durch die Abwesenheit des Metallions derart destabilisiert, dass es für die mTGase besser umsetzbar wurde. Die im Vergleich zum Lysozym vermehrt enthaltenen potentiell reaktiven Aminosäuren (doppelt so viel Lys und Gln) trugen ebenfalls zu einer stärkeren Oligomerisierung bei.

Abschließend erfolgten Studien zu nicht-enzymatischen, vakuuminduzierten Kondensationsreaktionen. Dabei wurde trockenes HEWL im Vakuum thermisch induziert vernetzt. Die Methode ist in der Literatur als Zero-Length-Cross-Linking (ZLCL) beschrieben. Die Untersuchung der Parameter Vakuum, Temperatur, pH-Wert und Zyklenzahl erfolgte an dem globulären Protein. Dieses konnte unter nicht denaturierenden Bedingungen bis zum Di- und Trimer vernetzt werden. Weitere Milchproteinproben (ein Molkenproteinisolat und  $\beta$ -Casein) wurden nur exemplarisch unter Standardbedingungen untersucht. Hierbei wurde das Molkenproteinisolat deutlich besser als HEWL und das  $\beta$ -Casein bei 85°C über je 24 h und Einsatz von Vakuum am stärksten oligomerisiert. Die gute Umsetzung des  $\beta$ -Caseins ist dabei auf die fehlende Tertiär- und Sekundärstruktur zurückzuführen. Zum Teil entstanden auch Casein-Polymere, welche nicht mehr elektroforesefähig waren. Die beteiligten Isopeptide wurden analog zu den enzymatisch vernetzten Proben über die Aminosäureanalytik nachgewiesen. Es konnte das Isopeptid N- $\epsilon$ -( $\beta$ -Aspartyl-)Lysin (Asp\_Lys) neben Lysinoalanin (LAL), aber kein Glu\_Lys in HEWL nachgewiesen werden. Beide Isopeptide (Asp\_Lys und Glu\_Lys) sowie LAL sind dagegen im  $\beta$ -Casein gebildet worden. Der Einfluss struktureller Gegebenheiten auf die Reaktionsfähigkeit der Proteine konnte folglich eindeutig belegt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abe M, Akbarzaderaleh P, Hamachi M, Yoshimoto N, Yamamoto S (2010). Interaction mechanism of mono-PEGylated proteins in electrostatic interaction chromatography. *J. Biotechnol.*, **5**, 477-483.
- Ajinomoto (2011). Product Information Activa ® MP. Ajinomoto Foods Deutschland GMBH, Hamburg. URL: [http://www.ajinomoto.de/cms/front\\_content.php?idart=330](http://www.ajinomoto.de/cms/front_content.php?idart=330)
- Akasaka K, Raziq A, Latif A, Nakamura A, Matsuo K, Tachibana H, Gekko K (2007). Amyloid protofibril is highly voluminous and compressible. *Biochemistry*, **46**, 10444-10450.
- Akasaka K, Tezuka T, Yamada H (1997). Pressure-induced changes in the folded structure of lysozyme. *J. Mol. Biol.*, **271**, 671-678.
- Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 2001-2005.
- Alizadeh-Pasdar N, Li-Chan ECY, Nakai S (2004). FT-Raman Spectroscopy, Fluorescent probe, and solvent accessibility study of egg and milk proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5277-5283.
- Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2613-2617.
- Anfinsen CB (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230.
- Annan WD, Manson W (1980). The production of lysinoalanine and related substances during processing of proteins. *Food Chem.*, **6**, 255-261.
- Arnaudov LN, de Vries R (2005). Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme. *Biophys. J.*, **88**, 515-526.
- Aschaffenburg R. (1963): Preparation of  $\beta$ -casein by a modified urea fractionation method. *J. Dairy Res.*, **30**, 259-260.
- Asquith R.S., Otterburn M.S., Sinclair W.J. (1974): Crosslinking by isopeptide bonds. Occurrence and role in protein structure. *Angew. Chem.*, **86**, 580-587.
- Asquith RS, Carthew P (1972). Mechanism of alkaline degradation of cysteine in intact protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 8-14.
- Bahr K (2012). Mikrobiologische Charakterisierung ausgewählter Lysozymoligomere sowie erste Untersuchungen zur enzymatischen Vernetzung von  $\alpha$ -Lactalbumin. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Dresden, Technische Universität Dresden.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2001). Lehrbuch der Lebensmittelchemie, 5. vollst. überarbeitete Auflage. Berlin, Springer Verlag.
- Bernkop-Schnürch A, Krist S, Vehabovic M, Valenta C (1998). Synthesis and evaluation of lysozyme derivatives exhibiting an enhanced antimicrobial action. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **6**, 301-306.
- Bhattacharjya S, Balaram P (1997). Effects of organic solvents on protein structures: Observation of a structured helical core in hen egg-white lysozyme in aqueous dimethylsulfoxide. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **29**, 492-507.
- Bianchi C (1982). Antigenic properties of hen egg white lysozyme (Fleming's lysozyme) and notes on its acute/sub-acute toxicity. *Curr. Ther. Res.*, **31**, 494-505.

- Birdsell DC, Doyle RJ, Morgenstern M (1975). Organization of teichoic acid in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **121**, 726-734.
- Bjarnason J, Carpenter KJ (1970). Mechanisms of heat damage in proteins. 2. Chemical changes in pure proteins. *Br. J. Nutr.*, **24**, 313-329.
- Blake CCF, Koenig DF, Mair GA, North ACT, Phillips DC, Sarma VR (1965). Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **206**, 757-761.
- Bolotin A, Wincker P, Mauger S (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL 1403. *Genome Res.*, **11**, 731-753.
- Booth DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, Hutchinson WL, Fraser PE, Hawkins PN, Dobson CM, Radford SE, Blake CCF, Pepys MB (1997). Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*, **385**, 787-793.
- Bottoni A, Miscione GP, De Vivo M (2005). A theoretical DFT investigation of the lysozyme mechanism: Computational evidence for a covalent intermediate pathway. *Proteins Struct. Funct. Bioinf.*, **59**, 118-130.
- Branen JJK (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int. J. Food Microbiol.*, **90**, 63.
- Brew K, Vanaman TC, Hill RL (1967). Comparison of the amino acid sequence of bovine  $\alpha$ -Lactalbumin and hens egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3747-3748.
- Calleweert, L., Walmagh, M., Michiels, C. W., Lavigne, R. (2010). Food applications of bacterial cell wall hydrolyases. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 1-8.
- Canfield RE (1963). The amino acid sequence of egg white lysozyme, *J. Biol. Chem.* **238**. 2698-2707.
- Cao A, Hu D, Lai L (2004). Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme. *Protein Sci.*, **13**, 319-324.
- Cardoso JC, Albuquerque Jr. RLC, Padilha FF, Bittencourt FO, Freitas O, Nunes PS, Pereira NL, Fonseca MJV, Araújo AAS (2011). Effect of the Maillard reaction on properties of casein an casein films. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **104**, 249-254.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesnierowski G, Kijowski J (2003). Antibacterial activity of lysozyme modified by the membrane technique. *Electron. J. Polish Agric.*, **6**, 1-5.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesnierowski G, Kijowski J (2009). Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by thermochemical technique. *Eur. Food Res. Technol.*, **228**, 841-845.
- Cegielska-Radziejewska R, Lesnierowski G, Szablewski T, Kijowski J (2010). Physico-chemical properties and antibacterial activity of modified egg white-lysozyme. *Eur. Food Res. Technol.*, **231**, 959-964.
- Chalikian TV, Breslauer KJ (1996a) On volume changes accompanying conformational transitions of biopolymers. *Biopolymers*, **39**, 619-626.
- Chalikian TV, Totrov M, Abagyan R, Breslauer KJ (1996b). The hydration of globular proteins as derived from volume and compressibility measurements: Cross correlating thermodynamic and structural data. *J. Mol. Biol.*, **260**, 588-603.
- Chalikian TV, Breslauer KJ (1996c). Compressibility as a means to detect and characterize globular protein states. *Proc. Natil. Acad. Sci. USA*, **93**,1012-1014.

- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain M, Zweibaum A (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: A survey of twenty cell lines. *Cancer Res.*, **48**, 1936-1942.
- Christensen BM, Sørensen ES, Hojrup P, Petersen TE, Rasmussen LK (1996). Localization of potential transglutaminase cross-linking sites in bovine caseins. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1943-1947.
- Clarke DD, Mycek MJ, Neidle A, Waelsch H (1959). The Incorporation of amines into protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 338-354.
- Coussons PJ, Price NC, Kelly SM, Smith B, Sawyer L (1992). Transglutaminase catalyzes the modification of glutamine side chains in the C-terminal region of bovine beta-lactoglobulin. *Biochem. J.*, **283**, 803-806.
- Cunningham FE, Proctor VA, Goetsch SJ (1991). Egg-white lysozyme as a food preservative: An overview. *World's Poultry Sci. J.*, **47**, 141-163.
- Damodaran S, Paraf A (1997). Food proteins and their applications, Series: Food Science and Technology. CRC Press, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Davies RC, Neuberger A, Wilson BM (1969). The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 294-305.
- de Jong GAH, Wijngaards G, Boumans H, Koppelman SJ, Hessing M (2001). Purification and substrate specificity of transglutaminases from blood and *Streptovorticillium mobaraense*. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3389-3393.
- Demanzeau G, Rivalain N (2011). High hydrostatic pressure and biology: a brief history. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 1305-1314.
- Demtröder W (2008). Experimentalphysik 1-Mechanik und Wärme, 5. Auflage. Berlin, Springer.
- Desai UR, Osterhout JJ, Klivanov AM (1994). Protein structure in the lyophilized state: A hydrogen isotope exchange/ NMR study with bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 9420-9422.
- Deutsche Gesellschaft für Amyloidkrankheiten: <http://www.amyloid.de> Zugriff am: 30.04.2012
- Divry P, Florin M (1927). The optic properties of amyloid, *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, **97**, 1808.
- Dobson CM (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, **426**, 884-890.
- Düring K, Porsch P, Mahn A, Brinkmann O, Gieffers W (1999). The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Letters*, **449**, 93-100.
- Ebner KE, Denton WL, Brodbeck U (1966). The substitution of  $\alpha$ -lactalbumin for the B protein of lactose synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 232-236.
- Ehrlich H, Hanke T, Simon P, Born R, Fischer C, Frolov A, Langrock T, Hoffmann R, Schwarzenbolz U, Henle T (2009): Carboxymethylation of the fibrillar collagen with respect to formation of hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **92**, 542-551.
- Eisenmenger MJ, Reyes-De-Corcuera JI (2009). High pressure enhancement of enzymes: A review. *Enzyme Microb. Technol.*, **45**, 331-347.
- Ellison RT, Giehl TJ (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J. Clin. Invest.*, **88**, 1080-1091.
- Englard S, Seiffter S, (1990). Precipitation Techniques. *Methods Enzymol.*, **182**, 283-300.

- Ereth N (2008). Enzymatische Quervernetzung von Lysozym: Isolierung und Charakterisierung von oligomeren Proteinen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Dresden, Technische Universität Dresden.
- Falcone P, Serafini-Fracassini D, Del Duca, S (1993). Comparative studies of transglutaminase activity and substrates in different organs of *Helianthus tuberosus*. *J. Plant Physiol.*, **142**, 265-273.
- Fink AL (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold. Des.*, **3**, 9-23.
- Finot PA, Magnenat E, Mottu F, Bujard E, Deutsch R, Dormond C, Isely A, Pignat L, Madelaine R (1978). Biological availability and metabolic transit of amino acids modified by technological treatments. *Ann. Nutr. Alim.*, **32**, 325-338.
- Fischer W, Gustafsson L, Mossberg A, Gronli J, Mork S, Bjerkvig R (2004). Human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Res.*, **64**, 2105-2112.
- Fleming A, Allison VD (1922). Observations on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues. *Br. J. Exp. Pathol.*, **5**, 252-260.
- Foguel D, Silva JL (2004). New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. *Biochem.*, **43**, 11361-11370.
- Folk JE (1969). Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3707-3713.
- Folk JE, Cole PW (1966). Transglutaminase - Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 244-264.
- Folk, JE (1980). Transglutaminases. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 517-531.
- Förster A (2006). Quantitative Studien zu Vorkommen und metabolischem Transit alimentärer Maillard-Reaktions-Produkte. *Dissertation*, Dresden, Technische Universität Dresden.
- Frare E, Poverino de Laureto P, Zurdo J, Dobson CM, Fontana A (2004). A highly amyloidogenic region of hen lysozyme. *J. Mol. Biol.*, **340**, 1153-1165.
- Freimuth U, Nötzold H, Krause W (1980). Alkali treatment of proteins. Part V. Formation of lysinoalanine in  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin. *Nahrung*, **24**, 351-357.
- Freitas DS, Freitas JAN (2010). Biochemical and biophysical characterization of lysozyme modified by PEGylation. *Int. J. Pharm.*, **392**, 111-117.
- Gauche C, Vieira JTC, Ogliari J, Bordignon-Luiz MT (2008). Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochem.*, **43**, 788-794.
- Gerbanowski A, Rabiller C, Larre C, Gueguen J (1999). Grafting of aliphatic and aromatic probes on bovine serum albumin: Influence on its structural and physicochemical characteristics. *J. Protein Chem.*, **18**, 325-336.
- Gerbaux V, Villa A, Monamy C, Bertrand A (1997). Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 49-54.
- Goda S, Takano K, Yamagata Y, Nagata R, Akutsu H, Maki S, Namba K, Yutani K (2000). Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution. *Protein Sci.*, **9**, 369-375.
- Goers J, Permyakov SE, Permyakov EA, Uversky VN, Fink AL (2002). Conformational prerequisites for  $\alpha$ -Lactalbumin Fibrillation. *Biochemistry*, **41**, 12546-51.

- Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, **5**, 467-477.
- Graham LL, Beveridge TJ (1994). Structural differentiation of the *Bacillus subtilis* 168 cell wall. *J. Bacteriol.*, **176**, 1413-1421.
- Gratzer W, Holzwarth G, Doty P (1961). Polarization of the ultraviolet absorption bands in  $\alpha$ -helical polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1785-1791.
- Greenfield N, Fasman G (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, **8**, 4108-4116.
- Griffin M, Casadio R, Bergamini CM (2002). Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochem. J.*, **368**, 377-396.
- Groombridge B, Jenkins MD (2000). Global biodiversity: Earth's living resources in the 21st century World Conservation Monitoring Centre, World Conservation Press, Cambridge.
- Gross M, Jaenicke R (1994). Proteins under pressure - the influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. *Eur. J. Biochem.*, **221**, 617-630.
- Grossowicz N, Ariel M (1983). Methods for determination of lysozyme activity. *Methods Biochem. Anal.*, **29**, 435-46.
- Gustafsson L, Hallgren O, Mossberg A, Pettersson J, Fischer W, Aronsson A (2005). HAMLET kills tumor cells by apoptosis: Structure, cellular mechanisms, and therapy. *J. Nutr.* **135**, 1299-1303.
- Hannig, C, Spitzmüller, B, Hannig, M (2009). Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. *Clin. Oral Invest.*, **13**, 15-21.
- Hayakawa S, Nakai S (1985). Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, **50**, 486-491.
- Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, Gorris LGM, von Wright A (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3590-3595.
- Hellwig M (2011). Proteolytische Freisetzung und epithelikal Transport von Maillard-Reaktionsprodukten und Crosslink-Aminosäuren. *Dissertation*, Dresden, Technische Universität Dresden.
- Hendrix T, Griko YV, Privalov PL (2000). A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine  $\alpha$ -Lactalbumin. *Biophys. Chem.*, **84**, 27-34.
- Henle T, Walter AW, Klostermeyer H (1993). Detection and identification of the cross-linking amino acids N  $\tau$ - and N  $\pi$ -(2'-amino-2'-carboxy-ethyl)-L-histidine ("histidinoalanine", HAL) in heated milk products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **197**, 114-117.
- Henle T, Walter H, Krause I, Klostermeyer H (1991). Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.*, **1**, 125-135.
- Holleman AF, Wiberg E (1995). Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 101. verbesserte und stark erweiterte Auflage von Niels Wiberg. Berlin, deGruyter & Co.
- Höltje J-V (1996). Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology - Bacterial Lysozymes . Schweiz, Basel. Birkhäuser-Verlag.
- Horn MJ, Jones DB, Ringel SJ (1941). Isolation of a new sulfur-containing amino acid (lanthionine).from sodium carbonated -treated wool. *J. Biol. Chem.*, **138**, 141-149.

- Humblet-Hua N, Sagis LMC, van der Linden E (2008). Effects of flow on hen egg white lysozyme (HEWL) fibril formation: Length distribution, flexibility, and kinetics. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 11875-11882.
- Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R (2007). Bioactive egg compounds. Berlin. Springer Verlag.
- Iacono VJ, Byrnes TP, Crawford IT, Grossbard BL, Pollock JJ, MacKay BJ (1985). Lysozyme-mediated de-chaining of *Streptococcus mutans* and its antibacterial significance in an acidic environment. *J. Dent. Res.*, **64**, 48-53.
- Ibrahim HR, (1998). On the novel catalytically-independent antimicrobial function of hen eggwhite lysozyme: A conformation-dependent activity. *Nahrung*, **42**, 187-193.
- Ibrahim HR, Kato A, Kobayashi K (1991). Antimicrobial effects of lysozyme against gram-negative bacteria due to covalent binding of palmitic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2077-2082.
- Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T (2001). Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Letters*, **506**, 27-32.
- Ibrahim RH, Higashiguchi S, Juneja LR, Kim M, Yamamoto T (1996). A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1416-1423.
- Ibrahim RH, Kobayashi K, Kato A (1993). Length of hydrocarbon chain and antimicrobial action to Gram-negative bacteria of fatty acylated lysozyme. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1164-1168.
- Ibrahim, RH, Yamada M, Kobayashi K, Kato A (1992). Bactericidal action of lysozyme against gram-negative bacteria due to insertion of a hydrophobic pentapeptide into its C-terminus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1361-1363.
- Imoto T (1987) Denaturation and renaturation of modified lysozymes. *Protein Eng.*, **1**, 229-229.
- Imoto T (1996). Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology - Engineering of lysozyme. Schweiz, Basel. Birkhäuser-Verlag.
- Ito Y, Yamada H, Nakamura M, Yoshikawa A, Ueda T, Imoto T (1993). The primary structures and properties of non-stomach lysozymes of sheep and cow, and implication for functional divergence of lysozyme. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 649-658.
- Ito Y, Yamada HI, Imoto T (1992). Colorimetric assay for lysozyme using *Micrococcus luteus* labeled with a blue dye, remazol brilliant blue R, as a substrate. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1523-1526.
- Jaros D, Partschefeld C, Henle T, Rohm H (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *J. Texture Stud.*, **37**, 113-155.
- Jin L, Claborn KA, Kurimoto M, Geday MA, Maezawa I, Sohraby F (2003). Imaging linear birefringence and dichroism in cerebral amyloid pathologies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15294-15298.
- Johnson RJK, Christodoulou J, Dumoulin M, Caddy GL, Alcocer MJC, Murtagh GJ, Kumita JR, Larsson G, Robinson CV, Archer DB, Luisi B, Dobson CM (2005). Rationalising lysozyme amyloidosis: Insights from the structure and solution dynamics of T70N Lysozyme. *J. Mol. Biol.*, **352**, 823-836.
- Jollès J, Dianoux AC, Hermann J, Niemann B, Jollès P (1966). Relationship between the cysteine and tryptophan contents of 5 different lysozymes and their heat stability and specific activity. *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 568-570.
- Jollès P (1969). Lysozyme : Ein Kapitel Molekularbiologie. *Angew. Chem.*, **81**, 244-256.

- Jollès P (1996). *Lysozymes: Model enzymes biochemistry and biology*. Schweiz, Basel. Birkhäuser-Verlag.
- Kamatari YO, Yokoyama S, Tachibana H, Akasaka K (2005). Pressure-jump NMR study of dissociation and association of amyloid protofibrils, *J. Mol. Biol.*, **349**, 916-921.
- Kamiya N, Takazawa T, Tanaka T, Uedac H, Nagamuneb T (2003). Site-specific cross-linking of functional proteins by transglutamination. *Enzyme Microb. Technol.*, **33**, 492-496.
- Kanaji T, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H, Motoki M, Shimonishi Y (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from streptovorticillium sp. strain s-8112. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11565-11572.
- Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matsui H, Suzuki E (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44252-44260.
- Katamari YO, Kitahara R, Yamada H, Yokoyama S, Akasaka K (2004). High-pressure NMR spectroscopy for characterizing folding intermediates and denatured states of proteins. *Methods*, **34**, 133-143.
- Kelly JW (2000). Mechanisms of amyloidogenesis. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 824-826.
- Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, Grover RK (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.*, **151**, 229-238.
- Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL (2001). Is congo red an amyloid-specific dye?. *J. Biol. Chem.*, **276**, 22715-22721.
- Kiczka W (1995). Antibacterial composition and method of use. Patent: 5466449.
- Kießling C (2011). Isolierung und Charakterisierung enzymatisch quervernetzter Lysozym-Oligomere. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Dresden, Technische Universität Dresden.
- Kijowski J, Marciszewska C, Popiol A (2005). Quality and microbiologic stability of chicken legs after treatment with lysozyme. *Proceedings of XI European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products*, Doorwerth, Netherlands. 19-25.
- Kleyn DH, Klostermeyer H (1980). Dehydroalanine as a reaction product during heat treatment of  $\beta$ -casein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **170**, 11-13.
- Klunk WE, Pettegrew JW, Abraham DJ (1989a). Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 1273-1281.
- Klunk WE, Pettegrew JW, Abraham DJ (1989b). Two simple methods for quantifying low-affinity dye-substrate binding. *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 1293-1297.
- Koshland, DE (1953). Stereochemistry and mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.*, **28**, 416-436.
- Kovacs-Nolan J, Phillips M, Mine Y (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 8421-8431.
- Krätz O (2004). Stein aus Milch-Aufstieg und Niedergang des Galaliths. *Chem. Unserer Zeit*, **38**, 133-137.
- Krebs MRH, Bromley EHC, Donald AM (2005). The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. *J. Struct. Biol.*, **149**, 30-37.

- Krebs MRH, Wilkins DK, Chung EW, Pitkeathly MC, Chamberlain AK, Zurdo J (2000). Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and a peptide fragment from the  $\beta$ -domain. *J. Mol. Biol.* **300**, 541-549.
- Kundrot CE, Richards FM (1987). Crystal structure of hen egg-white lysozyme at a hydrostatic pressure of 1000 atmospheres. *J. Mol. Biol.*, **193**, 157-170.
- Laible NJ, Germaine GR (1985). Bactericidal activity of human lysozyme, Muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect. Immun.*, **48**, 720-728.
- Lauber S (2002). Beziehungen zwischen Struktur und Gelbildungseigenschaften posttranslational quervernetzter Milchproteine. *Dissertation*, Dresden, Technische Universität Dresden.
- Lauber S, Henle T, Klostermeyer H, (2000). Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *Eur. Food Res. Technol.*, **210**, 305-309.
- Lauber S, Noack I, Klostermeyer H, Henle T (2001a). Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *Eur. Food Res. Technol.*, **213**, 273-276.
- Lauber S, Noack I, Klostermeyer H, Henle T (2001b) Oligomerization of  $\beta$ -lactoglobulin by microbial transglutaminase during high pressure treatment. *Eur. Food Res. Technol.*, **213**, 246-247.
- Lee DS, Matsumoto S, Matsumura Y, Mori T (2002). Identification of the  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine cross-linking sites in  $\alpha$ -Lactalbumin polymerized by mammalian and microbial transglutaminases. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7412-7419.
- Lesnierowski G, Cegielska-Radziejewska R, Kijowski J (2001). Antibacterial activity of thermally modified lysozyme. *Electron. J. Polish Agric.*, **4**.
- Li H, Akasaka K (2006). Conformational fluctuations of proteins revealed by variable pressure NMR. *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 331-345.
- Li TM, Hook JW, Drickamer HG, Weber G (1976). Plurality of pressure-denatured forms in chymotrypsinogen and lysozyme. *Biochemistry*, **15**, 5571-5580.
- Lilley GR, Skill J, Griffin M, Bonner PLR (1998). Detection of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Physiol.*, **117**, 1115-1123.
- Lindl T (2002). Zell- und Gewebekultur. 5. Auflage. Berlin, Spectrum akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Maenaka K, Kawai G, Watanabe K, Sunada F, Kumagai I (1994). Functional and structural role of a tryptophan generally observed in protein-carbohydrate interaction. TRP-62 of hen egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7070-7075.
- Maeno A, Matsuo H, Akasaka K (2009). The pressure-temperature phase diagram of hen lysozyme at low pH. *Biophysics (Biophys. Soc. Jpn.)*, **5**, 1-9.
- Maillart P, Ribadeau-Dumas B (1988). Preparation of  $\alpha$ -lactoglobulin and  $\beta$ -lacto-globulinfree proteins from whey retentate by NaCl salting out at low pH. *J. Food Sci.*, **53**, 743-745.
- Mark AE, Gunsteren WF (1992). Simulation of the thermal denaturation of hen egg white lysozyme: trapping the molten globule state. *Biochemistry*, **31**, 7745-7748.
- Maroufi B, Ranjbar B, Khajeh K, Naderi-Manesh H, Yaghoubi H (2008). Structural studies of hen egg-white lysozyme dimer: Comparison with monomer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 1043-1049.

- Marx C (2008). Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase mittels Random Mutagenese. *Dissertation*, Halle-Wittenberg, Martin-Luther-Universität.
- Masschalck B, Michiels CW (2003). Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, **29**, 191-214.
- Masschalck B, van Houdt R, van Haver EGR, Michiels CW (2001). Inactivation of gramnegative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 339-344.
- Matulis D, Lovrien R (1998). 1-anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophys. J.*, **74**, 422-429.
- McCarthy AN, Grigera JR (2006). Effect of pressure on the conformation of proteins. A molecular dynamics simulation of lysozyme. *J. Mol. Graphics Modell.*, **24**, 254-261.
- McKenzie HA (1996). Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology -  $\alpha$ -Lactalbumins and lysozymes. Schweiz, Basel. Birkhäuser-Verlag.
- Melo AMS, Cassar C, Miles RJ (1998). Trisodium phosphate increases sensitivity of gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *J. Food Prot.*, **61**, 839-844.
- Menéndez O (2006). Stability of microbial transglutaminase and its reactions with individual caseins under atmospheric and high pressure. *Dissertation*, Dresden, Technische Universität Dresden.
- Menéndez O, Rawel H, Schwarzenbolz U, Henle, T (2006). Structural changes of microbial transglutaminase during thermal and high-pressure treatment. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 1716-1721.
- Menéndez O, Schwarzenbolz U, Partschefeld C, Henle T (2009). Affinity of microbial transglutaminase to  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - and acid-casein under atmospheric and high pressure conditions *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4177-4184.
- Menzel H (2011). Schutzschicht gegen Bakterien. *Nachr. Chem.*, **59**, 1039-1043.
- Merlini G, Bellotti V (2003). Molecular mechanisms of amyloidosis. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 583-596.
- Merlini, G, Bellotti V (2005). Lysozyme: A paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. *Clin. Chim. Acta*, **357**, 168-172.
- Messens W, Van Camp J, Huyghebaert A (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends Food Sci. Technol.*, **8**, 107-112.
- Meyer M, Klostermeyer H, Kleyn DH (1981). Reduced formation of lysinoalanine in enzymically dephosphorylated casein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **172**, 446-448.
- Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila K (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect. Immun.*, **64**, 5403-5405.
- Mine Y (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 225-232.
- Mishra R, Sjolander D, Hammarstrom P (2011). Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile red. *Mol. Biosyst.*, **7**, 1232-1240.
- Mishra R, Soergjerd K, Nystroem S, Nordigarden A, Yu Y, Hammarstroem P (2007). Lysozyme amyloidogenesis is accelerated by specific nicking and fragmentation but decelerated by intact protein binding and conversion. *J. Mol. Biol.*, **366**, 1029-1044.

- Morozova-Roche LA (2007). Equine lysozyme: The molecular basis of folding, self-assembly and innate amyloid toxicity. *FEBS Letters*, **581**, 2587-2592.
- Morshedi D, Rezaei-Ghaleh N, Ebrahim-Habibi A, Ahmadian S, Nemat-Gorgani M (2007). Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives - possible mechanism of action. *FEBS Journal*, **274**, 6415-6425.
- Mossberg A, Hou Y, Svensson M, Holmqvist B, Svanborg C (2010a). HAMLET treatment delays bladder cancer development. *J. Urol. (N.Y., US)*, **183**, 1590-1597.
- Mossberg A, Mok KH, Morozova-Roche LA, Svanborg C (2010b). Structure and function of human  $\alpha$ -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET)-type complexes. *FEBS J.*, **277**, 4614-4625.
- Motoki M, Kumazawa Y (2000). Recent research trends in transglutaminase technology for food processing. *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 151-160.
- Motoki M, Nio N, Takinami K (1984). Functional properties of food proteins polymerized by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1257-1261.
- Mozhaev VV, Heremans K, Frank J, Masson P, Balny C (1996). High pressure effects on protein structure and function, *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **24**, 81-91.
- Mulkerrin M (1996). Protein structure analysis using circular dichroism. In: Havel HA (ed) *Spectroscopic Methods for Determining Protein Structure in Solution*. New York, VCH Publishers.
- Muraki M, Harata K, Hayashi Y, Machida M, Jigami Y (1991). The importance of precise positioning of negatively charged carboxylate in the catalytic action of human lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **1079**, 229-237.
- Muraki M, Morikawa M, Jigami Y, Tanaka H (1987). The roles of conserved aromatic amino-acid residues in the active site of human lysozyme: a site-specific mutagenesis study. *Biochim. Biophys. Acta*, **916**, 66-75.
- Murthy SNP, Lukas TJ, Jardetzky TS, Lorand L (2009). Selectivity in the post-translational transglutaminase-dependent acylation of lysine residues. *Biochemistry*, **48**, 2654-2660.
- Nakamura S, (1993). Novel surface functional properties of polymannosyl lysozyme constructed by genetic modification. *FEBS Letters*, **328**, 259-262.
- Nakamura S, Kato A, Kobayashi K (1991). New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 647-650.
- Nakanishi F, Ando A (1990). Hair dye composition. Patent 2237908: Kosmetika.- Japan, 20.09.1990.
- Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnol.*, **29**, 464-472.
- Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S (2001). Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism. *Biochem.*, **40**, 6036-6046.
- Nieuwenhuizen WF, Dekker HL, de Koning LJ, Groneveld T, de Koster CG, de Jong GA, (2003). Modification of glutamine and lysine residues in holo and apo  $\alpha$ -lactalbumin with microbial transglutaminase. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7132-7139.
- Nieuwenhuizen WF, Dekker HL, Groneveld T, de Koster CG, de Jong GA (2004). Transglutaminase-mediated modification of glutamine and lysine residues in native bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biotechnol. Bioeng.*, **85**, 248-258.

- Niraula TN, Konno T, Li H, Yamada H, Akasaka K, Tachibana H (2004). Pressure-dissociable reversible assembly of intrinsically denatured lysozyme is a precursor for amyloid fibrils. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4089-4093.
- Nitschmann H, Hadorn H (1944). The conversion of casein with HCHO. V. Behavior of the  $\epsilon$ -amino groups of lysine and the peptide groups. *Helv. Chim. Acta*, **27**, 299-312.
- Noack T (2011). Nicht-enzymatische Quervernetzung von Hühnereiweißlysozym und ausgewählten Milchproteinen. *Wissenschaftliche Abschlussarbeit*. Dresden, Technische Universität Dresden.
- Nonaka M, Ito R, Sawa A, Motoki M, Nio N (1997). Modification of several proteins by using  $\text{Ca}^{2+}$ -independent microbial transglutaminase with high-pressure treatment. *Food Hydrocolloids*, **11**, 351-353.
- Nonaka M, Matsuura Y, Motoki M (1996). Incorporation of lysine- and lysine dipeptides into  $\alpha_{s1}$ -casein by  $\text{Ca}^{2+}$ -independent microbial Transglutaminase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 131-133.
- Ohtsuka T, Ota M, Nio N, Motoki M (2000). Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **64**, 2608-2613.
- Partschefeld C (2011). Enzymatisch vernetzte Milchproteine: Reaktionsorte und funktionelle Konsequenzen. *Dissertation*, Dresden, Technische Universität Dresden.
- Partschefeld C, Richter S, Schwarzenbolz U, Henle T (2007a). Modification of  $\beta$ -lactoglobulin by microbial transglutaminase under high hydrostatic pressure: Localization of reactive glutamine residues. *J. Biotechnol.*, **2**, 462-468.
- Partschefeld C, Schwarzenbolz U, Richter S, Henle T (2007b). Crosslinking of casein by microbial transglutaminase and its resulting influence on the stability of micelle structure. *J. Biotechnol.*, **2**, 456-461.
- Paulus T, Henle T, Haeßner R, Klostermeyer H (1997). Formation of thiazolines within the peptide chain during heating of proteins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **204**, 247-251.
- Pedersen MH, Hansen TK, Sten E, Seguro K, Ohtsuka T, Morita A, Bindslev-Jensen C, Poulsen LK, (2004). Evaluation of the potential allergenicity of the enzyme microbial transglutaminase using the 2001 FAO/WHO Decision Tree. *Mol. Nutr. Food Res.*, **48**, 434-440.
- Pellegrini A, Thomas U, von Fellenberg R, Wild P (1992). Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *J. Appl. Bacteriol.*, **72**, 180-187.
- Pepys MB, Hawkins PN, Booth DR, Vigushin DM, Tennent GA, Soutar AK (1993). Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. *Nature*, **362**, 553-557.
- Permyakova EA, Berliner LJ (2000).  $\alpha$ -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, **473**, 269-274.
- Pettersson-Kastberg J, Aits S, Gustafsson L, Mossberg A, Storm P, Trulsson M (2009). Can misfolded proteins be beneficial? The HAMLET case. *Ann. Med.*, **41**, 162-176.
- Phillips DC (1966). Three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Am.*, **215**, 78-90.
- Pomory CM (2008). Color development time of the Lowry protein assay. *Anal. Biochem.*, **378**, 216-217.
- Provencher S, Gloeckner J (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, **20**, 33-37.

- Rammer P, Groth-Pedersen L, Kirkegaard T, Daugaard M, Rytter A, Szyniarowski P (2010). BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, **9**, 24-32.
- Reategui E, Aksan A, (2009). Structural changes in confined lysozyme. *J. Biomech. Eng.*, **131**, 0745201-0745204.
- Refaee M, Tezuka T, Akasaka K, Williamson MP (2003). Pressure-dependent changes in the solution structure of HEWL. *J. Mol. Biol.*, **327**, 857-865.
- Rochet J, Lansbury PTJr (2000). Amyloid fibrillogenesis: Themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 60-68.
- Röcken C (2008). Pathologie der Amyloidosen. *Der Nephrologe*, **4**, 275-284.
- Rodriguez-Nogales JM 2006. Effect of preheat treatment on the transglutaminase catalyzed cross-linking of goat milk proteins. *Process Biochem.*, **41**, 430-437.
- Rosenberg IM (1998). Protein analysis and purification: benchtop techniques. Boston, USA Birkhäuser.
- Rouget JB, Aksel T, Roche J, Saldana JL, Garcia AE, Barrick D, Royer CA (2011). Size and sequence and the volume change of protein folding, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 6020-6027.
- Royer C, Winter R (2011). Protein hydration and volumetric properties. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **16**, 568-571.
- Salton MRJ (1957). The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 82-99.
- Sarkar NNK, (1957). Enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 451.
- Sarkar PK, Doty P (1966). The optical rotatory properties of the  $\beta$ -configuration in polypeptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 981-989.
- Sava G (1996). Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology - Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes, Schweiz, Basel. Birkhäuser-Verlag.
- Schäfer C, Schott M, Brandl F, Neidhart S, Carlei R (2005). Identification and quantification of E-( $\gamma$ -Glutamyl)lysine in digests of enzymatically cross-linked leguminous proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS), *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2830-2837.
- Scheltingal ACT, Kalk KH, Beintema JJ, Dijkstra BW (1994). Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure*, **2**, 1181-1189.
- Scheuermann T (2003). Untersuchungen zum Einfluss von Polyalaninsequenzen auf die Bildung amyloider Fibrillen von PABPN1. *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schmitz I, Zahn H, Klostermeyer H, Rabbel K, Watanabe K (1976). On the occurrence of isopeptide bonds in heated milk protein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **160**, 377-381.
- Schwartz Ph (1970). Amyloidosis: Cause and manifestations of senile deterioration. Springfield, Illinois. Charles C Thomas Verlag.
- Schwarzenbolz U, Henle T (2010). Non-enzymatic modifications of proteins under high-pressure treatment, *High Pres. Res.*, **30**, 458-465.

- Schwietzke U (2012). Kombination analytischer Strategien und multivariante Datenanalysen zur Beurteilung von Milch- und Molkereierzeugnissen am Beispiel Schmelzkäse. *Dissertation*, Dresden, Technische Universität Dresden.
- Seguro K, Kumazawa Y, Kuraishi C, Sakamoto H, Motoki M (1996). The  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine moiety in crosslinked casein is an available source of lysine for rats. *J. Nutri.*, **126**, 2557-2562.
- Seguro K, Kumazawa Y, Ohtsuka T, Ide H, Nio N, Motoki M, Kubota K (1995). E-( $\gamma$ -glutamyl)lysine: hydrolysis by  $\gamma$ -glutamyltransferase of different origins, when free or protein bound. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1977-1981.
- Shelef LA, Seiter J A (1993). Indirect antimicrobials. *Antimicrobials in Foods 2nd ed.*, New York, Marcel Dekker, Inc.
- Shimba N, Shinohara M, Yokoyama K, Kashiwagi T, Ishikawa K, Ejima D, Suzuki E (2002). Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its flexible residues affecting the active site. *FEBS Letters*, **517**, 175-179.
- Shugar D (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 302-309.
- Siepaio MP, Meunier JCF (1995). Diamine oxidase and transglutaminase activities in white lupine seedlings with respect to crosslinking of proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1151-1156.
- Sigler J (2004). Der Einsatz von Lysozym in der Weinbereitung - Der badische Winzer. - 2004. - 7. [http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/show/1116502/WBI\\_Einsatz%20von%20Lysozym%20in%20der%20Weinbereitung%20Bad.%20Winzer%2007\\_2004.pdf](http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/show/1116502/WBI_Einsatz%20von%20Lysozym%20in%20der%20Weinbereitung%20Bad.%20Winzer%2007_2004.pdf)
- Simons BL, Hefford MA, Kaplan H (2003). International Publication Number: WO 03/018613, International Patent Classification: C07K 1/00.
- Simons BL, King MC, Cyr T, Hefford MA, Kaplan H (2002). Covalent cross-linking of proteins without chemical reagents. *Prot. Sci.*, **11**, 1558-1564.
- Smeller L, Meersman F, Heremans K (2006). Refolding studies using pressure: The folding landscape of lysozyme in the pressure-temperature plane. *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 497-505.
- Sophianopoulos AJ, Weiss BJ (1964). Thermodynamics of conformational changes of proteins I. pH-dependent denaturation of muramidase. *Biochemistry*, **3**, 1920-1928.
- Sørensen ES, Rasmussen LK, Petersen TE (1999). Component PP3 from bovine milk is a substrate for transglutaminase. Sequence location of putative crosslinking sites. *J. Dairy Res.*, **66**, 145-150.
- Sørensen M, Sørensen SPL (1939). The protein in whey. *C R Trav Lab Carlsberg*, **23**, 55-99.
- Sreerama N, Woody R (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.*, **287**, 252-260.
- Stauff J (1956). Denaturation of proteins. *Kolloid-Z.*, **146**, 48-50.
- Sternberg M, Kim CY, Schwende FJ (1975). Lysinoalanine: presence in foods and food ingredients. *Science*, **190**, 992-994.
- Strynadka NCJ, James MNG (1996). Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology - A model enzyme in protein crystallography. Schweiz, Basel. Birkhäuser-Verlag.

- Svensson M (2003). alpha-Lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) *Prot. Sci.*, **12**, 2794-2804
- Swaisgood HE (2005). The importance of disulfide bridging. *Biotechnol. Adv.*, **23**, 71-73.
- Tauscher B (1995). Review: Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **200**, 3-13.
- Tedford L, Smith D, Schaschke CJ (1999). High pressure processing effects on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Res. Int.*, **32**, 101-106.
- Tomita S, Yoshikawa H, Shiraki K (2011). Arginine controls heat-induced cluster-cluster aggregation of lysozyme at around the isoelectric point. *Biopolymers*, **95**, 695-701.
- Trexler AJ, Nilsson MR (2007). The formation of amyloid fibrils from proteins in the lysozyme family. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **8**, 537-557.
- Valenta C, Schwarz E, Bernkop-Schnürch A (1998). Lysozyme-caffeic acid conjugates: possible novel preservatives for dermal formulations. *Int. J. Pharm.*, **174**, 125-132.
- Vassar PS, Culling CFA (1959). Fluorescent stains with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch. Pathol.*, **68**, 487- 494.
- Virchow R (1854). Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefunden Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, **6**, 135-138.
- Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, **412**, 835-838.
- Wang SS, Chou S, Liu K, Wu C (2009a). Effects of glutathione on amyloid fibrillation of hen egg-white lysozyme. *Int. J. Biol. Macromol.*, **45**, 321-329.
- Wang SS, Liu K, Wu C, Lai J (2009b). Investigating the influences of redox buffer compositions on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 1663-1672.
- Watanabe K, Klostermeyer H (1977). Formation of dehydroalanine, lanthionine and lysinoalanine during heat treatment of  $\beta$ -lactoglobuline A. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **164**, 77-79.
- Weltgesundheits-Organisation (WHO, 2012). International Programme of Chemical Safty – IPCS <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je04.htm>, Zugriff am 21.02.2012.
- Wilson LJ, Adcock LD, Pusey ML (1993) A dialysis technique for determining aggregate concentrations in crystallizing protein solutions. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **26**, 8113-8117.
- Woodard JC, Short DD (1977). Reanal toxicity of N- $\epsilon$ -(DL-2-Amino-2-Carboxyethyl)-L-Lysine (Lysinoalanine) in rats. *Fd Cosmet. Toxicol.* **15**, 117-119.
- Xie J, Qin M, Cao Y, Wang W (2011). Mechanistic insight of photo-induced aggregation of chicken egg white lysozyme: The interplay between hydrophobic interactions and formation of intermolecular disulfide bonds. *Proteins*, **9**, 2505-2516.
- Yaghoubi H, Khajeh K, Hosseinkhani S, Ranjbar B, Naderi-Manesh H (2007). Application of zero-length cross-linking to form lysozyme, horseradish peroxidase and lysozyme-peroxidase dimers: Activity and stability. *J. Biol. Macromol.*, **41**, 624-630.
- Yan SB, Wold F (1984). Neoglycoproteins: in vitro introduction of glycosyl units at glutamines in beta-casein using transglutaminase. *Biochem.*, **23**, 3759-3765.

Yasueda H, Nakanishi K, Kumazawa Y, Nagase K, Motoki M, Matsui H (1995). Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*pagrus major*). Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **232**, 411-419.

Yeboah FK, Alli I, Yaylayan VA, Yasuo K, Chowdhury SF, Purisima EO (2004). Effect of limited solid-state glycation on the conformation of lysozyme by ESI-MS/MS peptide mapping and molecular modeling. *Bioconjugate Chem.*, **15**, 27-34.

Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 447-454.

## Veröffentlichungen

Schuh S, Schwarzenbolz U, Henle T (2010). Cross-linking of Hen Egg White Lysozyme by Microbial Transglutaminase under High Hydrostatic Pressure: Localization of Reactive Amino Acid Side Chains. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 12749-12752.

### Vortrag

Schuh S, Schwarzenbolz U, Henle T (2010). Reaktionsorte der enzymatischen Vernetzung von Lysozym unter Hochdruck. *Regionalverbandstagung (Ost) der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Dresden, 25. - 26.03.2010.

### Poster

Schuh S, Schwarzenbolz U, Henle T (2012). High pressure induced enzymatic functionalization of lysozyme. *Biotechnologisches Seminar*, Dresden, 27.02.2012 (Poster).

Schuh S, Noack T, Henle T (2011). Dry thermal induced cross-linking of  $\beta$ -casein and lysozyme. *Milk Conference 2011*, Bern, Schweiz, 12. - 13.09.2011 (Poster).

Schuh S, Schwarzenbolz U, Henle T (2011). Enzymatic Functionalization of Lysozyme under High Hydrostatic Pressure. *49. European High Pressure Research Group Conference*, Budapest, Ungarn, 28.08 - 02.09.2011 (Poster).

Schuh S, Schwarzenbolz U, Henle T (2010). Enzymatische Vernetzung von Lysozym unter Hochdruck: Identifizierung der reaktiven Aminosäureseitenketten. *39. Lebensmittelchemikertag*, Stuttgart, 20. - 22.09.2010 (Poster). Abstract: *Lebensmittelchemie*, **65**, 2011, 50-75.

Schuh S, Schwarzenbolz U, Henle T (2010). Enzymatic Modification of Lysozyme under High Hydrostatic Pressure: Localization of Reactive Amino Acid Side Chains. *6. High Pressure Bioscience and Biotechnology*, Freising, 28.08 - 01.09.2010 (Poster).

Schuh S, Schwarzenbolz U, Henle T (2009). Enzymatische Vernetzung von Lysozym unter Hochdruck. *38. Lebensmittelchemikertag*, Berlin, 14. - 16.09.2009 (Poster). Abstract: *Lebensmittelchemie*, **64**, 2010, 26-43.

---

## Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Thomas Henle (Professor für Lebensmittelchemie an der TU Dresden) möchte ich an dieser Stelle für die Bereitstellung des vielseitigen und interessanten Themas, sowie das entgegengebrachte Vertrauen, die Anregungen und seinem steten Optimismus danken.

Weiter gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Harshadrai Rawel (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Potsdam) für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Dr. Anke Förster und Dr. Uta Schwietzke gehört mein mannigfaltiger Dank für die Übernahme des Lektorates.

Für die engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten danke ich D. Pallmann, N. Ereth, D. Georgi, C. Kießling, T. Noack und K. Bahr. Ohne euch wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen und die Zeit im Labor hat mit euch viel Spaß gemacht! Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und all die Hilfe möchte ich mich bei meinem Labor 411 und meinen Büromitinsassen, aber auch allen anderen ehemaligen Kollegen/innen in der Lebensmittelchemie bedanken, die vielen fachlichen und privaten Gespräche sowie die amüsanten und skurrilen Frühstücksrunden haben meine Zeit sehr bereichert.

Herrn Dr. Uwe Schwarzenbolz und Frau Karla Schlosser danke ich für die zahlreichen Massenspektren und Aminosäureanalysen. Herrn Prof. Karl-Heinz van Pée, (Professor für allgemeine Biochemie), Anne Förster und allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für allgemeine Biochemie der TU Dresden sei gedankt für die Möglichkeit, ihre Räume und ihr Wissen nutzen zu dürfen, besonders aber für ihre stete und freundliche Hilfsbereitschaft. Frau R. Schulze aus der Professur für Bioanalytische Chemie danke ich für die Elementanalysen und den Mitarbeitern des Lehrstuhls für allgemeine Genetik der Fachrichtung Biologie für die Möglichkeit Fluoreszenzanalysen bei Ihnen durchführen zu können.

Für die Anfertigungen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Dr. Thomas Kurth vom Biotechnologischen Institut Dresden, TU Dresden und Prof. Dr. Harshadrai Rawel für die Möglichkeit Zirkulardichroismus-Messungen am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie in Potsdam durchzuführen zu können.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und meine Familie danken, die zwar oft nicht so recht wussten, wovon ich eigentlich rede, aber auf deren Unterstützung immer Verlass ist.

Danke

## Versicherung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Professur für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter Anleitung von Prof. Dr. Thomas Henle angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 23.02.2011 zuletzt geändert durch Beschluss des Fakultätsrates vom 15.06.2011 an. Weiterhin versichere ich, dass bisher kein erfolgloses früheres Promotionsverfahren stattgefunden hat.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift