

Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie, Max Planck Institut für Biochemie,
Martinsried

Klonierung, rekombinante Herstellung und Charakterisierung von humanen Mastzell-Tryptasen

Frank Zettl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Hiller
Prüfer der Dissertation:
1. apl. Prof. Dr. L. Moroder
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 23.01.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 06.03.2002 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für klinische Chemie und klinische Biochemie, Klinikum der Ludwig-Maximilians Universität in München angefertigt.

Den Leitern der Abteilung, Frau Prof. Marianne Jochum und Herrn Prof. Hans Fritz, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und ihrer Unterstützung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer und Mentor Prof. Christian P. Sommerhoff für seine hervorragende Betreuung, seine fachliche Unterstützung durch zahlreiche Anregungen und interessante Diskussionen, die eine erfolgreiche Arbeit ermöglicht haben. Auch für die Geduld bei der Korrektur der schriftlichen Arbeit möchte ich ihm herzlich Danken.

Herrn Prof. Moroder danke ich für die Betreuung seitens der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München, sowie für die gute Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe im Tryptase-Projekt.

Diese Arbeit wurde durch zahlreiche Kooperationen im Rahmen eines Sonderforschungsbereiches ermöglicht. Mein Dank für die gute Zusammenarbeit gilt Herrn Dr. Norbert Schaschke und Lissy Weiler (AG Moroder) für die Hilfe bei der Anfertigung der CD-Spektren, der Schmelzkurven. Ausserdem stellte Herr Schaschke zahlreiche Inhibitoren zur Verfügung. Herrn Ulf Marquardt (AG Bode/Huber) danke ich für die Anfertigung und Auswertung der Röntgenkristallstrukturen, sowie der Bereitstellung der vielen Abbildungen.

Mein besonderer Dank geht an Frau Sabine Streicher, sowie Jeanny Horstmann und Maria Stein für die hervorragende technische Unterstützung sowie an Herrn Reinhardt Mentele und Frau Monika Zobawa für die Durchführung der Aminosäuresequenzierung und des Peptide Map.

Meinen Kollegen in unserer Arbeitsgruppe, Thomas Laßleben, Gabi Matschiner, Sigrid Köhler, Maria Stein, Christian Oswald, Clara Höhnecke, Sabine Streicher, Britta Abel, Dusica Gabrielcic-Geiger Jeanny Horstmann, Christina Siefert und Simone Köppl möchte ich ganz herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die fachlichen Diskussionen Danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Danken, die mir das Studium der Chemie ermöglicht haben, meiner Frau Claudia danke ich für ihre Unterstützung und Begleitung bei dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Die immunologische Bedeutung der Mastzelle	3
2.2	Mastzell Tryptase	4
2.2.1	Physiologische und pathophysiologische Funktionen der Tryptase	4
2.2.2	Die Tryptasestruktur erklärt viele biochemische Eigenschaften des Enzyms	5
2.2.3	Regulation der Tryptaseaktivität	6
2.3	Tryptaseinhibitoren	7
2.4	Tryptase Isoenzyme	7
2.5	Aufgabenstellung	10
3	MATERIALIEN UND METHODEN	11
3.1	Materialien	11
3.1.1	Geräte	11
3.1.1.1	Geräte für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten	11
3.1.1.2	Geräte für biochemische und proteinchemische Arbeiten	11
3.1.1.3	Geräte für die Fermentation	11
3.1.1.4	Sonstige Geräte	12
3.1.2	Substanzen und Materialien	12
3.1.2.1	Chromatographiemedien und -säulen	12
3.1.2.2	Materialien für die Proteinanalytik	12
3.1.2.3	Materialien für Enzymtests und kinetische Messungen	13
3.1.2.4	Materialien für molekularbiologische Arbeiten	14
3.1.2.5	Sonstige Materialien	15
3.1.3	Bakterien- und Hefestämme sowie Plasmide	16
3.1.4	Oligonukleotide	19
3.1.4.1	Erst-Strang cDNA-Synthese Primer	19
3.1.4.2	PCR-Primer	20
3.1.4.3	Sequenzierprimer	21
3.2	Methoden	21
3.2.1	Klonierung der Tryptase-Isoenzyme aus HMC 1- und MM6-Zellen	21
3.2.1.1	RNA-Isolierung nach Chomczynski	22
3.2.1.2	Erststrang-cDNA-Synthese	22
3.2.1.3	PCR mit spezifischen Tryptase-Primern	22
3.2.2	Expression der Tryptasen in <i>E. coli</i>	25
3.2.3	Zellernte und Isolierung der Einschlußkörperchen	25
3.2.4	Rückfaltung der rekombinanten Trx-Pro-Tryptasen	26
3.2.5	Expression der Tryptasen in <i>Pichia pastoris</i> im Schüttelkolben	27
3.2.6	Expression der Tryptasen in <i>Pichia pastoris</i> im Fermenter	27
3.2.6.1	Anzucht der Vorkultur	28
3.2.6.2	Sterilisation des Mediums und Animpfen des Fermenters	28
3.2.6.3	Fermentation	28
3.2.6.4	Zellernte und Aufkonzentrierung des Mediums	29
3.2.7	Reinigung der Tryptase-Isoenzyme mittels Kationenaustausch-Chromatographie	30
3.2.8	Proteinchemische Charakterisierung der Tryptase-Isoenzyme	30
3.2.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
3.2.8.2	Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit <i>Coomassie Brilliant Blau</i>	32
3.2.8.3	Western Blot Analyse	32

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.8.4	N-terminale Aminosäuresequenzierung	33
3.2.8.5	„Peptide Map“	34
3.2.8.6	Deglycosylierung der Tryptase-Isoenzyme	34
3.2.8.7	CD-Spektren und Schmelzpunktbestimmung	34
3.2.8.8	Stabilitätsmessung des Tryptase-Tetramers	35
3.2.9	Enzymkinetische Charakterisierung der Tryptase-Isoenzyme	36
3.2.9.1	„Active site“-Titration	36
3.2.9.2	Bestimmung der Enzymaktivität	37
3.2.9.3	Bestimmung der enzymkinetischen Kenngrößen (K_m , K_{cat} , und K_{cat}/K_m)	37
3.2.9.4	Bestimmung der Dissoziationskonstante K_i des Enzym-Inhibitor-Komplexes	39
3.2.10	Trennung der „Tryptase-Spezies“	43
3.2.11	Allgemeine mikrobiologische und molekularbiologische Methoden	43
3.2.11.1	Stammhaltung von <i>E. coli</i> -Stämmen	43
3.2.11.2	Stammhaltung von <i>Pichia pastoris</i> -Stämmen	43
3.2.11.3	Anzucht und Vermehrung von <i>E. coli</i> -Stämmen	44
3.2.11.4	Anzucht und Vermehrung von <i>Pichia pastoris</i> -Stämmen	44
3.2.11.5	Medien und Antibiotika	44
3.2.11.6	Isolierung von DNA	45
3.2.11.7	Quantifizierung von DNA und RNA	46
3.2.11.8	<i>In vitro</i> -Arbeiten mit DNA	47
3.2.11.9	Transformation mittels Elektroporation	50
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Klonierung der cDNAs der Tryptase-Isoenzyme	52
4.1.1	PCR-Amplifikation der Tryptase-cDNAs aus MM6- bzw. HMC 1-Zellen	52
4.1.2	Ligation der PCR-Fragmente und Transformation von <i>E. coli</i>	53
4.1.3	Weitere Tryptase-Isoenzyme	56
4.2	Expression der Tryptase-Zymogene in <i>E. coli</i> als Thioredoxin-Fusionsproteine	56
4.2.1	Konstruktion der Plasmidvektoren und Klonierung in <i>E. coli</i>	56
4.2.2	Expression und Reinigung der Thioredoxin-Fusionsproteine	57
4.2.3	Rückfaltung der Trx- β 1b-Pro-Tryptase und deren Prozessierung <i>in vitro</i>	58
4.2.4	Assemblierung des enzymatisch aktiven Tryptase-Tetramers	60
4.3	Expression der Tryptase-Isoenzyme in <i>Pichia pastoris</i>	61
4.3.1	Konstruktion der Hefevektoren	61
4.3.2	Transformation von <i>Pichia pastoris</i> und Selektion von Klonen	62
4.3.3	Expression im Schüttelkolben	63
4.3.4	Fermentation	63
4.3.5	Reinigung	67
4.3.5.1	Konzentration und Filtration	67
4.3.5.2	Kationenaustauschchromatographie	68
4.3.5.3	Vergleich der Reinigung der Isoenzyme	70
4.4	Biochemische Charakterisierung	71
4.4.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	71
4.4.2	Deglycosylierung	72
4.4.3	N-terminale Aminosäuresequenzierung und „Peptide Map“	73
4.5	Funktionelle Charakterisierung	76
4.5.1	Spezifische Aktivität der β -Isoenzyme	77
4.5.2	Bestimmung der kinetischen Kenngrößen	78
4.5.3	Stabilität der Isoenzyme	80
4.5.3.1	Stabilität in der Abwesenheit von Heparin	80
4.5.3.2	Tetramer-Stabilität in der Gegenwart von Heparin	84
4.5.3.3	Stabilisierung des Tetramers durch Inhibitoren	86
4.5.4	Hemmkinetische Charakterisierung	88

INHALTSVERZEICHNIS

4.6	‚Tryptase-Spezies‘	92
4.6.1	Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘	92
4.6.2	Hemmkinetik mit bivalenten Inhibitoren	94
4.7	Strukturelle Charakterisierung	96
4.7.1	α 1-Tryptase	98
4.7.2	β 3-Tryptase/NS-222-Komplex	99
4.7.3	Komplex von β 1a-Tryptase mit Byk-76935.	100
4.7.4	Komplex von β 3-Tryptase mit Byk-150640	101
5	DISKUSSION	103
5.1	Bedeutung der Tryptase Isoenzyme	103
5.2	Klonierung der α1- und β1b-Tryptase	103
5.3	Expression der Zymogene in <i>E. coli</i>	104
5.4	Rückfaltung und Prozessierung der Zymogene	104
5.5	Expression der Tryptasen in <i>Pichia pastoris</i>	105
5.6	Reinigung	106
5.7	Tryptase Glykoformen	107
5.8	Stabilität der Isoenzyme	108
5.9	Kristallstruktur des α1-Tryptase-Tetramers	112
5.10	Kinetische Charakterisierung der Isoenzyme	113
5.10.1	α 1-Tryptase	113
5.10.2	β -Tryptasen	113
5.11	Hemmkinetische Charakterisierung	114
5.12	Bivalent bindende Inhibitoren	115
5.13	Tryptase Spezies	119
5.13.1	Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘	119
5.13.2	Charakterisierung der Tryptase-Spezies mit Inhibitoren	121
5.14	Ausblick	123
6	LITERATURVERZEICHNIS	124

Abkürzungsverzeichnis

AMC	7-Amino-4-methylcumarin
Amp	Ampicillin
APPA	„4-Amidinophenylpyruvicacid“
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumin“ (Rinderserumalbumin)
Bz	Benzoyl
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
CD	Circulardichroismus
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz
Ethanol abs.	absoluter Alkohol
EtOH	Ethanol
FPLC	„fast performance liquid chromatography“ (schnelle Flüssigkeitschromatographie)
HHT	Hexahydrotyrosyl

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HLT	Humane Lungentryptase
HMC	7-Hydroxy-4-methylcumarin
IgG	Immunglobulin G
K_i	Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
K_m	Michaelis Konstante
k_{cat}	Wechselzahl
LDTI	Tryptase Inhibitor aus dem Blutegel (leech-derived tryptase)
LB	Luria Bertoni
MCS	„multi cloning site“ (multiple Klonierungsstelle)
NaAc	Natriumacetat
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OD_x	optische Dichte bei x Nanometern
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pNA	para-Nitroanilin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tos	4-Toluolsulfonyl
Tris	Tris-(hydromethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid

1 Zusammenfassung

Mastzell-Tryptasen sind Trypsin-ähnliche Serinproteasen, die von mindestens drei Genen auf Chromosom 16p13.3 kodiert werden. Sie lassen sich in 3 Gruppen unterteilen, die α -Tryptasen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), die β -Tryptasen ($\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2$ und $\beta 3$) und die erst kürzlich identifizierten, wahrscheinlich membrangebundenen γ -Tryptasen ($\gamma 1$, $\gamma 2$ und TMT). Aus Lungen- oder Hautgewebe isolierte Tryptasen sind als Heparinstabilisierte Tetramere enzymatisch aktiv, die nach Dissoziation des Proteoglykans in inaktive Monomere zerfallen. Die Isoenzym-Zusammensetzung solcher Präparationen ist in der Regel unbekannt, sodaß nur wenig über Unterschiede zwischen den Isoenzymen hinsichtlich ihrer Aktivität, Stabilität, Hemmbarkeit und strukturellen Eigenschaften bekannt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die humanen Tryptase-Isoenzyme $\alpha 1$, $\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2$ und $\beta 3$ rekombinant herzustellen und biochemisch, funktionell sowie strukturell zu charakterisieren. Die rekombinante Expression der Zymogene der $\alpha 1$ - und $\beta 1b$ -Tryptasen als Fusionsproteine in *E. coli* führte zur Bildung von Einschlußkörperchen; sie konnten rückgefaltet, jedoch nicht zum aktiven Enzym prozessiert werden. Dagegen wurden bei der rekombinanten Expression in der Hefe *Pichia pastoris* in einem 10 l-Fermenter Ausbeuten zwischen 1,4 mg/l ($\beta 2$) und 85 mg/l ($\beta 3$) der aktiven Tryptasen erzielt. Die mittels Kationenaustausch-Chromatographie gereinigten Isoenzyme hatten eine spezifische Aktivität zwischen 75% und 95% des theoretisch möglichen Wertes und waren für Kristallisationsexperimente geeignet.

Die korrekte N-terminale Prozessierung und die Identität der rekombinanten Isoenzyme wurde durch Aminosäure-Sequenzierung und Peptide-map verifiziert. Die nur eine potentielle Konsensus-Glykosylierungsstelle aufweisende $\beta 2$ -Tryptase ist in einem ähnlichen Ausmaß wie das aus Lungengewebe isolierte Enzym glykosyliert, während die zwei Konsensus-Glykosylierungsstellen aufweisenden Isoenzyme $\alpha 1$, $\beta 1a$, $\beta 1b$ und $\beta 3$ deutlich stärker glykosyliert sind. Außerdem tragen die rekombinanten Isoenzyme Oligosaccharide vom Mannose-reichen Typ, während die Oligosaccharide der humanen Lungentryptase vom komplexen Typ sind.

Die Isoenzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aktivität, der Stabilität des Tetramers und der Hemmbarkeit durch bivalente Inhibitoren. Alle β -Isoenzyme spalten

ZUSAMMENFASSUNG

das fluorogene Substrat tos-Gly-Pro-Arg-AMC mit ähnlichen kinetischen Kenngrößen (K_m und k_{cat}) wie die humane Lungentryptase. Dagegen ist α 1-Tryptase nahezu inaktiv: die K_m ist zwar ähnlich, die k_{cat} aber um den Faktor 10^6 niedriger. In der Abwesenheit von Heparin sind die Tetramere der β 2-Tryptase und der humane Lungentryptase deutlich stabiler (Halbwertszeit 2,5 – 2,9 min) als die der anderen β -Tryptasen (0,82 – 1,02 min). Im thermodynamischen Assay in Anwesenheit von Heparin zeigt die β 2-Tryptase jedoch eine geringere Stabilität als die anderen Isoenzyme. Im Gegensatz zu den β -Tryptasen ist das α 1-Tetramer weitgehend stabil: sowohl im thermodynamischen Assay wie auch mittels Gelfiltration konnte keine Dissoziation in Monomere nachgewiesen werden.

In Tryptasepräparationen aus Lungengewebe waren in Vorarbeiten ‚Tryptase-Spezies‘ nachgewiesen worden, die von bivalenten Inhibitoren mit deutlich unterschiedlicher Affinität gehemmt werden. Die hemmkinetische Analyse der rekombinanten β -Isoenzyme mit bivalenten Inhibitoren ergab jedoch nahezu identische K_i -Werte; die ‚Tryptase-Spezies‘ können somit nicht den Isoenzymen zugeordnet werden. Überraschend wurden in Präparationen der rekombinanten β 1b-Tryptase erneut unterschiedlich gut hemmbare ‚Spezies‘ identifiziert. Sie konnten mittels Affinitätschromatographie an einem immobilisierten bivalenten Inhibitor getrennt werden. Erste hemmkinetische Studien mit verschiedenen bivalenten Inhibitoren lassen vermuten, daß sich diese ‚Tryptase-Spezies‘ hinsichtlich des Abstands der aktiven Zentren unterscheiden. Die isolierten ‚Tryptase-Spezies‘ werden derzeit detailliert analysiert, um ihre molekulare Genese (z.B. Faltungsisomere) aufzuklären.

Röntgenstrukturanalysen der Isoenzyme zeigen, daß die Isoenzyme α 1, β 1a und β 3 Tetramere bilden, deren quaternäre Architektur nahezu identisch mit der der β 2-Tryptase ist. Auch die Strukturen der β -Monomere unterscheiden sich nur geringfügig; dagegen führt in der α 1-Tryptase der Ersatz des Gly215-Rests der β -Tryptasen durch Asp215 zu einer Änderung der Konformation des Peptidsegments Ser213 – Gln219. Die dadurch bedingte Blockade der Substratbindungstasche erklärt die geringe Aktivität dieses Isoenzym. Durch Kokristallisation der Tryptase-Tetramere mit bivalenten Inhibitoren konnte erstmals ein struktureller Nachweis für die bivalente Inhibition einer Protease geführt werden. Die Kristallstrukturen der Tryptasen/Inhibitor-Komplexe dienen jetzt als Grundlage für die rationale Optimierung dieser Hemmstoffe.

2 Einleitung

2.1 Die immunologische Bedeutung der Mastzelle

Mastzellen entstammen ebenso wie die anderen Leukozyten den Stammzellen des Knochenmarks. Sie kommen ubiquitär im Organismus in großer Zahl vor, gehäuft jedoch in der Haut, dem Darmtrakt und der Lunge, also an den Grenzflächen des Organismus zur Umwelt. Diese Lokalisation entspricht ihrer Funktion als primäre Effektorzelle der IgE-vermittelten allergischen Sofortreaktion sowie der Abwehr von Parasiten. Neben diesen Funktionen im erworbenen Immunsystem spielen Mastzellen aber auch im natürlichen Immunsystem, etwa bei der Abwehr bakterieller Infektionen eine Rolle (Malaviya et al., 1996, Echtenacher et al., 1996, Galli und Wershil, 1996). Andererseits scheinen Mastzellen wesentlich an der Pathogenese (chronisch) entzündlicher Erkrankungen wie Asthma und Psoriasis (Schuppenflechte) beteiligt zu sein; bei diesen Erkrankungen steigt die Zahl der Mastzellen in den betroffenen Geweben an und sie sind vermehrt aktiviert (Temann et al., 1998).

Mastzellen sind stark granulierte Zellen. Die in diesen sekretorischen Granula enthaltenen Mediatoren können durch Degranulation in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Schwarz et al., 1981; Caughey et al., 1988). Die Aktivierung der Zellen kann über hochaffine IgE-Rezeptoren im Zuge der allergischen Sofortreaktion (Ishizaka, 1981), aber auch Antikörper-unabhängig erfolgen (Leal-Berumen, 1994, Stassen, 2001). Die sekretorischen Granula enthalten große Mengen enzymatisch aktiver Serinproteasen mit tryptischer bzw. chymotryptischer Aktivität sowie weitere Mediatoren wie Histamin und Proteoglykane. Die Serinproteasen Tryptase, Chymase und Cathepsin G sowie die Metalloprotease Carboxypeptidase A machen zusammen mehr als 90 % des Proteingehaltes der Granula aus. Tryptase ist mit 10 - 35 pg pro Mastzelle das mengenmäßig vorherrschende Protein der Mastzelle, das bis zu 25 % des gesamten Proteingehaltes der Zelle ausmacht (Schwartz et al., 1981, Smith et al., 1984). Für die Aufklärung der immunologischen Bedeutung der Mastzelle kommt der Frage nach quantitativen und qualitativen Unterschieden in der Mediatorenausschüttung eine entscheidende Bedeutung zu. So lassen sich menschliche Mastzellen aufgrund ihrer Proteasenausstattung in zwei Subtypen unterteilen: Der MC_T -Subtyp, der nur Tryptase enthält, kommt gehäuft in der Dünndarmmukosa und der Lunge vor, während der MC_{TC} -

Subtyp alle genannten Proteasen enthält und gehäuft in der Haut, der Submukosa des Dünndarms und der Konjunktiva zu finden ist.

2.2 Mastzell Tryptase

Der bisher und im folgenden verwendete Begriff ‚Tryptase‘ bezeichnet die in den entsprechenden Studien verwendeten Tryptase-Präparationen, die in der Regel aus Lungen- oder Hautgewebe isoliert wurden. Die Isoenzym-Zusammensetzung solcher Präparationen (siehe 2.4) ist in der Regel nicht bekannt.

2.2.1 Physiologische und pathophysiologische Funktionen der Tryptase

Die (patho)physiologischen Funktionen der Tryptase sind noch weitgehend unbekannt. Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Studien lassen jedoch vermuten, daß Tryptase an der Pathogenese akuter und chronischer Entzündungen, insbesondere des Asthma, beteiligt ist (Johnson et al, 1997, Caughey, 1997, Molinari et al., 1996). Die Hypothese stützt sich im wesentlichen auf Studien, in denen z.B. *in vitro* extrazelluläre Substrate für Tryptase identifiziert wurden. So werden die bronchodilatatorisch wirkenden Neuropeptide PHM (Peptid Histidin-Methionin) und VIP (,Vasoactives intestinales Peptid‘) von Tryptase gespalten (Franconi et al., 1989, Caughey et al., 1988, Tam and Caughey, 1990).

Weitere *in vitro*-Studien zeigen, daß Tryptase durch Spaltung der α -Kette des Fibrinogens gerinnungshemmend wirken kann (Schwartz et al., 1985) und somit zusammen mit der antikoagulatorischen Wirkung von Heparin eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Kommunikation zwischen entzündetem Gewebe und dem Blutkreislauf haben könnte (Thomas et al., 1998). Zudem wurde eine Beteiligung von Tryptase bei der Wundheilung nachgewiesen (Blair et al., 1997).

Tryptase kann auch direkt zelluläre Effekte auslösen und z.B. die Proliferation von Fibroblasten (Cairns et al., 1997, Rouss et al., 1991, Hartmann et al., 1992) und Keratinozyten (B. Eder, Dissertation, 1995) anregen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Tryptase an der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen und der Psoriasis beteiligt sein könnte, die sowohl durch eine Vermehrung der Mastzellen in den

erkrankten Geweben als auch durch eine erhöhte Proliferation von Fibroblasten bzw. Keratinozyten gekennzeichnet sind.

Eine neuroimmunologische Rolle von Tryptase wird schon seit längerem diskutiert, nicht zuletzt basierend auf der räumlichen Nähe von Mastzellen zu Nervenfasern (Stead et al., 1987, Naukkarinen et al., 1994). Tryptase kann den G-Protein-gekoppelten ,Protease-aktivierbaren Rezeptor ‘ PAR2 aktivieren (Molino et al., 1997), der auf sensorischen Nervenzellen vorkommt. Nach Aktivierung durch Tryptase/PAR2 schütten diese Nervenzellen die Entzündungs-induzierenden Neuropeptide Substanz P und CGRP (,calcitonin gene-related peptide‘) aus (Steinhoff et al., 2000). Tryptase kann auf diesem Weg als Auslöser neurogener Entzündungsreaktionen wirken.

2.2.2 Die Tryptasestruktur erklärt viele biochemische Eigenschaften des Enzyms

Die in Abbildung 2-1 dargestellte Kristallstruktur der β 2-Tryptase (Pereira et al, 1998, Sommerhoff et al., 1999, Sommerhoff et al., 2000) erklärt viele der bis dahin rätselhaften Eigenschaften des Enzymes.

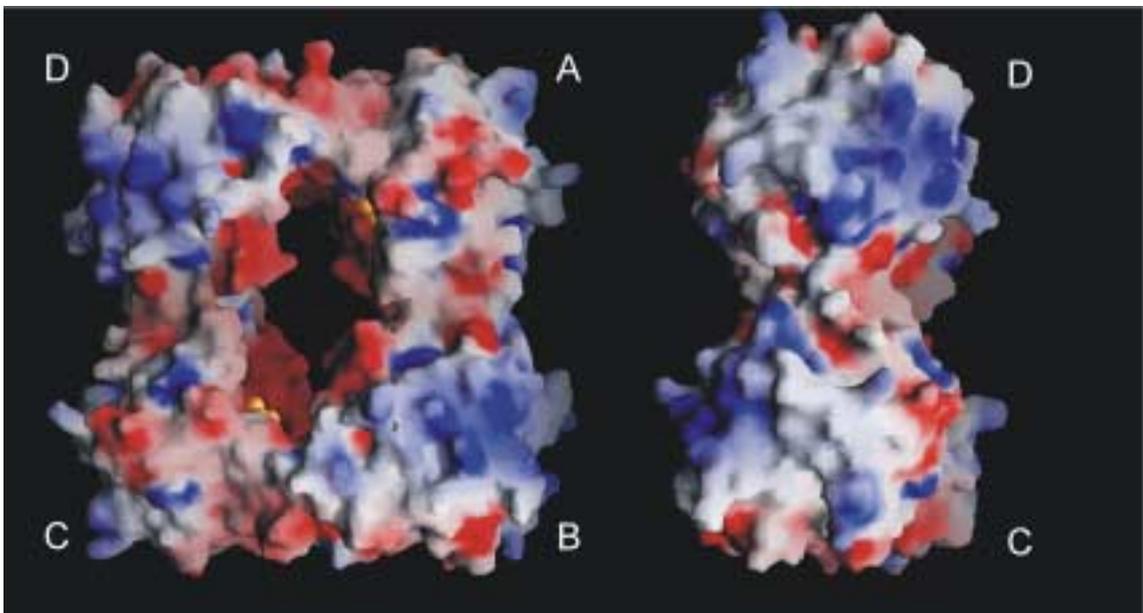


Abbildung 2-1 Oberflächendarstellung der Kristallstruktur des β 2-Tryptase-Tetramers
Blau gefärbte Bereiche symbolisieren positive Ladung, rot gefärbte negative Ladung. Die gelb gefärbten Moleküle des synthetischen Inhibitors APPA kennzeichnen die aktiven Zentren. Die Monomere sind mit A B C D bezeichnet. Links: Ansicht in Richtung der 4-zähligen Symmetrieachse, die durch die Mitte der zentralen Pore verläuft. Rechts: Seitenansicht auf die Monomere C und D.

Im Tryptase-Tetramer sind die vier Monomere an den Ecken eines Rechtecks angeordnet. Die vier aktiven Zentren sind zur Mitte der zentralen Pore hin ausgerichtet. Die

Monomere stehen über zwei verschiedenartige Kontaktflächen miteinander in Kontakt. Die Kontaktbereiche zwischen den Monomeren A und B (sowie den Äquivalenten C und D) sind hydrophober Natur und kleiner als die überwiegend hydrophilen Kontaktbereiche zwischen den Monomeren A und D (bzw. B und C). Die schwachen Wechselwirkungen zwischen den Monomeren A und B (bzw. C und D) reichen nicht aus, um ein unter physiologischen Bedingungen stabiles Tetramer zu erhalten. Diese hydrophoben Kontaktbereiche können *in vitro* durch hohe Salzkonzentrationen stabilisiert werden. *In vivo* werden sie durch kettigenartige, negativ geladene Proteoglykane wie Heparin stabilisiert, die an die positiv geladenen Bereiche an der Oberfläche der jeweiligen Monomere binden und damit den Kontaktbereich überbrücken und stabilisieren.

Die Bevorzugung kleiner Peptidsubstrate sowie die Resistenz gegen endogene Serinproteaseinhibitoren ist basierend auf der Struktur leicht zu erklären: Der Zutritt zur zentralen Pore des Tryptase-Tetramers ist sterisch limitiert, sodaß nur kleine Peptidsubstrate und Inhibitoren Zugang zu den aktiven Zentren haben.

2.2.3 Regulation der Tryptaseaktivität

Menschliche Tryptase wird durch keinen der bekannten endogenen Serinproteasen-Inhibitoren gehemmt; der einzige bekannte natürlich vorkommende Tryptaseinhibitor ist der LDTI („Leech derived Tryptase Inhibitor“, Sommerhoff et al., 1994). *In vivo* wird die Tryptaseaktivität wahrscheinlich über den Zerfall der enzymatisch aktiven Tetramere in inaktive Monomere reguliert. Dieser Prozeß ist abhängig von der lokalen Konzentration des stabilisierenden Heparins und kann durch basische, heparinbindende Proteine wie etwa Antithrombin III moduliert werden (Alter et al., 1990). Eine weitere Möglichkeit ist die Regulation der Aktivität über den pH-Wert. Im Gegensatz zu einem pH-Optimum von 7,4 bei der Spaltung von chromogenen und fluorogenen Substraten wird Fibrinogen durch Tryptase bei pH 6 50 mal schneller als bei pH 7,4 gespalten (Ren et al., 1996). Auch die Auto-Prozessierung der β 2-Protryptase (siehe auch 2.4) ist im sauren Milieu effizienter (Sakai et al., 1996). Ein niedriger pH scheint auch die Reassemblierung von Monomeren zu Tetrameren zu erleichtern (Ren et al., 1998). Die Freisetzung der Tryptase in saurem Milieu (z. B. in entzündetem Gewebe, den Schleimhäuten der Atemwege und in Bereichen der Wundheilung) scheint also für ihre Stabilität optimal zu sein; eine Diffusion in neutrales oder alkalisches Milieu scheint

diese zu verringern. Diese Mechanismen deuten auf eine lokale Wirkung der Tryptase im Bereich der Freisetzung hin.

2.3 Tryptaseinhibitoren

Die tetramere Architektur der Tryptase verhindert die Inhibition von Tryptase durch die natürlich vorkommenden ‚proteinergen‘ Inhibitoren (mit Ausnahme des LDTI, s.o.). Tryptase wird durch die allgemein wirksamen niedermolekularen Serinproteaseinhibitoren wie z.B. Diisopropylfluorophosphat und verschiedene Benzamidinderivate gehemmt (Smith et al., 1984, Stürzebecher et al., 1992). Die bisher synthetisierten Inhibitoren sind jedoch für die Applikation *in vivo* meist nicht geeignet, da sie toxisch, instabil oder zu unspezifisch (K_i -Werte im μM -Bereich) sind. Mit der Klärung der Tryptasestruktur (siehe oben), die eine symmetrische Anordnung der aktiven Zentren im Tetramer zeigt, ergab sich die Möglichkeit, multivalente Inhibitoren für Tryptase zu synthetisieren (Schaschke et al., 2001). Auch in der Natur wird das Prinzip der multivalenten Tryptaseinhibition ausgenutzt: So wurden im medizinischen Blutegel (*Hirudo medicinalis*) sowie im javanesischen Blutegel (*Hirudo javanica*) neben dem monomeren LDTI auch multimeren Varianten identifiziert (Piechotka, Dissertation in Vorbereitung; Matschiner, Dissertation, 1998). Diese multimeren LDTI-Varianten hemmen Tryptase mit wesentlich höherer Affinität als der monomere LDTI. Inzwischen wurden auch niedermolekulare bivalente Tryptaseinhibitoren synthetisiert (Rice et al., 1998), allerdings ist der Nachweis der bivalenten Bindung solcher Inhibitoren bisher nicht erbracht worden.

2.4 Tryptase Isoenzyme

Die Familie der humanen Tryptasen wird durch ein Gencluster auf Chromosom 16p13.3 kodiert (Pallaoro et al., 1999, Caughey et al., 2000). Die Mitglieder der Familie lassen sich in drei Gruppen einteilen, die α -Tryptasen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), die β -Tryptasen ($\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2$ und $\beta 3$) sowie die γ -Tryptasen ($\gamma 1$, $\gamma 2$ und TMT), die durch einen hydrophoben C-terminalen Bereich charakterisiert sind, der als Membrananker dienen könnte. Die Analyse von zwei BACs (*bacterial artificial chromosomes*) legt die Vermutung nahe, daß die Isoenzyme $\alpha 2$ und $\beta 1a$, $\beta 2$ und $\beta 3$ sowie $\gamma 1$ und $\gamma 2$ allelische Varianten sind (Pallaoro et al., 1999, Caughey et al., 2000). Die ebenfalls in diesen BACs identifizierten Gene für die mMCP-7-like-1 und mMCP-7-like-2-Tryptasen sowie das der mMCP-7-like-3-Tryptase wurden inzwischen als Pseudogene identifiziert (Min et al., 2001).

EINLEITUNG

Die Aminosäuresequenzen der reifen β -Tryptasen sind untereinander zu 98 % - 99 % identisch, die α -Isoenzyme zu 99 % und die γ -Isoenzyme zu 98 %. Die Sequenzidentität zwischen den Gruppen ist weniger stark ausgeprägt: So zeigen z.B β 2- und α 1-Tryptase 91 % Identität, während β 2 und γ 1-Tryptase nur zu 47 % identisch sind. Der in Abbildung 2-2 gezeigte Sequenzvergleich verdeutlicht die große Ähnlichkeit der Isoenzyme α 1, β 1a, β 1b, β 2 und β 3, zeigt aber auch, daß z.B. der Austausch einer Aminosäure in der β 2-Tryptase zum Verlust einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle führt.

					▽▽	
alpha 1	IVGGQEAPRS	KWPWQVSLRV	RDRYWMHFCG	GSLIHPQWVL	TAAHCLGPDV	
beta 1a	HGP.....V.....	
beta 1b	HGP.....V.....	
beta 2	HGP.....V.....	
beta 3V.....	
					▽	
alpha 1	KDLATLRVQL	REQHLYYQDQ	LLPVSRIIVH	PQFYIIQTGA	DIALLELEEP	
beta 1a	...A.....TA.I..	
beta 1b	...A.....TA.I..K.	
beta 2	...A.....TA.I..	
beta 3	...A.....TA.I..	
					▽	
alpha 1	VNIS	SRVHTV	MLPPASETFP	PGMPCWVTGW	GDVDNDEPLP	PPFPLKQVKV
beta 1a	.V.	H....	T.....R..
beta 1b	.V.	H....	T.....R..
beta 2	.KV.	H....	T.....R..
beta 3	.V.	H....	T.....R..
					▽	
alpha 1	PIMENHICDA	KYHLGAYTGD	DVRIIRDDML	CAGNSQRDSC	KGDSGGPLVC	
beta 1aV.....	...TR....	Q.....	
beta 1bV.....	...TR....	Q.....	
beta 2V.....	...TR....	Q.....	
beta 3V.....	...TR....	Q.....	
					▽	
alpha 1	KVNGT	WLQAG	VVSWDEGCAQ	PNRPGIYTRV	TYYLDWIHHY	VPKKP
beta 1aG.....
beta 1bG.....
beta 2G.....
beta 3G.....

Abbildung 2-2: Vergleich der Proteinsequenzen der reifen Tryptase-Isoenzyme
Die Aminosäurereste der katalytischen Triade ist mit offenen Dreiecken, die Disulfidbrücken ausbildenden Cysteine mit gefüllten Dreiecken markiert. Die Glycosylierungsstellen sind mit Rechtecken umrahmt. Die β 2-Tryptase besitzt nur eine Glycosylierungsstelle, alle anderen Isoenzyme zwei.

Durch die rekombinante Expression der Zymogene der Isoenzyme $\alpha 1$ und $\beta 2$ in einem Baculovirus-Expressionssystem konnte gezeigt werden, daß sie sich hinsichtlich der Prozessierung und Aktivierung unterscheiden (Sakai et al., 1996). Wie in Abbildung 2-3 gezeigt, wird $\beta 2$ -Tryptase nach Abspaltung des Signalpeptides durch einen 2-stufigen Mechanismus (Autokatalyse und Aktivierung durch Dipeptidylpeptidase I = Cathepsin C) aktiviert. Der autokatalytische erste Schritt kann bei den α -Tryptasen aufgrund des Austausches des Arginins durch Valin an Position -2 nicht stattfinden.

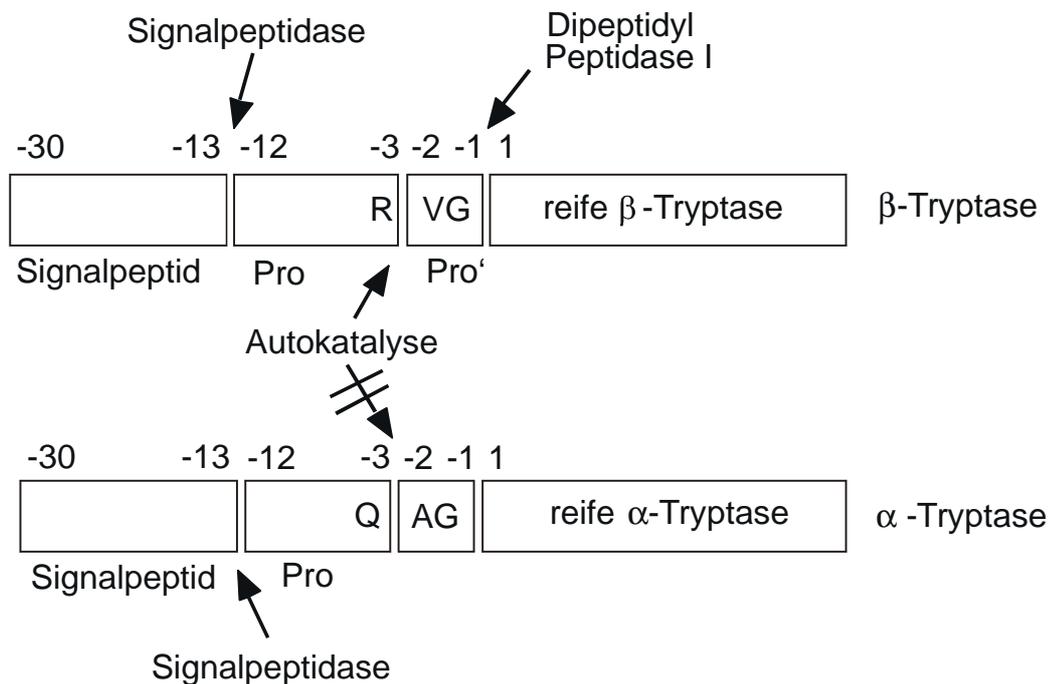


Abbildung 2-3: Prozessierung der Tryptase-Isoenzyme $\alpha 1$ und $\beta 2$.

Nach Abspaltung des Signalpeptids entsteht ein Zymogen der β -Tryptase, das durch einen 2-stufigen Prozess aktiviert wird: Der autokatalytischen Spaltung zwischen den Aminosäure -3 und -2 folgt die Aktivierung durch Dipeptidylpeptidase I (= Kathepsin C) zum reifen Enzym. Der autokatalytische erste Schritt kann bei der α -Tryptase nicht erfolgen, da in Position -2 ein basischer Argininrest durch ein Valin ausgetauscht ist.

In Mastzellen werden überwiegend β -Tryptasen exprimiert, in Basophilen dagegen fast nur α -Tryptasen (Xia et al., 1995, Caughey et al., 2000). In der monozytären Zelllinie Mono-Mac-6 (Ziegler-Heitbrock, 1988) wurde ebenfalls nur die mRNA der α -Tryptase nachgewiesen (Huang et al., 1993). Während β -Tryptasen in den Granula von Mastzellen gespeichert und durch Degranulation freigesetzt werden, scheinen α -Tryptasen konstitutiv als Zymogene sezerniert zu werden (Schwarz et al., 1995). Inwieweit diese Unterschiede zwischen den Isoenzymen auch (patho)physiologisch relevant sind, ist bisher nicht untersucht. Bisher wurde auch kein systematischer

Vergleich der Eigenschaften der reifen α - und β -Tryptasen sowie der verschiedenen β -Isoenzyme durchgeführt.

2.5 Aufgabenstellung

Die bisher erhobenen Daten zur Aktivität, Stabilität und anderen Eigenschaften von β -Tryptasen basieren fast ausschließlich auf Studien, in denen aus Lungen- oder Hautgewebe isolierte Tryptasepräparationen verwendet wurden. Solche Präparationen sind hinsichtlich ihrer Isoenzym-Zusammensetzung nicht definiert. Da eine Trennung der β -Isoenzyme aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität nicht möglich ist und α -Tryptasen bisher noch nicht aus Geweben isoliert werden konnten, setzt die Untersuchung der Eigenschaften und (patho)physiologischen Funktionen der verschiedenen Tryptase-Isoenzyme ihre rekombinante Herstellung voraus.

In dieser Arbeit sollten deshalb die Isoenzyme $\alpha 1$, $\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2$ und $\beta 3$ der menschlichen Tryptase rekombinant hergestellt und hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften charakterisiert werden. Dabei sollten insbesondere Unterschiede zwischen den Isoenzymen hinsichtlich Aktivität, Stabilität, und der Hemmbarkeit untersucht werden. Darüberhinaus sollten ausreichende Mengen für die Kristallisation und Röntgenstrukturanalysen hergestellt werden, um strukturelle Unterschiede zwischen den Tryptasen zu identifizieren.

Um das Konzept der bivalenten Hemmung von Tryptasen zu stützen, sollten Komplexe von Tryptase mit bivalenten Inhibitoren hergestellt und biochemisch sowie kristallographisch analysiert werden. Damit sollte insbesondere auch die Basis zum gezielten, strukturbasierten Design neuer bivalenter Inhibitoren geschaffen werden, die als Werkzeuge zur Klärung der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der Tryptase-Isoenzyme eingesetzt werden können.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

3.1.1.1 Geräte für mikrobiologische und molekularbiologische Arbeiten

Autoklav HST 300	Zirbus, Bad Grund
Autoklav LTA 400	Zirbus, Bad Grund
Brutschrank Typ B5060 E	Heräus, Osterode
Sterilbank Laminar Flow	Beer, Germering
Inkubationsschüttler Typ ITE	Ifors, Bottmingen
Inkubationsschüttler SM30	Bühler, Hechingen
Thermocycler Gen Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Langen
Spektralphotometer Smart Spec 3000	BioRad, München
Sequenzgel-Apparatur Typ Macropor	Pharmacia, Freiburg
Automatische DNA-Sequenziergeräte Typ A373 und A377	Applied Biosystems, Weiterstadt
Elektroporationseinheit Gene Pulser	BioRad, München

3.1.1.2 Geräte für biochemische und proteinchemische Arbeiten

Thermostatbad RM 6	Lauda, Königshofen
Gefriertrocknungsanlage WKF L05	Piatkowski, München
Vakuumentrifuge Speed Vac	Bachofer, Reutlingen
Tangentialflusskonzentrator, Minisette	Pall, Dreieich
Schlauchpumpe Masterflex	Cole Parmer, Kehl
Vakuumentfiltrationseinheit	Millipore, Eschborn
Proteingelkammer SE245	Hofer (USA)
Elektroblotting Apparatur, Hofer, Semi Dry	Pharmacia, Freiburg
HPLC-System mit UVVIS 205 Detektor	Sykam, Germering
FPLC Anlage bestehend aus	Pharmacia, Freiburg
Gradienten-Controller LCC-500 Plus	
Detektor UV-M	
Fraktionssammler FRAC-100	
2-Kanal Flachbrettschreiber REC-102	
Pumpen P500	
Fluorimeter SFM 225	Kontron, Eching
Spektralphotometer UVICON XL	Kontron, Eching
Spektropolarimeter J-715	Jasco, Groß-Umstadt
Microassay Reader Biolumin 960	Pharmacia, Freiburg

3.1.1.3 Geräte für die Fermentation

Fermenter Typ Biostat E bestehend aus	Braun Biotech, Melsungen
Regelungseinheit mit Regeleinschüben für	
Säure, Lauge und Antischaummittel sowie	

Sechs-Kanalschreiber
 Kulturgefäß ES 10
 Druckluftkompressor Whisper 0,56-20
 Dampferzeuger Typ 603
 Peristaltikpumpe P-1

Blitz, Bräunlingen
 Strobel, München
 Pharmacia, Freiburg

3.1.1.4 Sonstige Geräte

Digitales pH-Meter 646
 Präzisionswaage 2842
 Minishaker MS 1

 Wärmeblock Typ 2111 CHM-12-80
 Wärmeblock Typ 2101
 Electrophoresis Power Supply E424
 Image Master VDS
 Zentrifugen:
 Eppendorf, Hamburg
 Sigma 2K15
 Biofuge pico
 Minifuge RF
 Centrikon H-401
 Sorvall RC3B

Bachofer, Reutlingen
 Sartorius, Göttingen
 Bender & Hohbein,
 München
 Bachofer, Reutlingen
 Bachofer, Reutlingen
 Wagner & Munz, München
 Pharmacia, Freiburg
 Zentrifuge 3200

 Braun Biotech, Melsungen
 Heraeus, Osterode
 Heraeus, Osterode
 Kontron, Eching
 Sorvall, Bad Homburg

3.1.2 Substanzen und Materialien

3.1.2.1 Chromatographiemedien und –säulen

Fractogel EMD SO_3^- 650 (M)
 FPLC-Säule Superose 12
 HPLC-Säule LiChrosphere RP18 (2x125 mm)

Merck, Darmstadt
 Pharmacia, Freiburg
 Merck, Darmstadt

3.1.2.2 Materialien für die Proteinanalytik

3.1.2.2.1 Proteinbestimmung

BioRad Protein Assay

BioRad, München

3.1.2.2.2 Immunoblotting

Whatman Filterpapier No. 3
 Immobilon P Blotmenbran
 Nitrocellulose Blotmembran
 DAB Substrat-Kit für Peroxidase

 Maus-Anti-Tryptase-Antikörper
 Anti-Maus IgG-HRP-konjugiert
 Magermilchpulver

Whatman, Maidstone (USA)
 Millipore, Eschborn
 Millipore, Eschborn
 Vector Laboratories,
 Burlingame
 Chemicon, Hofheim
 Dako, Dänemark
 Merck, Darmstadt

3.1.2.2.3 Chemikalien

Acrylamid / N,N-Methylenbisacrylamid (40% T 3% C)	Appligene, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau, Na-Salz, reinst	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker, Broad range	BioRad, München
Molekulargewichtsmarker, Low range	BioRad, München
Ammoniumpersulfat, p.a.	Merck, Darmstadt
Gluthation, reduzierte Form (GSH)	Sigma, Deisenhofen
Gluthation, oxidierte Form (GSSG)	Sigma, Deisenhofen
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Methanol, LiChrosolve® gradient grade	Merck, Darmstadt
H ₂ O, LiChrosolve® gradient grade	Merck, Darmstadt
Acetonitril, LiChrosolve® gradient grade	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA), seq. grade	Fluka, Buchs (CH)

3.1.2.3 Materialien für Enzymtests und kinetische Messungen

3.1.2.3.1 Chromogene und fluorogene Substrate

Bz-L-Arg-pNA	Merck, Darmstadt
tos-GlyProArg-pNa	Sigma, Deisenhofen
HHT-AlaArg-pNa	American Diagnostica, Pfungstadt
Bz-L-Arg-AMC	Sigma, Deisenhofen
tos-GlyProArg-AMC	Sigma, Deisenhofen

3.1.2.3.2 Reagenzien für die ‚active site‘ Titrationen

4-Guanidinbenzoesäure-4-methylumbelliferon	Sigma, Deisenhofen
4-Guanidinbenzoesäure-4-nitrophenylester	Sigma, Deisenhofen

3.1.2.3.3 Sonstige Materialien

Heparin (Rinderlunge)	Sigma, Deisenhofen
rLDTI	Ciba-Geigy, Basel (CH)
Babim	Byk-Gulden, Konstanz
Byk 60603	Byk-Gulden, Konstanz
DNAse I	Sigma, Deisenhofen
Membranfilter 0,22 µm	Millipore, Eschborn
Acryl-Küvetten für Fluorimeter	Sarstedt, Ulm
Polystyrolküvetten für Spektralphotometer	Sarstedt, Ulm
UVetten für Spektralphotometer	Eppendorf, Hamburg
96-Well Mikrotiterplatten für Microassay Reader	Corning Costar, Bodenheim
Triton X-100	Applichem, Darmstadt

3.1.2.4 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

3.1.2.4.1 Nährmedien und Zusätze

Bacto-Tryptone	Difco, Augsburg
Bacto-Tryptone-Peptide	Difco, Augsburg
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids	Difco, Augsburg
Ampicillin, Natriumsalz USP	Biomol, Hamburg
Carbenicillin	Biomol, Hamburg
Zeocin	Invitrogen, Groningen (NL)
Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg

3.1.2.4.2 Chemikalien

DNA-Längenstandart 100bp Leiter	Gibco/BRL, Eggenstein
Aqua-Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chlorophorm	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Agarose, SeaKem	Biozym, Oldendorf
Agarose, NuSieve	Biozym, Oldendorf
Agarose, Typ II	Sigma, Deisenhofen

3.1.2.4.3 Kits

Plasmid Midi und Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
DIG Taq DNA Sequenzierungs Kit	Appl. Biosyst., Weiterstadt
GeneClean Kit	Dianova, Hamburg
PCR-Produkte Reinigungs Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.2.4.4 Verbrauchsmaterialien

Micro Spin S400 HR Säulen	Pharmacia, Freiburg
Elektroporationsküvetten, Elektrodenabstand 0,2 cm	BioRad, München

3.1.2.4.5 Enzyme

<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	Eurogentech, Seraign (B)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega, Heidelberg
<i>Goldstar</i> -DNA-Polymerase	Eurogentech, Seraign (B)
T4-DNA-Ligase	Promega, Heidelberg
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim

3.1.2.5 Sonstige Materialien

Quarz-Küvetten QS 1000

Bachofer, Reutlingen

Alle anderen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Buchs, CH), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) in der Qualitätsstufe z. A. bezogen. Reinstwasser wurde mittels des Reinstwasser-Systems Clear der Firma SG (Barsbüttel) gewonnen. Für die molekularbiologischen Arbeiten wurde zusätzlich 'Aqua ad injectabilia' der Firma Pharmacia (Erlangen) verwendet.

3.1.3 Bakterien- und Hefestämme sowie Plasmide

Es wurden folgende Bakterien- und Hefestämme verwendet:

Stamm	Organismus	Genotyp	Literatur bzw. Bezugsquelle
JM109	<i>E. coli</i>	<i>recA1, endA1, syrA96, thi, hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^q ZΔM15]</i>	Yannisch-Perron et al. (1985); Novagen
BL21(DE3)	<i>E. coli</i>	F' <i>ompT hsdS_B</i> (r _B -m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Studier & Moffat (1986); Novagen
TOP10F'	<i>E. coli</i>	F' { <i>proAB, lacI^q lacZΔM15, Tn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC), Δ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, λ⁻ araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1, nupG</i>	Invitrogen
B834(DE3)	<i>E. coli</i>	F' <i>ompT hsdS_B</i> (r _B -m _B ⁻) <i>gal dcm met</i> (DE3)	Leahy et al. (1992); Novagen
GS115	<i>Pichia pastoris</i>	<i>his4</i> (Phänotyp: His ⁻ , Mut ⁺)	Invitrogen
KM71H	<i>Pichia pastoris</i>	<i>arg4 aox1::ARG4</i> (Phänotyp: Arg ⁺ , Mut ^S)	Invitrogen
X33	<i>Pichia pastoris</i>	Wildtyp (Phänotyp: Mut ⁺)	Invitrogen

pGEM-T-Vektor

Der Vektor pGEM-T ist durch seine 3' überhängenden Thymidine an beiden Enden der Insertionsstelle für die Klonierung von PCR-Produkten besonders geeignet. Das ‚high-copy‘ plasmid enthält eine T7- und eine SP6-RNA-Polymerase-Promotorsequenz, welche die multiple Klonierungsstelle (MCS) flankieren. Die MCS befindet sich innerhalb der α -Peptid-kodierenden Region des Enzyms β -Galactosidase und erlaubt somit eine direkte Identifizierung von rekombinanten Klonen über eine Farbreaktion auf Indikatorplatten.

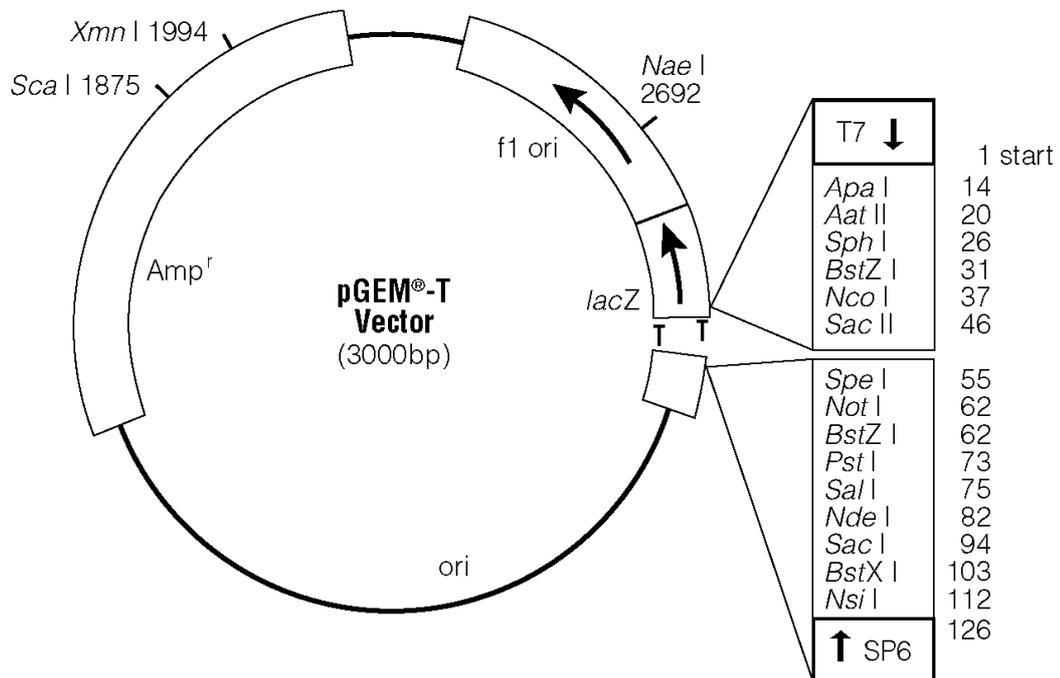


Abbildung 3-1: Schematische Plasmidkarte des Klonierungsvektors pGEM-T

Die Abkürzungen bedeuten: f1 ori = Replikationsursprung des f1 filamentösen Phagen, ori = Replikationsursprung, Amp^r = Ampicillin-Resistenz, T7 = T7 Promotorsequenz, SP6 = SP6 Promotorsequenz, lac Z = Gen für β -Galactosidase.

pBlueskript KS-Vektor

Der pBlueskript-Vektor ist ein ‚high copy‘ Plasmid zur Klonierung von Fremd-DNA in *E. coli*. Das Plasmid trägt ein Ampicillin-Resistenzgen.



Abbildung 3-2: Schematische Plasmidkarte des Klonierungsvektors pBlueskript KS (+)
 Die Abkürzungen bedeuten: ColE1 ori = Replikationsursprung, Amp = Ampicillin-Resistenz, f1 ori = Replikationsursprung des f1 filamentösen Phagen, MCS = Multiple Klonierungsregion, lac Z = Gen für β -Galactosidase.

pET-32c (+) Vektor

Der pET-32-Vektor ist ein Expressionsvektor für *E. coli*. 5' von der multiplen Klonierungsstelle (MCS) enthält er die Sequenz eines Thioredoxintags. Zwischen dem Thioredoxintag und der MCS sind die Erkennungssequenzen für eine Thrombin- und eine Enterokinaseschnittstelle lokalisiert.

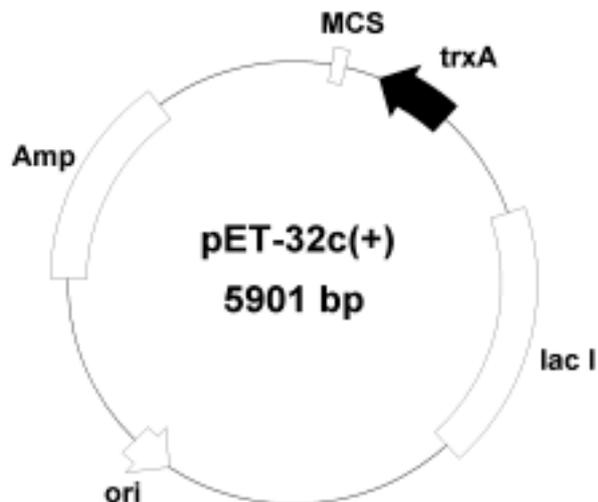


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pET-32c(+)
 Die Abkürzungen bedeuten: ori = Replikationsursprung, Amp = Ampicillin-Resistenz, lac I = lac I Repressorgen, MCS = Multiple Klonierungsregion, trxA = Thioredoxintag.

pPicZαA-Vektor

Der pPicZαA-Vektor ist ein Expressionsvektor für *Pichia pastoris*. Er verfügt über ein Zeocin-Resistenzgen zur Selektion. Die AOX1-Region (Alkohol Oxidase 1-Region) mit dem starken AOX1 Promotor erlaubt die methanolinduzierbare Expression von Fremdproteinen in *Pichia pastoris*. Die α-Faktor-Signalsequenz sorgt für die Ausschleusung des Fremdproteins in das Medium.

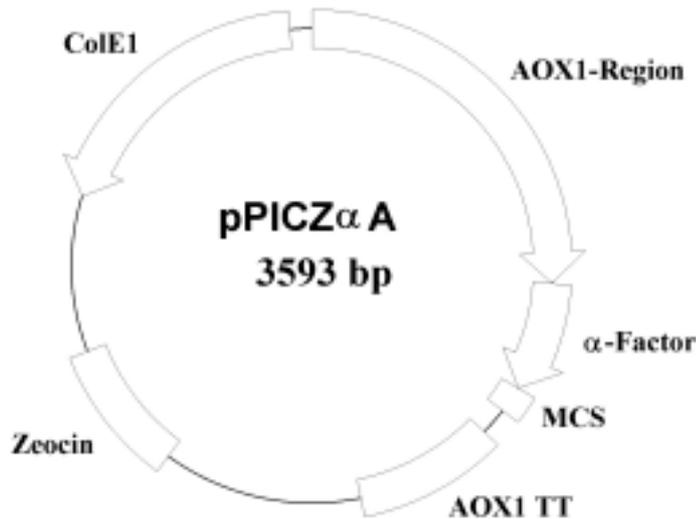


Abbildung 3-4: Schematische Plasmidkarte des Expressionsvektors pPIC ZαA

Die Abkürzungen bedeuten: AOX1 = 5' Alkohol Oxidase 1-Region, AOX1 TT = Alkohol Oxidase 1 Transkriptionstermination, Zeocin = Zeocinresistenz, MCS = Multiple Klonierungsregion, α-Factor = α-Faktor Signalsequenz, Col E1 = Replikationsursprung des Plasmids.

3.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonucleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die Sequenzierprimer wurden in HPLC-gereinigter Qualität bezogen. Die unterstrichenen Nucleotide der Primer binden an das Template, während die nicht unterstrichenen Nucleotide zusätzliche Sequenzen für die Klonierung einführen.

3.1.4.1 Erst-Strang cDNA-Synthese Primer

Diese Primer binden an den poly-A Schwanz der mRNA; sie fügen am 5'-Ende der cDNA eine Adaptersequenz für PCR-Reaktionen ein.

PRQT 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCT₁₇-3'

YXAS 1.5 5'-CGAGGGGGATGGTCGACGGAAGCGAACCT₁₈-3'

Not I 5'-AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAAT₁₈-3'

3.1.4.2 PCR-Primer

α -Pro-Try-CC 5'-CCGCCCCCTGCCCCAGTCCAGG-3'

Bindet an das 5'-Ende der für das Propeptid kodierenden Region der α -Tryptase-cDNA. Für die Expressionsklonierung in pET-32c werden zum Erhalt des Leserasters am 5'-Ende die Nucleotide CC eingefügt.

β -Pro-Try-CC 5'-CCGCCCCCTGCCCCAGGCCAGG-3'

Bindet an das 5'-Ende der für das Propeptid kodierenden Region der β -Tryptase-cDNA. Für die Expressionsklonierung in pET-32c werden zum Erhalt des Leserasters am 5'-Ende die Nucleotide CC eingefügt.

Tryptase I 5'-GCCAGGATGCTGAATCTGCT-3'

Bindet im Bereich der Startcodons der cDNAs aller β -Tryptasen.

Tryptase reif pichia 5'-CCGCTCGAGAAAAGAATCGTCGGGGGTCAGGAGGCC-3'

Bindet an das 5'-Ende der für die reifen Tryptasen kodierenden cDNA, füllt die α -Faktor Signalsequenz bis zur Klonierungsschnittstelle auf und fügt am 5'-Ende eine Xho I-Restriktionsschnittstelle ein.

Tryptase IV 5'-TTCCATGCACTTTAATGAGG-3'

Bindet in der 3'- nichtcodierenden Region der cDNAs der α - und β -Tryptasen.

Tryptase Stop Xba I 5'-GCTCTAGAGCCTGACTCACGGC-3'

Bindet im Bereich des Stopcodons der Tryptase-cDNA und fügt eine Xba I-Restriktionsschnittstelle für die Klonierung ein.

Tryptase Stop Eco RI 5'-GGAATTCGCCTGACTCACGGC-3'

Bindet im Bereich des Stopcodons der Tryptase-cDNA und fügt eine Eco RI-Restriktionsschnittstelle für die Klonierung ein.

3.1.4.3 Sequenzierprimer

SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

Bindet in der SP6-Promotorregion des pGEM-T-Vectors.

T7 Promotor 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Bindet in der T7-Promotorregion des pGEM-T-Vectors.

KS 5'-TCGAGGTCGACGGTATC-3'

Sequenzierprimer für den pBlueskript KS-Vektor.

SK 5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATC-3'

Sequenzierprimer für den pBlueskript KS-Vektor.

α -Faktor 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'

Bindet in der α -Faktor-Signalsequenz des pPICZ α A-Vektors.

5'AOX1 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

Bindet in der 5'AOX1-Region des pPICZ α A-Vektors.

3'AOX1 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Bindet in der 3'-AOX1-Region des pPICZ α A-Vektors.

3.2 Methoden

3.2.1 Klonierung der Tryptase-Isoenzyme aus HMC 1- und MM6-Zellen

Bei Arbeiten mit RNA wurden streng aseptische Arbeitstechniken zur Vermeidung der Kontamination mit RNAsen beachtet. Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem H₂O hergestellt. Nach Möglichkeit wurden sterile Einmal-Verbrauchsmaterialien verwendet oder Glasgeräte benutzt, die 4 h bei 200°C sterilisiert worden waren.

3.2.1.1 RNA-Isolierung nach Chomczynski

Verwendete Lösungen:

RNAzol B (WAK-Chemie)

Chloroform

100 % Ethanol

Isopropanol

Zur RNA-Isolierung aus HMC 1- oder MM6-Zellen wurden jeweils 10^6 Zellen mit 0,2 ml RNAzol B, einem Lysepuffer, der unter anderem Phenol und Guanidiniumisothiocyanat enthält, lysiert. Nach der Zugabe von 1/10 Volumen Chloroform und 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Zelllysat für 15 min bei $11000 \times g$ zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen: eine untere Phenol-Chloroform Phase, die die Proteine und die DNA enthält, sowie eine obere wäßrige Phase, in der die Gesamt-RNA gelöst ist. Nach Entnahme dieser Phase wurde die RNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt und nach einem Waschschrift mit Ethanol in H_2O_{DEPC} resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mittels $OD_{260/280}$ -Messung (siehe 3.2.11.7.2) bestimmt.

3.2.1.2 Erststrang-cDNA-Synthese

Für die Synthese des ersten Stranges der cDNA wurde der Kit der Firma Pharmacia verwendet. Gemäß der Herstellerangabe wurden jeweils 11 μ l Reaktionsmix mit 0,5 μ g Gesamt-RNA und 50 ng Erst-Strang-cDNA-Synthese Primer (siehe 3.1.4.1) versetzt und für 1 h bei $37^\circ C$ im Wasserbad revers transkribiert. Als cDNA-Syntheseprimer wurden dabei drei Primer in getrennten Ansätzen verwendet (siehe 3.1.4.1). Die cDNA wurde anschließend bei $-20^\circ C$ gelagert.

3.2.1.3 PCR mit spezifischen Tryptase-Primern

Mittels PCR wurden die cDNAs der Tryptase-Isoformen amplifiziert, um ausreichende Mengen für die Ligation in die Klonierungsvektoren pGEM-T und pBlueskript sowie in den Expressionsvektor pPICZ α A zu erhalten. In Tabelle 3-1 sind die PCR-Bedingungen und die verwendeten Primer zusammengefaßt.

MATERIAL UND METHODEN

Template	Primer-Kombination, Vorwärts/ Rückwärts	Anzahl der Zyklen, Annealingtemperatur und -zeit, Polymerase	Beschreibung des PCR Produktes
XYAS MM6 cDNA	Tryptase I/ Tryptase IV	25 Zyklen, $T_{an} = 53^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pfu</i> -Polymerase	α 1-Tryptase mit glatten Enden zur Ligation in pBlueskript KS (+)
PRQT HMC 1 cDNA	Tryptase I/ Tryptase IV	25 Zyklen, $T_{an} = 53^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pfu</i> -Polymerase	β Ib-Tryptase mit glatten Enden zur Ligation in pBlueskript KS (+)
XYAS MM 6 cDNA	Tryptase I/ Tryptase IV	25 Zyklen, $T_{an} = 53^{\circ}\text{C}$, 2 min Goldstar-Polymerase	α 1-Tryptase mit 5' überhängenden Adenosinen zur Ligation in pGEM-T
PQRT MM 6 cDNA	Tryptase I/ Tryptase IV	25 Zyklen, $T_{an} = 53^{\circ}\text{C}$, 2 min Goldstar-Polymerase	α 1-Tryptase mit 5' überhängenden Adenosinen zur Ligation in pGEM-T
α 1-Tryptase- cDNA in pBlueskript	Tryptase reif pichia/ Tryptase Stop Xba I	25 Zyklen, $T_{an} = 59^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pwo</i> -Polymerase	reife α 1-Tryptase zur Ligation in pPIC Z α A
β Ia-Tryptase- cDNA in pASK75	Tryptase reif pichia / Tryptase Stop Xba I	25 Zyklen, $T_{an} = 59^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pwo</i> -Polymerase	reife β Ia-Tryptase zur Ligation in pPIC Z α A
β Ib-Tryptase- cDNA in pBlueskript	Tryptase reif pichia / Tryptase Stop Xba I	25 Zyklen, $T_{an} = 59^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pwo</i> -Polymerase	reife β Ib-Tryptase zur Ligation in pPIC Z α A

Template	Primer-Kombination, Vorwärts/ Rückwärts	Anzahl der Zyklen, Annealingtemperatur und -zeit, Polymerase	Beschreibung des PCR Produktes
β II-Tryptase in pASK75	Tryptase reif pichia / Tryptase Stop Xba I	25 Zyklen, $T_{an} = 59^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pwo</i> -Polymerase	reife β II-Tryptase zur Ligation in pPIC Z α A
β III-Tryptase in pASK75	Tryptase reif pichia / Tryptase Stop Xba I	25 Zyklen, $T_{an} = 59^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pwo</i> -Polymerase	reife β III-Tryptase zur Ligation in pPIC Z α A
α -Tryptase in pBlueskript	α -Pro-Try-CC/ Tryptase Stop EcoR1	30 Zyklen, $T_{an} = 59^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pwo</i> -Polymerase	Pro- α -Tryptase zur Ligation in den pET- 32c(+) Vector
β Ib-Tryptase in pBlueskript	β -Pro-Try-CC/ Tryptase Stop EcoR1	30 Zyklen, $T_{an} = 59^{\circ}\text{C}$, 2 min <i>pwo</i> -Polymerase	Pro- β Ib-Tryptase zur Ligation in den pET- 32c(+) Vector

Tabelle 3-1: Übersicht über die verwendeten PCR-Bedingungen.

Die folgenden Parameter waren bei allen PCRs identisch: Denaturierung ($T = 94^{\circ}\text{C}$ für 1 min), DNA-Synthese ($T = 72^{\circ}\text{C}$, 2 min, beim letzten Zyklus 15 min).

Nach der PCR wurden die Produkte mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.2.11.8.3); Produkte, die mit einem Vektor mit überhängenden Enden ligiert werden sollten, wurden zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen inkubiert (siehe 3.2.11.8.7). Die dem gewünschten Produkt entsprechende Bande wurde im UV-Licht sichtbar gemacht, ausgeschnitten, und das PCR-Produkt mit dem GeneClean Kit der Fa. Dianova isoliert und gereinigt (siehe 3.2.11.8.4). Anschließend wurde es wie in 3.2.11.8.8 beschrieben mit dem entsprechend geschnittenen Vektor ligiert.

3.2.2 Expression der Tryptasen in *E. coli*

Zur Expression der Thioredoxin-Fusionsproteine der Pro- α 1- und Pro- β 1b-Tryptase wurde der Vektor pET-32c (+) in *E. coli* B834(DE3) verwendet. Die Eigenschaften des Vektors und des *E. coli* Stamms sind in 3.1.3 beschrieben.

Für die Expression wurde eine 50 ml Vorkultur ü. N. bei 37°C in LB_{amp}-Medium angezogen und am nächsten Tag in einen Schüttelkolben mit 400 ml LB_{amp}-Medium überimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ = 1,0 wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Zellen bei 37°C für weitere 4 h geschüttelt.

3.2.3 Zellernte und Isolierung der Einschlusskörperchen

Verwendete Lösungen:

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 mM
NaCl

Nach der Expression wurde die *E. coli*-Kultur 15 min auf Eis gekühlt. Die Kultursuspension wurde zentrifugiert (10 min bei 4500 x g, 4°C) und das Zellpellet in 3 ml Lysepuffer pro Gramm Pellet resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend bei 4°C mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Dazu wurde die Druckzelle der French Press mit einem Aliquot der Zellsuspension (ca 50 ml) gefüllt und in der Apparatur fixiert. Nach dem Anlegen von 200 bar Überdruck wurde das Ablassventil der Zelle geöffnet und die Suspension tropfenweise (15 – 25 Tropfen pro Minute) in einem gekühlten Gefäß aufgefangen. Der plötzliche Druckabfall beim Austritt der Zellen aus der Druckzelle führt zum Platzen der Bakterien. Der Vorgang wurde einmal wiederholt.

Das *E. coli*-Lysat wurde 45 min bei 37°C mit DNase I (10 µg/ml) und RNase A (10 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Einschlusskörperchen durch Zentrifugation (6000 x g, 15 min) geerntet und mehrmals durch Resuspendieren in einem Potter gewaschen. Die dabei verwendeten Puffer und Zentrifugationsschritte sind in Tabelle 3-2 zusammengefaßt.

	Puffer (40 ml/Gramm Pellet)	Zentrifugation	Bemerkung
Waschschritt 1	Lysepuffer mit 0,5 % Chaps	12500 x g, 15 min, 4°C	Entfernung von Membranbestandteilen
Waschschritt 2	Lysepuffer mit 1 M Guanidiniumchlorid	12500 x g, 15 min, 4°C	Entfernung von kontaminierenden <i>E. coli</i> - Proteinen
Waschschritt 3	Lysepuffer	12500 x g, 15 min, 4°C	Entfernung des Detergens

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der Waschschritte der Einschlußkörperchen.

3.2.4 Rückfaltung der rekombinanten Trx-Pro-Tryptasen

Verwendete Lösungen:

Solubilisierungspuffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM DTT, 4 M Guanidiniumchlorid

Renaturierungspuffer: 10 mM MES, pH 5,5, 100 mM NaCl, 300 mM L-Arginin, 0,05 % Chaps, 1 M Guanidiniumchlorid, 2,5 mM GSH, 0,5 mM GSSG

Dialysepuffer 10 mM MES, pH 5,5, 100 mM NaCl

Die gewaschenen Einschlußkörperchen (‘inclusion bodies’) wurden in 30 ml Solubilisierungspuffer pro Gramm gelöst und aliquotiert. Nicht sofort weiterverarbeitete Aliquots wurden bei –80°C gelagert.

Die Rückfaltung der Thioredoxin-Pro-Tryptase-Fusionsproteine erfolgte in einem zweistufigen Prozess durch Verdünnung und Dialyse bei 4°C. Dazu wurde unter Rühren 1 ml der gelösten ‘inclusion bodies’ tropfenweise in 50 ml Renaturierungspuffer verdünnt. Die Lösung wurde anschließend 4 h bei 4°C inkubiert und dreimal gegen den 50-fachen Überschuß Dialysepuffer bei 4°C dialysiert (Ausschlußgröße 3 kD). Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 12000 x g entfernt.

3.2.5 Expression der Tryptasen in *Pichia pastoris* im Schüttelkolben

Für die Expression der Zymogene und der katalytischen Domäne der Tryptasen wurde der Vektor pPicZ α A und die Hefestämme X33, GS115 und KM71H verwendet. Die Eigenschaften dieses Vektors und der Stämme sind in 3.1.3 beschrieben. Die Ligation der für die Zymogene bzw. reifen Domänen kodierenden Abschnitte der cDNAs in den Vektor und die Transformation von *Pichia pastoris* erfolgte wie in 3.2.11.8.8 und 3.2.11.9 beschrieben.

10 ml BMGH Medium wurden aus einer Glycerinkultur oder von einem Verdünnungsausstrich angeimpft und 1 – 2 Tage bei RT inkubiert, bis eine OD₆₀₀ 4 – 6 erreicht war. Diese Vorkultur wurde in 300 ml BMGH Medium überimpft und ÜN bei 30°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 2 – 6 erreicht war. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1500 x g geerntet, der Überstand verworfen und das Pellet in BMMH Medium resuspendiert, so daß die Kultur eine OD₆₀₀ = 1 hatte. Zur Expression wurden maximal 300 ml dieser Kultur in einem 1 l Fernbachkolben mit Schikane bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert.

3.2.6 Expression der Tryptasen in *Pichia pastoris* im Fermenter

Verwendete Lösungen:

Spurenelemente-Lösung: 0,6 % CuSO₄·5H₂O, 0,008 % NaI, 0,3 % MnSO₄·H₂O, 0,02 % NaMoO₄·2H₂O, 0,002 % Borsäure, 0,05 % CoCl₂, 2 % ZnCl₂, 6,5 % FeSO₄·7H₂O, 0,02 % Biotin, 0,5 % (v/v) H₂SO₄

Glycerollösung: 50 % Glycerol mit 12 ml/l Spurenelemente-Lösung versetzt.

Methanollösung: 100 % Methanol, mit 12 ml/l Spurenelemente-Lösung versetzt.

Alle Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert.

Der verwendete Fermenter Biostat E (B. Braun Biotech) besteht aus einem Kulturgefäß (10 l) und einer Regeleinheit. Die Regeleinheit erlaubt die Regelung wichtiger Parameter wie Sauerstoffgehalt, Temperatur, pH-Wert und Schaumbildung. Die

Handhabung des Gerätes erfolgte wie im Handbuch der Fa. B. Braun Biotech, Melsungen, beschrieben.

3.2.6.1 Anzucht der Vorkultur

Zur Expression im Fermenter wurde ausschließlich der Hefestamm X33 verwendet. 10 ml BMGY Medium wurden aus einer Glycerinkultur oder von einem Verdünnungsausstrich angeimpft und 1 – 2 Tage bei RT inkubiert, bis eine OD_{600} 4 – 6 erreicht war. Dann wurden 500 ml BMGH Medium in einem Schüttelkolben mit Schikane mit dieser Kultur beimpft und bei 30°C für 2 - 3 Tage inkubiert, bis eine $OD_{600} = 2 - 6$ erreicht war.

3.2.6.2 Sterilisation des Mediums und Animpfen des Fermenters

Das für die Expression verwendete Basalsalzmedium (5 l) wurde im Fermenter bei 121 °C für 30 min sterilisiert. Bereits vor der Sterilisation war das folgende Zubehör am Fermenter angebracht worden: Temperaturfühler PT 100, Sauerstoffelektrode, pH-Elektrode und Antischaumsonde. Nach dem Abkühlen des Mediums auf 30°C wurden zusätzlich Zuluftnadel, Zuleitungen für Säure, Lauge und Antischaum sowie eine zusätzliche Anstechnadel mit Sterilkupplung (zur späteren Zugabe der Vorkultur, des Glycerols und des Methanols) am Fermenter montiert. Der pH des Mediums wurde auf 5,5 geregelt und 21,75 ml Spurenelemente-Lösung wurden steril zugegeben. Mit einer Schlauchpumpe wurde anschließend die Vorkultur, die im Schüttelkolben angezogen worden war (siehe 3.2.6.1), in den Fermenter gepumpt.

3.2.6.3 Fermentation

Sollwerte der Fermentation:

pH-Wert:	5,5
Temperatur:	30°C
Sauerstoffsättigung:	35 %
Sauerstoffkontrolle:	Rührer + Ventil
Minimale/Maximale	300 rpm / 1500 rpm
Rührgeschwindigkeit:	
Ventilstellung:	ganz geöffnet (max. 10 l/min)

Die Fermentation unterteilt sich in 3 Abschnitte: die Glycerol ‚Batch‘-Phase, die Glycerolfütterung und die Methanolfütterung. Die Zuleitung von Glycerol bzw. Methanol in den Fütterungsphasen erfolgte über eine Schlauchpumpe. In Tabelle 3-3 sind die Fermentationsphasen zusammengefasst.

Phase	Dauer	Beschreibung
Glycerol- ,Batch‘:	24-48 h	Erzeugung von Biomasse; das im Basalsalzmedium vorhandene Glycerol wird verbraucht.
Glycerol- fütterung:	3-4 h	Vermehrung der Biomasse; über die zusätzliche Anstechnadel werden 90 ml/h Glycerollösung in die Kultur gepumpt. Die Kultur wird an eine limitierte Kohlenstoffquelle adaptiert.
Methanol- fütterung:	68-72 h	Expression der Tryptasen. Die Fütterungsgeschwindigkeit wurde in drei Stufen gesteigert: von 18 ml/h über 36 ml/h auf 54,5 ml/h. Vor jeder Erhöhung wurde überprüft, ob die ‚Spike‘-Zeit kürzer als eine Minute ist, um sicherzustellen, daß sich kein (in höheren Konzentrationen toxisches) Methanol in der Kultur anreichert. Die ‚Spike‘-Zeit ist diejenige Zeit, in der nach dem Ausschalten der Methanolfütterung die Sauerstoffkonzentration in der Kultur um 10 % ansteigt.

Tabelle 3-3: Die verschiedenen Phasen der Fermentation.

3.2.6.4 Zellernte und Aufkonzentrierung des Mediums

Um die bei der Expression ins Medium sezernierten Tryptasen von den Hefezellen zu trennen, wurde die Kultur 10 min bei 1500 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und das Medium auf Eis aufkonzentriert.

Das Kulturmedium aus kleinen Ansätzen (Schüttelkolben) wurde mittels einer Ultrafiltrationsmembran (Ausschlußgröße 10 kD; Amicon, Witten) in einer Druckfiltrationszelle unter Rühren und mit einem Stickstoffdruck von max. 3 bar aufkonzentriert. Ansätze aus dem Fermenter wurden über das Tangentialflußsystem

Miniset (Pall) mit einer Membrankassette von 8 kD Ausschlußgröße konzentriert. Die konzentrierten Medien wurden aliquotiert und bis zur Reinigung bei -20°C gelagert.

3.2.7 Reinigung der Tryptase-Isoenzyme mittels Kationenaustausch-Chromatographie

Verwendete Lösungen:

Auftragspuffer (Puffer A): 50 mM Tris/HCl, pH 5,5

Elutionspuffer (Puffer B): 50 mM Tris/HCl, pH 5,5, 2 M NaCl

Die chromatographische Reinigung wurde an einer FPLC Anlage bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Elution wurde über die Absorbtion bei 280 nm verfolgt und die Eluate fraktioniert gesammelt.

Das Medium wurde vor dem Auftrag auf die Chromatographiesäule bei 4°C für 20 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand mit einer Spritze durch ein $0,45 \mu\text{m}$ Filter gepresst. Das klare, grünliche Filtrat wurde mit einer Flußrate von 2 ml/min auf eine mit Auftragspuffer äquilibrierte Fractogelsäule (Fractogel EMD- SO_3^-) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit ca. 10 Säulenvolumen Auftragspuffer gewaschen und dann mit einem linear ansteigenden Elutionspuffergradienten bei einer Flußrate von 2 ml/min eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Tryptase-Aktivitätstests und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (siehe 3.2.8.1).

3.2.8 Proteinchemische Charakterisierung der Tryptase-Isoenzyme

3.2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen (Lämmli, 1970) wurden homogene 12 %- oder 15 %-ige Trenngele mit 5 %-igen Sammelgelen verwendet.

MATERIAL UND METHODEN

Verwendete Lösungen:

4x Sammelgel	Puffer 0,5 mM Tris/HCl pH 6,8
4x Trenngel	Puffer 1,5 mM Tris/HCl pH 8,8
Acrylamid/Bisacrylamid 29/1	40 % (w/v)
SDS-Lösung	10 % in H ₂ O
TEMED	
APS-Lösung	10 % in H ₂ O
2x Lämmli Probenpuffer	100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 200 mM DTT
Tris/Glycin Puffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS
Molekulargewichtsstandart	Protein Marker Broad Range (BioRad)

Der Aufbau der Gelapparatur und das Gießen der Gele erfolgte entsprechend der Anleitung des Geräteherstellers. Die Gellösungen setzten sich dabei wie folgt zusammen:

	12 % Trenngel	15 % Trenngel	5 % Sammelgel
Sammelgelpuffer	--	--	1,00 ml
Trenngelpuffer	2,50 ml	2,50 ml	--
SDS (10 %)	100 µl	100,0 µl	40,0 µl
Wasser	4,35 ml	3,60 ml	2,40 ml
TEMED	5,00 µl	5,00 µl	5,00 µl
APS (10 %)	44,30 µl	44,3 µl	26,6 µl
Acrylamid/Bisacrylamid 29/1 (40 %)	3,00 ml	3,75 ml	500 µl

Tabelle 3-4: Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Die Proben und der Molekulargewichtsmarker wurden vor dem Auftrag zur Denaturierung und Reduktion für 5 min auf 100 °C erhitzt. Während der Elektrophorese betrug die Stromstärke bei der Konzentrierung der Proben im Sammelgel 25 mA und beim Lauf im Trenngel 30 mA.

3.2.8.2 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit *Coomassie Brilliant Blau*

Verwendete Lösungen:

Färbelösung	450 ml Wasser, 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure (100 %), 2,5 g Coomassie Brilliant Blau R250
Entfärbelösung	450 ml Wasser, 450 ml Methanol, 100 ml Essigsäure (100 %)

Um die Proteinbanden nach der SDS-PAGE sichtbar zu machen, wurden die Gele mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Dazu wurden sie nach der Elektrophorese für 15 min in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden sie in der Entfärbelösung geschüttelt, bis der Hintergrund klar und nur noch die Proteinbanden blau waren. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt.

3.2.8.3 Western Blot Analyse

3.2.8.3.1 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen

Verwendete Lösungen:

Towbin Puffer	39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol
Ponceau S Lösung	0,2 g Ponceau S, 3 g Trichloressigsäure, 3 g Sulfosalicylsäure, H ₂ O ad 100 ml
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ mit HCl pH 7,4 einstellen, mit Wasser auf 1 l auffüllen.

Der Proteintransfer aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrocellulose wurde mit Hilfe einer ElektrobloTTing-Apparatur durchgeführt. Zunächst wurden 6 Lagen Whatman Filterpapier (je 2 mm) und die Nitrocellulose-Membran in leitfähigem Towbin Puffer getränkt. Das Gel wurde auf der Nitrocellulose-Membran zwischen je 3 Lagen Whatman Filterpapier zwischen die beiden Elektroden der Appartur gelegt. Der

Transfer wurde für 1 h bei 8 mA/cm² durchgeführt. Der Proteintransfer wurde anschließend durch Färbung der Membran mit Ponceau-S Lösung überprüft und die Markerbanden mit Kugelschreiber gekennzeichnet. Die Membran wurde anschließend mit PBS-Lösung wieder entfärbt.

3.2.8.3.2 Bindung des spezifischen Antikörpers

Verwendete Lösungen:

PBS 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄
mit HCl pH 7,4 einstellen, mit Wasser auf 1 l
auffüllen.

PBS (0,1 % Tween)

PBS (5 % Milchpulver)

Um die freien Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran abzusättigen, wurde die Membran für 30 min bei 4°C in PBS mit 5 % Milchpulver bei niedriger Rotationsgeschwindigkeit geschüttelt. Anschließend wurde sie ü. N. mit dem Maus-anti-Tryptase Antikörper (Verdünnung 1/5000 in PBS mit 5 % Milchpulver) inkubiert.

3.2.8.3.3 Detektion mittels Enzym/Substrat-vermittelter Farbreaktion

Nach Bindung des spezifischen Antikörpers wurde die Membran dreimal je 10 min mit PBS gewaschen und 2 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Schaf-anti-Maus Antikörper (Verdünnung 1/5000 in PBS) bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (dreimal 10 min) mit PBS (0,1 % Tween) folgte die Farbreaktion mit DAB entsprechend den Angaben des Kit-Herstellers (DAB-Substrate Kit, Vector Laboratories).

3.2.8.4 N-terminale Aminosäuresequenzierung

Ca. 50 - 100 pmol der mittels FPLC gereinigten Proteine wurden nach dem Prinzip des Edman-Abbaus vollautomatisch mittels eines Gasphasensequenzator 473 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) ansequenziert.

3.2.8.5 ‚Peptide Map‘

Zur Überprüfung der Identität der Isoenzyme auf Proteinebene wurden ca. 100 – 200 pmol der mittels FPLC gereinigten Proteine mit Trypsin oder mit Trypsin und LysC gespalten. Die so erzeugten Fragmente wurden massenspektrometrisch analysiert.

3.2.8.6 Deglycosylierung der Tryptase-Isoenzyme

Für die Deglycosylierung wurden die Glycosidasen PNGase F und Endo H nach Angabe des Herstellers in den mitgelieferten Puffersystemen eingesetzt. Die Tryptasen wurden entweder zunächst für 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend bei 37°C für 90 min deglycosyliert oder aber ohne vorherige Denaturierung für 3 – 24 h mit den Glycosidasen inkubiert.

3.2.8.7 CD-Spektren und Schmelzpunktbestimmung

Verwendete Lösungen:

Puffer ohne Heparin	50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl
Puffer mit Heparin	50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl, 6,65 mg/ml Heparin

CD-Spektren und Schmelzkurven wurden mit einem Jasco Spektropolarimeter J-715, das mit einem temperaturkontrollierten Küvettenhalter (Modell PFD-350S) ausgerüstet war, aufgezeichnet. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten von 0,1 cm Schichtdicke. Die CD-Spektren wurden im fernen UV von 250 nm bis 210 nm aufgezeichnet, die Schmelzkurven wurden bei 230 nm mit einer Heizrate von 10°C/30 min verfolgt.

Die Tryptasekonzentration betrug in allen Fällen 6,7 µM. Zur Aufzeichnung der Schmelzkurven der verschiedenen Isoenzyme wurde ein Heparin-haltiger Puffer eingesetzt. Die Bestimmung der Schmelzpunkte der Komplexe von β3-Tryptase mit den Inhibitoren NS-216 (1 mM) und NS-222 (10 µM) erfolgte in einem Puffer ohne Heparinzusatz.

Die aufgezeichneten Schmelzkurven wurden durch Anpassung sigmoider Kurven mit Hilfe des Programmes Origin (Microcal; Northhampton, USA) gemäß Gleichung 3-1 ausgewertet. Der Wendepunkt T_m dieser Kurven entspricht dem Schmelzpunkt des Proteins bzw. des Enzym/Inhibitor-Komplexes.

Gleichung 3-1:
$$\Theta(T) = \frac{\Theta_1 - \Theta_2}{1 + e^{(T-T_m)/k}} + \Theta_2$$

$\Theta(T)$ = Elliptizität bei 230 nm bei der Temperatur T

Θ_2 = Elliptizität des geschmolzenen Proteins/Komplexes

Θ_1 = Elliptizität des intakten Proteins/Komplexes

T = Temperatur

T_m = Schmelztemperatur (= Schmelzpunkt)

k = Konstante

3.2.8.8 Stabilitätsmessung des Tryptase-Tetramers

Verwendete Lösungen:

Testpuffer (ohne Heparin)	50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100
Substrat-Lösung	Bz-Arg-AMC, 50 mM in DMSO
Tryptaseverdünnungspuffer	10 mM MES, pH 6,1; 2 M NaCl; 0,01 % Triton, 0,01 % NaN ₃
Tryptaselösung	300 nM in Tryptaseverdünnungspuffer

Um die Tetramer-Stabilität der verschiedenen β -Isoenzyme zu vergleichen, wurde die Abnahme der enzymatischen Aktivität in einem das Tetramer nicht stabilisierenden Puffer bei 37°C verfolgt. In einer 3 ml Küvette wurden 2978 μ l Testpuffer und 2 μ l Substratlösung (Endkonzentration 33,3 μ M) vorgelegt. Es wurden 20 μ l Tryptaselösung (Endkonzentration 2 nM) zugegeben, gut gerührt und die Spaltung des Substrates Bz-Arg-AMC in einem Fluorimeter (SFM 225, Kontron) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{Ex} = 380$ nm und einer Emissionswellenlänge $\lambda_{Em} = 460$ nm über die Zeit verfolgt. Aus den erhaltenen Daten für die Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit wurden mit Hilfe des Computerprogrammes proFit (Cherwell Scientific Publishing, Palo Alto, USA) durch nicht lineare Regressionsanalyse unter Verwendung von Gleichung 3-2 die Werte für die Zeitkonstante k berechnet.

Gleichung 3-2
$$P(t) = v_s t - \frac{(v_s - v_0)(1 - e^{-kt})}{k} + d$$

P_t = Freigesetztes Produkt zum Zeitpunkt t .

v_s = Reaktionsgeschwindigkeit am Ende des Zerfalls

v_0 = Reaktionsgeschwindigkeit am Anfang des Zerfalls

k = Zeitkonstante

t = Zeit

d = Achsabschnitt (= Freigesetztes Produkt zum Zeitpunkt $t = 0$)

Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ergibt sich aus k gemäß Gleichung 3-3.

Gleichung 3-3
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

3.2.9 Enzymkinetische Charakterisierung der Tryptase-Isoenzyme

3.2.9.1 „Active site“-Titration

Verwendete Lösungen:

Tryptase-Testpuffer (TTP)	50 mM Tris/HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100, 50 µg/ml Heparin
Hydroxymethylcumarin- guanidinbenzoat (HMC-GB)	250 µM in TTP
Hydroxymethylcumarin	50 µM in TTP

Einstellungen am Fluorimeter:

Anregungswellenlänge (λ_{Ex})	365 nm
Emissionswellenlänge (λ_{Em})	445 nm
Eichung	200 nM Hydroxymethylcumarin = 100 %
Temperatur	37°C

Die Konzentration der aktiven Tryptasen wurde mit Hilfe der ‚Burst‘ Titration (Kezdy et al., 1965) mit Hydroxymethylcumarin-Guanidinbenzoat (HMC-GB) bestimmt. Dieses Substrat inaktiviert bei der Spaltung durch Tryptase das aktive Zentrum der Protease durch Acylierung, das dabei freigesetzte Hydroxymethylcumarin wurde fluorimetrisch bestimmt.

In einer 3 ml Küvette wurde 1 µM HMC-GB Lösung in Tryptase-Testpuffer vorgelegt und die kontinuierliche Fluoreszenzmessung gestartet. Nachdem die Basislinie aufgezeichnet worden war, wurde die Messung unterbrochen, eine definierte Menge aktiver Tryptase zugegeben, gut gerührt und die Fluoreszenzmessung solange fortgesetzt, bis sich wieder ein stabiler Meßwert ergab. Die schlagartig freigesetzte Menge Hydroxymethylcumarin entspricht der zugegebenen Menge Tryptase. Die Messdaten wurden durch einen Computer aufgezeichnet und mit dem Programm Profit (Cherwell Scientific Publishing, Palo Alto, USA) ausgewertet.

3.2.9.2 Bestimmung der Enzymaktivität

Verwendete Lösungen:

Testpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 50 µg/ml Heparin, 0,01 % Triton X-100
Substrat-Lösung	tos-Gly-Pro-Arg-pNA, 20 mM in DMSO

Zur Bestimmung der Aktivität der Tryptase-Isoenzyme wurden die Tryptaselösungen in geeigneter Verdünnung in Testpuffer in einer 1 ml Küvette vorgelegt. Es wurden 5 µl der Substratlösung zugegeben (Endkonzentration 100µM), gut gerührt und die Spaltung des Substrates in einem Spektralphotometer (Uvikon XL, Kontron) bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt.

3.2.9.3 Bestimmung der enzymkinetischen Kenngrößen (K_m , K_{cat} , und K_{cat}/K_m)

Der Bestimmung der Kenngrößen liegt das Michaelis-Menten-Modell zur Beschreibung der enzymatischen Katalyse zugrunde, das auf folgendem Reaktionsschema basiert:



Zur Bestimmung der enzymkinetischen Kenngrößen K_m (Michaelis-Menten Konstante), K_{cat} (Wechselzahl), und K_{cat}/K_m der Tryptase-Isoenzyme wurde die Geschwindigkeit v_0 der Substratspaltung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt. Die Meßbedingungen sind in Tabelle 3-5 zusammengefaßt.

Temperatur	RT
Testvolumen	200 μ l
Substrat	tGRP-AMC [1,56 μ M – 200 μ M]
Tryptase-Isoenzyme	100 pM
Puffer	50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100, 0,1 μ g/ml Heparin

Tabelle 3-5: Zusammenfassung der Testbedingung für die Bestimmung der enzymkinetischen Kenngrößen K_m , K_{cat} , und K_{cat}/K_m .

Die Messungen erfolgten in 96-Well Mikrotiterplatten. In der ersten Spalte der Platte wurden 200 μ l der Substratlösung vorgelegt, in den restlichen Spalten 100 μ l Testpuffer. In einer Verdünnungsreihe wurde das Substrat jeweils im Verhältnis 1:1 in Testpuffer verdünnt, so daß in jedem Well 100 μ l Substratlösung vorlag. Nach Zugabe von 100 μ l Tryptaselösung wurde die Aktivitätsmessung in einem Mikrotiterplattenreader der Firma Pharmacia sofort gestartet (Anregungswellenlänge λ_{Ex} =380 nm, Emissionswellenlänge λ_{Em} = 460 nm, 10 min). Auf jeder Platte wurde eine AMC-Eichkurve mitgeführt. Aus den erhaltenen Daten der Produktbildung über die Zeit wurden zunächst die Reaktionsgeschwindigkeiten berechnet; anschließend wurden aus den Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit Hilfe des Computerprogrammes ProFit (Cherwell Scientific Publishing, Palo Alto, USA) durch nicht lineare Regressionsanalyse unter Verwendung der Michaelis-Menten Gleichung 3-4 (Michaelis und Menten, 1913) die Werte für K_M und V_{max} berechnet.

Gleichung 3-4
$$v(S) = \frac{v_{\max} S}{S + K_M}$$

K_M = Michaelis-Menten Konstante

S = Substratkonzentration

v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung

$v(S)$ = Beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit bei der Substratkonzentration S

Die Wechselzahl des Enzyms k_{cat} (umgesetzte Moleküle des Substrats pro Molekül Enzym und Sekunde) und die abgeleitete Kenngröße K_{cat}/K_m wurden über Gleichung 3-5 berechnet.

Gleichung 3-5
$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]}$$

k_{cat} = Wechselzahl

$[E]$ = Konzentration der Enzyms

3.2.9.4 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_i des Enzym-Inhibitor-Komplexes

Die Dissoziationskonstante K_i der Komplexe der Tryptase-Isoenzyme mit verschiedenen Inhibitoren wurden unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt (‘steady-state’ Kinetik). Die Testbedingungen sind in Tabelle 3-6 zusammengefaßt:

MATERIAL UND METHODEN

Temperatur	RT
Vorinkubationszeit	30 min
Testvolumen	200 μ l
Substrat	Tos-Gly-Pro-Arg-AMC [5 μ M]
Inhibitoren	Babim [48,83 pM - 50 nM] 60603 [1,95 pM – 2 nM] rLDTI [14,65 pM – 15 nM]
Tryptase-Isoenzyme	100 pM
Puffer für rLDTI und 60603	50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100, 0,1 μ g/ml Heparin
Puffer für Babim	50 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100, 0,1 μ g/ml Heparin, 1 mM ZnCl

Tabelle 3-6: Testbedingung für die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_i unter Gleichgewichtsbedingungen.

Die zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen Enzym, Inhibitor und Enzym/Inhibitor Komplex benötigte Vorinkubationszeit wurde in Vorversuchen ermittelt. Die Enzymkonzentration wurde niedrig genug gewählt, so daß die Restaktivität mit steigender Inhibitorkonzentration nichtlinear abnahm. Die Messung erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten. In der ersten Spalte der Platte wurden pro Well 200 μ l der jeweiligen Inhibitorlösung, in den Spalten 2 – 12 pro Well 100 μ l Testpuffer vorgelegt. In einer Verdünnungsreihe wurden die Inhibitoren dann jeweils im Verhältnis 1:1 von Spalte 1 bis Spalte 11 in Testpuffer verdünnt, so daß in jedem Well 100 μ l Lösung vorlag. Nach Zugabe von 50 μ l Tryptaselösung wurde 30 min bei RT vorinkubiert und anschließend 50 μ l der Substratlösung zugegeben. Die Messung der Restaktivität des Enzymes erfolgte in einem Mikrotiterplattenreader der Firma Pharmacia fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 380$ nm und einer

Emissionswellenlänge $\lambda_{Em} = 460 \text{ nm}$ über einen Zeitraum von 10 min. Die Substratkonzentration wurde so gewählt, daß während der Meßzeit weniger als 10 % des Substrates verbraucht wurden. Die gemessene Geschwindigkeit der Freisetzung von gespaltenem Substrat ist dann der Enzymaktivität direkt proportional.

Aus der erhaltenen Hemmkurve wurde die scheinbare Dissoziationskonstante K_{iapp} des Enzym/Inhibitor-Komplexes durch Anpassung der Gleichung 3-6 für festbindende Inhibitoren (Morrison, 1969) mittels nichtlinearer Regression berechnet.

Gleichung 3-6
$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{\left[E_t + I_t + K_{iapp} - \sqrt{(E_t + I_t + K_{iapp})^2 - 4E_t I_t} \right]}{2E_t}$$

v_i = Enzymaktivität in Anwesenheit des Inhibitors

v_0 = Enzymaktivität in Abwesenheit des Inhibitors

E_t = Gesamtkonzentration des Enzyms

I_t = Gesamtkonzentration des Inhibitors

K_{iapp} = scheinbare Dissoziationskonstante des Enzym/Inhibitor-Komplexes
(in Anwesenheit eines Substrates)

Da Tryptasen bei bestimmten Inhibitoren auch bei einem hohen Überschuß an Inhibitor eine nicht hemmbare Restaktivität zeigten, mußte die Gleichung nach Morrison zur Berücksichtigung dieser Restaktivität wie folgt abgeändert werden:

Gleichung 3-7
$$v_i = v_s + v_0 \left[1 - \frac{\left[E_t + I_t + K_{iapp} - \sqrt{(E_t + I_t + K_{iapp})^2 - 4E_t I_t} \right]}{2E_t} \right]$$

v_i = Enzymaktivität in Anwesenheit des Inhibitors

v_0 = Enzymaktivität in Abwesenheit des Inhibitors

v_s = nicht hemmbare Enzymrestaktivität

E_t = Gesamtkonzentration des Enzyms

I_t = Gesamtkonzentration des Inhibitors

K_{iapp} = scheinbare Dissoziationskonstante des Enzym/Inhibitor-Komplexes
(in Anwesenheit eines Substrates)

Die tatsächliche Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_i wurde aus dem Wert für K_{iapp} durch Extrapolation der Substratkonzentration gegen Null entsprechend Gleichung 3-8 berechnet.

Gleichung 3-8
$$K_i = \frac{K_{iapp}}{1 + \frac{S}{K_M}}$$

K_{iapp} = scheinbare Dissoziationskonstante des Enzym/Inhibitor-Komplexes (in Anwesenheit eines Substrates)

K_i = tatsächliche Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

S = Substratkonzentration

K_M = Michaelis-Menten-Konstante des Substrates

Die K_M -Werte wurden wie in 3.2.9.4 beschrieben bestimmt.

3.2.10 Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘

Verwendete Lösungen:

Auftragspuffer (Puffer A) 50 mM Tris, pH 7,6, 500 µg/ml Heparin

Elutionspuffer (Puffer B) 50 mM Tris, pH 7,6, 500 µg/ml Heparin, 2 M NaCl

Die chromatographische Trennung wurde an einer FPLC-Anlage bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Elution wurde über die Bestimmung der Absorption bei 280 nm verfolgt und das Eluat fraktioniert gesammelt.

Die Trennung wurde mittels einer Affinitätssäule durchgeführt. Sie besteht aus einer Sepharosematrix, an die der bivalente Inhibitor NS-358 in einer Konzentration von 1 mM gekoppelt ist. 2 ml gequollenes Säulenmaterial (von Dr. Norbert Schaschke, MPI für Biochemie, AG Moroder zur Verfügung gestellt) wurden bei einem Fluß von 2 ml/min in einem passenden Säulenmantel (5mm x 50 mm) gepackt.

200 µl Tryptaselösung (3 µM) wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die mit Auftragspuffer äquilibrierte Affinitätssäule aufgetragen. Die Säule wurde mit ca. 10 Säulenvolumen Auftragspuffer gewaschen und dann in einem linear ansteigenden Elutionspuffer-Gradienten eluiert. Die noch an die Säule gebundene Tryptase wurde mit 3x200 µl Benzamidinlösung (1 mM) eluiert.

3.2.11 Allgemeine mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

Falls nicht anders angegeben wurden die mikrobiologischen und molekularbiologischen Methoden gemäß den Protokollen von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

3.2.11.1 Stammhaltung von *E. coli*-Stämmen

Die Bakterienstämme wurden als Verdünnungsausstriche angezogen und nach der Bebrütung für 4 - 5 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Für die längerfristige Stammhaltung wurden 700 µl einer ÜN Kultur mit 300 µl sterilem Glycerin (50 % in H₂O) gemischt und in kleinen Präparateröhrchen bei -70°C eingefroren.

3.2.11.2 Stammhaltung von *Pichia pastoris*-Stämmen

Die Hefestämme wurden als Verdünnungsausstriche angezogen und nach der Bebrütung für 4 - 5 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Für die längerfristige Stammhaltung wurde eine

ÜN Kultur 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und das Pellet in YPD-Medium resuspendiert, so daß die Kultur eine $OD_{600} = 50 - 100$ aufwies. 70 µl dieser Kultur wurden nach Zugabe von 30 µl sterilem Glycerin (50 % in H₂O) in kleinen Präparaterörchen bei -70°C eingefroren.

3.2.11.3 Anzucht und Vermehrung von *E. coli*-Stämmen

Alle Stämme, die eine Antibiotikaresistenz tragen, wurden unter Antibiotikazusatz (100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Zeocin) kultiviert. ÜN-Kulturen bis zu einem Volumen von 50 ml wurden am Vorabend mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Bei größeren Kulturen wurde das Medium mit 1/10 Volumen einer Vorkultur (ÜN-Kultur) beimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ erreicht war.

3.2.11.4 Anzucht und Vermehrung von *Pichia pastoris*-Stämmen

ÜN-Kulturen bis zu einem Volumen von 50 ml wurden am Vorabend mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 30°C über Nacht geschüttelt. Bei größeren Kulturen wurde das Medium mit 1/10 Volumen einer Vorkultur (ÜN-Kultur) beimpft und bei 30°C in einem Kolben mit Schikane geschüttelt, bis eine $OD_{600} = 5 - 15$ erreicht war.

3.2.11.5 Medien und Antibiotika

LB Medium	100 g Trypton, 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, mit H ₂ O dest. auf 1 l auffüllen.
LB Platten	100 g Trypton, 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 13 g Bacto-Agar, mit H ₂ O dest. auf 1 l auffüllen.
YPD Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Peptone auf 900 ml H ₂ O dest. auffüllen, nach dem Autoklavieren 100 ml 20 % Dextrose zugeben.
YPD Platten	10 g Hefeextrakt, 20 g Peptone, 20 g Bacto-Agar, auf 900 ml H ₂ O dest. auffüllen, nach dem Autoklavieren 100 ml 20 % Dextrose Lösung zugeben.

MATERIAL UND METHODEN

YPDS Platten	10 g Hefeextrakt, 20 g Peptone, 182,2 g Sorbitol, 20 g Bacto-Agar, auf 900 ml H ₂ O dest. auffüllen, nach dem Autoklavieren 100 ml 20 % Dextrose zugeben.
BMGH Medium	Zu 690 ml autoklaviertem H ₂ O steril zugeben: 100 ml 13,4 % Yeast Nitrogen Base Lösung, 100 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 100 ml 10 % Glycerol, 10 ml 0,4 % Histidin, 4 ml 0,01 % Biotin.
BMMH Medium	Zu 690 ml autoklaviertem H ₂ O steril zugeben: 100 ml 13,4 % Yeast Nitrogen Base Lösung, 100 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,0, 100 ml 10 % Methanol, 10 ml 0,4 % Histidin, 4 ml 0,01 % Biotin
Basales Salz Medium	2,27 % (v/v) H ₃ PO ₄ , 0,093 % CaSO ₄ , 1,8 % KSO ₄ , 1,49 % Mg SO ₄ .7H ₂ O, 0,413 % KOH, 4 % Glycerol.
Antibiotika	Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml), Zeocin (Endkonzentration 25 µg/ml bis 2000 µg/ml)

3.2.11.6 Isolierung von DNA

3.2.11.6.1 Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit DNA

1M Tris/HCl (pH 8,0) Tris wurde in H₂O Bidest gelöst, der pH-Wert mit konz. HCl eingestellt und die Lösung mit H₂O Bidest auf das Endvolumen aufgefüllt.

TE Puffer (pH 8,0) 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

3.2.11.6.2 Präparative Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die präparative Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der Qiaprep Spin Miniprep-Kit oder die Qiagen Plasmid Midi- oder Maxi-Kits verwendet. Alle benötigten Lösungen sowie die Säulen sind im jeweiligen Kit enthalten. Die Aufarbeitung beruht auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.11.7 Quantifizierung von DNA und RNA

3.2.11.7.1 Quantifizierung durch Agarosegel-Elektrophorese

Geringe Mengen DNA wurden zusammen mit einer Vergleichs-DNA bekannter Konzentration in einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid wurde die Konzentration der zu bestimmenden DNA durch den Vergleich mit der UV-induzierten Bandenintensität der DNA mit bekannter Konzentration abgeschätzt.

3.2.11.7.2 Quantifizierung durch UV-Spektroskopie

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde über die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Dazu wurde die DNA oder RNA verdünnt und die E_{260} gegen einen geeigneten Referenzpuffer gemessen. Für die photometrische Quantifizierung gilt folgende Beziehung:

$$\text{ds DNA:} \quad 1 E_{260} \hat{=} 50 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{RNA:} \quad 1 E_{260} \hat{=} 40 \mu\text{g/ml}$$

Die Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden mit bekannter Sequenz erfolgte über die Extinktionsmessung bei 260 nm mit Hilfe des millimolaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{mM} , der sich über folgende Gleichung berechnet:

$$\epsilon_{mM} \text{ Oligonukleotid} = n\epsilon_{mM} \text{ dATP} + n\epsilon_{mM} \text{ dCTP} + n\epsilon_{mM} \text{ dGTP} + n\epsilon_{mM} \text{ dTTP}$$

n = Anzahl der entsprechenden Nukleotide im Oligonukleotid.

Die millimolaren Extinktionskoeffizienten der Nukleotide sind:

$$\epsilon_{mM} \text{ dATP} = 15,4 \text{ [mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\epsilon_{mM} \text{ dCTP} = 7,3 \text{ [mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\epsilon_{mM} \text{ dGTP} = 11,7 \text{ [mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\epsilon_{mM} \text{ dTTP} = 8,8 \text{ [mM}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$$

Die Konzentration c der Oligonucleotidlösung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{E_{260}}{\epsilon_{mM}} d$$

mit d = Schichtdicke [cm]

3.2.11.8 *In vitro*-Arbeiten mit DNA

3.2.11.8.1 Extraktion mit Phenol/Chloroform

Die Extraktion von DNA-Lösungen mit Phenol wurde durchgeführt, um unerwünschte Proteine wie z.B. DNasen und Restriktionsenzyme zu entfernen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0,5 – 1 Volumen Phenol/Chissom (1:1) kräftig gemischt und zur Phasentrennung 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, noch zweimal mit einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt und die DNA anschließend mit Ethanol gefällt (siehe 3.2.11.8.2).

3.2.11.8.2 Fällung von DNA mit Ethanol

Verwendete Lösungen:

Natriumacetat Lösung 3 M, pH 5,2

Ethanol (100 %)

Ethanol (70 %)

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Vol. Ethanol (100 %) versetzt, 20 min auf Trockeneis gekühlt und anschließend zentrifugiert (30 min, 17600 x g). Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und in einer geringen Menge TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

3.2.11.8.3 Agarosegel-Elektrophorese

Verwendete Lösungen:

DNA-Auftragspuffer 10 % Ficoll 400, 0,2 % Bromphenolblau,
0,2 % Xylene-cyanol, 50 mM EDTA (pH 8,0)

1x TAE-Puffer 0,04 M Tris/Acetate (pH 8,0), 0,005 M Natriumacetat,
1 mM EDTA

Für analytische Gele wurde Agarose der Fa. Sigma bei einer Konzentration von 1,5 % (w/v) verwendet. Bei präparativen Gelen wurden Agarosen der Fa. Biozym verwendet; die Konzentration betrug hier 2 % (w/v) und zwar je zur Hälfte Nu-Sieve GTG (low melting) und SeaKem GTG. Die Agarosen wurden in der entsprechenden Menge 1 x TAE Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und die Lösung in das Gelbett gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt,

der Probenkamm entfernt und der Laufpuffer (1 x TAE) zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer versetzt, in die Geltaschen gefüllt und der Elektrophoreselauf bei 80 - 100 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) für 20 min unter Taumeln gefärbt und anschließend für 15 min mit Wasser gewaschen. Die DNA-Banden wurden anschließend auf einem Transilluminator bei 302 nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert (Image Master, Pharmacia). Bei präparativen Gelen wurde(n) die gewünschte(n) Bande(n) ausgeschnitten und, wie unter 3.2.11.8.4 beschrieben, aus dem Gel eluiert. Um Strahlenschäden an der zu isolierenden DNA zu vermeiden, wurde die UV-Exposition beim Ausschneiden so gering wie möglich gehalten.

3.2.11.8.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde der Gel-Extraktionskit entsprechend den Vorschriften der Fa. Dianova verwendet. Das ausgeschnittene Gelstück wurde bei 55°C in der 3-fachen Menge Natriumjodid-Puffer geschmolzen und die DNA an eine Silika-Matrix gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer wurde die DNA in H₂O Bidest oder TE-Puffer eluiert.

3.2.11.8.5 Kolonie-PCR

Um bei einer größeren Anzahl von Kolonien nachzuweisen, ob der Plasmidvektor ein Fremdgen korrekter Größe trägt, wurden die Kolonien mittels PCR analysiert.

Jede der zu untersuchenden Kolonien wurde möglichst quantitativ mit einer Pipettenspitze gepickt, auf eine andere Agar-Platte übertragen und die Pipettenspitze anschließend gut in 50 µl H₂O Bidest gespült. Die resultierende Bakteriensuspension wurde 5 min bei 100°C aufgekocht und 2 min bei 250 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 10 µl als ‚Template DNA‘ in der PCR eingesetzt; die für das entsprechende Konstrukt benutzten Primer sowie weitere Reaktionskomponenten und das Thermocyclerprogramm entsprechen den in 3.2.1.3 beschriebenen Bedingungen.

3.2.11.8.6 DNA-Reinigung mit Siebsäulen

Um DNA haltigen Lösungen zu entsalzen, wurden sie mit MicroSpin-Säulen gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt.

3.2.11.8.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Verwendete Lösungen:

10x Reaktionspuffer

Restriktionsenzym 10 U/ μ l

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen und mit den mitgelieferten Puffersystemen durchgeführt. Im allgemeinen wurde folgender Ansatz verwendet:

1/10 Vol. 10 x Reaktionspuffer

2 - 20 U Enzym, je nach DNA-Menge (0,5 - 20 μ g)

H₂O Bidest ad 10 bis 30 μ l Endvolumen.

Der Ansatz wurde 1 - 2 h bei 37° C inkubiert.

Bei präparativen Ansätzen oder bei stärkerer Verdünnung der DNA (z.B. nach präparativer PCR) wurde die Spaltung in Volumina zwischen 200 μ l und 500 μ l durchgeführt. Hier wurden bis zu 50 U Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

3.2.11.8.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Verwendete Lösungen:

10x Ligasepuffer 300 mM Tris/HCl (pH 7,4), 50 mM MgCl₂, 100 mM
DTT, 10 mM ATP

T4 Ligase (Promega) 30 U/ μ l

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden erfolgte bei 16°C ü. N. Die aus dem Agarose-Gel isolierten Fragmente (siehe 3.2.11.8.4) wurden mit dem linearisierten Vektor (50 ng), 2 μ l Ligasepuffer und 30 U Ligase gemischt und der

Ansatz mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die ligierte DNA wurde nach Fällung mit Ethanol (siehe 3.2.11.8.2) zur Transformation eingesetzt.

3.2.11.9 Transformation mittels Elektroporation

3.2.11.9.1 Vorbereitung der *E. coli*-Zellen

50 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer ÜN-Kultur beimpft und unter Schütteln bei 37° C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 0,5 - 0,7 erreicht war. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt; alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 0 - 4°C durchgeführt. Die Kultur wurde bei 900 x g 20 min zentrifugiert, der Überstand sofort abgegossen und das Pellet in 50 ml eiskaltem H₂O Bidest resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren (20 min, 900 x g) wurde dieser Waschgang wiederholt. Der Überstand wurde bis auf einen geringen Rest (ca. 1 ml) abgegossen und das Pellet resuspendiert. Diese kompetenten Zellen wurden für die Elektroporation eingesetzt.

3.2.11.9.2 Vorbereitung der *Pichia pastoris*-Zellen

Verwendete Lösungen:

Sorbitollösung	1 M
----------------	-----

250 ml YPD Medium wurden mit 0,2 ml einer ÜN-Kultur beimpft und unter Schütteln in einem 1 l Fernbachkolben bei 30°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 1,3 - 1,5 erreicht war. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt; alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 0 - 4°C durchgeführt. Die Kultur wurde bei 1500 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 250 ml eiskaltem H₂O Bidest resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren (1500 x g, 5 min) wurde dieser Waschgang wiederholt. Danach wurde die Suspension ein drittes mal zentrifugiert (1500 x g, 5 min) und das Pellet in 10 ml Sorbitollösung resuspendiert. Nach einer letzten Zentrifugation (1500 x g, 5 min) wurde das Pellet in 0,5 ml Sorbitollösung resuspendiert. Diese kompetenten Zellen wurden auf Eis aufbewahrt und noch am selben Tag für die Elektroporation eingesetzt.

3.2.11.9.3 Transformation von *E. coli*

Verwendete Lösungen:

SOC Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
------------	---

Einstellungen am Gene Pulser:

Controller	200 Ohm
Pulser	25 μ FD, 2,5 kV

2,5 μ l Plasmid-DNA wurden mit 50 μ l kompetenten Zellen (siehe 3.2.11.9.1) auf Eis gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Durch mehrmaliges Klopfen der Küvette auf eine harte Unterlage wurde sichergestellt, daß die Flüssigkeit den Boden ohne Luftblasen bedeckt. Die Außenseite der Küvette wurde gründlich abgewischt, die Küvette möglichst schnell in den Küvettenhalter gestellt und gepulst. Sofort nach dem Pulsen wurde 1 ml SOC Medium zugegeben, der Ansatz in ein steriles Eppendorf-Cup überführt und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde für 2 min bei 900 x g zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und diese Suspension ausplattiert.

3.2.11.9.4 Transformation von *Pichia pastoris*

Verwendete Lösungen:

Sorbitollösung	1 M
----------------	-----

Einstellungen am Gene Pulser:

Controller	200 Ohm
Pulser	25 μ FD, 1,5 kV

10 μ g einer mit Pme I linearisierten und mittels Phenolextraktion (siehe 3.2.11.8.1) und Ethanol-fällung (siehe 3.2.11.8.2) gereinigten Plasmid-DNA wurden mit 80 μ l kompetenten *Pichia pastoris*-Zellen (siehe 3.2.11.9.2) auf Eis gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Durch mehrmaliges Klopfen der Küvette auf eine harte Unterlage wurde sichergestellt, daß die Flüssigkeit den Boden ohne Luftblasen bedeckt. Die Außenseite der Küvette wurde gründlich abgewischt, die Küvette möglichst schnell in den Küvettenhalter gestellt und gepulst. Sofort nach dem Pulsen wurde 1 ml eiskalte Sorbitollösung zugegeben, der Ansatz in ein steriles 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 90 min bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde gemischt und je 200 μ l auf YPDS Platten mit folgenden Zeocinkkonzentrationen ausplattiert: 100 μ g/ml, 500 μ g/ml, 1000 μ g/ml und 2000 μ g/ml.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der cDNAs der Tryptase-Isoenzyme

Für die Klonierung der Tryptase-Isoenzyme wurden als Ausgangsmaterial Mono Mac 6-Zellen (MM6) und HMC 1-Zellen verwendet. Diese Zelllinien, die Promonozyten bzw. unreifen Mastzellen entsprechen, exprimieren α - bzw. β -Tryptase (Huang et al., 1993, Xia et al., 1995). Aus den Zellen wurde die totale RNA nach der Methode von Chomczynski und Sacci präpariert (siehe 3.2.1.1) und mittels reverser Transkription in adapterligierte cDNA umgeschrieben. Diese cDNAs wurden als Template für die anschließende PCR-Amplifikation der Tryptase-cDNAs verwendet.

4.1.1 PCR-Amplifikation der Tryptase-cDNAs aus MM6- bzw. HMC 1-Zellen

Für die Amplifikation der Tryptase-cDNAs wurden basierend auf den bekannten DNA-Sequenzen der α - und β 1a-Tryptasen (Miller et al. 1989) spezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer konstruiert. Die PCR wurde mit verschiedenen Kombinationen von Polymerasen und adapterligierten cDNAs durchgeführt und die Produkte mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (siehe Abbildung 4-1). Bei der PCR mit adapterligierten cDNAs aus HMC 1-Zellen (PRQT-HMC 1 und XYAS-HMC 1) als Template wurden sowohl mit *pfu*-Polymerase (Spur 2 und 4) als auch mit *Goldstar*-Polymerase (Spur 8) PCR-Produkte der richtigen Größe (ca. 1200 bp) detektiert, während ausgehend von der cDNA aus MM6-Zellen (XYAS-MM6) nur mit *Goldstar*-Polymerase ein entsprechendes Produkt amplifiziert wurde. Die in Abbildung 4-1 mit Pfeilen markierten Banden wurden ausgeschnitten und die entsprechenden PCR-Produkte für die Ligation präparativ aus dem Agarosegel isoliert.



Abbildung 4-1: 2% iges Agarosegel der PCR-Produkte zur Amplifikation der Tryptase-cDNAs
M=100 bp Größenstandart; Spur 1: Negativkontrolle, Spur 2-5: Mit pfu-Polymerase, Spur 6 – 9:Mit Goldstar-Polymerase, Spur 2 und 8: Mit dem Primer XYAS synthetisierte cDNA aus HMC I-Zellen , Spur 3 und 7: XYAS cDNA aus MM6 Zellen, Spur 4 und 6: PRQT HMC I cDNA, Spur 5 und 9 = PRQT MM6 cDNA.

4.1.2 Ligation der PCR-Fragmente und Transformation von *E. coli*

Die mit der *Goldstar*-Polymerase amplifizierten Tryptase-cDNAs haben an ihrem 3'-Ende ein überhängendes Adenin und wurden mittels A/T-Klonierung in den pGEM-T Vektor ligiert. Die mit *pfu*-Polymerase amplifizierten cDNAs haben aufgrund der 3'-5'-Exonucleaseaktivität dieser Polymerase glatte Enden und wurden deshalb in den pBlueskript-Vektor ligiert. Anschließend wurde *E. coli* JM109 mit diesen Konstrukten transformiert und zur Selektion auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausgestrichen. Zur Identifikation positiver Klone wurde zunächst 24 Kolonien mittels Kolonie-PCR (siehe 3.2.11.8.5) getestet. Bei 9 Kolonien wurde anschließend die erfolgreiche Ligation und die Identität des Inserts durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung nachgewiesen.

In Abbildung 4-2 sind die Sequenzen der klonierten Tryptasen mit denen der bekannten Isoenzyme verglichen. Die Sequenz der klonierten α -Tryptase entspricht der der bekannten α 1-Tryptase, während die klonierte β 1-Tryptase einen Basenaustausch (G385->A) aufweist, der zu einem Austausch von Glutaminsäure zu Lysin an Position 99 der Aminosäure-Sequenz führt. Diese Variante der β 1-Tryptase, die auch von Chan und Mitarbeitern (Chan et al., 1995) in HMC 1 Zellen nachgewiesen wurde, wird im Folgenden als β 1b-Tryptase bezeichnet, die publizierte β 1-Tryptase (Accession AF099144) als β 1a-Tryptase.

ERGEBNISSE

α1 (M30038)	-----ATGC	TGAGCCTGCT	GCTGCTGGCG	CTGCCCGTCC	TGGCGAGCCG	CGCCTACGGC
α MM6	-----
α2 (AF098328)	-----C	G.....
β1 (AF099144)	-----AT.
β1 HMC-I	GCCAGG.AT.
β2 (M33492)	-----AT.
β3 (AF099143)	-----AT.
α1 (M30038)	GCCCCTGCCC	CAGTCCAGGC	CCTGCAGCAA	GCGGGTATCG	TCGGGGGTCA	GGAGGCCCCC
α MM6
α2 (AF098328)
β1 (AF099144)G.....G.....T...C...
β1 HMC-IG.....G.....T...C...
β2 (M33492)G.....G.....T...C...T.....
β3 (AF099143)G.....G.....T...C...T.....
α1 (M30038)	AGGAGCAAGT	GGCCCTGGCA	GGTGAGCCTG	AGAGTCCGCG	ACCGATACTG	GATGCACTTC
α MM6
α2 (AF098328)
β1 (AF099144)A..	G..C.....
β1 HMC-IA..	G..C.....
β2 (M33492)A..	G..C.....
β3 (AF099143)
α1 (M30038)	TGCGGGGGCT	CCCTCATCCA	CCCCAGTGG	GTGCTGACCG	CGGCGCACTG	CCTGGGACCG
α MM6
α2 (AF098328)	..T.....
β1 (AF099144)A.....G.....
β1 HMC-IA.....G.....
β2 (M33492)A.....G.....
β3 (AF099143)A.....G.....
α1 (M30038)	GACGTCAAGG	ATCTGGCCAC	CCTCAGGGTG	CAACTGCGGG	AGCAGCACCT	CTACTACCAG
α MM6
α2 (AF098328)
β1 (AF099144)G.....
β1 HMC-IG.....
β2 (M33492)G.....
β3 (AF099143)G.....
α1 (M30038)	GACCAGCTGC	TGCCAGTCAG	CAGGATCATC	GTGCACCCAC	AGTTCTACAT	CATCCAGACT
α MM6
α2 (AF098328)G.....
β1 (AF099144)G.....C	..GC....TC
β1 HMC-IG.....C	..GC....TC
β2 (M33492)G.....C	..GC....TC
β3 (AF099143)G.....C	..GC....TC
α1 (M30038)	GGAGCGGATA	TCGCCCTGCT	GGAGCTGGAG	GAGCCCGTGA	ACATCTCCAG	CCGCGTCCAC
α MM6
α2 (AF098328)
β1 (AF099144)C.....G.....G.....A.....
β1 HMC-IC.....G.....G.....A.....
β2 (M33492)C.....G.....GG.....A.....
β3 (AF099143)C.....G.....G.....A.....

ERGEBNISSE

$\alpha 1$ (M30038)	ACGGTCATGC	TGCCCCCTGC	CTCGGAGACC	TTCCCCCCGG	GGATGCCGTG	CTGGGTCACT
α MM6
$\alpha 2$ (AF098328)
$\beta 1$ (AF099144)CC.A.
$\beta 1$ HMC-ICC.A.
$\beta 2$ (M33492)CC.A.
$\beta 3$ (AF099143)CC.A.
$\alpha 1$ (M30038)	GGCTGGGGCG	ATGTGGACAA	TGATGAGCCC	CTCCCACCGC	CATTTCCTCT	GAAGCAGGTG
α MM6
$\alpha 2$ (AF098328)
$\beta 1$ (AF099144)G.T.
$\beta 1$ HMC-IG.T.
$\beta 2$ (M33492)G.T.
$\beta 3$ (AF099143)G.T.
$\alpha 1$ (M30038)	AAGGTCCCA	TAATGGAAAA	CCACATTTGT	GACGCAAAAT	ACCACCTTGG	CGCTACACG
α MM6
$\alpha 2$ (AF098328)
$\beta 1$ (AF099144)
$\beta 1$ HMC-I
$\beta 2$ (M33492)
$\beta 3$ (AF099143)
$\alpha 1$ (M30038)	GGAGACGACG	TCCGCATCAT	CCGTGACGAC	ATGCTGTGTG	CCGGAACAG	CCAGAGGGAC
α MM6
$\alpha 2$ (AF098328)CG.....
$\beta 1$ (AF099144)G.CG.....
$\beta 1$ HMC-IG.CG.....
$\beta 2$ (M33492)G.CG.....
$\beta 3$ (AF099143)G.CG.....
$\alpha 1$ (M30038)	TCCTGCAAGG	GCGACTCTGG	AGGGCCCTG	GTGTGCAAGG	TGAATGGCAC	CTGGCTACAG
α MM6
$\alpha 2$ (AF098328)	..A..C...
$\beta 1$ (AF099144)	..A..C...C.G...
$\beta 1$ HMC-I	..A..C...C.G...
$\beta 2$ (M33492)	..A..C...C.G...
$\beta 3$ (AF099143)	..A..C...C.G...
$\alpha 1$ (M30038)	GCGGGCGTGG	TCAGCTGGGA	CGAGGGCTGT	GCCCAGCCCA	ACCGGCCTGG	CATCTACACC
α MM6
$\alpha 2$ (AF098328)
$\beta 1$ (AF099144)G
$\beta 1$ HMC-IG
$\beta 2$ (M33492)G
$\beta 3$ (AF099143)G
$\alpha 1$ (M30038)	CGTGTCACCT	ACTACTTGGG	CTGGATCCAC	CACTATGTCC	CCAAAAAGCC	GTGA
α MM6
$\alpha 2$ (AF098328)
$\beta 1$ (AF099144)
$\beta 1$ HMC-I
$\beta 2$ (M33492)
$\beta 3$ (AF099143)

Abbildung 4-2: Sequenzvergleich der bekannten α - und β -Tryptasen mit den aus MM 6- und HMC-I klonierten cDNAs.

α MM6: Die in dieser Arbeit klonierte α -Tryptase; $\beta 1$ HMC I: Die in dieser Arbeit klonierte $\beta 1$ -Tryptase.

Von den bekannten Tryptasen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) sind die Accession-Nummern angegeben (Miller et al., 1989, Pallaoro et al., 1999, Vanderslice et al., 1999). Der Austausch eines Guanins gegen ein Adenin in der $\beta 1$ -Tryptasesequenz ist grau hinterlegt.

4.1.3 Weitere Tryptase-Isoenzyme

Die cDNAs der Tryptase-Isoenzyme β 1a, β 2 und β 3 (im pBlueskript-Vektor) wurden freundlicherweise von G. Caughey (San Francisco) zur Verfügung gestellt. Die Identität der cDNAs dieser Isoenzyme wurde durch Sequenzierung beider Stränge überprüft.

4.2 Expression der Tryptase-Zymogene in *E. coli* als Thioredoxin-Fusionsproteine

Mehrere Serinproteasen, z. B. Proteinase 3 und Granzym K, wurden in *E. coli* rekombinant hergestellt (Harmsen et al., 1997, Wilharm et al., 1999); in den meisten Fällen war jedoch eine Rückfaltung der entstandenen Einschlußkörperchen notwendig. Da die korrekte Faltung von Proteinen oft durch Propeptide erleichtert wird, wurden in dieser Arbeit die Zymogene eines α - (α 1) und eines β -Isoenzym (β 1b) in *E. coli* exprimiert. Der Versuch die Tryptase-Zymogene im pET22-Expressionssystem löslich ins Periplasma auszuschleusen, führte jedoch zu Einschlußkörperchen. Da eine Rückfaltung dieser Materials aufgrund der nicht abgespaltenen hydrophoben pelB-Signalsequenz nicht aussichtsreich erschien, wurde alternativ das Expressionssystem pET-32 (Novagen) verwendet. Die in diesem System entstehenden Fremdproteine enthalten einen N-terminalen Thioredoxin-Fusionsanteil, der die Löslichkeit im Cytoplasma von *E. coli* erhöht und mit Enterokinase abgespalten werden kann. Zusätzlich enthält das System einen *E. coli*-Stamm mit oxidativem, die Bildung von Disulfidbrücken ermöglichendem, Zytoplasma.

4.2.1 Konstruktion der Plasmidvektoren und Klonierung in *E. coli*

Für die Konstruktion der Expressionsplasmide wurden die cDNAs der α 1 und β 1b-Tryptase mittels PCR amplifiziert. Die dabei verwendeten spezifischen Vorwärtsprimer, die am 5'-Ende der cDNA der Zymogenen binden (α -Pro-CC und β 1b-Pro-CC, vgl. 3.1.4.2) führen am 5'-Ende zwei überhängende Cytidine ein, die der Erhaltung des Leserahmens nach der Ligation in den pET32-Vektor dienen. Der Rückwärtsprimer ‚Tryptase Stop EcoRI‘ bindet am Stopcodon beider Tryptasen und fügt eine Eco RI Schnittstelle zur Ligation in den Vektor ein. Nach der Amplifikation mit diesen Primern (siehe auch 3.2.1.3) wurden die PCR-Produkte mit Eco RI geschnitten und mit dem mit Eco RV und Eco RI linearisierten Vektor pET-32c(+) ligiert. Anschließend wurde *E. coli* JM109 mit diesen Konstrukten durch Elektroporation transformiert. Nach dem

Ausstreichen der transformierten Bakterien auf ampicillinhaltigen LB-Platten wurden positive Klone mittels Kolonie-PCR (siehe 3.2.11.8.5) und Restriktionsanalyse identifiziert. Die korrekte Konstruktion aller für die Expression verwendeten Plasmide wurde durch Sequenzierung beider Stränge verifiziert.

4.2.2 Expression und Reinigung der Thioredoxin-Fusionsproteine

Für die Expression der Thioredoxin-Zymogen-Fusionsproteine wurden verschiedene *E.coli* Expressionsstämme mit den Plasmiden transformiert. Der Thioredoxin-Reduktase-defiziente (*trxB*) Stamm AD494(DE3) soll die Löslichkeit von Fremdproteinen im Zytoplasma steigern, da er die Bildung von Disulfidbrücken ermöglicht (Derman et al, 1993, La Vallie et al, 1993). Zusätzlich wurde die Expression in *E. coli* B834(DE3) durchgeführt, da in diesem Stamm für verschiedene Fremdproteine eine bessere Expressionsleistung beschrieben ist als in dem üblicherweise verwendeten BL21(DE3) Stamm (Doherty et al., 1995).

Die Kulturen (400 ml) wurden in Schüttelkolben herangezogen und die Expression mit IPTG (1 mM) für 4 h bei 37°C induziert. Die Analyse der Zellbestandteile mittels SDS-PAGE (Abbildung 4-3) zeigt, daß in beiden Stämmen unlösliche Einschlußkörperchen entstehen. Auch die Erniedrigung der Temperatur während der Expression (25°C und 20°C) sowie die Reduktion der IPTG-Konzentration auf 0,5 mM führte in keinem der verwendeten Stämme zu einer Zunahme des löslichen Proteins. Die Expressionsleistung, die mittels SDS-PAGE abgeschätzt wurde, war im Stamm B834(DE3) mit ca. 85 mg/l deutlich höher als in *E.coli* AD494(DE3) (ca. 22 mg/l).

ERGEBNISSE

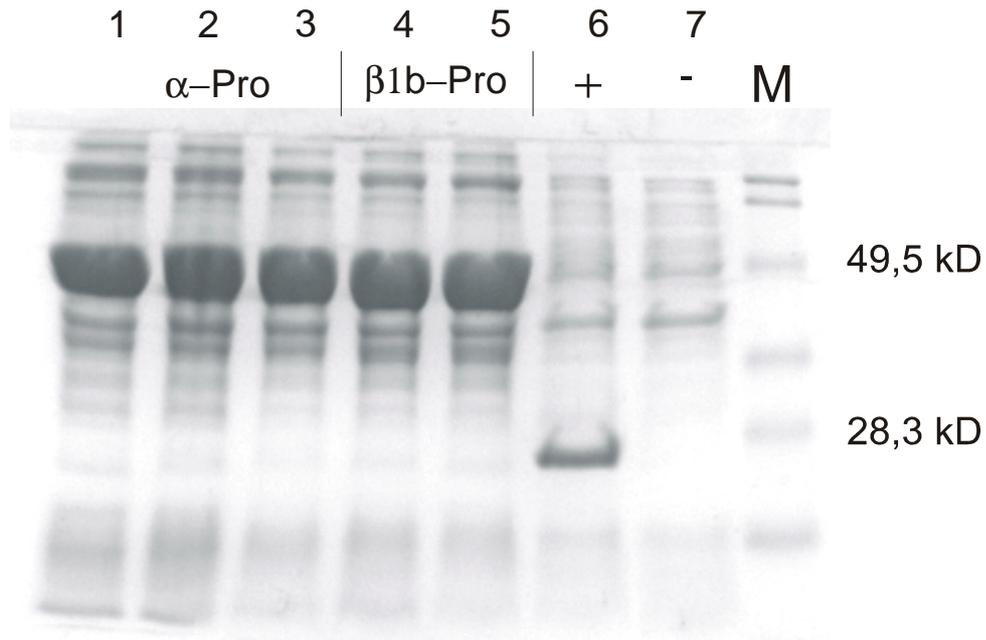


Abbildung 4-3: Expression der rekombinanten Trx-Pro-Tryptasen in *E.coli* B834(DE3)
Die Zellpellets wurden nach dem Aufschluß der Zellen mit Ultraschall mittels SDS-Page / Comassie Brilliant Blau Färbung analysiert. Spuren 1 – 3: verschiedene Klone, die Trx-Pro- α -Tryptase exprimieren. Spur 4 und 5: Klone, die Trx-Pro- β -Tryptase exprimieren. Spur 6: Expression des Thioredoxin-Fusionsanteils allein. Spur 7: Negativkontrolle; eine Präparation von *E. coli* B834 ohne Expressionsplasmid.

Zur präparativen Herstellung der Fusionsproteine für Rückfaltungsexperimente wurde *E. coli* B834(DE3) verwendet, da er höhere Ausbeuten liefert. Nach der Expression in Schüttelkolben im 400 ml Maßstab wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit Hilfe der „French Press“ aufgeschlossen. Die Einschlußkörperchen wurden in mehreren Waschschrinen gereinigt und anschließend in Solubilisierungspuffer unter denaturierenden Bedingungen aufgelöst (siehe 3.2.3).

4.2.3 Rückfaltung der Trx- β 1b-Pro-Tryptase und deren Prozessierung *in vitro*

Die Versuche zur Renaturierung zu löslichem, korrekt gefaltetem Fusionsprotein wurde mit dem Fusionsprotein der β 1b-Protryptase durchgeführt. Die Rückfaltung aus den solubilierten Einschlußkörperchen wurde in zwei Schritten durchgeführt: Die Lösung wurden zunächst bei 4°C mit einem 50-fachen Überschuß des Renaturierungspuffer verdünnt. Dieser Puffer enthält ein Glutathion-Redoxsystem, das die Bildung der Disulfidbrücken erleichtert (Saxena & Wetlaufer, 1970, Creighton, 1984), sowie L-Arginin als Chaotrop (Buchner, et al., 1991, Rudolph, 1990). In einem zweiten Schritt wurde diese Lösung ÜN gegen einen Puffer dialysiert, der diese Bestandteile nicht mehr enthält; dabei fallen nicht korrekt gefaltete Proteine aufgrund ihrer geringen Löslichkeit

aus. Durch Analyse der Rückfaltung mittels Proteinbestimmung wurde eine Rückfalteausbeute von 20,8 % ermittelt.

Zur Gewinnung von reifer, aktiver Tryptase war die Abspaltung des Thioredoxin-Fusionsanteils sowie des Propeptides notwendig. Dazu wurden die renaturierten Trx-Pro- β -Tryptase in drei verschiedenen Ansätzen mit Enterokinase, HLT sowie ohne Zusätze bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionsprodukte mittels SDS-PAGE (vgl. Abbildung 4-4) analysiert. In Abbildung 4-5 sind die möglichen Reaktionsprodukte schematisch dargestellt. Bei der Inkubation mit Enterokinase konnten 4 Produkte identifiziert werden: Das Spaltprodukt 1 (SP 1) entspricht hinsichtlich seines Laufverhaltens einer N-terminal um 36 AS verlängerten Form, das bei der Spaltung des Fusionsproteins an der Thrombinschnittstelle entsteht. Das Spaltprodukt 2 (SP 2) entspricht einer N-terminal um 7 AS verlängerten Form der Pro-Tryptase, das bei der Spaltung des Fusionsproteins an der Enterokinaseschnittstelle entsteht. Das Spaltprodukt Pro'-T entspricht hinsichtlich seines Laufverhaltens der Pro'-Tryptase und wird scheinbar autokatalytisch aus dem Fusionsprotein freigesetzt. Außerdem ist der abgespaltene Thioredoxintag (Trx) zu sehen. Bei der Inkubation mit HLT entstand neben dem Spaltprodukt 1 ein im Vergleich zur Spaltung mit Enterokinase deutlich erhöhter Anteil des Produktes Pro'-T. Außerdem ist ein kleineres Produkt bei etwa 16 kD zu sehen. Die Inkubation ohne Zusätze führte autokatalytisch zum Spaltprodukt 1 und der Pro'-Tryptase (Pro'-T). Es ist anzunehmen, daß die autokatalytische Spaltung an der Thrombinschnittstelle auf der ähnlichen Substratspezifität von Tryptase und Thrombin basiert. Die Rückstellprobe zeigt, daß diese Autokatalyse schon während der Rückfaltung stattgefunden hatte.

ERGEBNISSE

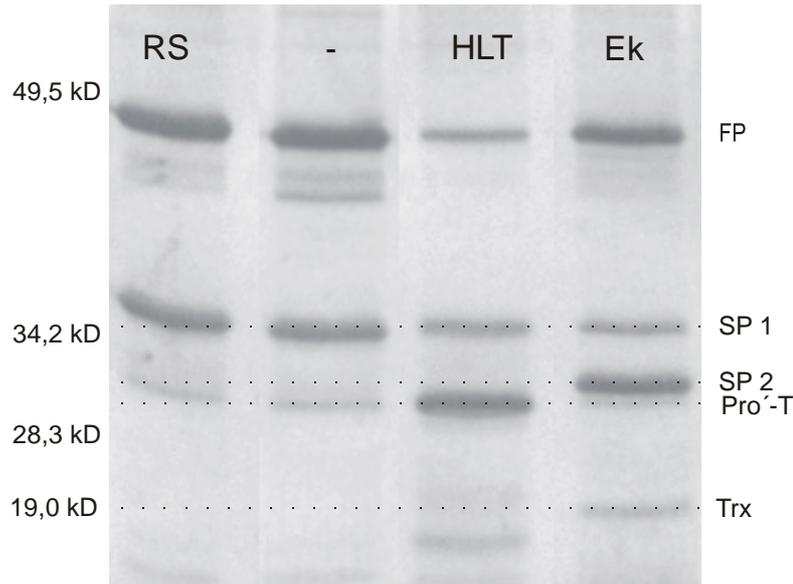


Abbildung 4-4: SDS-PAGE der Prozessierung der rückgefalteten Trx- β -Protrypsin

Das Gel wurde mit Silber gefärbt. Die Beschriftung der Spuren bedeutet: RS = Rückstellprobe nach der Rückfaltung, aber vor der Prozessierung bei RT, - = Inkubation ohne Zusätze, EK = Inkubation mit Enterokinase, HLT = Inkubation mit humaner Lungentryptase. SP 1 = Spaltprodukt 1, SP 2 = Spaltprodukt 2 (vgl. Abbildung 4-5). Pro'-T = Pro'-Tryptase.

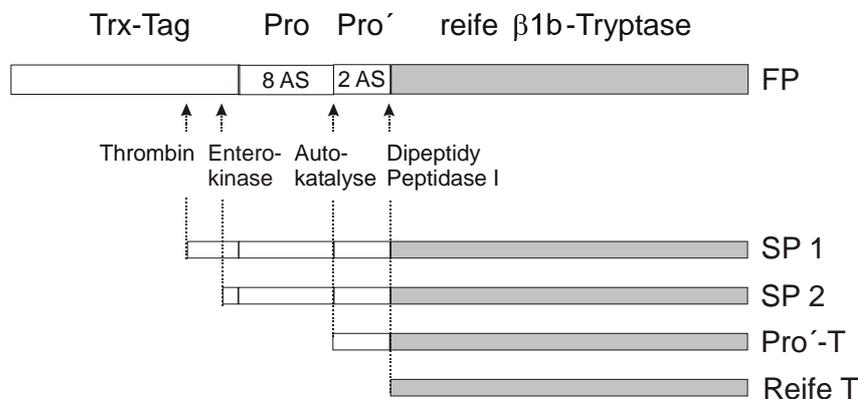


Abbildung 4-5: Schematische Darstellung der Prozessierung der Trx- β -Protrypsin.

FP = Fusionsprotein, SP 1 = Spaltprodukt 1, SP 2 = Spaltprodukt 2, Pro'-T = Pro'-Tryptase, Reife-T = Reife Tryptase, Trx-Tag = Thioredoxin Fusionsanteil.

4.2.4 Assemblierung des enzymatisch aktiven Tryptase-Tetramers

Die Aktivierung der β -Pro'-Tryptase zu tetramerer, reifer β -Tryptase erfolgt durch Dipetidylpeptidase I. Dieses Enzym spaltet das N-terminale Dipeptid ab, die reife Tryptase assembliert sich dabei in Gegenwart von Heparin spontan zum aktiven Tetramer (Sakai et al., 1996).

Beim Versuch, die rückgefaltete β -Pro'-Tryptase mit Dipetidylpeptidase I und Heparin

zu aktivieren, fiel das Protein nahezu vollständig aus. Da zudem die Ausbeute des Prozessierungsschrittes bis zur Pro'-Tryptase sehr gering war, wurde die Expression in *E. coli* nicht weiter verfolgt.

4.3 Expression der Tryptase-Isoenzyme in *Pichia pastoris*

Das Ausfallen der rekombinanten in *E. coli* hergestellten Tryptasen bei der Tetramer-Assemblierung (siehe 4.2.4) ist wahrscheinlich auf die fehlende Glycosilierung zurückzuführen, da Zuckerseitenketten die Löslichkeit von Proteinen beeinflussen. Für die Expression der Tryptasen, die eine ($\beta 2$) bzw. zwei ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 3$) potentielle N-Glycosylierungsstellen haben, wurde deshalb ein eukaryontisches Expressionssystem gewählt, das Fremdproteine glycosyliert.

Im Hefesystem *Pichia pastoris* wurden bereits andere Trypsin-ähnliche Proteasen (Nyaruhucha et al., 1997) sowie inzwischen auch Tryptasen löslich exprimiert (Niles et al., 1998). Im Gegensatz zu anderen eukaryontischen Expressionssystemen können Hefen zu hohen Zelldichten fermentiert werden, so daß hohe Ausbeuten möglich sind. Im hier verwendeten System pPICZ α können zudem Klone, die das Fremdgen tragen, durch Zeocin selektiert werden. Die Expression ist Methanol-induzierbar; das Fremdprotein wird ins Medium ausgeschleust und ermöglicht so eine einfache Reinigung.

4.3.1 Konstruktion der Hefevektoren

Für die Expression der glycosilierten Formen der Isoenzyme in *Pichia pastoris* wurden die cDNAs der Isoenzyme $\alpha 1$, $\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2$ und $\beta 3$ in den Hefevektor pPICZ αA ligiert. Der für die reife katalytische Domäne kodierende Abschnitt der cDNA wurde so in den Vektor ligiert, daß bei der Expression ein Fusionsprotein mit dem α -Faktor-Signalpeptid entsteht. Dieses sorgt für die Sekretion des Fremdproteins ins Medium; dabei wird das Signalpeptid durch das KEX2-Genprodukt abgespalten.

Für die Ligation wurde der Vektor pPICZ αA mit den Restriktionsenzymen Xho I und Xba I linearisiert, wobei ein Teil der α -Faktor-Signalsequenz zerstört wurde. Die Tryptase-cDNAs wurden mittels PCR amplifiziert; über die dabei eingesetzten Primer wurden die nötigen Schnittstellen eingeführt und die α -Faktor Signalsequenz vervollständigt. *E. coli* Top 10 F wurde mit den so konstruierten Expressionsplasmiden

transformiert. Die Selektion und Identifikation von positiven Klonen erfolgte durch Selektion auf Ampicillin-haltigen Medien und Restriktionsanalyse sowie Sequenzierung.

4.3.2 Transformation von *Pichia pastoris* und Selektion von Klonen

Um stabile Hefeklone zu erzeugen, muß das Fremdgen durch homologe Rekombination in das Hefegenom integriert werden. Dabei ist die Integration mehrerer Kopien des Plasmids möglich, was zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Zeocin sowie einer höheren Expressionsausbeute führen kann. Die für die Transformation der Hefen benötigten Mengen der Plasmide (10 µg) wurden durch Plasmidpräparationen von 100 ml-Kulturen gewonnen. Danach wurden die Hefestämme X33, GS115 und KM71 mit Plasmiden transformiert, die zuvor mit Bst X1 linearisiert worden waren. Die Hefezellen wurden auf Zeocin-haltigen (100 µg/ml) YPDS-Platten ausgestrichen und 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Um Klone zu identifizieren, die das Konstrukt mehrfach integriert haben, wurden die selektierten Klone weiter untersucht. Dazu wurden jeweils 10⁵ Zellen auf YPD-Platten mit unterschiedlichen Zeocinkonzentrationen ausplattiert. Mit steigender Zeocinkonzentration verringerte sich dabei die Anzahl der Kolonien (50 – 600 bei 100 µg/ml Zeocin, 20 – 200 bei 500 µg/ml und 0 – 60 bei 1000 µg/ml). Mit jeweils 5 Klonen wurden Testexpressionen in BMMH Medium im 10 ml Maßstab durchgeführt. Durch anschließende Messung der Tryptaseaktivität wurden die Expressionsausbeuten verglichen. In Tabelle 4-1 sind exemplarisch die Expressionsausbeuten bei der Testexpression von β1a-Tryptase im *Pichia* Stamm X33 angegeben.

Zeocinkonzentration	Expressionsausbeute [µg/l]
100 µg/ml	206 – 435
500 µg/ml	171 – 360
1000 µg/ml	84 – 193

Tabelle 4-1: Testexpression von β1a-Tryptase
 Angegeben sind die maximalen und minimalen Ausbeuten von jeweils 5 Klonen, die auf verschiedenen Zeocinkonzentrationen selektiert worden waren.

Hier und bei allen anderen Testexpressionen produzierten die auf den höchsten Zeocinkonzentrationen wachsenden Klone nicht immer die größten Tryptase-Mengen. Deshalb mußten die für die weitere Expression im Schüttelkolben und im Fermenter verwendeten Klone durch Testexpressionen ausgewählt werden.

4.3.3 Expression im Schüttelkolben

Für die präparative Expression wurden zunächst Schüttelkolben (300 ml Kultur im 1 l-Kolben) verwendet. Dabei wurden Fernbachkolben mit Schikane eingesetzt, um eine gute Sauerstoffversorgung der Kulturen zu gewährleisten. Zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes wurde die Expression in gepuffertem Minimalmedium (BMMH-Medium) durchgeführt. Dieses Medium erleichtert die Aufreinigung der sezernierten Tryptasen, da es nur die zum Wachstum der Hefen essentiellen Bestandteile enthält.

In mehreren Ansätzen (n = 6) wurden Expressionsausbeuten zwischen 0,3 und 10 mg/l der β 1b-Tryptase und α 1-Tryptase erzielt. Die Ausbeuten waren jedoch nicht in allen Fällen reproduzierbar; darüberhinaus kam es bei mehreren Ansätzen zur Kontamination der Kulturen, da die Kolben zur besseren Sauerstoffversorgung nur mit Gaze verschlossen werden konnten und die Kulturgefäße mehrfach geöffnet werden mußten, um den pH-Wert des Mediums wieder einzustellen.

4.3.4 Fermentation

Um die rekombinanten Tryptasen reproduzierbarer und in für Kristallisationsversuche ausreichenden Mengen herzustellen, wurde die Expression in einen Fermenter überführt. Die Verwendung eines Fermenters ermöglicht nicht nur größere Kulturvolumina (bis zu 10 l), sondern erlaubt auch die konstante Regelung wichtiger Parameter der Fermentation, wie Sauerstoffgehalt und pH-Wert des Mediums.

Für die Fermentation wurde ein Minimalmedium (Basalsalzmedium) verwendet. Bei der Erzeugung von Biomasse dient Glycerol als Kohlenstoffquelle, bei der Expression Methanol. Der pH-Wert des Mediums wurde mit Ammoniumhydroxid, das gleichzeitig als Stickstoffquelle dient, und mit Schwefelsäure eingestellt.

Die Fermentation gliedert sich in drei Phasen: Die ‚Glycerol Batch‘- und die Glycerol-Fütterungsphase dienen der Gewinnung von Biomasse, in der Methanol-

Fütterungsphase erfolgt dann die Expression. Abbildung 4-6 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf der Fermentation.

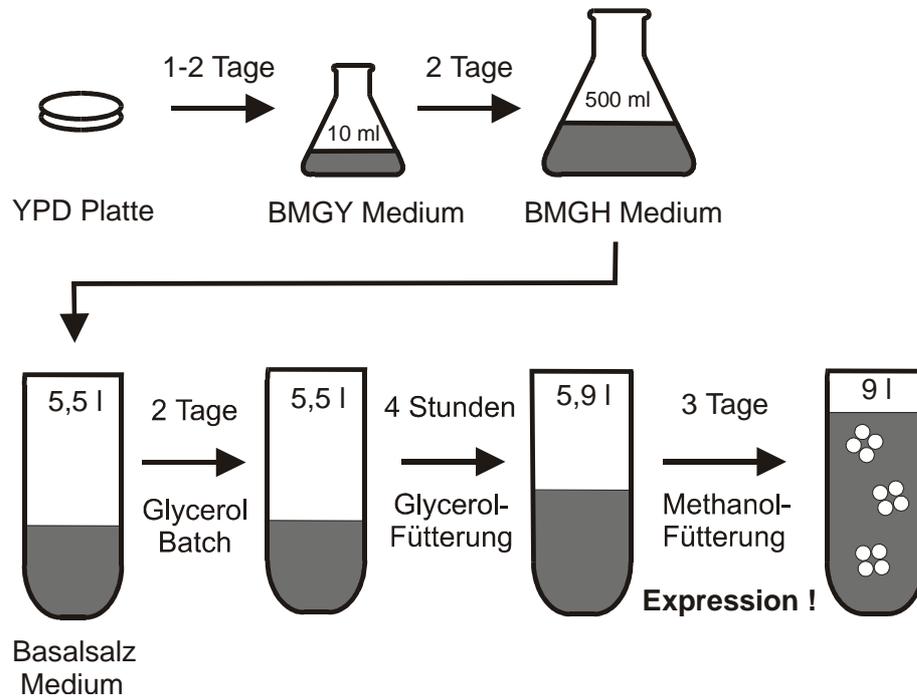


Abbildung 4-6: Die verschiedenen Phasen der Fermentation

Obere Zeile: Anzucht der Vorkultur

Untere Zeile: Die verschiedenen Fermentationsphasen (Glycerol-Batch, Glycerol-Fütterung und Methanol-Fütterung) mit Angabe der Dauer und des jeweiligen Kulturvolumens am Ende der entsprechenden Phase. Die Expression der Fremdproteine findet nur während der Methanol-Fütterung statt.

Beispielhaft für alle Isoformen ist in Abbildung 4-7 A der Verlauf der Sauerstoffsättigung und der Rührergeschwindigkeit während der Fermentation der β 3-Tryptase dargestellt. Parallel ist in Abbildung 4-7 B das Wachstums der Hefen und die Expression der β 3-Tryptase illustriert.

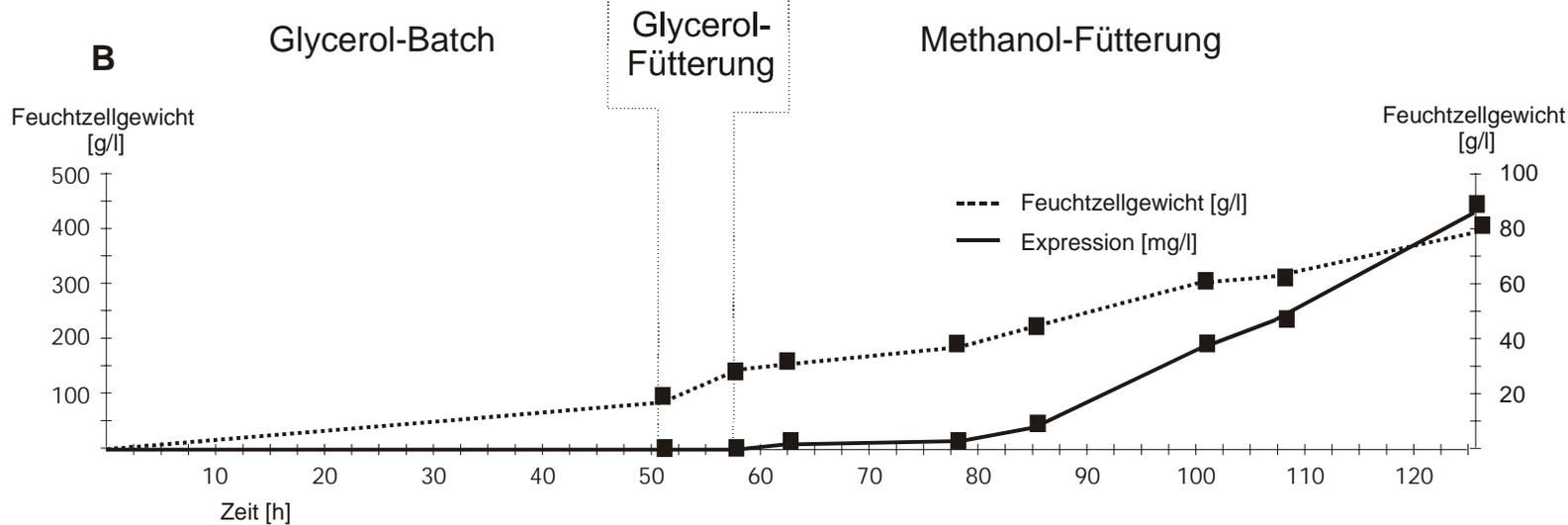
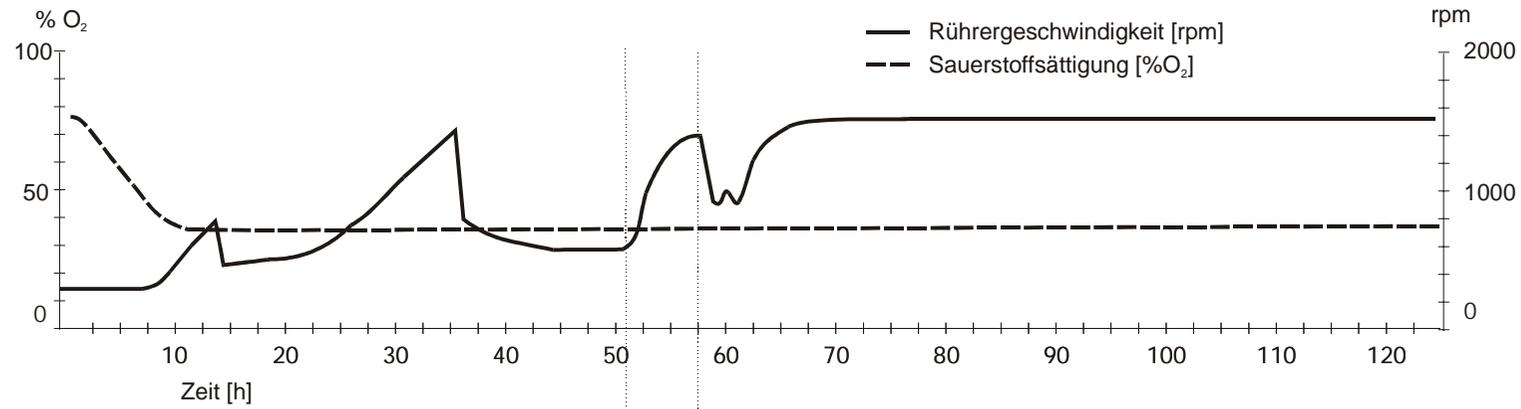


Abbildung 4-7: Verlauf der Fermentation der β 3-Tryptase.

A: Schreibernaufzeichnung der Rührergeschwindigkeit und der Sauerstoffsättigung während der Fermentation.

B: Verlauf des Wachstums der Hefen und der Expression der β 3-Tryptase. Das Zellwachstum wurde anhand des Feuchtzellgewichts, die Expressionsrate anhand von Aktivitätsmessungen mit dem chromogenen Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-pNA bestimmt.

ERGEBNISSE

Vor Beginn der Fermentation beträgt die Sauerstoffsättigung des Mediums ca. 80%. Nach dem Animpfen wachsen die Hefen, so daß der Sauerstoffgehalt auf ca. 35% sinkt. Um ein weiteres Absinken zu verhindern wird durch die Regelung des Fermenters die Rührergeschwindigkeit gesteigert. Eine steigende Rührergeschwindigkeit bedeutet einen stärkeren Sauerstoffverbrauch der Kultur und somit ein stärkeres Wachstum der Hefen. Bis 12,5 h nach dem Animpfen wachsen die Hefen, scheinbar werden dabei die im Medium der Vorkultur noch vorhandenen Nährstoffe verbraucht. In der folgenden Ruhephase stellt die Kultur ihren Stoffwechsel auf das Basalsalzmedium um (bis ca. 25 h nach dem Animpfen). In einem weiteren Wachstumsschub wird das vorhandene Glycerol verbraucht (25 h bis 37,5 h nach dem Animpfen). Erst in der folgenden Glycerolfütterungsphase wächst die Kultur weiter. Zu Beginn der Methanolfütterung stellen die Hefen ihren Stoffwechsel auf die neue Kohlenstoffquelle um und zeigen für ca. 5 h kein stetiges Wachstum, es resultiert ein schwankender Sauerstoffverbrauch. Die Methanolfütterung, die zur Expression der Tryptasen führt, wurde 67,5 h durchgeführt. In dieser Phase stieg sowohl das Feuchtzellgewicht wie auch die Menge der exprimierten Tryptase stetig an. Um einen Abbau der rekombinanten Tryptase durch *Pichia*-Proteasen zu vermeiden und aufgrund des beschränkten Fermentervolumens (10 l) wurde die Expression an diesem Punkt abgebrochen.

Die Expressionsleistung im Fermentationsmedium wurde durch Aktivitätsmessungen bestimmt und lag bei den Isoenzymen mit zwei Glycosilierungsstellen (β 1a, β 1b, β 3) zwischen 18 mg/l und 85 mg/l, bei der β 2-Tryptase jedoch nur bei 1,4 mg/l. Da bei α 1-Tryptase keine Aktivität meßbar war (vgl. 4.5) und eine Proteinbestimmung aufgrund der von den Hefen ins Medium sekretierten Pigmente und Proteine nicht durchführbar war wurde auf eine Rohausbeutebestimmung für dieses Isoenzym verzichtet (zur Ausbeute von gereinigter α 1-Tryptase siehe 4.3.5.3). Das Feuchtzellgewicht, das die erzielte Biomasse der Hefen angibt, liegt zwischen 322 g/l und 370 g/l (vgl. Tabelle 4-2).

Isoform	Feuchtzellgewicht [g/l]	Expressionsleistung im Medium [mg/l]	Volumen des Mediums [ml]
α 1-Tryptase	322	n. b.	4500
β 1a-Tryptase	329	18	4000
β 1b-Tryptase	373	19,2	6000
β 2-Tryptase	330	1,4	6000
β 3-Tryptase	370	85	6000

Tabelle 4-2: Fermentationsausbeuten und Volumina des Mediums.

4.3.5 Reinigung

Exemplarisch wird im Folgenden die Reinigung der β 1b-Tryptase beschrieben; die anderen Isoenzyme wurden analog mit ähnlichen Ausbeuten isoliert da die Reinigungsprozedur bei allen Isoenzymen nahezu gleich durchgeführt worden war, und die Ausbeuten der einzelnen Schritte bei allen Isoenzymen ähnlich waren. Da die α 1-Tryptase enzymatisch weitgehend inaktiv ist, wurde die Reinigung dieses Isoenzymen mittels SDS-PAGE verfolgt.

4.3.5.1 Konzentration und Filtration

Während der Fermentation wird die rekombinanten Tryptase ins Medium sezerniert. Dabei wird die α -Faktor-Signalsequenz durch das KEX2-Genprodukt abgespalten, so daß die Tryptase im Medium in Form aktiver Tetramere vorliegt. Für die Reinigung wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500 x g) abgetrennt und die Zellpellets verworfen. Das durch Pigmente von *Pichia pastoris* grün gefärbte Medium wurde zur Aufkonzentrierung der Tryptasen mit einem Tangentialflußsystem (Pall Minisette) ultrafiltriert und bis zur weiteren Reinigung entweder für maximal 24 h bei 4° C oder aliquotiert bei -20°C gelagert.

4.3.5.2 Kationenaustauschchromatographie

Zur Entfernung der bei der Ultrafiltration entstandenen Niederschläge wurde das Konzentrat vor der Kationenaustausch-Chromatographie zentrifugiert und filtriert (siehe 3.2.6.4). Die erhaltene klare, grüne Lösung wurde auf die Kationenaustausch-Säule (Fractogel EMD SO_3^- 650 (M)) aufgetragen (siehe 3.2.7). Nach dem Waschen der Säule mit Auftragspuffer wurde das gebundene Protein durch Erhöhung der Salzkonzentration in einem linearen Gradient auf 2 M NaCl eluiert. Der Durchlauf und die eluierten Fraktionen wurden auf Tryptaseaktivität getestet (siehe 3.2.9.2) und die Fraktionen, die Tryptaseaktivität zeigten, anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Abbildung 4-8 zeigt ein typisches Elutionsprofil und das zugehörige SDS-PAGE der Fraktionen, in denen Tryptaseaktivität nachgewiesen wurde.

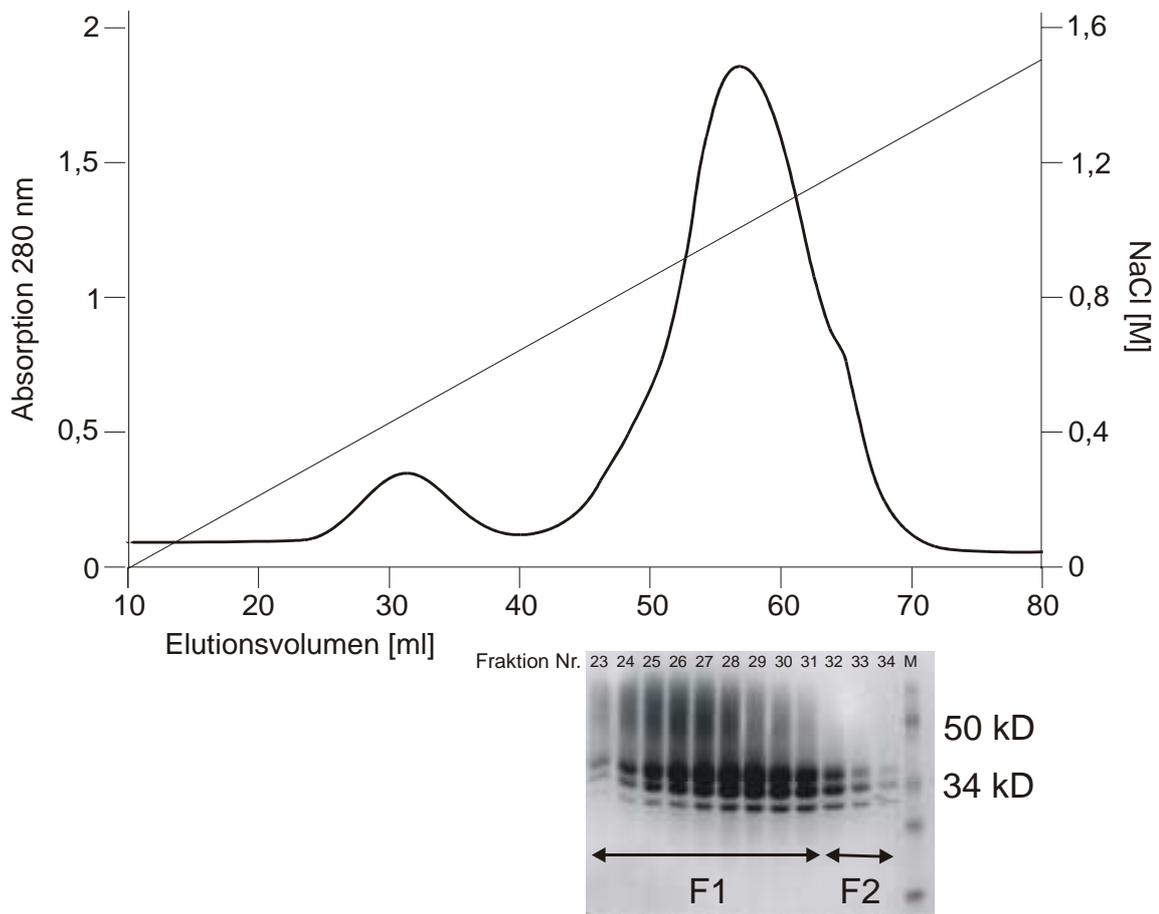


Abbildung 4-8 Reinigung der rekombinanten β 1b-Tryptase mittels Kationenaustausch-Chromatographie.

Gezeigt ist das Elutionsprofil der Kationenaustausch-Chromatographie und ein SDS-PAGE der Fraktionen, die Tryptaseaktivität zeigten. Fraktionen die außer den drei scharfen Banden zwischen 32 kD und 36 kD noch eine diffuse Bande bei 50 kD aufwiesen, wurden im Pool F1 vereinigt, Fraktionen die diese diffuse Bande nicht haben, im Pool F2.

ERGEBNISSE

Im Elutionsprofil erkennt man zwei Peaks. Ein erster Peak bei etwa 0,5 M NaCl zeigt keine Tryptaseaktivität. Gemäß den Aktivitätsmessungen eluiert die rekombinante Tryptase in einem Peak bei ca. 1 M NaCl. Das SDS-PAGE der Fraktionen des Tryptasepeaks zeigt eine inhomogene Zusammensetzung der gereinigten Tryptase: Fraktionen, die bei niedrigeren Salzkonzentrationen eluieren, zeigen 3 Banden zwischen 32 kD und 36 kD sowie eine sehr diffuse Bande bei ca. 50 kD. In den Fraktionen, die bei höheren Salzkonzentrationen eluieren, fehlt diese diffuse Bande. Da die rekombinanten Tryptasen auch für Kristallisationsexperimente eingesetzt werden sollten und eine starke Glycosilierung die Kristallisierung erschwert, wurden die Fraktionen mit der diffusen Bande bei 50 kD zu einem Pool F1 und die Fraktionen ohne diese Bande zu einem Pool F2 vereinigt.

In Tabelle 4-3 ist die Reinigung der β 1b-Tryptase bilanziert.

Reinigungsschritt		Volumen [ml]	Tryptase [mg]	Ausbeute des Reinigungs- schritts [%]	Gesamtausbeute [%]
Medium der Fermentation		5200	65,0	-	100
Ultrafiltration		700	64,9	99,8	99,8
Zentrifugation		700	46,4	71,5	71,3
Filtration		700	43,1	92,9	66,3
Kationenaustausch- chromatographie	F1	85	34,9	81,0	53,7
	F2	50	3,0	7,0	4,6
				Σ 88,0	Σ 58,3

Tabelle 4-3: Bilanzierung der Reinigungsschritte der β 1b-Tryptase.

Die Tryptasemenge wurde durch Aktivitätsmessung mit dem chromogenen Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-pNA bestimmt. Die Gesamt-Ausbeute ist bezogen auf die Menge im Medium der Fermentation.

Die Gesamtausbeute der Reinigung lag bei 58,3 %; sie setzte sich zusammen aus den Gesamtausbeuten des Pools F1 (53,7 %, stärker glykosiliert) und F2 (4,6 %, schwächer glykosiliert). Während die Ausbeuten bei der Ultrafiltration, der Filtration und der Kationenaustauschchromatographie bei mindestens 88% lagen, mußte der größte

ERGEBNISSE

Ausbeuteverlust beim Zentrifugationsschritt in Kauf genommen werden (Ausbeute 71,5%).

Zur weiteren Untersuchung der gereinigten Trypsasen, die im SDS-PAGE mehrere Banden zeigten, wurden die Pools F1 und F2 mittels Western Blot analysiert. Um gleiche Trypsasemengen auftragen zu können wurden beide Fraktionen ‚active site‘ titriert (vgl. 4.5.1 und 3.2.9.1) und im Vergleich mit humaner Lungentrypsase auf ein Gel aufgetragen.

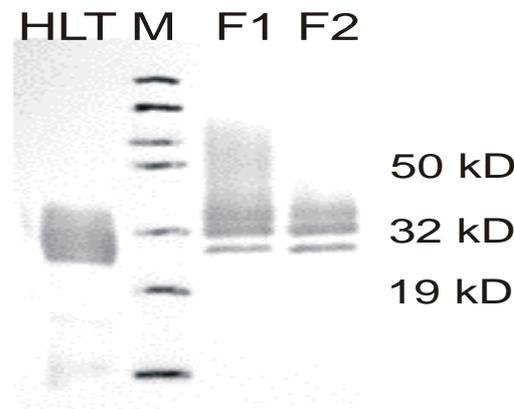


Abbildung 4-9: Western Blot der Trypsasepools F1 und F2

Aufgetragen wurden gleiche Mengen F1-Trypsase, F2-Trypsase und HLT (humane Lungentrypsase) gemäß ‚active site‘ Titration.

Wie in Abbildung 4-9 zu sehen ist sind alle im SDS-PAGE sichtbaren Banden Trypsasen, da sie alle gegen einen monoklonalen Trypsaseantikörper immunoreaktiv sind. Außerdem zeigen die vereinigten Fraktionen F1 und F2 auch beim Auftrag gleicher Mengen gemäß ‚active site‘ Titration unterschiedliche Bandenmuster. Das inhomogene Laufverhalten der Trypsasen ist durch die Annahme erklärbar, daß es sich bei den verschiedenen Banden im Gel um Trypsase Glycoformen handelt. Diese Annahme wurde später durch Deglycosylierung aller Isoformen verifiziert (siehe 4.4.2).

4.3.5.3 Vergleich der Reinigung der Isoenzyme

In Tabelle 4-4 sind die Ausbeuten der Reinigungen aller Isoenzyme zusammengefaßt. Während stärker glykosylierte Formen beim Isoenzym $\beta 2$ nicht nachweisbar sind, wurden bei den anderen Isoenzymen die Ausbeute zwischen 34,5 mg ($\beta 1b$ -Trypsase und 315,5 mg ($\beta 3$ -Trypsase) erzielt. Von den schwächer glykosylierten Formen (Pool F2), wurden zwischen 3,0 mg ($\beta 2$ -Trypsase) und 16, 5 mg ($\beta 3$ -Trypsase) erhalten. Die höchste Ausbeute wurde dabei mit 18% bei der $\beta 1a$ -Trypsase erzielt.

Isoenzym		Ausbeute		
		Pool F1 (stärker glykosyliert)	Pool F2 (schwächer glykosyliert)	Gesamt
α -Tryptase	[mg]	112,0	3,3	115,3
	[%]	n. b.	n. b.	n. b.
β 1a-Tryptase	[mg]	41,3	13	54,3
	[%]	57,3	18	75,3
β 1b-Tryptase	[mg]	34,9	3,0	37,9
	[%]	53,7	4,6	58,3
β 2-Tryptase	[mg]	0	3,0	3,0
	[%]	0	40,4	40,4
β 3-Tryptase	[mg]	315,5	16,5	332,0
	[%]	61,8	3,2	65,1

Tabelle 4-4: Ausbeuten der Reinigung aller Isoenzyme.

4.4 Biochemische Charakterisierung

4.4.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Homogenität wurden die Isoenzyme mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Dazu wurden von den gereinigten Tryptase-Isoenzymen jeweils 5 μ g der gepoolten Fraktionen F1 aufgetragen und das Gel nach dem Elektrophoreselauf mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt (vgl. Abbildung 4-10). Die Isoenzyme α 1, β 1a, β 1b und β 3, die jeweils zwei Glycosylierungsstellen an den Positionen 102 und 203 der Aminosäuresequenz des reifen Enzyms aufweisen, zeigen jeweils 3 Banden bei ca. 28 kD, 31 kD und 34 kD sowie eine diffuse Bande bei ca.

ERGEBNISSE

50 kD. Dagegen zeigt das Isoenzym $\beta 2$, das nur eine Glycosylierungsstelle an Position 203 der Aminosäuresequenz des reifen Enzyms aufweist, nur zwei Banden bei ca. 28 kD und 31 kD. Das Laufverhalten dieses Isoenzym im SDS-PAGE entspricht weitgehend dem der aus Lungengewebe isolierten Tryptase (HLT).

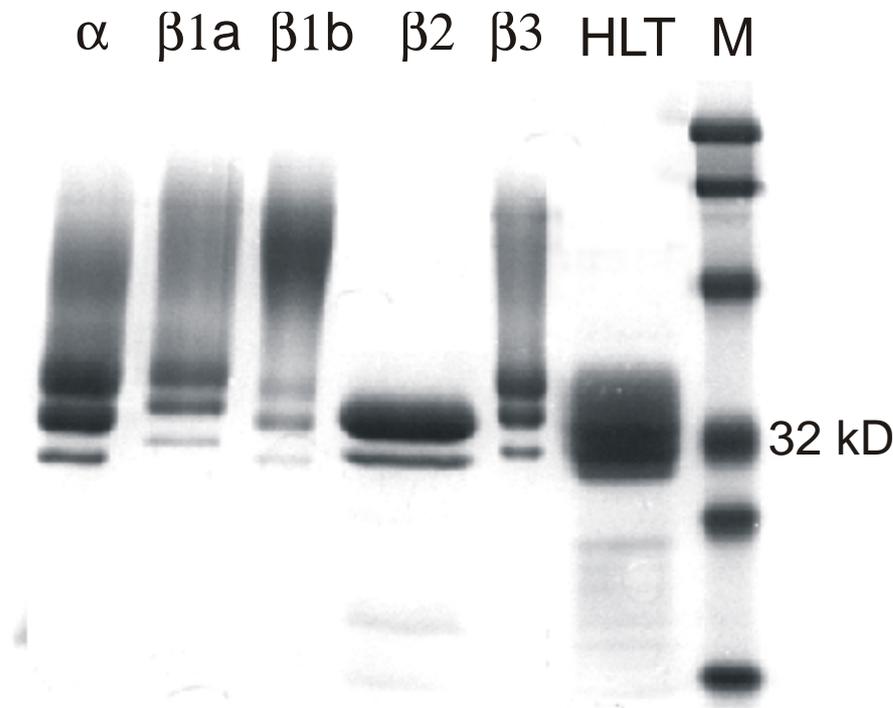


Abbildung 4-10: SDS-PAGE der gereinigten reifen Tryptase-Isoenzyme.

Aufgetragen wurden jeweils 5 μ g gereinigter rekombinanter Tryptase bzw. humaner Lungentryptase (HLT).

4.4.2 Deglycosilierung

Um zu überprüfen, ob die Inhomogenität der rekombinanten Tryptasen auf eine unterschiedlich starke Glycosylierung zurückzuführen ist, wurden die Isoenzyme mit den Glycosidasen Endo H und PNGase F deglycosyliert. Während PNGase F sowohl Oligosaccharide vom komplexen Typ wie auch solche vom Mannose-Typ von Glycoproteinen abspaltet, entfernt Endo H nur Oligosaccharide vom Mannose-Typ. Die anschließend zur Analyse angefertigten Western Blots sind in Abbildung 4-11 gezeigt.

Die rekombinanten Enzyme werden durch Endo H vollständig deglycosiliert, während das Laufverhalten der aus Lunge gereinigten Tryptase (HLT) durch diese Deglycosidase nur wenig verändert wird. PNGase F deglycosiliert dagegen sowohl die rekombinanten Tryptasen wie auch HLT. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die in Hefe produzierten Zuckerseitenketten vom Mannose-reichen Typ sind, während die der HLT vom komplexen Typ sind.

ERGEBNISSE

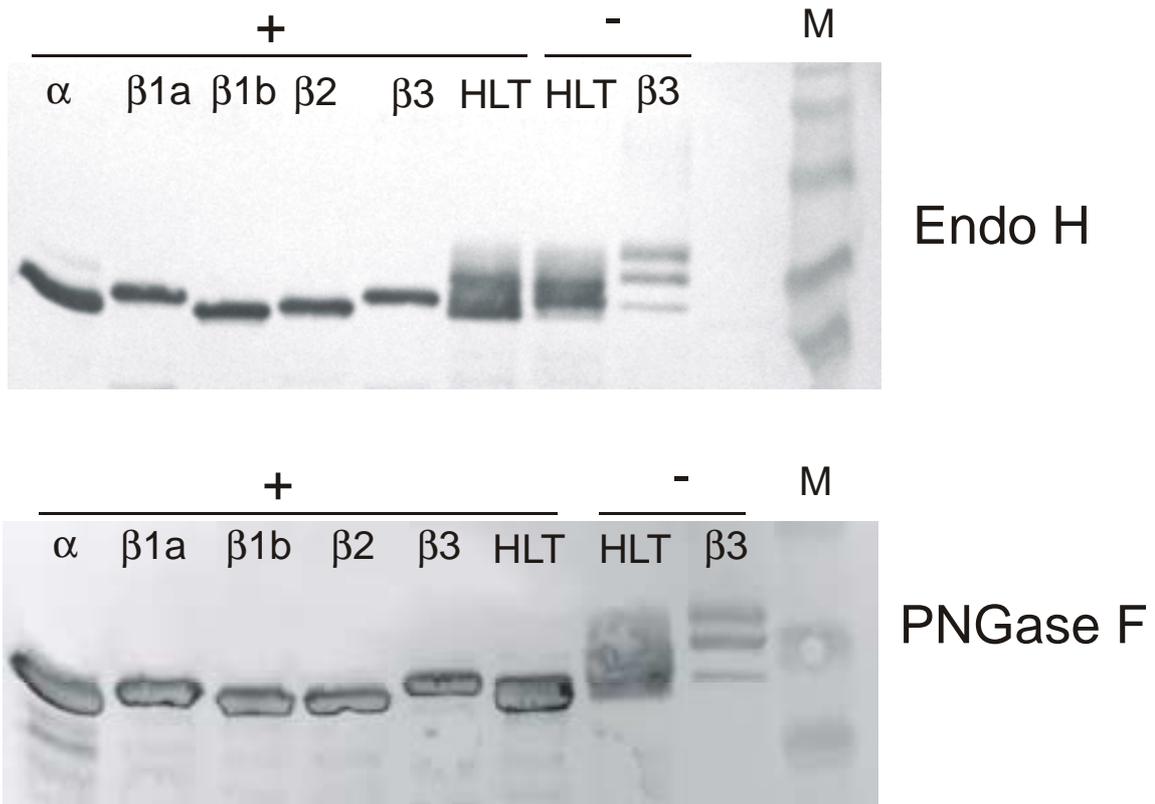


Abbildung 4-11: Deglycosilierung der Trypsin-Isoenzyme im Vergleich zur HLT mit Endo H und PNGase F.

In den mit + bezeichneten Spuren sind die deglycosylierten Isoenzyme bzw. HLT aufgetragen, die Negativkontrollen sind in den mit – bezeichneten Spuren aufgetragen. M ist der Marker.

4.4.3 N-terminale Aminosäuresequenzierung und ‚Peptide Map‘

Zur Überprüfung der Identität der rekombinanten Trypsin-Isoenzyme sowie zum Nachweis der korrekten Prozessierung durch das KEX2-Genprodukt bei der Ausschleusung wurden sie auf Proteinebene N-terminal sequenziert (siehe Tabelle 4-5)

Isoenzym	Sequenz	Nebensequenzen
α -Trypsin	IVGGQEAPRSKWPWQVSLR <u>VRDR</u> . . .	< 10%
β 1a-Trypsin	IVGGQEAPRSKWPWQVSLR <u>VHGP</u> . . .	< 10%
β 1b-Trypsin	IVGGQEAPRSKWPWQVSLR <u>VHGP</u> . . .	< 10%
β 2-Trypsin	IVGGQEAPRSKWPWQVSLR <u>VHGP</u> . . .	< 10%
β 3-Trypsin	IVGGQEAPRSKWPWQVSLR <u>VRDR</u> . . .	< 10%

Tabelle 4-5: N-terminale Sequenz der exprimierten Trypsin-Isoenzyme.

Bei allen Isoenzymen entspricht die gefundene Sequenz der theoretisch erwarteten. Die Isoenzyme unterscheiden sich am N-Terminus nur an den unterstrichenen Aminosäuren.

Die N-terminale Aminosäuresequenz entspricht bei allen Trypsinen der theoretisch erwarteten, sie wurden also alle korrekt prozessiert. Die Reinheit lag bei allen

ERGEBNISSE

Isoenzymen über 90%. Aufgrund der hohen Sequenzidentität der Isoenzyme kann jedoch aufgrund der N-terminalen Sequenz noch keine eindeutige Aussage zur Identität der Isoenzyme gemacht werden.

Für die eindeutige Identifizierung der Isoenzyme wurde für alle exprimierten Trypsasen ein ‚Peptide Map‘ durchgeführt. Dazu wurden die Proteine mit Trypsin, Lys C oder der Kombination beider Enzyme proteolytisch gespalten. Die Peptidfragmente (vgl. Tabelle 4-6 und Abbildung 4-12) wurden massenspektrometrisch analysiert und den Trypsase-Isoenzymen zugeordnet (siehe Tabelle 4-7).

Masse [g/mol]	Sequenz
3152	YWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVK
3164	YWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCLGPDVK
3540	VHGPLYWMHFCGGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVK
2582	IIVHPQFYTAQIGADIALLELEK
2907	IIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVK
658	DLAALR
688	DLATLR
908	LPPPFPLK

Tabelle 4-6: Sequenzen der Fragmente, die beim Abbau der Trypsase-Isoenzyme mit Trypsin und/oder Lys C entstehen können.

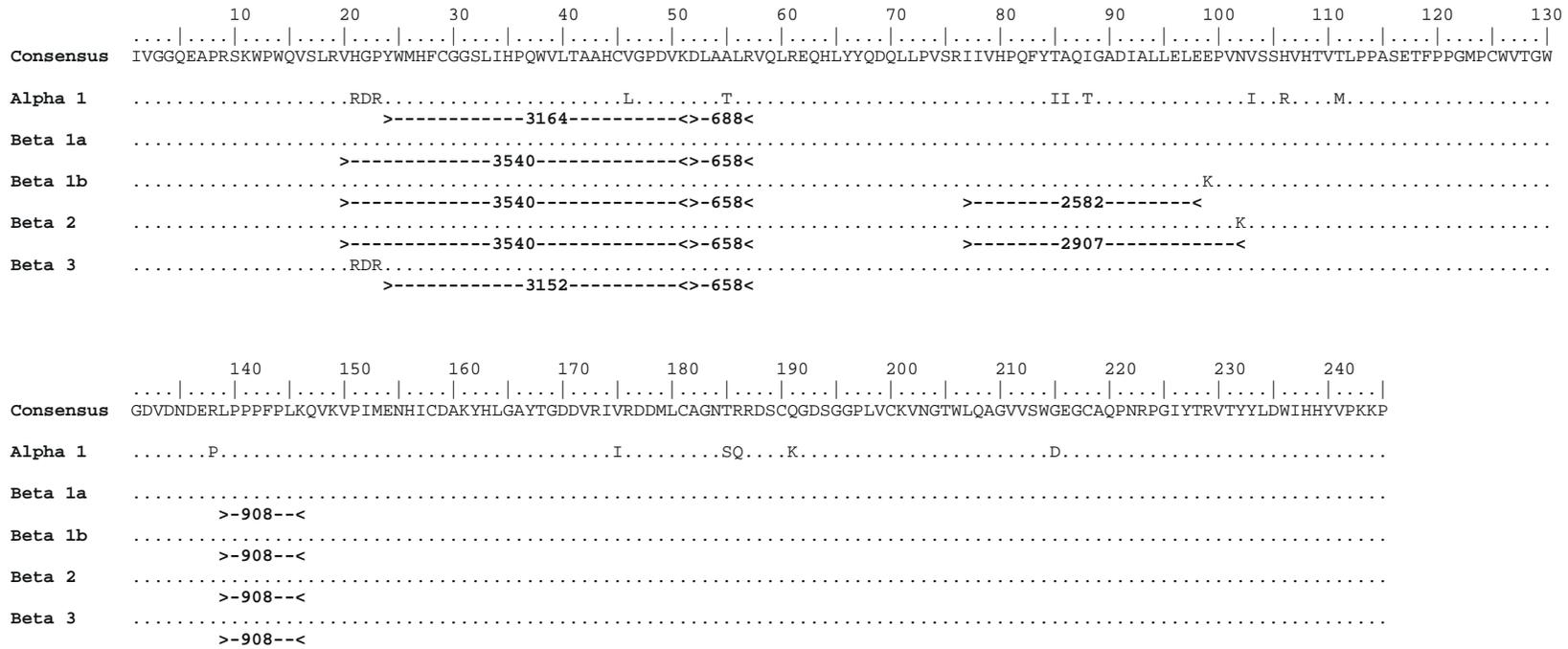


Abbildung 4-12: Fragmente, die zur Unterscheidung der Trypsin-Isoenzyme dienen.

Die theoretisch beim proteolytischen Abbau mit Lys C und/oder Trypsin entstehenden Fragmente sind für die jeweiligen Isoenzyme angegeben. Die Zahlen bedeuten die relative Masse in g/mol des entsprechenden Fragmentes. Die Fragmente sind durch offene Dreiecke (><) begrenzt

ERGEBNISSE

Tabelle 4-7 gibt eine Übersicht über die zu erwartenden und die nachgewiesenen Fragmente bei den verschiedenen Isoenzymen.

Fragmente	688	3164	658	908	3540	2582	2907	3152	AS 21-23
r α 1-Tryptase	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/n. b.	-/-	-/-	RDR
r β 1a Tryptase	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	HGP
r β 1b Tryptase	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	HGP
r β 2 Tryptase	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-	HGP
r β 3 Tryptase	-/n. b.	-/-	+/n. b.	+/+	-/-	-/n. b.	-/-	+/+	RDR

Tabelle 4-7: Erwartete und tatsächlich gefundene Peptidfragmente beim ‚peptide map‘, sowie Aminosäuresequenz an Position 21 – 23.

In der ersten Zeile sind alle theoretisch vorkommenden Fragmentgrößen angegeben. Darunter ist mit + oder – gekennzeichnet, ob dieses Fragment beim jeweiligen rekombinant hergestellten Isoenzym theoretisch erwartet wurde (vor dem /) und ob es gefunden wurde (nach dem /). Außerdem sind die durch N-terminale Sequenzierung gefundenen Aminosäuren an Position 21 – 23 angegeben.

Alle rekombinanten Isoenzyme konnten durch den Nachweis charakteristischer Peptide eindeutig identifiziert werden. Darüberhinaus konnte eine Kontamination der Präparationen durch andere Isoenzyme weitgehend ausgeschlossen werden; lediglich eine Verunreinigung der rekombinanten β 1b- und β 2-Tryptasen durch das β 1a-Isoenzym kann nicht sicher ausgeschlossen werden.

4.5 Funktionelle Charakterisierung

Um (patho)physiologisch relevante Unterschiede zwischen den Tryptase-Isoenzymen nachzuweisen, wurden die rekombinanten Tryptasen hinsichtlich ihrer Aktivität, Stabilität und ihrer Hemmbarkeit durch Inhibitoren verglichen.

4.5.1 Spezifische Aktivität der β -Isoenzyme

Für die vergleichende funktionelle Charakterisierung der Tryptase-Isoenzyme wurde zunächst deren spezifischen Aktivität ermittelt. Die Bestimmung der Konzentration der aktiven Zentren erfolgte durch ‚active-site‘ Titration mit dem Suizidsubstrat Hydroxymethylcumarin-guanidino-benzoat (Kezdy et al, 1965, Fersht, 1977). Das dabei aufgezeichnete Fluoreszenz-Zeit-Diagramm wurde mit Hilfe des Computerprogrammes ProFit ausgewertet (vgl. Abbildung 4-13).

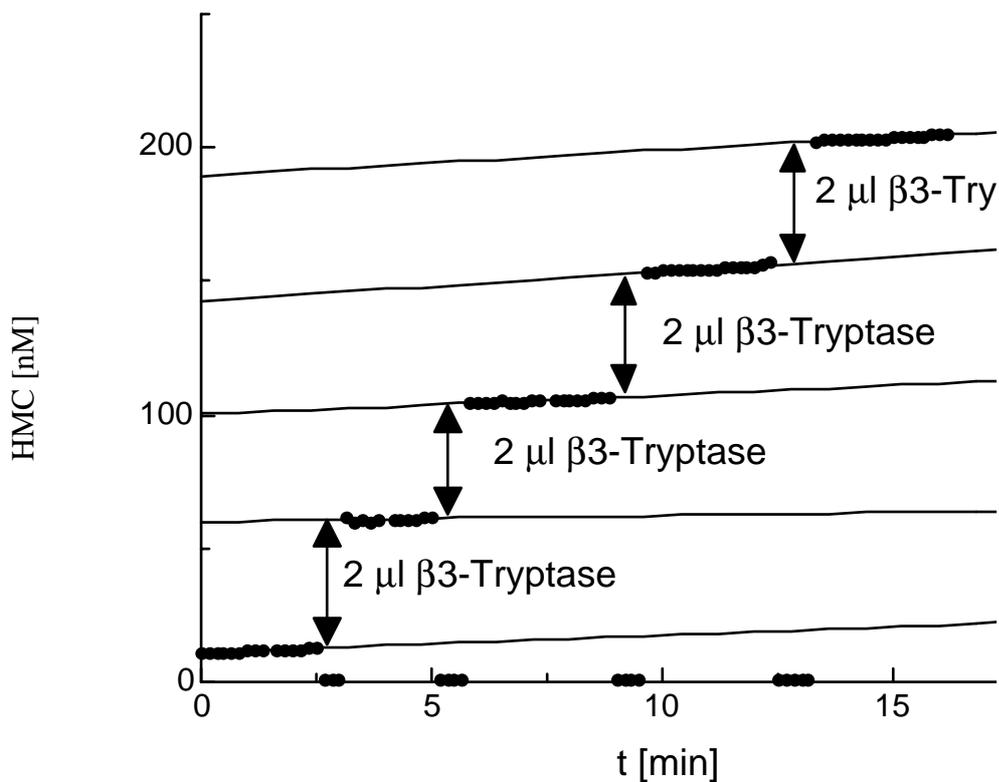


Abbildung 4-13: Auswertung der ‚active-site‘ Titration der β 3-Tryptase

An den mit Doppelpfeilen markierten Zeitpunkten wurden jeweils 2 μ l einer β 3-Tryptase-Lösung zugegeben. Durch Spaltung des Suizidsubstrates wird schlagartig Fluoreszenz freigesetzt. Aus der freigesetzten Fluoreszenz wurde die Konzentration der Tryptase-Lösung berechnet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (Bradford et al., 1976). In Tabelle 4-8 sind die Mittelwerte der Messwerte und die abgeleitete spezifische Aktivität in Prozent des maximalen theoretischen Wertes aufgeführt.

ERGEBNISSE

Isoenzym	Konzentration der aktiven Zentren [μM] n = 3	Proteinkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] n = 4	Spezifische Aktivität
α 1-Tryptase	0	1600,5	n. b.
β 1a-Tryptase	14,4 \pm 0,55	545,3 \pm 24,8	87
β 1b-Tryptase	24,3 \pm 0,39	918,4 \pm 83,3	87
β 2-Tryptase	7,1 \pm 0,29	311,8 \pm 18,6	75
β 3-Tryptase	43,2 \pm 0,25	1496,9 \pm 42,7	95

Tabelle 4-8: Ergebnisse der Proteinbestimmung und der Konzentrationsbestimmung der aktiven Zentren.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM (SEM = Standardabweichung vom Mittelwert)

Bei der Umrechnung der bei der ‚active site‘ Titration gemessenen Stoffmengenkonzentration in eine Massenkonzentration wurde von einem Molekulargewicht von 33 kD für alle Tryptase-Isoenzyme ausgegangen. α 1-Tryptase zeigte keine Aktivität gegen das Suizidsubstrat, deshalb konnte keine spezifische Aktivität bestimmt werden. Die spezifische Aktivität der anderen Isoenzyme beträgt zwischen 75 % und 95 % des theoretisch möglichen Wertes. Bei allen weiteren Versuchen beziehen sich die eingesetzten Tryptasemengen auf die hier bestimmten Konzentrationen der aktiven Zentren.

4.5.2 Bestimmung der kinetischen Kenngrößen

Um potentielle Unterschiede der Tryptase-Isoenzyme hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität und Substratspezifität nachzuweisen, wurden die kinetischen Kenngrößen K_m (Michaelis-Menten Konstante), k_{cat} (Wechselzahl) und k_{cat}/K_m mit dem fluorogenen Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-AMC ermittelt. Dazu wurden konstante Mengen Tryptase (gemäß ‚burst Titration‘) mit steigenden Mengen des Substrats inkubiert und die jeweilige Geschwindigkeit der Substratspaltung ermittelt. Die Reaktionsgeschwindig-

keiten wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen und in diese Datenpunkte eine Kurve gemäß der Michaelis-Menten Gleichung durch nichtlineare Regression eingepaßt (vgl. Abbildung 4-14)

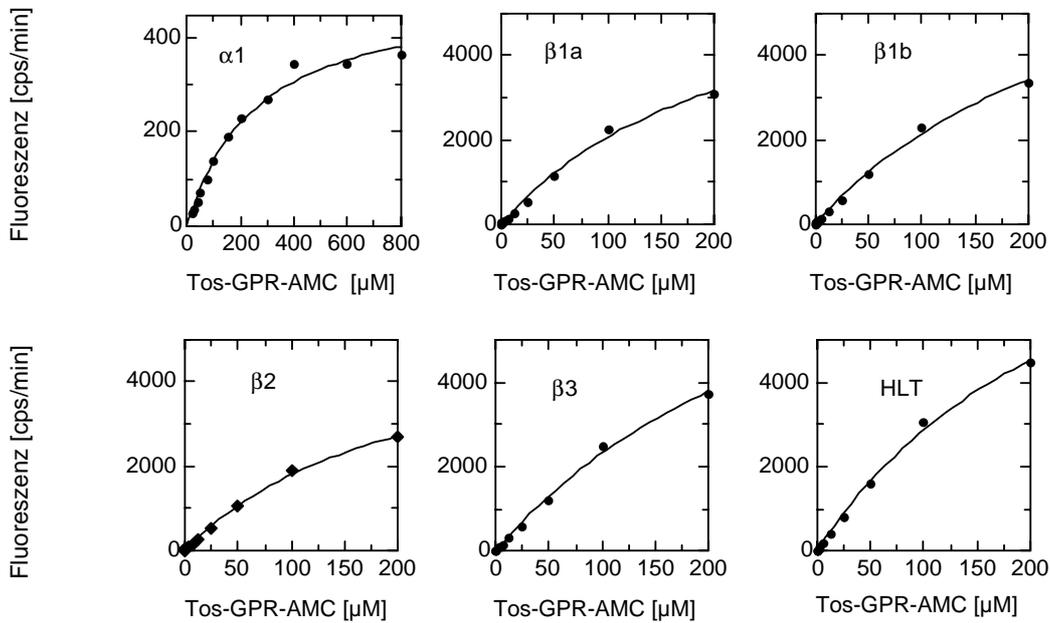


Abbildung 4-14: Km-Bestimmung der Tryptase Isoenzyme

Aufgetragen sind jeweils die bei steigender Konzentration des Substrates Tos-GPR-AMC (Tos-Gly-Pro-Arg-AMC) durch die Tryptasen freigesetzte Fluoreszenz pro Minute (in cps/min). In die erhaltenen Daten wurde mittels nichtlinearer Regression Kurven gemäß der Michaelis-Menten Gleichung eingepaßt.

Aus den so bestimmten K_m und V_{max} -Werten wurden die Werte für k_{cat} und k_{cat}/K_m errechnet (vgl. 4.5.2), die in Tabelle 4-9 zusammengefaßt sind. Die β -Isoenzyme zeigen keine signifikante Unterschiede in ihren kinetischen Kenngrößen gegenüber dem fluorogenen Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-AMC. Die $\alpha 1$ -Tryptase zeigt dagegen einen leicht erhöhten K_m -Wert und einen um den Faktor 10^6 geringere k_{cat} und eine um den selben Faktor höhere k_{cat}/K_m . Dies bedeutet eine ähnlich starke Substratbindung aller Isoenzyme, jedoch eine um den Faktor 10^6 langsamere Substratspaltung durch die $\alpha 1$ -Tryptase verglichen mit den β -Tryptasen.

Isoenzym	K_m [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]
α 1-Tryptase	478 ± 7	$0,00028 \pm 0$	$0,48 \pm 0$
β 1a Tryptase	239 ± 51	137 ± 70	$5,7 \pm 2,6 \times 10^{-5}$
β 1b Tryptase	225 ± 51	109 ± 59	$4,7 \pm 1,8 \times 10^{-5}$
β 2 Tryptase	193 ± 54	104 ± 39	$5,2 \pm 1,1 \times 10^{-5}$
β 3 Tryptase	360 ± 44	130 ± 82	$4,6 \pm 2,0 \times 10^{-5}$
HLT	245 ± 31	105 ± 34	$4,4 \pm 1,4 \times 10^{-5}$

Tabelle 4-9: Zusammenfassung wichtiger kinetischer Kenngrößen der rekombinanten Tryptase-Isoenzyme im Vergleich zur humanen Lungentryptase.
Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Messungen \pm SEM

4.5.3 Stabilität der Isoenzyme

Ein wichtiger Parameter, der die Aktivität der Tryptasen beeinflusst, ist die Stabilität des Tetramers. Dazu wurden die Isoenzyme mit zwei verschiedenen Assays verglichen: Ein Aktivitätsassay zur Bestimmung der Stabilität des Tetramers in der Abwesenheit von Heparin, und eine Schmelzpunktvergleich der Isoenzyme in der Gegenwart stabilisierender Heparin-Glycosamino-glycane.

4.5.3.1 Stabilität in der Abwesenheit von Heparin

Zur Bestimmung der Stabilität des Tryptasetetramers in der Abwesenheit von Heparin, bei 37°C und unter ‚physiologischen‘ Bedingungen wurde ein fluorimetrischer Aktivitätsassay durchgeführt. Dazu wurde die Substratspaltung in einem Puffer ohne Heparin (pH 7,6, 150 mM NaCl) direkt in einer Fluorimeterküvette bei einer Substratkonzentration von 33 μM (Substrat: Bz-Arg-AMC) und einer Tryptasekonzentration von 2 nM über die Zeit (20 min) verfolgt. In Abbildung 4-15 ist exemplarisch der Verlauf der freigesetzten Fluoreszenz mit der Zeit für jedes Isoenzym dargestellt. Die Fluoreszenz und somit die Menge des gespaltenen Substrates nimmt im

gemessenen Zeitraum zu, die Steigung der Kurven und somit die Aktivität der Tryptasen nimmt jedoch während der ersten 12 Minuten ab. In diesem Zeitraum verlieren die Tryptasen ca. 90 % ihrer Aktivität; die verbleibende Restaktivität nimmt im betrachteten Zeitraum in Übereinstimmung mit Schechter et al. (Schechter et al., 1995) nicht weiter ab.

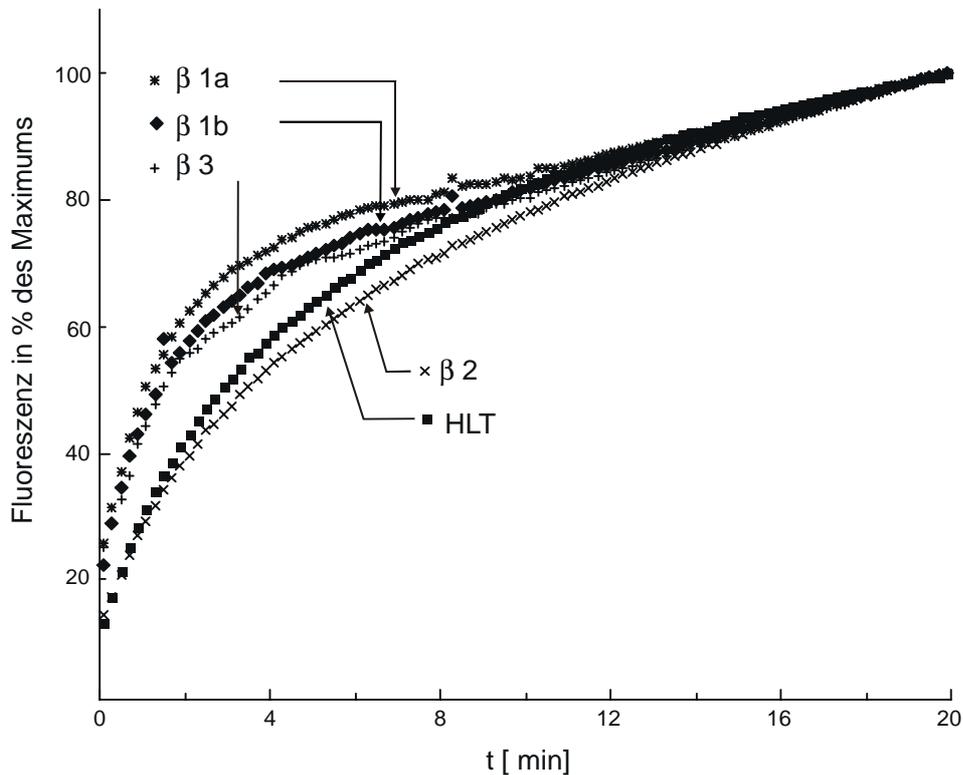


Abbildung 4-15: Freigesetzte Fluoreszenz durch die β -Isoenzyme in einem Puffer ohne Heparin.

Aus den aufgezeichneten Kurven wurde mit Hilfe von Gleichung 3-2 und Gleichung 3-3 die Zeitkonstanten k für den Zerfall und die Halbwertszeit $t_{1/2}$ berechnet. Die in Tabelle 4-10 tabellarisch dargestellten Halbwertszeiten entsprechen dem Mittelwert aus 4 Messungen des jeweiligen Isozyms.

Die Halbwertszeiten der Isoenzyme $\beta 1a$, $\beta 1b$ und $\beta 3$ unterscheiden sich nicht wesentlich, sie betragen 0,84 min bis 1 min. Dagegen sind die Halbwertszeiten der $\beta 2$ -Tryptase und der HLT mehr als doppelt so groß (2,5 min und 2,9 min). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die in diesen Versuchen verwendete, aus Lungengewebe isolierte Tryptase mittels ‚peptide map‘ als $\beta 2$ -Tryptase identifiziert wurde (Pereira et al., 1998) und die rekombinante $\beta 2$ -Tryptase in ihrem Glycosylierungsmuster der Lungentryptase (vgl. Abbildung 4-10) entspricht.

ERGEBNISSE

Isoenzym	t $\frac{1}{2}$ in min n = 4
β 1a-Tryptase	0,84 \pm 0,12
β 1b-Tryptase	0,97 \pm 0,08
β 2-Tryptase	2,92 \pm 0,5
β 3-Tryptase	1,02 \pm 0,16
HL-Tryptase	2,57 \pm 0,24

Tabelle 4-10: Halbwertszeiten der Isoenzyme bei einer Konzentration von 2 nM unter physiologischen Bedingungen in der Abwesenheit von Heparin

Die angegebenen Halbwertszeiten (t $\frac{1}{2}$) sind als Mittelwert \pm SEM (n = 4) angegeben.

Da die Stabilität der α 1-Tryptase wegen ihrer sehr geringen Aktivität gegenüber fluorogenen Substraten nicht mit der oben beschriebenen Methode bestimmt werden konnte, wurde die Monomerisierung mittels Gelfiltration (Sepharose 12) untersucht. Dazu wurden die Isoenzyme β 3 und α 1 (Konzentration jeweils 4,5 μ M) nach einer 15-stündigen Inkubation in einem physiologischen Puffer ohne Heparin (50 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl,) analysiert. Die Chromatographie wurde anschließend mit einem Laufpuffer (10 mM MES, pH 6,1, 1 M NaCl) durchgeführt, der sowohl den tetrameren wie auch den monomeren Zustand der Tryptasen nicht verändern sollte (Ren et al, 1998).

Während β 3-Tryptase nach Inkubation im Puffer ohne Heparin in zwei Peaks eluierte die basierend auf einem Vergleich mit einem Massenstandart mono- bzw. dimerer Tryptase entsprechen, eluierte α -Tryptase ebenso wie heparin-stabilisierte β 3-Tryptase in einem Peak, der tetramerer Tryptase entsprach (vgl. Abbildung 4-16). Diese Analyse zeigt eine bemerkenswerte Stabilität der α 1-Tryptase, die auch ohne Heparin in ihrem tetrameren Zustand bleibt, während die β 3-Tryptase unter diesen Bedingungen vollständig in Monomere und Dimere zerfallen ist.

ERGEBNISSE

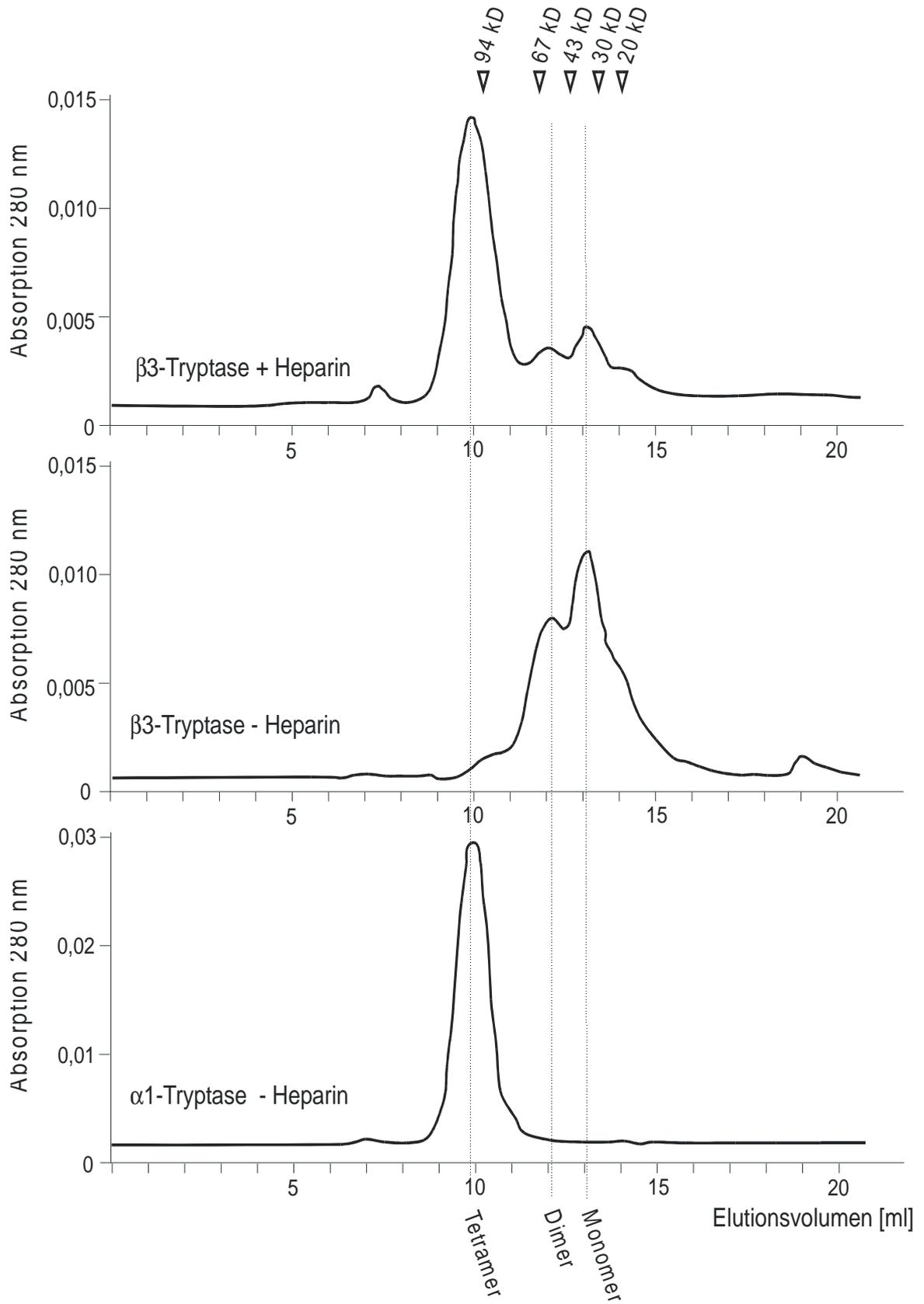


Abbildung 4-16: Analyse der Tetramerstabilität von $\alpha 1$ und $\beta 3$ -Tryptase mittels Gelfiltration

4.5.3.2 Tetramer-Stabilität in der Gegenwart von Heparin

Die Stabilität der Tryptase-Tetramere in Gegenwart von Heparin wurde mittels Schmelzpunktbestimmung untersucht. Dazu wurde der Übergang von (enzymatisch aktiven) Tetrameren zu (enzymatisch inaktiven) Monomeren im CD-Spektrum der Tryptasen verfolgt. Dies ist möglich, da bei der Inaktivierung von Tryptase ein charakteristisches dichroisches Minimum bei 230 nm verschwindet (Schwarz et al, 1990, Schechter et al, 1995). Das hier eingesetzte Spektrophotometer erlaubte die Verfolgung der Elliptizität bei einer bestimmten Wellenlänge in Abhängigkeit von der Temperatur und somit die kontinuierliche Aufzeichnung einer Schmelzkurve bei 230 nm. In Abbildung 4-17 A sind die CD-Spektren von β 3-Tryptase in tetramerem und monomerem Zustand verglichen. Die Monomere wurden durch Inkubation von tetramerer Tryptase für 24 h bei RT in einem Puffer ohne Heparin (50 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl) erzeugt. In Abbildung 4-17 B ist eine Schmelzkurve der tetrameren β 3-Tryptase bei 230 nm abgebildet.

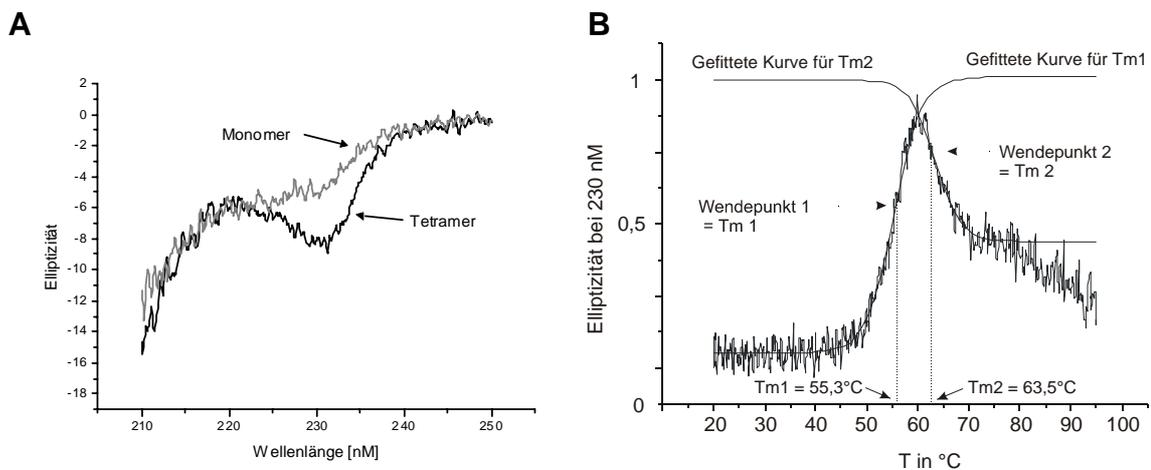


Abbildung 4-17: CD Spektren von tetramerer und monomerer Tryptase im fernen UV und Schmelzkurven von β 3-Tryptase bei 230 nm

A: CD Spektren von tetramerer und monomerer Tryptase.

B: Schmelzkurve von tetramerer β 3-Tryptase in einem heparinhaltigen Puffer. Die für die Schmelzpunktbestimmung gefitteten Kurven sind ebenfalls eingezeichnet.

T_{m1} = Schmelzpunkt 1 (Dissoziation des Tetramers in Monomere), T_{m2} = Schmelzpunkt 2 (Schmelzen der Sekundärstrukturen).

Im CD-Spektrum des Monomers erkennt man deutlich das Fehlen des negativ dichroischen Peaks bei 230 nm. Die Schmelzkurve zeigt einen zweiphasigen Übergang: Der erste Übergang (Schmelzpunkt 1) ist durch die Abnahme der dichroischen Intensität bei 230 nm charakterisiert und entspricht dem Zerfall des Tetramers in Monomere

ERGEBNISSE

(Schwarz et al. 1990). Der zweite Übergang (Schmelzpunkt 2) entspricht der thermischen Denaturierung der Monomere mit dem Verlust der Sekundärstrukturen.

Für den Stabilitätsvergleich wurden die Schmelzkurven der Isoenzyme $\alpha 1$, $\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2$ und $\beta 3$ in einem Puffer mit Heparin bei 230 nm aufgezeichnet (vgl. 3.2.8.7). In die aufgezeichneten Schmelzkurven wurden mit Hilfe des Programmes Origin eine bzw. zwei sigmoide Kurve(n) eingepaßt (siehe Abbildung 4-17 B). Die Wendepunkte dieser Kurven entsprechen den Schmelzpunkten bei 230 nm. Die auf diese Weise für alle Isoenzyme bestimmten Schmelzpunkte (T_m) sind in Tabelle 4-11 zusammengefaßt.

Isoenzym	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]
$\alpha 1$ -Tryptase	n. b.	75 (ohne Heparin 62,9)
$\beta 1a$ Tryptase	54,0	66,7
$\beta 1b$ -Tryptase	55,4	65,2
$\beta 2$ -Tryptase	47,7	63,7
$\beta 3$ -Tryptase	55,3	63,4

Tabelle 4-11: Schmelzpunkte der Tryptase Isoenzyme.

T_{m1} = Schmelzpunkt 1 (entspricht der Monomerisierung, T_{m2} = Schmelzpunkt 2 (entspricht der Denaturierung des Proteins))

Die Schmelzpunkte T_{m1} der Isoenzyme $\beta 1a$, $\beta 1b$ und $\beta 3$ unterscheiden sich nicht signifikant, auch die Schmelzpunkte T_{m2} aller β -Isoenzyme sind vergleichbar. Dagegen ist der Schmelzpunkt T_{m1} der $\alpha 1$ -Tryptase in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 4.5.3.1 sowohl in einem Puffer mit als auch in einem Puffer ohne Heparin nicht bestimmbar. Der Vergleich der Schmelzkurven (vgl. Abbildung 5-3) zeigt, daß der beobachtete Übergang der Denaturierung des Proteins und somit dem Schmelzpunkt T_{m2} entspricht. Die im Vergleich mit den anderen Isoenzymen geringere Stabilität der $\beta 2$ -Tryptase in Gegenwart von Heparin ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die Tetramerstabilität bzw. die Bindung von Heparin an das Tetramer über die Glykosilierung moduliert wird.

4.5.3.3 Stabilisierung des Tetramers durch Inhibitoren

Tryptase stellt ein ideales Modell zur Untersuchung des Prinzips der multivalenten Bindung von Inhibitoren an Proteasen dar. Ein bivalent bindender Inhibitor, der die nicht durch Heparin stabilisierten Kontaktflächen zwischen den Monomeren A/D und B/C überbrückt (vgl. Abbildung 2-1 und Abbildung 5-8) sollte die Stabilität des Tetramers erhöhen.

Um die Stabilisierung des Tryptase-Tetramers durch die bivalente Bindung eines Inhibitors nachzuweisen, wurden die Schmelzkurven der Komplexe des β 3-Tryptase-Tetramers mit mono- und bivalent bindenden Inhibitoren in einem physiologischen Puffer ohne Heparin untersucht. Die dabei verwendeten Inhibitoren NS-216 (monovalent) und NS-222 (bivalent) wurden von Dr. Norbert Schaschke (MPI für Biochemie) zur Verfügung gestellt. Die Dissoziationskonstanten der Komplexe dieser Inhibitoren mit Tryptase und Trypsin (vgl. Tabelle 4-12) lieferten einen hemmkinetischen Hinweis auf die bivalente Inhibition des Tryptase-Tetramers durch NS-222.

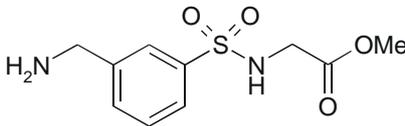
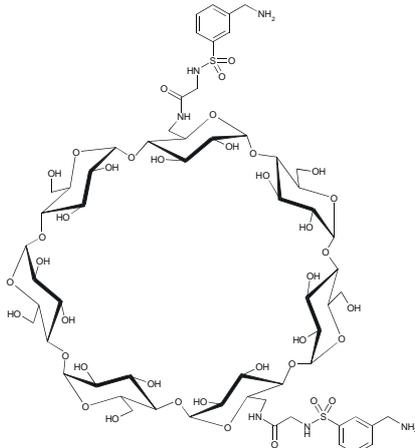
Inhibitor	Struktur	K_i Tryptase	K_i Trypsin
NS-216		17 μ M	43 μ M
NS-222		0,0006 μ M	4,8 μ M

Tabelle 4-12: Struktur und K_i -Werte der Inhibitoren NS216 und NS222

Während sich die K_i -Werte der Komplexe der beiden Inhibitoren sich gegen Trypsin nur um den Faktor 10 unterscheidet, ist die K_i des bivalenten Inhibitors mit Tryptase im Vergleich zum monovalenten um den Faktor 3×10^4 niedriger.

ERGEBNISSE

Bei der Aufzeichnung der Schmelzkurven der Komplexe betrug die Konzentration des Inhibitors NS-216 = 1 mM und die des Inhibitors NS-222 = 10 μ M, so daß sichergestellt war, daß alle aktiven Zentren der Tryptase mit Inhibitor gesättigt waren. Zum Vergleich wurde eine Schmelzkurve des β 3-Tryptase Monomers aufgezeichnet (siehe Abbildung 4-18). Aus diesen Schmelzkurven wurden die in Tabelle 4-13 zusammengefaßten Schmelzpunkte bestimmt.

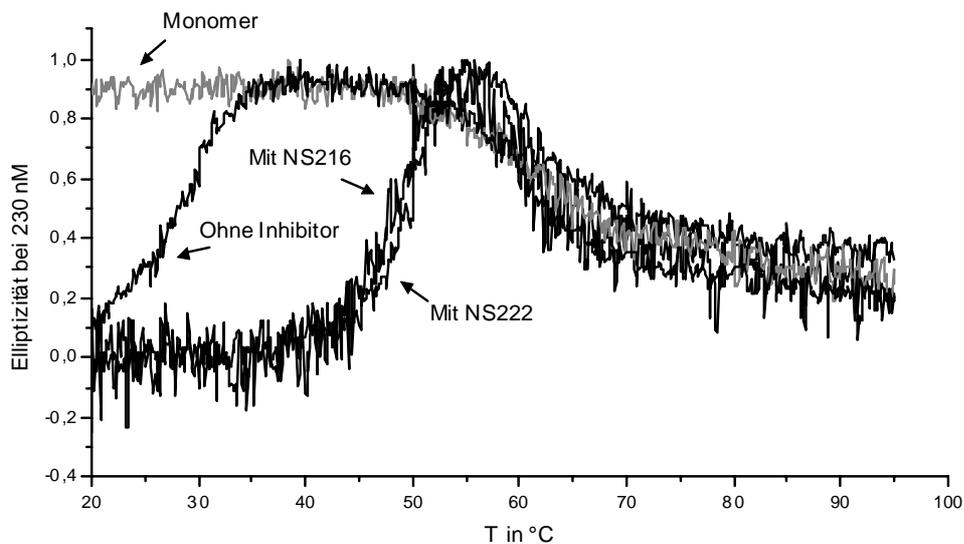


Abbildung 4-18: Schmelzkurven der β 3-Tryptase mit und ohne Stabilisierung durch Inhibitoren
Die Schmelzkurve des Monomers ist in grau dargestellt, die verschiedenen Schmelzkurven der Komplexe des Tetramers mit den Inhibitoren, sowie die des Tetramers alleine in schwarz.

Komplex	T_m 1 [°C]
β 3 Tryptase	(28,6 °C)
β 3 Tryptase + NS-216 (Kopfgruppe)	48,6 °C
β 3 Tryptase + NS-222 (Bivalent bindender Inhibitor)	49,9 °C

Tabelle 4-13: Schmelzpunkte des Tryptase-Tetramers mit und ohne Inhibitoren

Der monovalent bindende Inhibitor NS-216 bewirkt eine deutliche Steigerung des Schmelzpunktes, während der bivalente Inhibitor nur noch eine geringe weitere Erhöhung des Schmelzpunktes bewirkt.

Der ‚Schmelzpunkt‘ des Tryptase-Tetramers in Abwesenheit eines Inhibitors lag bei 28,6°C, allerdings zerfällt das Tryptase-Tetramer unter den hier verwendeten

Bedingungen auch spontan zu Monomeren. Die Zugabe des monovalenten Inhibitors NS-216 führte zu einer bemerkenswerten Zunahme des Schmelzpunktes auf 48,6 °C, während der bivalente Inhibitor nur noch zu einer schwachen Erhöhung des Schmelzpunktes auf 49,9°C führte.

Die Erhöhung des Schmelzpunktes durch die mono- und bivalenten Inhibitoren zeigen eine Stabilisierung des Tryptase-Tetramers durch solche Inhibitoren. Die Schmelzpunktsdifferenz von 1,3°C zwischen dem mono- und dem bivalenten Inhibitor geben einen biochemischen Hinweis auf die bivalente Hemmung der Tryptase

4.5.4 Hemmkinetische Charakterisierung

Bei der Reinigung von Tryptase aus humanem Lungengewebe wurden ‚Tryptase-Spezies‘ identifiziert, die sich in ihrem hemmkinetischen Verhalten gegenüber bivalenten Inhibitoren deutlich unterscheiden (Gabi Matschiner, pers. Mitteilung). Um zu untersuchen, ob diese ‚Tryptase-Spezies‘ den Tryptase-Isoenzymen zugeordnet werden können, sowie zur Charakterisierung der Isoenzyme gegenüber bekannten Trypraseinhibitoren wurden die rekombinanten β -Tryptasen bezüglich ihrer Hemmung durch die Inhibitoren LDTI, Babim und Byk-60603 untersucht. Dazu wurde die Dissoziationskonstanten K_i der Komplexe unter Gleichgewichtsbedingungen (‚steady state-Bedingungen‘) entsprechend den Vorschlägen von Morrison et al. (1969) bestimmt. Konstante Mengen Tryptase wurden mit steigenden Mengen des jeweiligen Inhibitors inkubiert und nach Gleichgewichtseinstellung die verbleibende Restaktivität gemessen. In Vorversuchen wurde ermittelt, daß für eine Auswertung geeignete konkave Hemmkurven bei einer Tryptasekonzentration von 100 pM erzielt werden und daß die Gleichgewichtseinstellung nach 20 min weitgehend abgeschlossen ist. Die Enzyme bleiben über diesen Zeitraum vollständig aktiv. Zur Messung der Enzymaktivität wurde das sensitive fluorogene Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-AMC verwendet. Aus den erhaltenen Hemmkurven (vgl. Abbildung 4-19) wurden die K_i -Werte nach der modifizierten Gleichung von Morrison (siehe 3.2.9.4), die eine nicht-hemmbar Restaktivität berücksichtigt, ermittelt. In Tabelle 4-14 sind die K_i Werte der Komplexe der verwendeten Inhibitoren mit den verschiedenen Tryptase-Isoenzymen zusammengefasst.

ERGEBNISSE

Inhibitor	rLDTI K _i [nM] n = 4	Babim K _i [nM] n = 4	60603 K _i [nM] n = 4
β1a-Tryptase	1,2 ± 0,6	0,9 ± 0,3	0,03 ± 0,007
β1b-Tryptase	2,6 ± 0,7	0,7 ± 0,2	0,04 ± 0,020
β2-Tryptase	1,7 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,02 ± 0,003
β3-Tryptase	4,2 ± 1,7	0,3 ± 0,1	0,01 ± 0,004
HLT-Tryptase	4,0 ± 1,5	0,3 ± 0,0	0,01 ± 0,003

Tabelle 4-14: K_i Werte der rekombinanten Tryptase Isoenzyme gegen die Inhibitoren rLDTI, Babim und Byk-60603.

Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Messungen ± SEM.

Keiner der Inhibitoren zeigte bei den K_i-Werte signifikante Unterschiede zwischen den Isoenzymen. Sie lagen bei rLDTI zwischen 1,2 nM und 4,2 nM, bei Babim zwischen 0,3 nM und 0,9 nM und bei 60603 zwischen 0,01 und 0,04 nM. Während alle Isoenzyme beim niedermolekularen synthetischen Inhibitor Babim keine und beim proteinergeren Blutegel-Inhibitor rLDTI eine Restaktivität von ca. 50%, aufweisen, unterscheiden sich die Isoenzyme bei den eingesetzten Inhibitorkonzentrationen in ihrer Restaktivität gegenüber dem synthetischen bivalenten Inhibitor Byk-60603. Wie Abbildung 4-19 zeigt, bleibt bei β1b-Tryptase eine nicht hemmbare Restaktivität von 25 %, auch bei der humane Lungentryptase bleibt eine Restaktivität von ca. 40 %, während alle anderen Isoenzyme bei diesen Inhibitorkonzentrationen vollständig durch 60603 gehemmt werden.

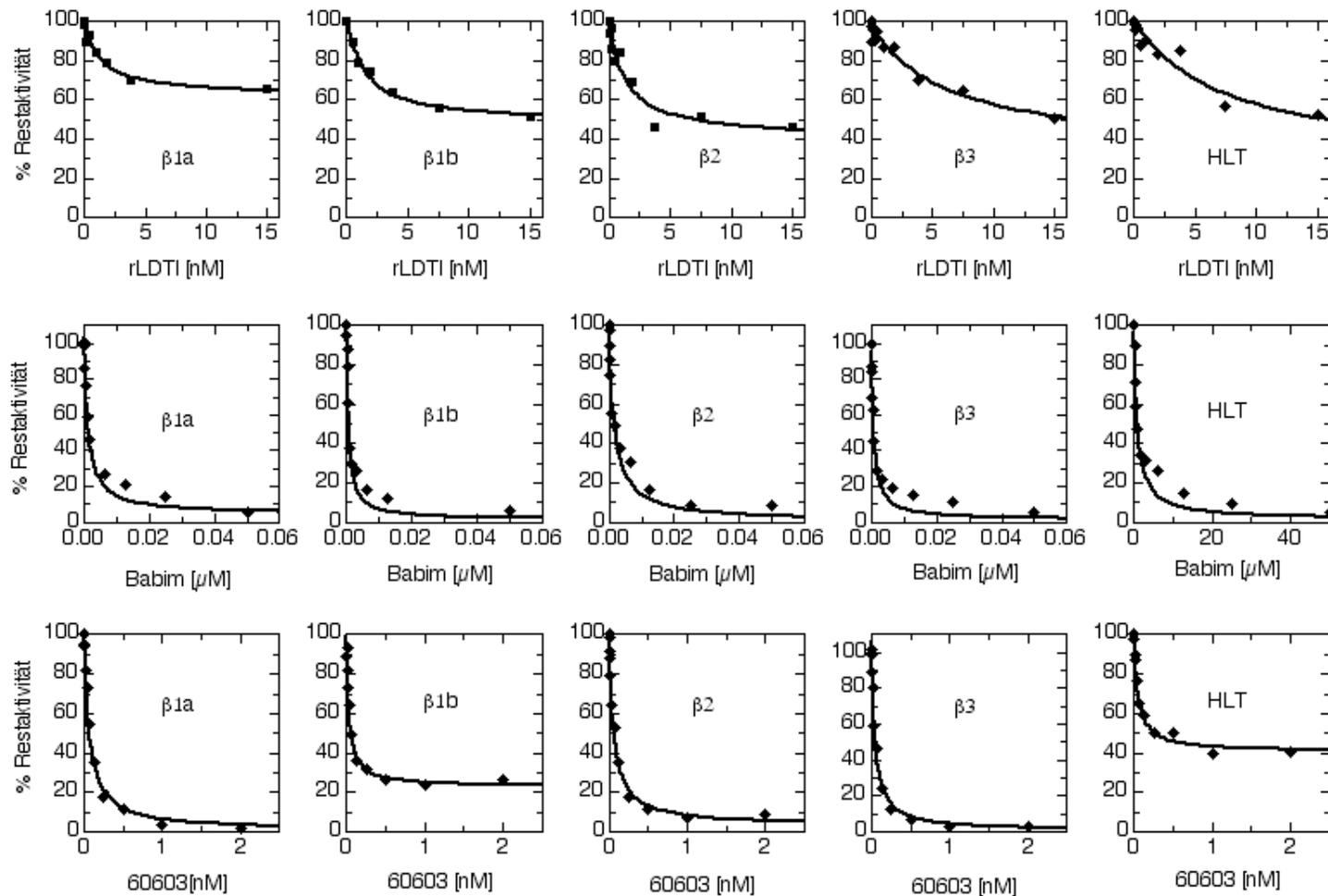


Abbildung 4-19: Hemmung verschiedener rekombinanter Isoenzyme im Vergleich zu humaner Lungentryptase (HLT)
 Die Isoenzyme unterscheiden sich nicht in ihrem Hemmverhalten gegenüber den Inhibitoren rLDTI und Babim. Der bivalente niedermolekulare 60603 Inhibitor hemmt die β1b-Tryptase und HLT im eingesetzten Konzentrationsbereich mit einer deutlichen Restaktivität, während alle anderen Isoenzyme durch diesen Inhibitor nahezu vollständig gehemmt werden.

ERGEBNISSE

Um zu überprüfen, ob die rekombinante β 1b-Tryptase bei ausreichend hohen Inhibitorkonzentrationen vollständig gehemmt wird, wurde die Hemmkinetik in einem größeren Konzentrationsbereich des Inhibitors durchgeführt. Die dabei erhaltene Hemmkurve zeigt eine zweistufige Hemmung (vgl. Abbildung 4-20), bei Inhibitorkonzentrationen im μ M Bereich kann die β 1b-Tryptase vollständig gehemmt werden. Dieses Verhalten wurde auch bei der HLT beobachtet (G. Matschiner, pers. Mitteilung). In beiden Fällen liegen also zwei unterschiedlich gut hemmbare ‚Spezies‘ vor, die als hochaffine und niederaffine Tryptase bezeichnet wurden. Diese beiden Spezies werden von doppelköpfigen Inhibitoren mit unterschiedlichen K_i -Werten gehemmt. Ein solcher Unterschied in den K_i -Werten kann über den Bindungsmodus des Inhibitors erklärt werden. Ein bivalent bindender Inhibitor hat aufgrund von Entropieeffekten einen um Zehnerpotenzen niedrigeren K_i als ein monovalent Bindender (vgl. 5.11). Unklar ist allerdings warum die hier aufgetretenen Tryptase-Spezies mono- bzw. bivalent gehemmt werden.

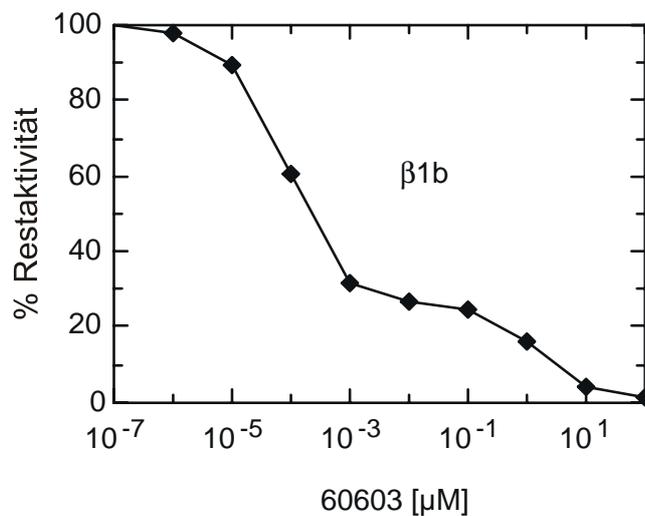


Abbildung 4-20: Vollständige Hemmung der rekombinanten β 1b-Tryptase durch Byk-60603
Auf der x-Achse ist die Konzentration des Inhibitors Byk-60603 im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Die deutlich zu erkennende zweistufige Hemmkinetik zeigt, daß ein Gemisch von zwei unterschiedlich gut hemmbaren Spezies vorliegt.

4.6 ‚Tryptase-Spezies‘

Um diese ‚Tryptase-Spezies‘ charakterisieren zu können, war eine Trennung im präparativen Maßstab nötig.

4.6.1 Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘

Zur Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘ wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurde der bivalente Inhibitor NS-358 von Dr. Norbert Schaschke (MPI für Biochemie) an NHS-aktivierte Sepharose gekoppelt. Dieser Inhibitor hemmt die hochaffine ‚Tryptase-Spezies‘ aus Lungengewebe deutlich besser ($K_i = 50 \text{ nM}$), als die niederaffine ‚Spezies‘ ($K_i = 3,8 \text{ }\mu\text{M}$). Die Affinitätssäule war 1 mM mit Inhibitor belegt und wurde bei einem Fluß von 2 ml/min in einen Mantel gepackt.

Die Säule wurde in einem Puffer mit Heparin, aber ohne Salz äquilibriert. Nach dem Auftrag der β 1b-Tryptase (0,6 nmol) wurde die Säule gewaschen, die Tryptase mit einem steigenden Salzgradient (0 bis 2 M NaCl) eluiert und das Eluat fraktioniert gesammelt. Da eine Analyse des Durchlaufs und der eluierten Fraktionen zeigte, daß ein Teil der Tryptase an die Säule gebunden blieb, wurde die Säule anschließend mit 1 mM Benzamidin gewaschen. Alle Fraktionen sowie der Durchlauf und das Eluat mit Benzamidin wurden auf Tryptaseaktivität getestet. Die Tryptase eluiert im Salzgradienten in 2 Peaks, außerdem findet sich sowohl im Durchlauf wie auch im Eluat mit Benzamidin Tryptaseaktivität. Die in Tabelle 4-15 gezeigte Bilanzierung der Affinitätschromatographie basiert auf diesen Aktivitätsmessungen.

Chromatographie-schritt	Tryptase [μg]	Ausbeute [%]
Auftrag auf die Säule	19,80	100
Nicht an die Säule gebundene Tryptase	0,69	3,5
Elution mit NaCl	7,97	40,3
Elution mit Benzamidin	1,71	8,6
Gesamt	10,37	52,4

Tabelle 4-15: Bilanzierung der Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘.

ERGEBNISSE

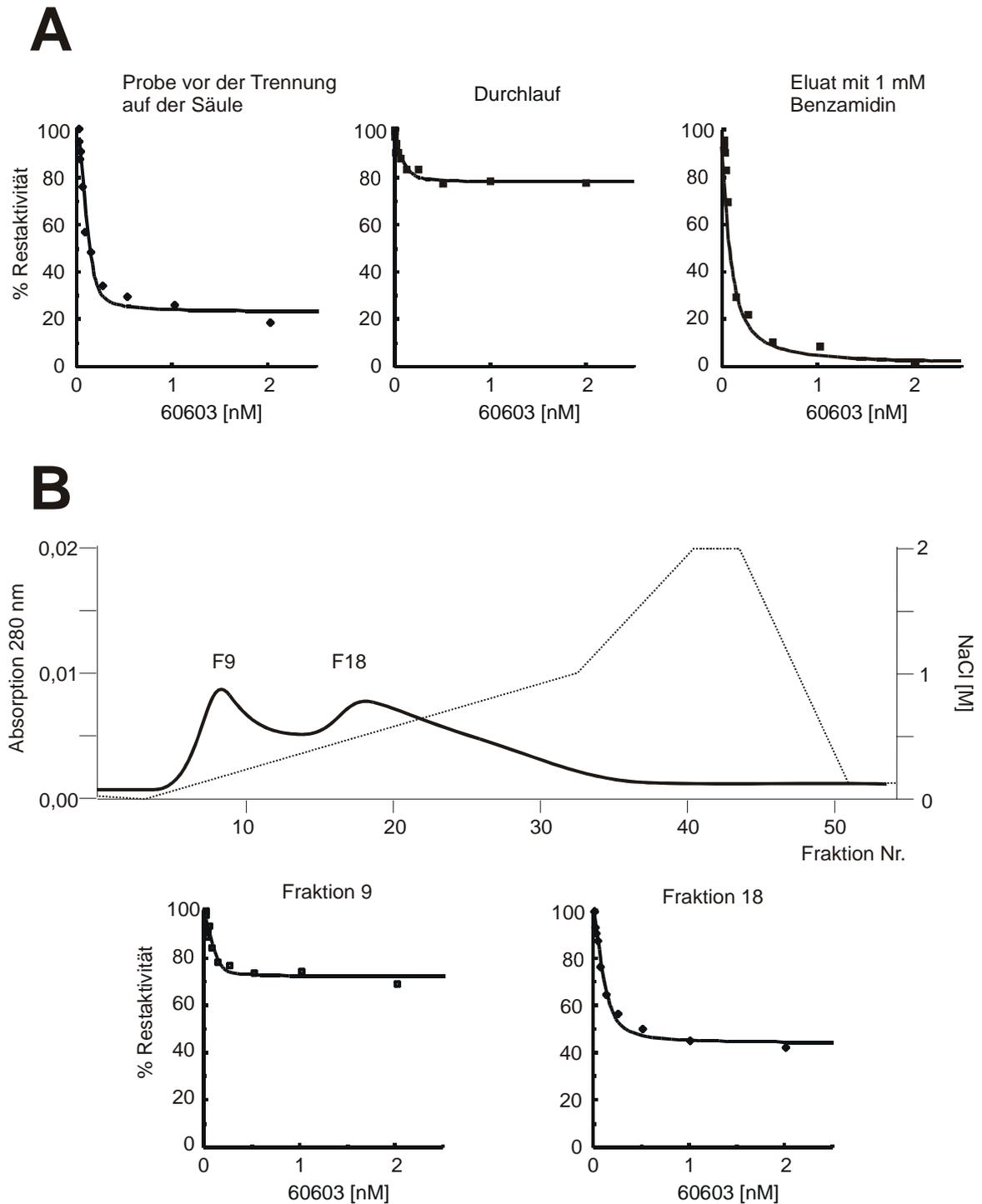


Abbildung 4-21: Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘ mittels Affinitätschromatographie.

A: Analyse der Affinitätschromatographie mit dem Inhibitors Byk-60603: Probe der β 1b-Tryptase vor dem Auftrag auf die Säule sowie Durchlauf und das Eluat mit Benzamidin.

B: Elutionsprofil im steigenden Salzgradient sowie die Hemmkinetik des Inhibitors Byk-60603 mit zwei ausgewählte Fraktionen.

Die nicht an die Affinitätssäule gebundenen und die eluierten Fraktionen wurden in ihrem Hemmverhalten gegenüber dem bivalenten Inhibitor Byk-60603 analysiert. In Abbildung 4-21 ist das Elutionsprofil der Affinitätschromatographie sowie die

Hemmkurven einiger ausgewählter Fraktionen gegen den Inhibitor Byk-60603 dargestellt.

Die Analyse der Fraktionen zeigt, daß die beiden ‚Tryptase-Spezies‘ durch die Affinitätssäule weitgehend getrennt werden konnten. Der Durchlauf besteht zu 80% aus niederaffiner Tryptase, während das Eluat mit Benzamidin zu 100% aus hochaffiner Tryptase besteht (vgl. Abbildung 4-21 A). Die in Abbildung 4-21 B dargestellte Elution im Salzgradienten zeigte 2 Peaks. Die hemmkinetische Analyse von 2 Fraktionen aus diesen Peaks ist ebenfalls dargestellt. Wie zu erwarten, nimmt der Anteil niederaffiner Tryptase mit steigendem Salzgradienten ab, da die Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum über Wasserstoffbrücken vermittelt wird.

4.6.2 Hemmkinetik mit bivalenten Inhibitoren

Zur weiteren Analyse der ‚Tryptase-Spezies‘, wurden die K_i -Werte der Komplexe verschiedener bivalenter Inhibitoren bestimmt, die sich hinsichtlich des Abstands ihrer reaktiven Zentren unterscheiden. Die für diese Analyse benötigten Inhibitoren wurden von Dr. Norbert Schaschke (MPI für Biochemie, Martinsried, AG Moroder) zur Verfügung gestellt. Sie bestehen alle aus einem identischen ‚core‘ und identischen Kopfgruppen, unterscheiden sich jedoch in der Länge ihrer ‚spacer‘. Die getrennten ‚ β 1b-Tryptase-Spezies‘ wurden mit diesen Inhibitoren hemmkinetisch analysiert (siehe 4.5.4).

Tabelle 4-16 gibt einen Überblick über die Strukturen verwendeten Inhibitoren und die bestimmten K_i -Werte. Die K_i -Werte mit ‚hochaffiner‘ Tryptase liegen zwischen 0,013 μ M und 2,27 μ M, das Minimum der K_i -Werte wird bei einem Abstand der reaktiven Zentren von 29 Bindungen erreicht. Bei der ‚niederaffinen‘ Tryptase liegen die K_i -Werte dagegen deutlich höher (zwischen 1 μ M und 110 μ M), das Minimum der K_i -Werte wird hier bei einem größeren Abstand der reaktiven Zentren von 31 Bindungen erreicht. Diese Daten deuten auf einen größeren Abstand der aktiven Zentren bei der niederaffinen Tryptase hin.

ERGEBNISSE

Inhibitor	Struktur	Bindungen	K _i (na) [μM]	K _i (ha) [μM]
NS-283		25	8,300	2,270
NS-326		27	6,170	0,190
NS-257		29	8,500	0,014
NS-273		31	1,000	0,013
NS-318		33	110,00	0,322

Tabelle 4-16: K_i Werte und Strukturen der Inhibitoren, die zur Charakterisierung der ‚Tryptase-Spezies‘ eingesetzt wurden.

Die reaktiven Aminogruppen der Inhibitoren sind zwischen 25 und 33 Bindungen voneinander entfernt. K_i (na) = K_i des Komplexes mit niederaffiner Tryptase, K_i (ha) = K_i des Komplexes mit hochaffiner Tryptase.

4.7 Strukturelle Charakterisierung

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung des Tryptase-Tetramers mit bivalenten und monovalenten niedermolekularen Inhibitoren sowie zur Aufklärung von Struktur/Funktionsbeziehungen der α -Tryptase und des Tryptase-Monomers wurden in Zusammenarbeit mit Ulf Marquardt (MPI Biochemie, Martinsried) verschiedene Kristallisationsexperimente durchgeführt:

- Die Kristallisation der α 1-Tryptase sollte die ungewöhnliche Substratspezifität und die Stabilität des Tetramers klären.
- Die Kristallisation des Monomers sollte Aufschluß über die strukturelle Basis des Verlustes der aktiven Konformation geben.
- Die Kokristallisation von Tryptase mit dem bivalenten Inhibitor NS-222 sollte einen strukturellen Beweis für die bivalente Inhibition von Tryptase erbringen.
- Die Kokristallisation von verschiedenen Inhibitoren der Firma Byk Gulden (Konstanz) mit Tryptase sollte bei der Optimierung dieser Inhibitoren hinsichtlich ihrer Hemmaktivität helfen (siehe 4.7.3).

In Tabelle 4-17 sind die durchgeführten Kristallisationsansätze zusammengefaßt.

ERGEBNISSE

Tryptase				Inhibitor			
Isoenzym	Konz. [μ M]	Volumen [μ l]	Menge [mg]	Name	Ki [μ M]	Konz. [μ M]	Struktur
α 1-F2	200	500	3,3	Entfällt	Entfällt	Entfällt	+
α 1-F1	485	400	6,4	Entfällt	Entfällt	Entfällt	-
β 3-F2 Monomer	156	450	2,3	Entfällt	Entfällt	Entfällt	-
β 3-F2	203	580	3,9	NS-222	0,003	1260	+
β 3-F2	180	500	3,0	NS-222	0,003	400	-
β 3-F2	288	650	6,2	NS-257	0,018	2100	-
β 1a-F2	206	940	6,4	Byk-76935	0,028	700	+
β 3-F2	180	420	2,5	Byk-150640	0,0003	800	+
β 3-F1	421	500	7,0	Byk-112676	0,0003	700	-
β 3-F1	363	500	6,0	Byk-112675	0,01	1500	-
β 1b-F2	92	950	2,9	Byk-164689	0,0075	400	-
β 3-F1	253	800	6,7	Byk-196363	0,06	800	-
β 3-F1	253	740	6,2	Byk-165265	0,2	750	-

Tabelle 4-17: Zusammenfassung der durchgeführten Kristallisationsexperimente.

F1 sind jeweils stark glycosylierte Fraktionen, F2 sind schwach glycosylierte Fraktionen.

In den mit + bezeichneten Kombinationen konnte die Röntgenkristallstruktur bestimmt werden. In vielen anderen wurden zwar Kristalle die jedoch zu klein oder zu verwachsen waren, um die Struktur lösen zu können.

Die Kristallisationsansätze und die Röntgenstrukturanalyse wurde von Ulf Marquard (MPI für Biochemie AG Bode/Huber) durchgeführt.

4.7.1 α 1-Tryptase

Zur Klärung der ungewöhnlich geringen Aktivität und der hohen Tetramer-Stabilität der α 1-Tryptase wurde die Kristallstruktur der α 1-Tryptase gelöst. α 1-Tryptase bildet wie β 2-Tryptase Tetramere; die vier Monomere sind in den Ecken eines Rechtecks angeordnet und die aktiven Zentren sind zur Mitte der dabei entstehenden zentralen Pore hin ausgerichtet (vgl. Abbildung 2-1.). α 1- und β 2-Tryptasen unterscheiden sich jedoch in einer Peptidschleife im Bereich des aktiven Zentrums. In Abbildung 4-22, sind die Strukturen der aktiven Zentren der α 1-Tryptase und der β 2-Tryptase überlagert.

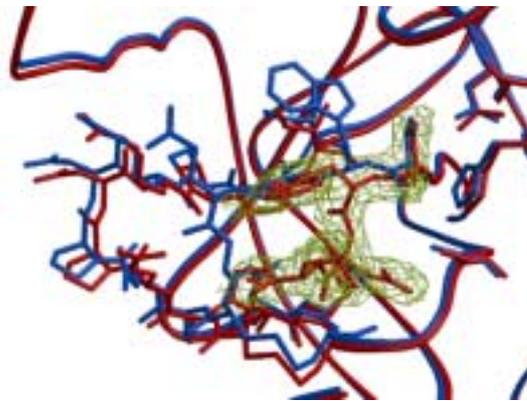


Abbildung 4-22: Kristallstruktur der aktiven Zentren der α 1-Tryptase und der β 2-Tryptase in Standardorientierung.

α 1-Tryptase ist rot, β 2-Tryptase blau gefärbt. Das Peptidsegment 213 – 219 der α 1-Tryptase ist durch eine grüne Oberflächendarsellung hervorgehoben. Substrate binden in dieser Standardorientierung von links nach rechts in das aktive Zentrum. Das Peptidsegment 213 – 219 der α 1-Tryptase blockiert das aktive Zentrum.

Bei der in rot dargestellten α 1-Tryptase ist das aktive Zentrum durch das Peptidsegment Ser213 - Gln219 (grüne Oberflächendarsellung) blockiert. Die unterschiedliche Geometrie dieses Peptidsegments ist durch den Ersatz von Gly215 in der β 2-Tryptase durch Asp215 in der α 1-Tryptase bedingt.

α 1-Tryptase hat ebenso wie β 2-Tryptase, eine Heparinbindungsstelle entlang des A/B (und C/D) Kontaktes (vgl. Abbildung 2-1). Die in 4.5.3 beschriebenen Ergebnisse zeigen jedoch, daß im Gegensatz zu den β -Tryptasen die α 1-Tryptase kein Heparin zur Stabilisierung des Tetramers benötigt. Die Röntgenkristallstruktur zeigt hier Unterschiede zwischen der β 2-Tryptase und der α 1-Tryptase. In Abbildung 4-23 ist die A/B Kontaktfläche der α 1-Tryptase (farbig) im Vergleich zur β 2-Tryptase (grau) dargestellt.

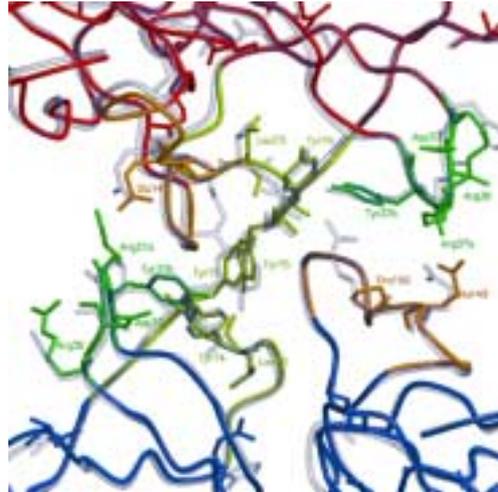


Abbildung 4-23: A/B Kontaktfläche der α -Tryptase im Vergleich zur β 2-Tryptase
 α 1-Tryptase ist farbig, β 2-Tryptase grau dargestellt.

Zwischen Arg23 der α 1-Tryptase (in der Abb. ist die Chymotrypsin-Nummerierung Arg37a angegeben) und Glu137 (in der Abb. Glu149) ist eine zusätzliche Salzbrücke möglich, die allerdings in der Elektronendichte nicht gut definiert ist. Zusätzlich entfällt in der α 1-Tryptase durch den Austausch von Arg138 durch Pro138 (in der Abb. Pro150) die ungünstige Ladungsabstoßung zwischen zwei positiv geladenen Argininresten. Dadurch lagern sich die Monomere enger zusammen, was eine Stärkung der hydrophobe Wechselwirkungen und somit die Stabilisierung des Tetramers erhöht.

4.7.2 β 3-Tryptase/NS-222-Komplex

Um einen strukturellen Beweis für die bivalente Bindung des Inhibitors NS-222 an das Tryptase-Tetramer zu erhalten, wurde die in Abbildung 4-24 gezeigte Röntgenkristallstruktur des Komplexes β 3-Tryptase/NS-222 angefertigt. Trotz der geringen Auflösung von 3,2 Å zeigt die Dichteverteilung (blau) klar die Position der Cyclodextrinringe zwischen den aktiven Zentren A/D und B/C. Die exakt modellierte Struktur des Inhibitors zeigt, daß die Kopfgruppen bei dieser Position des Cyclodextrinringes in die aktiven Zentren binden können.

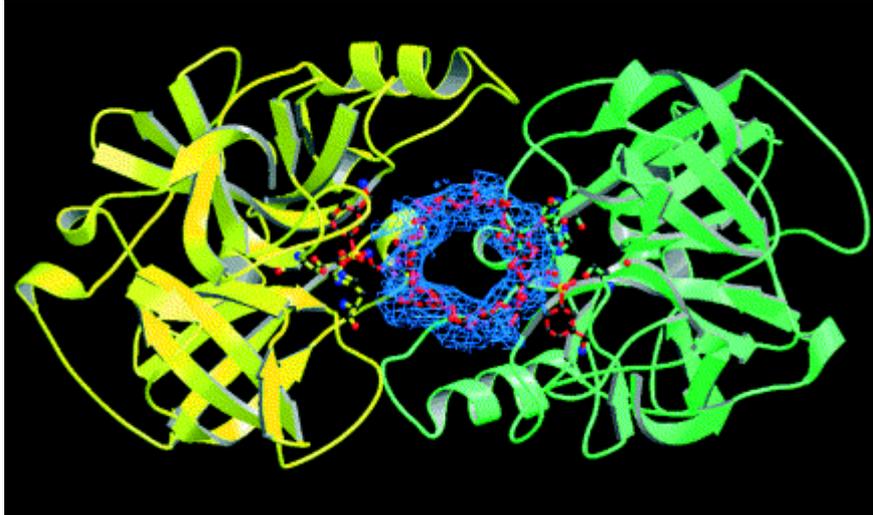


Abbildung 4-24: Röntgenkristallstruktur von β 3-Tryptase im Komplex mit dem bivalenten Inhibitor NS-222

Die Dichteverteilung des Cyclodextrinringes ist blau dargestellt. Die Tryptaseuntereinheiten A (grün) und D (gelb) sind in Bänderdarstellung gezeigt, die katalytischen Triade in Skelettdarstellung. Im Skelettmodell des Inhibitors sind Bindungen rot, C-Atome schwarz, O-Atome rot, N-Atome blau und S-Atome gelb dargestellt.

4.7.3 Komplex von β 1a-Tryptase mit Byk-76935.

Die Röntgenkristallstruktur dieses Komplexes zeigte, daß β 1a-Tryptase ebenso wie α 1- β 2- und β 3-Tryptase (siehe 4.7.4) ein Tetramer ausbildet. Der bivalente Inhibitor Byk-76935 bindet jedoch nicht wie erwartet bivalent, sondern nur monovalent an dieses Tetramer (vgl. Abbildung 4-25). Diese Röntgenkristallstruktur wurde zur Optimierung von Tryptaseinhibitoren verwendet.

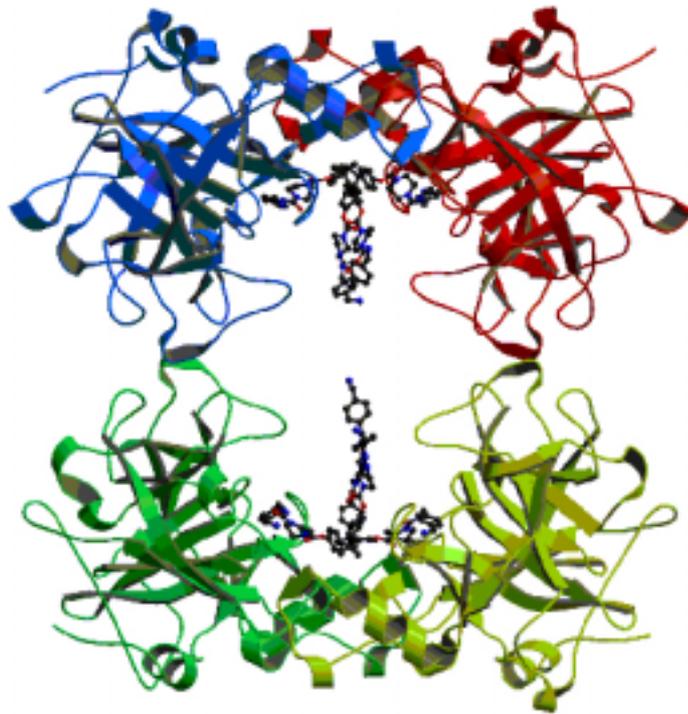


Abbildung 4-25: Röntgenkristallstruktur des Komplexes β 1a-Tryptase/Byk-76935

Der Inhibitor Byk-76935 bindet monovalent an das Tryptase Tetramer. Zur vollständigen Inhibition eines Tryptase-Tetramers werden vier Inhibitormoleküle benötigt.

4.7.4 Komplex von β 3-Tryptase mit Byk-150640

Die Röntgenkristallstruktur dieses Komplexes zeigt wie in Abbildung 4-26 zu sehen, die erwartete bivalente Bindung des Inhibitors Byk-150640 an die β 3-Tryptase. Auch diese Struktur diente zur Verbesserung von Tryptase-Inhibitoren.



Abbildung 4-26: Röntgenkristallstruktur des Komplexes β 3-Tryptase/Byk-150640
Man erkennt die bivalente Inhibition der β 3-Tryptase durch Byk-150640.

5 Diskussion

5.1 Bedeutung der Tryptase Isoenzyme

Tryptasen sind die mengenmäßig dominierenden Proteine der menschlichen Mastzellen. Während die unterschiedliche Ausstattung verschiedener Mastzellsubtypen mit den Proteasen Tryptase und Chymase relativ gut untersucht ist, ist wenig über die Expression der verschiedenen Tryptase-Isoenzymen bekannt. So wird lediglich die konstitutive Sezernierung von α -Protryptase durch Mastzellen und Basophile diskutiert (Xia et al., 1995, Caughey et al., 2000, Schwarz et al., 1995). Auch über biochemische und funktionelle Unterschiede zwischen den Tryptase-Isoenzymen ist wenig bekannt, da bisher nahezu alle Studien mit aus Lungen- oder Hautgeweben isolierten Präparationen durchgeführt wurden, die hinsichtlich ihrer Isoenzym-Zusammensetzung nicht definiert waren. Um die biochemischen Eigenschaften der Tryptase-Isoenzyme vergleichen zu können, wurden die Isoenzyme $\alpha 1$, $\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2$ und $\beta 3$ rekombinant hergestellt und charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, daß sie sich hinsichtlich ihrer Aktivität, Stabilität und der Hemmbarkeit zum Teil deutlich unterscheiden und geben erste Hinweise auf eine mögliche (patho)physiologische Bedeutung der Tryptase-Isoenzyme.

5.2 Klonierung der $\alpha 1$ - und $\beta 1b$ -Tryptase

Die cDNA der $\alpha 1$ -Tryptase wurde ausgehend von Mono Mac-6 Zellen amplifiziert, da in dieser promonozytären Zelllinie α -Tryptase-mRNA nachgewiesen worden war (Huang et al., 1993). Die in dieser Arbeit aus der unreifen Mastzelllinie HMC-1 klonierte, $\beta 1b$ -Tryptase genannte Isoform hat einen kodierenden Basenaustausch im Vergleich zur publizierten Sequenz der nun $\beta 1a$ -Tryptase genannten Isoform. Dieses neue Isoenzym, das auch von einer anderen Gruppe in diesen Zellen nachgewiesen wurde (Chan et al., 1995), ist bisher beim Menschen basierend auf den untersuchten BACs (*bacterial artificial chromosomes*) nicht bekannt (Pallaoro et al., 1999, Caughey et al., 2000). Möglicherweise wird es nur in der transformierten HMC-1-Tumorzelllinie exprimiert. Alternativ könnte es sich auch um einen weiteren Polymorphismus handeln; so wurde in den Tryptasegenen ein SNP (*single nucleotide polymorphism*) pro 90 Basenpaaren identifiziert, während sich normalerweise nur ein SNP pro 1000 Basenpaaren in codierenden Regionen findet (Guida et al., 2000). Die cDNAs der

Isoenzyme $\beta 1a$, $\beta 2$ und $\beta 3$ wurden uns freundlicherweise von G. Caughey (San Francisco) zur Verfügung gestellt.

5.3 Expression der Zymogene in *E. coli*

Der Versuch, die Zymogene der $\alpha 1$ - und $\beta 1b$ -Tryptase mit Hilfe des periplasmatischen Expressionssystems pET-22b(+) zu exprimieren, führte zur Bildung von Einschlusskörperchen (‘inclusion bodies‘). Die mit den Tryptasen N-terminal fusionierte pelB-Signalsequenz wurde nicht abgespalten, da das unlösliche Material nicht in das Periplasma ausgeschleust worden war. Da solche hydrophoben Sequenzbereiche die Rückfaltung stören, wurde zur Gewinnung von ausreichendem Material für Faltungsstudien das Expressionssystem pET-32 verwendet. Durch die Expression eines Fusionsproteins mit einem N-terminalen Thioredoxin-Anteil und der Verwendung eines Thioredoxin-Reduktase-defizienten (*trxB*) *E. coli* Stamms (AD494(DE3)) soll dieses System die Expression von löslichem Protein und die Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma ermöglichen. Auch in diesem Expressionssystem wurden die Tryptasen jedoch als unlösliche Proteine exprimiert. Die Trx-Fusionsproteine konnten jedoch in *E. coli* B834(DE3) in relativ großen Mengen (85 mg/l) als ‘inclusion bodies‘ hergestellt werden. Eine Rückfaltung dieses relativ hydrophilen Fusionsproteins erschien aussichtsreich, zumal der Fusionsanteil mit Thrombin oder Enterokinase *in vitro* abgespalten werden kann und damit eine Prozessierung der Zymogene zu reifen Tryptasen möglich erschien.

5.4 Rückfaltung und Prozessierung der Zymogene

Die unter denaturierenden Bedingungen gelösten ‘inclusion bodies‘ wurden in einem zweistufigen Prozess durch Verdünnung und Dialyse rückgefaltet (vgl. 3.2.4). Zur Optimierung des Prozesses wurden dem Renaturierungspuffer ein Gluthation-Redoxsystem, das die Bildung von Disulfidbrücken erleichtert, sowie Arginin als Chaotrop zugegeben. Da die Aktivierung der Pro‘-Tryptase mit Dipeptidylpeptidase I ein heparinabhängiger Prozeß ist (Sakai et al, 1996), wurde nach der Abspaltung des Fusionsproteins (vgl. 4.2.3) versucht, die rückgefaltete Pro‘-Tryptase durch Dipeptidylpeptidase I in Gegenwart von Heparin zu aktivieren. Dies gelang jedoch nicht; das Zymogen fiel nach der Zugabe von Heparin und DPP I nahezu quantitativ aus. Die Prozessierung der in *E. coli* exprimierten Zymogene zum reifen, enzymatisch aktiven Tetramer war damit nicht möglich.

5.5 Expression der Tryptasen in *Pichia pastoris*

Die Löslichkeit von Proteinen wird durch hydrophile Zuckerseitenketten beeinflusst (Glykosylierung). Die Tryptase-Isoenzyme $\alpha 1$, $\beta 1a$, $\beta 1b$ und $\beta 3$ besitzen zwei, die $\beta 2$ -Tryptase eine potentielle Glykosylierungsstelle, die bei der Expression in einem *prokaryotischen* Expressionssystem jedoch nicht zur Anheftung von Kohlenhydrat-Seitenketten benutzt werden. Die Instabilität der in *E.coli* hergestellten, rückgefalteten β -Tryptase ist somit möglicherweise auf die fehlende Glykosylierung zurückzuführen. Um glykosylierte Tryptasen herzustellen, wurde die Expression der Isoenzyme in einem Hefesystem untersucht, zumal gleichzeitig durch eine andere Gruppe die Expression von reifer $\beta 1$ -Tryptase in *Pichia pastoris* beschrieben wurde (Niles et al, 1998).

Das *Pichia* Expressionssystem pPICZ α ermöglicht eine Selektion über die Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin. Prinzipiell ist die Selektion von Stämmen, die das Resistenzgen mehrfach integriert haben, durch Verwendung höherer Zeocin-Konzentrationen möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch keine strenge Korrelation zwischen der Zeocinresistenz und der Expressionsausbeute festgestellt werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß Resistenz- und Expressionsgen nicht immer zusammen in das Hefegenom integriert wurde, oder daß Zeocin von resistenten Hefen zersetzt wird und somit benachbarte Klone geringere Zeocinkonzentration vorfinden. Trotz mehrfacher Subklonierung konnte die Korrelation von Zeocinresistenz und Expressionsausbeute jedoch nicht entscheidend verbessert werden. Die für die präparative Fermentation verwendeten Klone wurden deshalb durch Testexpressionen im 10 ml-Maßstab ermittelt.

Bei der Fermentation im 10 l-Fermenter lagen die Expressionsausbeuten bei den Isoenzymen $\alpha 1$, $\beta 1a$, $\beta 1b$ und $\beta 3$ -Tryptase zwischen 18 mg/l und 85 mg/l, während bei der $\beta 2$ -Tryptase nur 1,4 mg/l erzielt wurden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß das $\beta 2$ -Isoenzym im Gegensatz zu den anderen Tryptasen nicht zwei, sondern nur eine Konsensus-Glykosylierungsstelle aufweist. So sank z.B. bei der Expression von Granzym B in *Pichia pastoris* die Ausbeute um das 100-fache, als eine Glykosylierungsstelle deletiert wurde (Harris et al., 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden auch von anderen Arbeitsgruppen Tryptasen als Zymogene oder Pseudozymogene in Insektenzellen und in *Pichia pastoris* hergestellt

(Sakai et al. 1996, Huang et al. 1999, Chan et al., 1999). Aus diesen (Pseudo-) Zymogenen mußte das reife Enzym durch einen ein- oder mehrstufigen Aktivierungsprozess gewonnen werden. So erzielten Chan et al. (1999) in *Pichia pastoris* Ausbeuten von 6,5 mg/ml; jedoch waren 70 % der so erhaltenen Zymogene N-terminal verkürzt, so daß die weitere Prozessierung und Reinigung nur zu sehr geringen Ausbeuten an aktivem Enzym führte. Die durch andere Gruppen erzielten Ausbeuten sind zum Teil nicht spezifiziert oder in Aktivitäts-Einheiten angegeben, die nicht in Massen umgerechnet werden können. Gegenüber der Expression in Insektenzellen hat das von uns verwendete *Pichia pastoris*-Expressionssystem die Vorteile einer einfacheren Handhabung, höherer Ausbeuten, der Möglichkeit des ‚scale up‘ in den 10 l Fermenter und der einfachen Reinigung, da das rekombinante Protein in ein chemisch definiertes Minimal-Medium sezerniert wird.

Um bei der Expression reifer Tryptasen den tetrameren Zustand zu stabilisieren, setzen Niles et al. dem Expressionsmedium Heparin zu; ohne Heparin erhielten die Autoren nur geringe Mengen des aktiven Proteins. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß ein solcher Glycosaminoglykanzusatz nicht nötig ist, um aktive tetramere Tryptasen in *Pichia pastoris* herzustellen. Die unterschiedliche Stabilisierung ist möglicherweise auf den verwendeten Hefestamm zurückzuführen: Während wir den Stamm X33 verwenden, benutzten Niles et al. den Stamm GS115.

5.6 Reinigung

Die Reinigung der rekombinanten Tryptasen gestaltete sich relativ einfach, da die Proteine in ein Minimalmedium sezerniert wurden. Nach der Konzentrierung des durch ein *Pichia*-Pigment grünlich gefärbten Mediums über ein Tangentialflußsystem wurde der dabei entstehende Niederschlag durch Zentrifugation und Filtration (0,45 µm) entfernt. Der wahrscheinlich aus Hefezellen und Zellbestandteilen bestehende Niederschlag wurde nicht näher untersucht; er erklärt möglicherweise den deutlichen Ausbeuteverlust bei der Zentrifugation (vgl. Tabelle 4-3), da Tryptase an solche (proteoglykanhaltigen) Zell- und Membranbestandteile binden kann.

Aus dem so verarbeiteten Medium konnten die Tryptasen in einem Chromatographieschritt am Kationenaustauscher gereinigt werden. Die von Niles et al. (1998) beschriebene Kopurifikation des grünen *Pichia*-Pigmentes wurde dabei nicht

beobachtet. Auf einen von anderen Gruppen beschriebenen, zwei- oder mehrstufigen Reinigungsprozess mittels hydrophober Interaktionschromatographie, Antikörper-Affinitätssäulen, Benzamidin-Affinitätssäulen oder Heparin-Affinitätssäulen konnte somit verzichtet werden (Niles et al., 1998, Sakai et al., 1996, Chan et al., 1999). Dadurch war es möglich, die verschiedenen Isoformen ohne großen Aufwand an verschiedenen Säulen zu reinigen und die Gefahr einer Kreuzkontamination zu minimieren.

5.7 Tryptase Glykoformen

Die Trennung unterschiedlich stark glykosylierter Formen der Tryptase in die Pools F1 und F2 mittels Kationenaustauschchromatographie steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß auch Plasminogen-Glykoformen unterschiedliche Affinität zu Lysin-Sepharose zeigen (Hayes et al., 1979). Die nur eine potentielle N-Glykosilierungsstelle aufweisende β 2-Tryptase ist weniger stark glykosyliert und eluiert, wie auch die schwächer glykosylierten Formen der anderen Isoenzyme, bei geringfügig höheren Salzkonzentrationen.

Durch Deglykosylierung mit den Glykosidasen PNGase F und ENDO H konnte nachgewiesen werden, daß die Inhomogenität der rekombinanten Tryptase-Isoenzyme in der SDS-PAGE und im Western Blot auf unterschiedliche Glykoformen zurückzuführen ist. Während aus Lungengewebe gereinigte Tryptase (HLT) von ENDO H nicht deglykosyliert wird, werden die rekombinanten Tryptasen von diesem Enzym vollständig deglykosyliert; die Glykosylierung der rekombinanten Tryptasen ist somit vom mannosereichen Typ ist, die der Lungentryptase dagegen vom komplexen Typ (vgl. Alberts et al, 1989). Bei der Verwendung der rekombinanten Tryptasen in Untersuchungen zellulärer Effekte muss diese unterschiedliche Glykosylierung beachtet werden, da viele Zellerkennungsprozesse von der Struktur der Oligosaccharideinheiten der Glykoproteine abhängen (Dwek, 1995). Die Glykosylierung vom komplexen Typ der Lungen-Tryptasen unterscheidet sich auch vom (Mannose-6-phosphat enthaltenden) mannosereichen Typ der Granzyme. So werden Granzym A und B vor allem durch den Mannose-6-phosphat-Rezeptor in die Granula dirigiert (Griffith et al. 1993). Bei Tryptase muß dies also über andere Mechanismen geschehen.

Die Glykosylierung der β 2-Tryptase unterscheidet sich in ihrem Ausmaß von der aller anderen Isoenzyme. Die Glykosylierung von Proteinen kann nicht nur deren Struktur und Stabilität beeinflussen, sondern auch deren enzymatische und proteolytische Aktivität modulieren (Joao et al., 1992, Rudd et al., 1994). Dies ist z.B. für die wie Tryptase zur Familie der Serinproteasen gehörenden Enzyme tPa („tissue plasminogen activator“) (Wittwer et al., 1989, Rudd et al., 1995) und Plasminogen (Davidson et al., 1993, Rudd et al., 1995) bekannt. Somit könnte die in vielen Bereichen des Immunsystems beobachtete Regulation der Funktion durch Glykosylierung auch bei den Tryptasen zu einem Prinzip der Modulation der Aktivität oder der Substraterkennung gehören.

5.8 Stabilität der Isoenzyme

Unter physiologischen Bedingungen zerfällt das Tryptase-Tetramer in der Abwesenheit von Heparin in enzymatisch inaktive Monomere (Schwarz et al., 1986, Alter et al., 1987). Der Mechanismus der Monomerisierung und Re-Tetramerisierung war Gegenstand intensiver Untersuchungen (Schechter et al., 1993 und 1995, Addington et al., 1996, Ren, et al., 1998, Selwood et al., 1998). Bei diesen Untersuchungen wurden Tryptase-Präparationen verwendet, die aus Lungen- oder Hautgewebe gereinigt und nicht hinsichtlich ihrer Isoenzym-Zusammensetzung charakterisiert worden waren. Durch die rekombinante Herstellung der Tryptasen war es erstmals möglich, die Stabilität der einzelnen Isoenzyme zu vergleichen.

In der Abwesenheit von Heparin wurde die Stabilität über den mit dem Zerfall des Tetramers einhergehende Aktivitätsverlust der β -Tryptasen verfolgt; die Aktivität wurde dabei mit dem fluorogenen Substrat Bz-Arg-AMC bestimmt. Da α 1-Tryptase dieses Substrat nur sehr langsam spaltet, wurde bei diesem Isoenzym die Tetramerstabilität in Abwesenheit von Heparin mittels Gelfiltrations-Chromatographie analysiert.

Die thermische Stabilität der Tetramere wurde in einem Heparin-haltigen Puffer durch Aufzeichnung der Schmelzkurven in einem Spektropolarimeter bei 230 nm untersucht, da alle β -Isoenzym-Tetramere in der Abwesenheit von Heparin schon bei Raumtemperatur in einem thermodynamisch instabilen Bereich sind. Die Untersuchung basiert auf deutlichen Unterschieden zwischen den CD-Spektren von monomerer und tetramerer Tryptase: Nur die enzymatisch aktiven, tetrameren Tryptasen zeigen ein

negatives Maximum bei 230 nm, das beim Übergang in inaktive Monomere verschwindet. Die strukturelle Veränderung des aktiven Zentrums bei diesem Übergang führt zur Modifikation der Umgebung eines Tryptophanrestes (Trp-130 gemäß einem strukturbasierten Proteinsequenzvergleich von Johnson et al. (1992)). Viele Trysin-ähnliche Serinproteasen zeigen in ihrer aktiven Konformation dieses negative Maximum im CD-Spektrum, während ihre Zymogene im fernen UV CD-Spektren ähnlich denen der Tryptase-Monomere aufweisen.

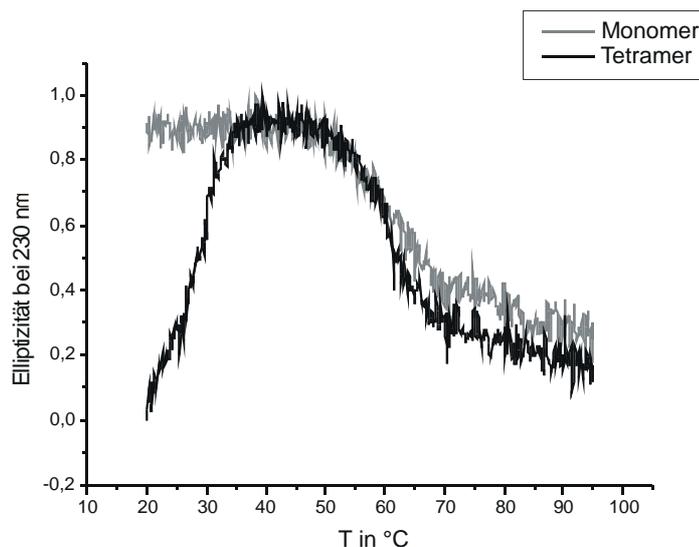


Abbildung 5-1: Schmelzkurve des β_3 -Tryptase-Monomers und -Tetramers in der Abwesenheit von Heparin.

Die Elliptizität bei 230 nm wurde bei steigender Temperatur aufgezeichnet. Die Schmelzkurve des isolierten Monomers ist grau, die des Tetramers in schwarz dargestellt.

Abbildung 5-1 zeigt, daß sich die Schmelzkurven von monomerer und tetramerer β_3 -Tryptase deutlich unterscheiden.

Die Schmelzkurve des Monomers zeigt einen einphasigen Übergang; er entspricht dem Verlust der Sekundärstrukturen und wird auch bei 215 nm beobachtet (in der Abbildung nicht gezeigt). In diesem Bereich ist der dichroische Effekt von β -Faltblatt- und α -Helix-Strukturelementen besonders stark (Johnson, 1990). Die Schmelzkurve des Tetramers zeigt dagegen einen zweiphasigen Übergang (vgl. Abbildung 5-1 und 4.5.3.2): Neben dem Verlust der Sekundärstruktur bei etwa 63°C ist der Zerfall des Tetramers in Monomere bei etwa 29°C sichtbar.

DISKUSSION

In Abbildung 5-2 sind die durch Aktivitätsmessung bestimmten Halbwertszeiten der β -Tryptasen und in Abbildung 5-3 die aufgezeichneten Schmelzkurven aller Isoenzyme grafisch verglichen.

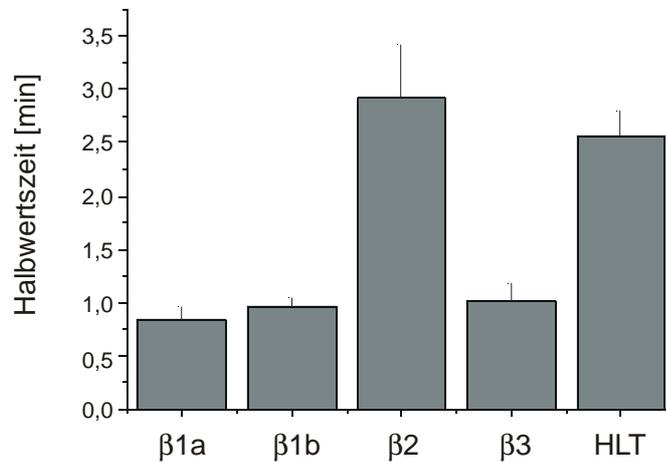


Abbildung 5-2: Halbwertszeiten der β -Tryptasen und der aus Lungengewebe isolierten Tryptase
Der Zerfall des Tetramers wurde in einem Puffer ohne Heparin durch Aufzeichnung der enzymatischen Aktivität verfolgt. Die Tryptasekonzentration betrug 2 nM. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM ($n = 4$) angegeben.

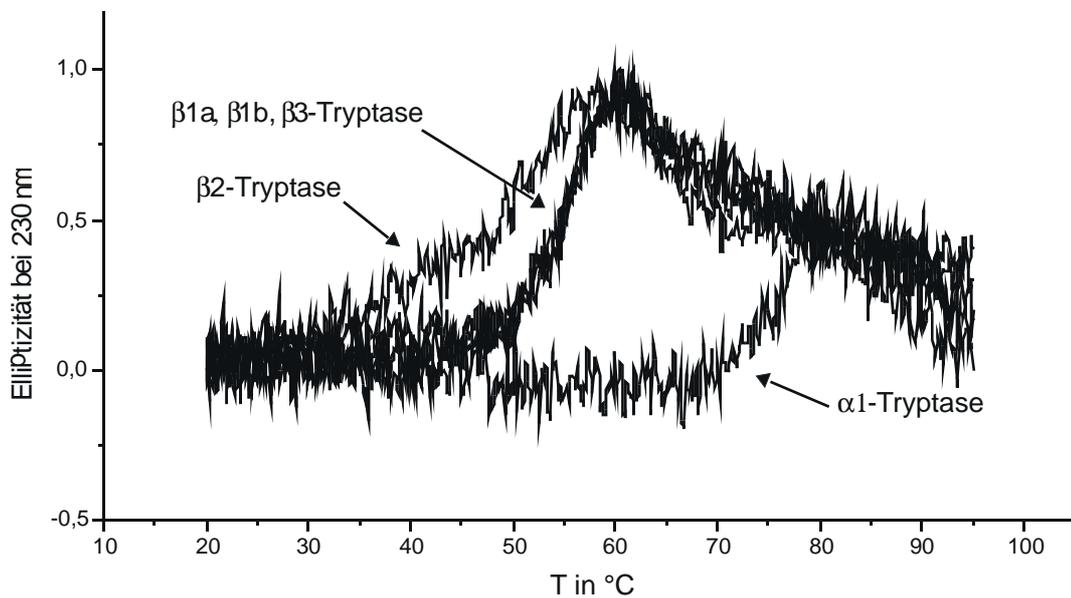


Abbildung 5-3: Schmelzkurven der Tryptase-Isoenzyme in der Gegenwart von Heparin.
Die Elliptizität bei 230 nm wurde bei steigender Temperatur aufgezeichnet. Die Schmelzkurven der Isoenzyme $\beta 1a$, $\beta 1b$ und $\beta 3$ sind nahezu identisch, während die Isoenzyme $\beta 2$ und $\alpha 1$ ein deutlich unterschiedliches Verhalten zeigen.

Der deutliche Stabilitätsunterschied zwischen der $\beta 2$ -Tryptase und der HLT (Halbwertszeiten 2,5 min – 2,9 min, Schmelzpunkt 47,7 °C) und den anderen

Isoenzymen (Halbwertszeiten 0,84 min - 1,02 min, Schmelzpunkte 54,0 – 55,3 °C) überrascht angesichts der 98% Identität der Aminosäuresequenzen der Isoenzyme. Die β 2-Tryptase weist jedoch als einziges Isoenzym nur eine N-Glykosylierungsstelle auf und ist deutlich schwächer glykosyliert als die anderen Isoenzyme. Da die Glykosylierung die Stabilität von Proteinen beeinflussen kann (Dwek, 1995, Wormald & Dwek, 1999), ist der beobachtete Stabilitätsunterschied möglicherweise auf die unterschiedliche Glykosylierung zurückzuführen. Die geringere thermische Stabilität des β 2-Tryptase-Tetramers steht im Gegensatz zu der größeren Stabilität bei der Aktivitätsmessung in der Abwesenheit von Heparin. Dieser Befund steht jedoch im Einklang mit der Beobachtung, daß die Tryptase mMCP-7 (Mouse mast cell protease-7) thermisch instabiler wird, wenn eine ihrer beiden N-Glykosylierungsstellen durch Mutagenese entfernt wird (Huang et al., 2000).

Das α 1-Tryptase-Tetramer zeigt sowohl in der Abwesenheit von Heparin bei der Analyse mittels Gelfiltrations-Chromatographie wie auch bei der thermischen Denaturierung eine bemerkenswert hohe Stabilität: Die Inkubation über 24 h in Abwesenheit von Heparin zeigte, daß das Tetramer weitgehend stabil ist. Bei der thermischen Denaturierung konnte für das α 1-Tryptase-Tetramer kein Schmelzpunkt T_m1 ermittelt werden, der dem Zerfall des Tetramers in Monomere entspricht. Wie aus den Schmelzkurven ersichtlich, entspricht der Übergang vielmehr der Denaturierung der Monomere und somit dem Schmelzen der Sekundärstrukturen. Dieser Vorgang wird durch den Schmelzpunkt T_m2 charakterisiert, der bei der α 1-Tryptase in der Abwesenheit von Heparin (in der Abbildung nicht gezeigt) bei 62,9°C und bei in Gegenwart von Heparin bei 75°C liegt. Da sich α 1-Tryptase in ihrem Glykosylierungsmuster nicht von den Isoenzymen β 1a, β 1b und β 3 unterscheidet, muß die ungewöhnliche Stabilität auf andere Wechselwirkungen zurückzuführen sein. Zur Klärung dieser Stabilität sowie der weitgehenden enzymatischen Inaktivität der α 1-Tryptase (siehe 5.10.1) wurde die Röntgenkristallstruktur dieses rekombinant hergestellten Isoenzym von Ulf Marquardt (MPI für Biochemie AG Bode/Huber) gelöst (siehe 5.9).

5.9 Kristallstruktur des α 1-Tryptase-Tetramers

Obwohl die Sequenz der α 1-Tryptase zu über 95% identisch mit denen der β -Tryptasen ist, unterscheidet sich dieses Isoenzym hinsichtlich der Aktivität und Stabilität deutlich von den β -Isoenzymen. Der strukturelle Vergleich der α 1-Tryptase und der β 2-Tryptase (in Abbildung 5-4) zeigt, daß die Sequenzunterschiede überwiegend im Bereich des aktiven Zentrums und im Bereich der Monomer-Monomer-Kontaktbereiche liegen.

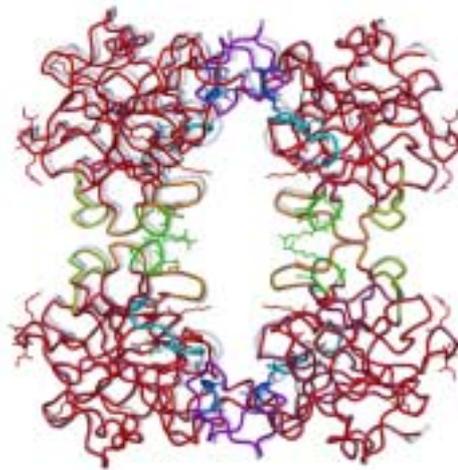


Abbildung 5-4: Überlagerung der Strukturen der α 1- und β 2-Tryptase
 α 1-Tryptase ist farbig, β 2-Tryptase grau gezeichnet. Nur diejenigen Aminosäure-Seitenketten der α 1-Tryptase, die sich von denen der β 2-Tryptase unterscheiden sind dargestellt.

Mögliche Ursachen für die höhere Stabilität der α 1-Tryptase zeigt die Analyse des Kontaktbereichs zwischen den Monomeren A/B und C/D. So ist in der α 1-Tryptase im Vergleich zur β 2-Tryptase eine zusätzliche Salzbrücke zwischen Arg23 und Glu137 möglich. Durch den Austausch von Arg138 (in der β 2-Tryptase) durch Pro138 (in der α 1-Tryptase) entfällt zudem eine ungünstige Ladungsabstoßung zwischen zwei Argininresten was eine engere Zusammenlagerung der Monomere (und somit die Stärkung der hydrophoben Wechselwirkungen) ermöglicht (vgl. 4.5.3.).

Der Vergleich der aktiven Zentren (Abbildung 4-22) zeigt, daß nur eine Aminosäure, der Austausch eines Glycins durch Asparaginsäure (Gly215 \rightarrow Asp), zu einer Blockade der Substratbindungstasche durch das Peptidsegment Ser213 – Gln219 führt. Da α 1-Tryptase einige Substrate mit sehr geringer Aktivität spaltet, ist anzunehmen, daß diese Peptidschleife eine geringe Flexibilität zeigt.

Die Annahme, daß die geringe Aktivität der α 1-Tryptase wesentlich durch die Aminosäure 215 bedingt ist, wird auch dadurch bestätigt, daß die Mutagenese der Asparaginsäure zu Glycin zu aktiver α 1-Tryptase führt (Huang et al. 1999). Diese Variante ist jedoch weniger aktiv als die β -Tryptasen (k_{cat} gegen tos-Gly-Pro-Arg-pNA um den Faktor 10 niedriger). Dies legt den Schluß nahe, daß weitere Unterschiede in den Spezifitätstaschen eine für die Aktivität entscheidende Rolle spielen.

5.10 Kinetische Charakterisierung der Isoenzyme

5.10.1 α 1-Tryptase

Ein markanter Unterschied zwischen den Isoenzymen ist die nahezu völlig fehlende enzymatische Aktivität der α 1-Tryptase. Dieses Isoenzym spaltet die fluorogenen Substrate tos-Gly-Pro-Arg-AMC und Bz-Arg-AMC fast nicht; auch die ‚active site-Titration‘ war aufgrund der zu geringen Aktivität gegenüber dem verwendeten Suizidsubstrat nicht möglich (vgl. 4.5.1). Physiologisch relevante Substrate der β -Tryptasen wie VIP (Daten nicht gezeigt) sowie die α - und β -Ketten von Fibrinogen (Huang et al. 1999) werden von α 1-Tryptase nicht hydrolysiert. Bemerkenswert ist, daß sich der K_m -Wert der Interaktion der α 1-Tryptase mit dem Substrat tos-Gly-Pro-Arg-AMC kaum von denen der β -Tryptasen unterscheidet, während der k_{cat} -Wert um den Faktor 10^6 niedriger ist (vgl. Tabelle 4-9 und Abbildung 5-5). Diese Daten lassen vermuten, dieses Substrates an die aktive Zentren der α 1- und β -Tryptase ähnlich gut bindet, die Spaltung dann allerdings wesentlich langsamer abläuft.

Solange physiologisch relevante Substrate für α 1-Tryptase nicht identifiziert werden, bleibt die biologische Funktion dieses Isoenzymen unklar. Möglicherweise ist es ein Antagonist der β -Tryptase und schützt deren Substrate vor dem Abbau. α 1-Tryptase könnte aber auch ähnlich wie Antithrombin III oder Lactoferrin (Alter et al., 1990, Rice et al., 1998) mit β -Tryptasen um stabilisierende Proteoglykane kompetieren und so deren Aktivität regulieren.

5.10.2 β -Tryptasen

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die enzymkinetischen Eigenschaften aller bekannten β -Isoenzyme verglichen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den

kinetischen Konstanten von HLT und den rekombinanten Tryptasen gegenüber dem fluorogenen Substrat tos-Gly-Pro-Arg-AMC konnte jedoch nicht ermittelt werden (vgl. Abbildung 5-5). Auch untereinander zeigen die Isoenzyme keinen signifikanten Aktivitätsunterschied. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Isoenzyme hinsichtlich der Spaltung höhermolekularer Substrate wie Peptiden und Proteinen unterscheiden.

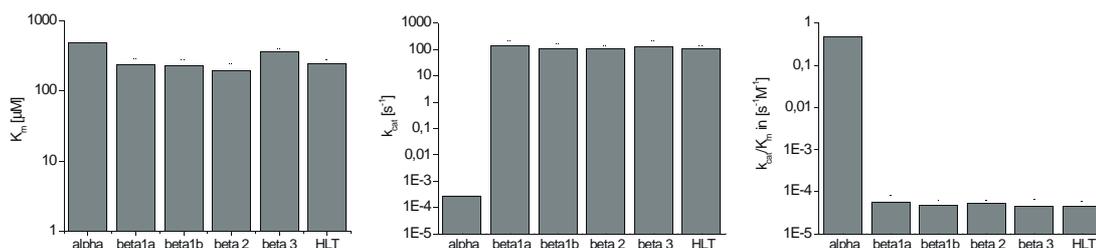


Abbildung 5-5: Vergleich der kinetischen Kenngrößen K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m der Tryptase Isoenzyme und des aus Lungengewebe isolierten Enzyms (HLT)

Die bisher veröffentlichten Daten zu den kinetischen Kenngrößen der rekombinanten β -Tryptasen sind widersprüchlich. So fanden Chan et al. (1999), daß rekombinante β 1-Tryptase ähnliche K_m und k_{cat} Werte aufweist wie aus Zellen und Lungengewebe gereinigtes Enzym. Dagegen beobachteten Niles et al. (1998) ähnliche K_m Werte, aber einen doppelt so hohen k_{cat} Wert für die rekombinante Tryptase. Möglicherweise sind diese Unterschiede auf die unterschiedlichen Substrate, die in diesen Studien verwendet wurden, zurückzuführen.

5.11 Hemmkinetische Charakterisierung

Bei der hemmkinetischen Charakterisierung von Tryptase-Präparationen, die aus Lungengewebe gereinigt worden waren, wurden zwei ‚Tryptase-Spezies‘ identifiziert, die sich in ihrer Hemmbarkeit durch bivalente Inhibitoren deutlich unterscheiden (G. Matschiner, pers. Mitteilung). Um zu untersuchen, ob diese ‚Tryptase-Spezies‘ den Isoenzymen zugeordnet werden können, wurden die Hemmung der rekombinanten β -Tryptasen im Vergleich zur HLT durch verschiedene Inhibitoren analysiert; aufgrund der geringen proteolytischen Aktivität war die entsprechende Untersuchung der α 1-Tryptase nicht möglich. Die Ergebnisse zeigen, daß die K_i -Werte der Komplexe der Inhibitoren mit den verschiedenen Isoenzymen ähnlich sind (vgl. Abbildung 5-6), die Tryptase-Spezies können somit nicht den Isoenzymen zugeordnet werden.

Allerdings zeigt das Isoenzym $\beta 1b$ ebenso wie HLT bei der Hemmung durch den bivalenten Inhibitor Byk-60603 eine Restaktivität, die erst durch deutlich höhere Konzentrationen des Inhibitors hemmbar ist (vgl. Abbildung 4-19). Das rekombinante Isoenzym $\beta 1b$ besteht also wie die HLT aus einer niederaffinen und einer hochaffinen Spezies.

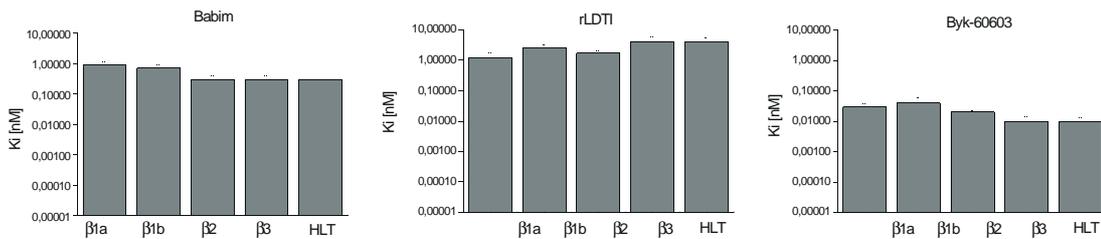


Abbildung 5-6: Vergleich der Hemmung der β -Tryptasen und der aus Lungengewebe isolierten Protease durch verschiedene Inhibitoren

Um die Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens gegenüber bivalenten Inhibitoren zu klären und diese ‚Spezies‘ genauer charakterisieren zu können, wurden sie mittels Affinitätschromatographie getrennt (siehe 5.13).

5.12 Bivalent bindende Inhibitoren

Die Architektur des Trypsin-Tetramers führt zu einem definierten Abstand der vier aktiven Zentren innerhalb eines Tetramers. Diese Anordnung ermöglicht eine Interaktion der Trypsinen mit homobivalenten Inhibitoren. Ein bivalent bindender Inhibitor sollte gegenüber einem monovalent bindenden entropisch begünstigt sein. Wie in Tabelle 4-12 gezeigt ist die Dissoziationskonstante K_i des Komplexes des Trypsin-Tetramers mit dem (relativ starren) bivalenten Inhibitor NS-222 im Vergleich zur monovalenten Kopfgruppe um 5 Zehnerpotenzen niedriger (17 μM bzw. 0,6 nM), während sich die K_i -Werte der Hemmung von Trypsin nur um den Faktor 10 unterscheiden (43 μM bzw. 4,8 μM). Die experimentell bestimmte Dissoziationskonstante K_i des Komplexes des bivalenten Hemmstoffs mit Trypsin entspricht somit nahezu exakt der für eine bivalente Bindung theoretisch erwarteten K_i , die sich wie folgt errechnet:

$$K_{i,\text{bivalent}} = (K_{i,\text{monovalent}})^2$$

Der Faktor α der das Ausmaß der Kooperativität angibt, ist wie folgt definiert:

$$\alpha = \frac{\log K_{i, \text{bivalent}}}{\log K_{i, \text{monovalent}}}$$

Für den Tryptase/NS-222-Komplex errechnet sich ein α von 1,9 im Vergleich zu dem maximal erreichbaren theoretischen Wert von 2 (Mammen et al., 1998).

Diese kinetischen Daten belegen die homobivalente Inhibition des Tryptase Tetramers durch NS-222. Die thermodynamischen Grundlagen für eine bivalente Inhibition des Tryptase-Tetramers sind in Abbildung 5-7 zusammengefaßt. Bei der bivalenten Bindung eines starren Inhibitors resultiert im Vergleich zur monovalenten Inhibition ein Energiegewinn. Dieser basiert auf dem Entropieterm, der vor allem durch den Verlust von Translations- und Rotationsentropie der Kopfgruppen entsteht (vgl. Abbildung 5-7 A und B). Dagegen kann bei einem Inhibitor mit einem flexiblen ‚Spacer‘ dieser Entropieverlust fast vollständig durch den Gewinn von Konformationsentropie aufgezehrt werden (vgl. Abbildung 5-7 C).

Die bivalente Bindung des Inhibitors NS-222 an die aktiven Zentren der Monomere A und D (bzw. C und B) überbrückt den Kontakt zwischen diesen Monomeren und sollte deshalb zu einer thermodynamisch nachweisbaren Stabilisierung des Tetramers führen. Überraschenderweise steigert schon die Inhibition durch die monovalente Kopfgruppe die thermodynamische Stabilität des Tetramers deutlich (Schmelzpunktunterschied 20,0°C); der zusätzliche Effekt des bivalenten Inhibitors war dagegen nur gering (Schmelzpunktunterschied 1,3°C). Die Stabilisierung des Tryptase-Tetramers durch den monovalenten Inhibitor ist ein weiterer Hinweis, daß die isolierten Monomere eine Zymogen-artige Konformation haben (vgl. die CD Spektren in 4.5.3.2). In der Zymogen-Konformation ist das aktive Zentrum nicht vollständig ausgebildet (Huber et al., 1978, Bode, 1979); die Bindung des Inhibitors an das aktive Zentrum stabilisiert andererseits den aktiven Zustand und damit die quaternäre Struktur. Es erscheint möglich, daß analog auch die Interaktion mit Substraten das Tetramer stabilisiert; damit wäre Tryptase eine Protease, die sich nach dem Verbrauch des Substrates selbst ‚abschaltet‘.

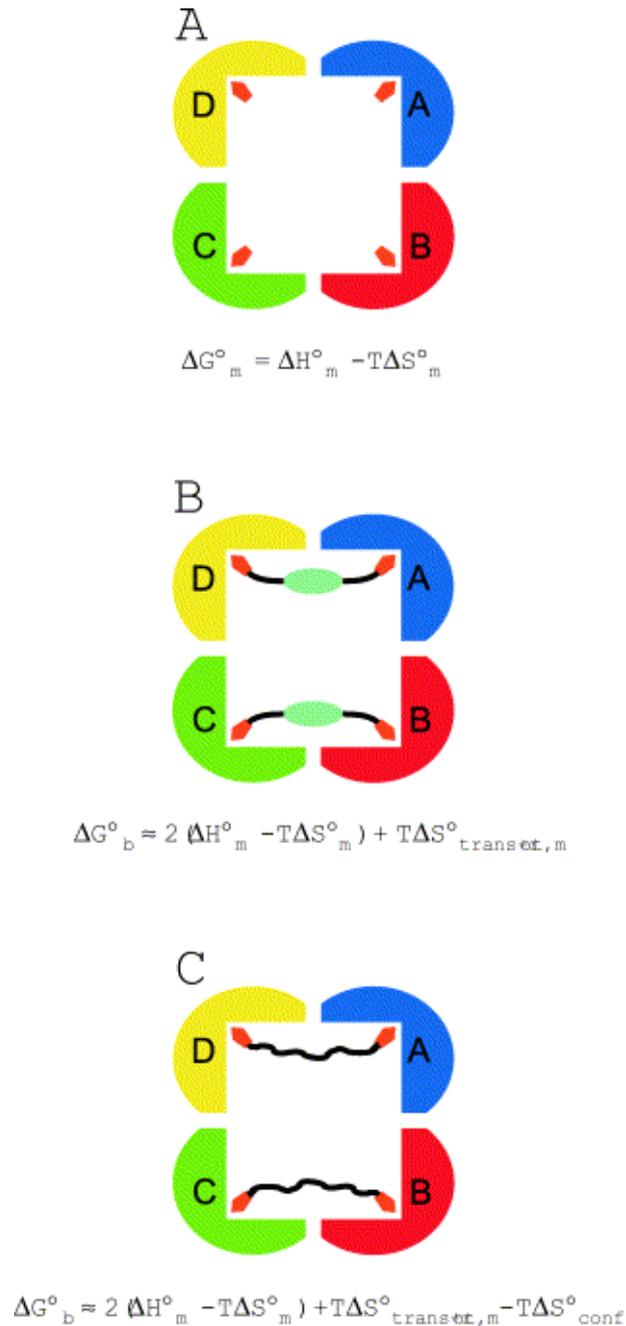


Abbildung 5-7: Thermodynamik der mono- und bivalenten Inhibition von β -Tryptasen (Schaschke et al., 2001).

A: Kopfgruppen alleine, B: Bivalenter Inhibitor mit perfektem starren ‚Spacer‘, C: Bivalenter Inhibitor mit flexiblem Spacer.

ΔG_m° = freie Energie der monovalenten Inhibition, ΔH_m° = freie Enthalpie der monovalenten Inhibition, $T\Delta S_m^{\circ}$ = freie Entropie der monovalenten Inhibition, $T\Delta S_{\text{trans,rot,m}}^{\circ}$ = Translations und Rotationsentropie bei der monovalenten Bindung, $T\Delta S_{\text{conf}}^{\circ}$ = Konformationsentropie bei der bivalenten Bindung, ΔG_b° = freie Energie der bivalenten Inhibition.

Mit Hilfe der rekombinant hergestellten Tryptasen gelang es in dieser Arbeit erstmals, die *homobivalente* Bindung eines Inhibitors an zwei aktive Zentren einer Protease auch strukturell zu belegen (vgl. Abbildung 4-24). Abbildung 5-8 zeigt das basierend auf der

Röntgenstruktur angefertigte Modell des Komplexes des $\beta 3$ Tryptase-Tetramers mit dem Inhibitor NS-222.

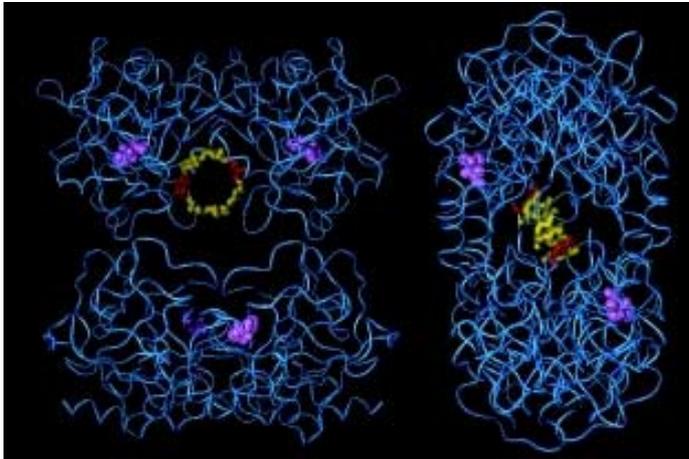


Abbildung 5-8: Bänderdarstellung des Modells der $\beta 3$ -Tryptase im Komplex mit NS-222 (Aus Schaschke et al., 2001).

Tryptase ist in blau, das in die aktiven Zentren gebundene APPA in violett dargestellt. Der Cyclodextrinring des Inhibitors ist gelb und rot eingefärbt, dabei entsprechen die rot gefärbten Zuckereinheiten diejenigen an die das reaktive Zentrum gebunden ist.

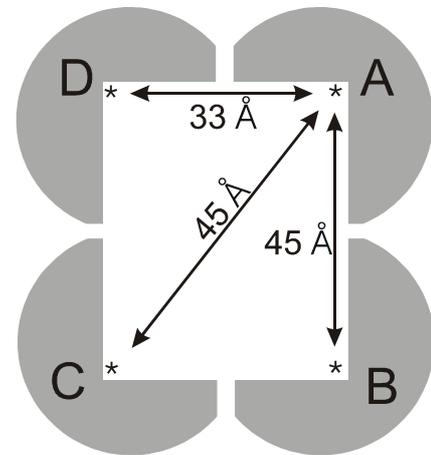


Abbildung 5-9: Abstand der aktiven Zentren im β -Tryptase Tetramer (Schaschke et al., 2001)

Ein bivalenter Inhibitor mit entsprechendem Abstand der reaktiven Zentren kann aufgrund der Abstandsverhältnisse im Tryptase-Tetramer nur die Kontaktflächen zwischen den Monomeren A und D (bzw. B und C) überbrücken.

Der strukturelle Nachweis einer multivalenten Enzyminhibition war bis vor kurzem nur durch die Röntgenkristallstruktur des Thrombin/Hirudin Komplexes gelungen (Rydel et al., 1990). Die hohe Affinität und Selektivität dieses Inhibitors basiert auf der Interaktion von zwei verschiedenen Hemmstoffdomänen mit dem aktiven Zentrum bzw. der Fibrinogenbindungsstelle des Thrombins. Heterobivalente Inhibitoren des 20S Proteasoms von *Saccharomyces cerevisiae* zeigten erstmals die selektive Inhibition eines tryptischen und eines chymotryptischen aktiven Zentrums (Loidl et al., 1999, Loidl et al., 2000).

In Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Bär (Byk-Gulden, Konstanz) und Ulf Marquardt (MPI für Biochemie, AG W. Bode) wurden die Strukturen der Komplexe von zwei weiteren bivalenten Inhibitoren mit Tryptase aufgeklärt: Der Inhibitor Byk-150640 bindet, ähnlich wie NS-222, bivalent an das Tryptase-Tetramer. Dagegen interagiert der Hemmstoff Byk-76935 nur mit einer Kopfgruppe mit einem aktiven Zentrum des Tetramers. Basierend auf diesen Röntgenstrukturen ist die gezielte Optimierung dieser Inhibitoren möglich.

5.13 Tryptase Spezies

Die bei der hemmkinetischen Analyse mit bivalenten Inhibitoren identifizierten ‚Tryptase-Spezies‘ konnten nicht den Tryptase Isoenzymen zugeordnet werden (vgl. 5.11). Diese hochaffinen und niederaffinen ‚Tryptase-Spezies‘ konnten nur durch ihre unterschiedliche Affinität zu bivalenten Inhibitoren charakterisiert werden. Dieses Hemmverhalten ist möglicherweise dadurch bedingt, daß der bivalente Inhibitor an die niederaffine Tryptase nur monovalent bindet.

Da die β 1b-Tryptase einen relativ großen Anteil der Glycoform mit einer Masse von etwa 50 kD enthält (vgl SDS-PAGE Seite 72) und sich in dieser Hinsicht von den anderen Isoenzymen unterscheidet wurde untersucht, ob die angehefteten Oligosaccharide die Bindungsaffinität von bivalenten Inhibitoren beeinflußt. Der hemmkinetische Vergleich von tetramerer β 1b-Tryptase sowohl im unbehandelten wie auch im deglykosylierten Zustand zeigte jedoch identisches Verhalten (Daten nicht gezeigt), d.h. die Oligosaccharide beeinflussen die Affinität des assemblierten Tryptase-Tetramere zu bivalenten Inhibitoren nicht. Möglicherweise wird aber durch die Oligosaccharide die Quaternäre Struktur des Tetramers beim Aufbau aus den Monomeren beeinflußt. Zur weiteren Untersuchung der Ursachen des unterschiedlichen Verhaltens der Spezies gegenüber bivalenten Inhibitoren war zunächst ihre Trennung notwendig

5.13.1 Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘

Basierend auf der unterschiedlichen Affinität der ‚Tryptase-Spezies‘ zu bivalenten Inhibitoren erschien es möglich, sie mittels Affinitätschromatographie zu trennen. Die zu diesem Zweck von Dr. Norbert Schaschke (MPI Biochemie, AG Moroder) synthetisierte Affinitätsmatrix ist in Abbildung 5-10 dargestellt.

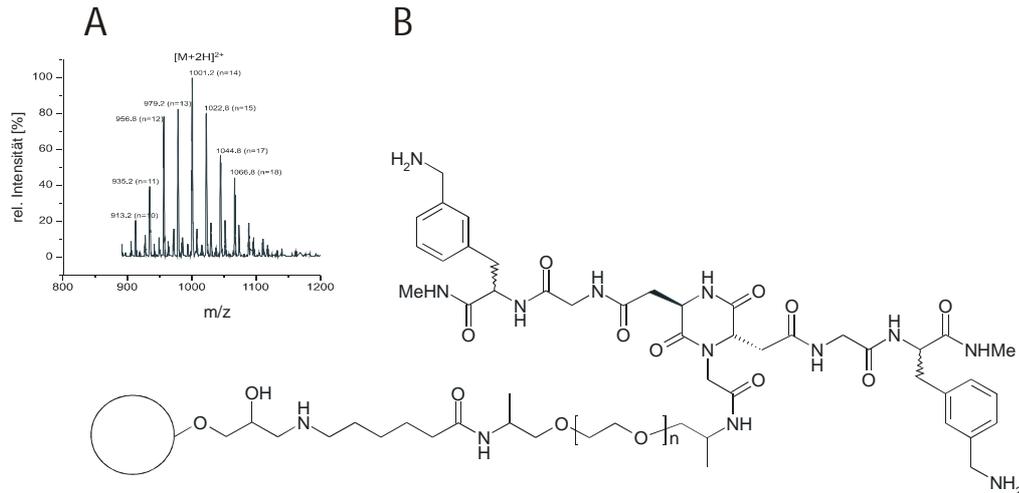


Abbildung 5-10: Struktur der Affinitätsmatrix NS-358 und Verteilung der Spacerlänge.
 Im Massenspektrogramm (A) ist die Verteilung der Spacerlängen mit einem Maximum bei $n = 14$ angegeben. Die Struktur der Verbindung ist in B dargestellt.

Der freie, nicht nicht immobilisierte Inhibitor hemmt die hochaffine Tryptase mit einer 100-fach niedrigeren K_i als die niederaffine Spezies (50 nM und 3,8 μ M).

Bei der Elution der an die Affinitätsäule gebundenen Tryptase mit einem NaCl-Gradienten wurden Gemische von hoch- und niederaffiner Tryptase gewonnen. Dagegen bestand die nicht an die Säule bindende Fraktion (Durchlauf) bzw. das Material, das erst mit Benzamidin (1 mM) eluiert werden konnte, überwiegend aus niederaffiner bzw. hochaffiner Spezies. Tabelle 5-1 gibt einen Überblick über den Anteil der niederaffinen Spezies in den verschiedenen Elutions-Fractionen.

Fraktion	Anteil der niederaffinen Spezies [%]
Durchlauf	80
F 9	74
F 11	69
F 18	43
F 22	35
Benzamidin-Eluat	0

Tabelle 5-1: Trennung der Spezies mittels Affinitätschromatographie
 Der Anteil der niederaffinen ‚Tryptase Spezies‘ in den einzelnen Fraktionen wurde über die Hemmung durch den bivalenten Inhibitor Byk-60603 ermittelt.

5.13.2 Charakterisierung der Tryptase-Spezies mit Inhibitoren

Die Bestimmung der K_i -Werte der ‚Tryptase-Spezies‘ mit bivalenten Inhibitoren unterschiedlicher Spacerlängen erlaubt Aussagen zum Abstand der aktiven Zentren benachbarter Untereinheiten des Tetramers: Ein bivalenter Inhibitor kann nur dann bivalent und damit mit deutlich niedrigeren K_i -Werten an das Tryptase-Tetramer binden, wenn der Abstand der reaktiven Zentren eine Interaktion mit benachbarten aktiven Zentren des Tetramers erlaubt (vgl. 5.12).

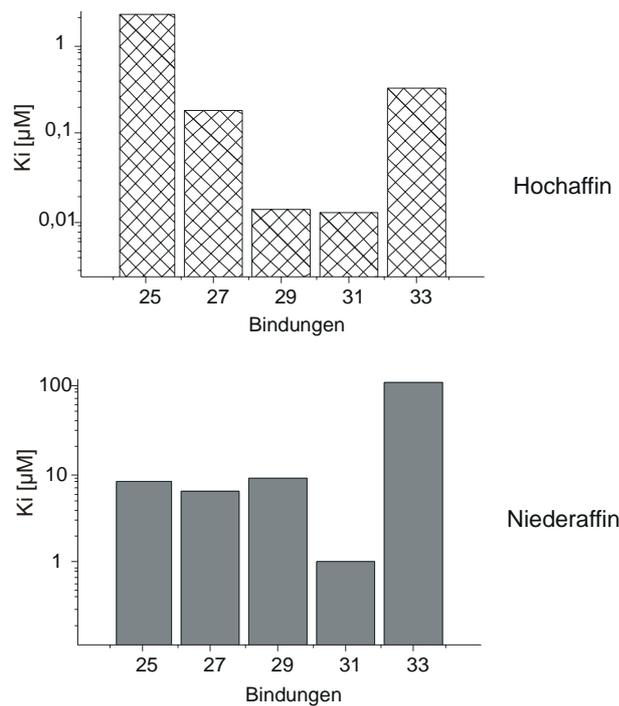


Abbildung 5-11: Dissoziationskonstanten K_i der Komplexe der ‚Tryptase-Spezies‘ mit verschiedenen bivalenten Inhibitoren mit unterschiedlicher Spacer-Länge (25 – 33 Bindungen)

In Abbildung 5-11 sind die experimentell bestimmten Werte grafisch dargestellt. Die hochaffine Spezies wird durch bivalente Inhibitoren mit 29 – 31 Bindungen zwischen den Kopfgruppen um den Faktor 100 besser gehemmt als durch den Inhibitor mit einem Abstand von 25 Bindungen zwischen den Kopfgruppen. Im Gegensatz dazu wird die beste Hemmung der niederaffinen Spezies erst bei einem Kopfgruppenabstand von 31 Bindungen erreicht, die K_i sinkt dabei nur um den Faktor 10 (Abbildung 5-11 unten). Da die hochaffine Tryptase verglichen mit der niederaffinen schon bei einem kürzeren Spacer das Minimum ihrer K_i gegen den betrachteten Inhibitorensatz erreicht, ist

möglicherweise der Abstand der aktiven Zentren in der hochaffinen Spezies kleiner als in der niederaffinen. Zwei stark vereinfachte Modelle für einen solch unterschiedlichen Abstand der aktiven Zentren und deren Inhibition ist in Abbildung 5-12 gezeigt. Da die Hemmbarkeit der niederaffinen Spezies (K_i -Werte $1 \mu\text{M} - 110 \mu\text{M}$) aber niemals die der hochaffinen erreicht (K_i -Werte $0,013 \mu\text{M} - 2,27 \mu\text{M}$), scheint der größere Abstand der aktiven Zentren nicht durch eine einfache Translation der Monomere zu entstehen (vgl. Abbildung 5-12 B). Denkbar wäre eine kompliziertere Änderung der Orientierung im Tetramer, etwa durch eine Rotation (vgl. Abbildung 5-12 C).

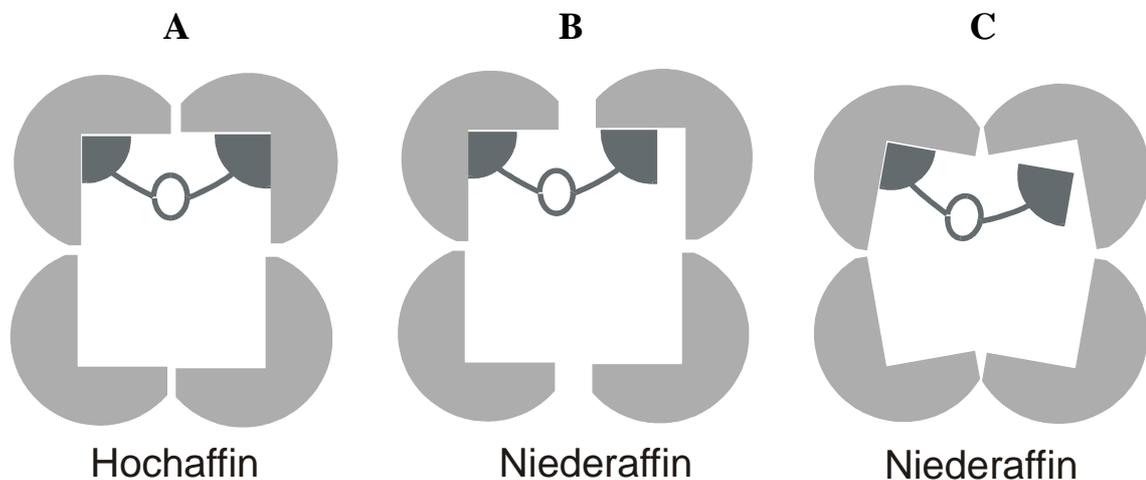


Abbildung 5-12: Modell der Inhibition der hoch- und niederaffinen Tryptase-Spezies durch bivalente Inhibitoren.

A: ‚Hochaffine Tryptase‘ wird bivalent gehemmt. B und C: ‚Niederaffine Tryptase‘ wird von einem bivalenten Inhibitor monovalent gehemmt, da der Abstand der aktiven Zentren zu groß ist oder sich die Orientierung der aktiven Zentren im Tetramer geändert hat.

Die Ursache für einen unterschiedlichen Abstand oder eine unterschiedliche Ausrichtung der Monomere im Tetramer ist weiterhin unklar. Initiale Untersuchungen von Matschiner (pers. Mitteilung) zeigten jedoch daß sich der Anteil an hoch und niederaffiner Tryptase in einem Gemisch auch dann nicht ändert, wenn das Gemisch monomerisiert und anschließend wieder tetramerisiert wird. Diese Daten deuten darauf hin, daß das Phänomän schon durch eine Eigenschaft des Monomers, etwa Faltungsisomerie bedingt ist.

5.14 Ausblick

Die rekombinante Herstellung der Tryptase-Isoenzyme ermöglicht erstmals die vergleichende Charakterisierung dieser Proteasen, die ausgehend von Geweben bisher nicht rein dargestellt werden konnten. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Unterschieden hinsichtlich ihrer Aktivität und Stabilität soll jetzt insbesondere die Substratspezifität der verschiedenen Tryptasen verglichen und mit ihrer Expression bei verschiedenen Erkrankungen verglichen werden, um ihre pathophysiologischen Bedeutung zu untersuchen. Darüberhinaus sollen die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse zur proteolytischen Aktivität der isolierten Tryptase Monomere und ihrer Re-Assemblierung zum enzymatisch aktiven Tetramer überprüft werden. Sie sind möglicherweise auf die in den Studien verwendeten heterogenen, aus Geweben isolierten Tryptasen zurückzuführen.

Weiterer Untersuchung bedarf die ungewöhnliche Substratspezifität der α 1-Tryptase. So sollen physiologisch relevante Substrate für α 1-Tryptase identifiziert werden, und auch ihr Einfluß als Heparinantagonist (und somit ‚Inhibitor‘) auf β -Tryptasen näher untersucht werden.

Nachdem in einem Schafsmodell die Wirksamkeit von Tryptaseinhibitoren beim Asthma gezeigt wurde (Molinari et al., 1996), versuchen mehrere Arbeitsgruppen und die pharmazeutische Industrie Tryptaseinhibitoren als Medikamente zu entwickeln. Die hier erarbeiteten Bedingungen zur Kokristallisation von Tryptase mit Inhibitoren und die bereits aufgeklärten Strukturen ermöglichen jetzt ein rationales Design. Durch die weitere Optimierung der Expression und Reinigung der schwächer glykosilierten (und damit besser zur Kristallisation geeigneten) β 2-Tryptase sollte es ermöglichen ausreichend Material für intensivere Kristallisationsstudien zur Verfügung zu stellen.

Die Identifizierung und Trennung der ‚Tryptase-Spezies‘, die durch bivalente Inhibitoren mit deutlich unterschiedlicher Affinität gehemmt werden, ermöglicht erstmals ihre Analyse und Charakterisierung. Somit sollte es möglich sein, sowohl ihre molekulare Genese als auch ihre potentielle (patho)physiologische Relevanz aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., (1989) *Molecular Biology of the cell* (R. Adams, A. Walker, eds.), New York, Garland 446-455.
- Alter, S. C., Metcalf, D. D., Bradford, T.R. and Schwarz, L.B. (1987) Regulation of human mast cell tryptase. Effects of enzyme concentration, ionic strength and the structure and negative charge density of polysaccharides *Biochem J.* **248**, 821 – 827.
- Addington, K. A. and Johnson, D.A. (1996) Inactivation of human lung tryptase: evidence for a re-activatable tetrameric intermediate and active monomers *Biochemistry* **35**, 13511 – 13518.
- Birnboim, H. C., Doly, J., (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **337**, 385 – 386.
- Blair R.J., Meng H., Marchese M.J., Ren S., Schwartz L.B., Tonnesen M.G., & Gruber B.L. (1997) Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest* **99**, 2691-700.
- Bode, W. (1979) The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. II. The binding of the pancreatic trypsin inhibitor and of isoleucine-valine and of sequentially related peptides to trypsinogen and to p-guanidinobenzoate-trypsinogen *J. Mol. Biol.* **127**, 357-374.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Buchner J. & Rudolph R. (1991) Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* **9**, 157-62.
- Cairns J.A. & Walls A.F. (1997) Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J Clin Invest* **99**, 1313-21.

- Caughey, G. H., Lazarus, S.C., Viro, N. F. and Nadel, J. A. (1988) Tryptase and Chymase: comparison of extraction and release in two dog mastocytoma lines. *Immunology*, **63**, 339-344
- Caughey G.H., Leidig F., Viro N.F., & Nadel J.A. (1988) Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 133-7.
- Caughey G.H., Raymond W.W., Blount J.L., Hau L.W., Pallaoro M., Wolters P.J., & Verghese G.M. (2000) Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostasin gene families. *J Immunol* **164**, 6566-75.
- Caughey, G. H., Raymond, W. W., Blount, J. L., Hau, W.T., Pallaoro, M. Wolters, P.J. and Verghese G. M. (2000) Characterization of human γ -tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostasin gene families *J. Immunol.* **164** 6566-6575
- Chan, H, Tanaka, R. and Clark, J., (1995), Tryptase cDNA sequences in a human mast cell line *FASEB J* **9**: A1343,
- Chan, H., Elrod, K.C. Numerof, R.P., Sideris, S., Clark, J.M. (1999) Expression and Characterization of recombinant mast cell tryptase *Prot. Expr. Purif.* **15**, 251-257
- Creighton T.E. (1984) Disulfide bond formation in proteins. *Methods Enzymol* **107**, 305-29.
- Davidson D.J. & Castellino F.J. (1993) The influence of the nature of the asparagine 289-linked oligosaccharide on the activation by urokinase and lysine binding properties of natural and recombinant human plasminogens. *J Clin Invest* **92**, 249-54.
- De Sanctis G.T., Merchant M., Beier D.R., Dredge R.D., Grobholz J.K., Martin T.R., Lander E.S., & Drazen J.M. (1995) Quantitative locus analysis of airway hyperresponsiveness in A/J and C57BL/6J mice. *Nat Genet* **11**, 150-4.

- Derman A.I., Prinz W.A., Belin D., & Beckwith J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli. *Science* **262**, 1744-7.
- Doherty A.J., Ashford S.R., Brannigan J.A., & Wigley D.B. (1995) A superior host strain for the over-expression of cloned genes using the T7 promoter based vectors. *Nucleic Acids Res* **23**, 2074-5.
- Dwek R.A. (1995) Glycobiology: "towards understanding the function of sugars". *Biochem Soc Trans* **23**, 1-25.
- Erba F., Fiorucci L., Coletta M., & Ascoli F. (1998) Bovine mast cell tryptase inactivation: effect of temperature. *Peptides* **19**, 437-43.
- Echtenacher B., Mannel D.N., & Hultner L. (1996) Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* **381**, 75-7.
- Fersht, A. (1977) Enzyme structure and mechanism. Freeman Verlag, New York.
- Franconi G.M., Graf P.D., Lazarus S.C., Nadel J.A., & Caughey G.H. (1989) Mast cell tryptase and chymase reverse airway smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the ferret. *J Pharmacol Exp Ther* **248**, 947-51.
- Griffiths G.M. & Isaza S. (1993) Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J Cell Biol* **120**, 885-96.
- Galli S.J. & Wershil B.K. (1996) The two faces of the mast cell. *Nature* **381**, 21-2.
- Guida M., Riedy M., Lee D., & Hall J. (2000) Characterization of two highly polymorphic human tryptase loci and comparison with a newly discovered monkey tryptase ortholog. *Pharmacogenetics* **10**, 389-96.
- Harmsen M.C., Heeringa P., van der Geld Y.M., Huitema M.G., Klimp A., Tiran A., & Kallenberg C.G. (1997) Recombinant proteinase 3 (Wegener's antigen) expressed in *Pichia pastoris* is functionally active and is recognized by patient sera. *Clin Exp Immunol* **110**, 257-64.

- Harris J.L., Peterson E.P., Hudig D., Thornberry N.A., & Craik C.S. (1998) Definition and redesign of the extended substrate specificity of granzyme B. *J Biol Chem* **273**, 27364-73.
- Hartmann T., Ruoss S.J., Raymond W.W., Seuwen K., & Caughey G.H. (1992) Human tryptase as a potent, cell-specific mitogen: role of signaling pathways in synergistic responses. *Am J Physiol* **262**, L528-34.
- Hayes M.L. & Castellino J.F. (1979) Carbohydrate of the human plasminogen variants. I. Carbohydrate composition, glycopeptide isolation, and characterization. *J Biol Chem* **254**, 8768-71.
- Huang C., Li, L. Krilis, A. Chanasyk, K., Tang, Y., Li, Z., Hunt J.E. and Stevens, R. L., (1999) Human tryptases α and β /II are functionally distinct due, in part, to a single amino acid difference in one of the surface loops that forms the substrate-binding cleft *J. Biol. Chem.* **28**, 19670-19676
- Huang C., Morales G., Vagi A., Chanasyk K., Ferrazzi M., Burklow C., Qiu W.T., Feyfant E., Sali A., & Stevens R.L. (2000) Formation of enzymatically active, homotypic, and heterotypic tetramers of mouse mast cell tryptases. Dependence on a conserved Trp-rich domain on the surface. *J Biol Chem* **275**, 351-8.
- Huang R., Abrink M., Gobl A.E., Nilsson G., Aveskogh M., Larsson L.G., Nilsson K., & Hellman L. (1993) Expression of a mast cell tryptase in the human monocytic cell lines U-937 and Mono Mac 6. *Scand J Immunol* **38**, 359-67.
- Huber, R. and Bode, W. (1978), Structural basis of activation and action of trypsin *Acc Chem Res* **11** 114 – 122.
- Hunt J.E., Stevens R.L., Austen K.F., Zhang J., Xia Z., & Ghildyal N. (1996) Natural disruption of the mouse mast cell protease 7 gene in the C57BL/6 mouse. *J Biol Chem* **271**, 2851-5.
- Ishizaka,T.(1981) Analysis of the triggering events in mast cells for immunoglobulin E-mediated histamine releases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **67**, 90-96

- Joao H.C., Scragg I.G., & Dwek R.A. (1992) Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B. *FEBS Lett* **307**, 343-6.
- Johnson, D.A. and Barton, G.J. (1992) Mast cell tryptases: examination of unusual characteristics by multiple sequence alignment and molecular modelling. *Protein Sci.* **1**, 370 – 377.
- Johnson, P.R., Ammit, A.J., Carlin, S.M., Armour, C.L. Caughey, G. H. and Black, J. L. (1997). Mast cell tryptase potentiates histamin-induced contraction in human sensitized bronchus *Eur. Respir. J.* **10**, 38 – 43.
- Johnson W.C. Jr (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* **7**, 205-14.
- Kezdy, F. J., Lorand, L. and Miller, K. D. (1965): Titration of active centers in Thrombin solutions. Standardization of the enzyme. *Biochem.* **4**, 2302-8.
- LaVallie, E.R. DiBlasio, E.A. Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J. M. (1993) *Bio/Technology* **11**, 187 – 193.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680 – 685.
- Leahy D.J., Hendrickson W.A., Aukhil I., & Erickson H.P. (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* **258**, 987-91.
- Leal-Berumen I., Conlon P., & Marshall J.S. (1994) IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **152**, 5468-76.
- Loidl G., Groll M., Musiol H.J., Huber R., & Moroder L. (1999) Bivalency as a principle for proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5418-22.
- Loidl G., Musiol H.J., Groll M., Huber R., & Moroder L. (2000) Synthesis of bivalent inhibitors of eucaryotic proteasomes. *J Pept Sci* **6**, 36-46.

- Mammen, M., Choi, S.-K., Whitesides, G.M. (1998) Polyvalent interactions in biological systems – Implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 2755-94
- Malaviya R., Ikeda T., Ross E., & Abraham S.N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 77-80.
- Michaelis, I. and Menten, M.L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* **49**, 333 – 369.
- Miller J.S., Westin E.H., & Schwartz L.B. (1989) Cloning and characterization of complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest* **84**, 1188-95.
- Miller J.S., Moxley G., & Schwartz L.B. (1990) Cloning and characterization of a second complementary DNA for human tryptase. *J Clin Invest* **86**, 864-70.
- Min H.K., Kambe N., & Schwartz L.B. (2001) Human mouse mast cell protease 7-like tryptase genes are pseudogenes. *J Allergy Clin Immunol* **107**, 315-321.
- Molinari J.F., Scuri M., Moore W.R., Clark J., Tanaka R., & Abraham W.M. (1996) Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. *Am J Respir Crit Care Med* **154**, 649-53.
- Molino M., Barnathan E.S., Numerof R., Clark J., Dreyer M., Cumashi A., Hoxie J.A., Schechter N., Woolkalis M., & Brass L.F. (1997) Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* **272**, 4043-9.
- Morrison, J.W. (1969) Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight binding inhibitors *Biochem Biophys Acta* **185**, 269-286
- Naukkarinen A., Harvima I.T., Aalto M.L., & Horsmanheimo M. (1994) Mast cell tryptase and chymase are potential regulators of neurogenic inflammation in psoriatic skin. *Int J Dermatol* **33**, 361-6.

- Niles, A.L., Maffitt, M., Haak-Frendscho, M., Wheelless, C.J., Johnson, D.A. (1998) Recombinant human mast cell tryptase: stable expression in *Pichia pastoris* and purification of fully active enzyme *Biotechnol. Appl. Biochem.***28**, 125 – 131.
- Nyaruhucha C.N., Kito M., & Fukuoka S.I. (1997) Identification and expression of the cDNA-encoding human mesotrypsin(ogen), an isoform of trypsin with inhibitor resistance. *J Biol Chem* **272**, 10573-8.
- Pallaoro, M., Fejzo, M.S. Shayesteh, L., Blount, J. L. and Caughey, G. H. (1999) Characterization of genes encoding known and novel human mast cell tryptases on chromosome 16p13.3. *J Biol Chem* **274**, 3355 - 3362
- Pereira P.J. Bergner A., Macedo Ribeiro S, Huber, R. Matschiner G., Fritz H. Sommerhoff, C.P. and Bode W.(1998) Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature* **392**, 306 – 311.
- Ren S., Lawson A.E., Carr M., Baumgarten C.M., & Schwartz L.B. (1997) Human tryptase fibrinogenolysis is optimal at acidic pH and generates anticoagulant fragments in the presence of the anti-tryptase monoclonal antibody B12. *J Immunol* **159**, 3540-8.
- Ren, S., Sakai, K., Schwarz, L. B.(1998) Regulation of human mast cell β -tryptase: conversion of inactive monomer to active tetramer at acid pH, *J. Immunol* **160**, 4561 – 4569.
- Rice K.D., Tanaka R.D., Katz B.A., Numerof R.P., & Moore W.R. (1998) Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases. *Curr Pharm Des* **4**, 381-96.
- Rudd P.M., Woods R.J., Wormald M.R., Opdenakker G., Downing A.K., Campbell I.D., & Dwek R.A. (1995) The effects of variable glycosylation on the functional activities of ribonuclease, plasminogen and tissue plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta* **1248**, 1-10.
- Rudolph, R. (1990) in *Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Analysis*.(Tschesche, H. ed.), pp. 149-171, Walter de Gruyter, Berlin and New York, NY

- Ruoss S.J., Hartmann T., & Caughey G.H. (1991) Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest* **88**, 493-9.
- Rydel T.J., Ravichandran K.G., Tulinsky A., Bode W., Huber R., Roitsch C., & Fenton J.W. 2nd (1990) The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin. *Science* **249**, 277-80.
- Sakai, K., Ren, S., Schwartz, L.B. (1996) A Novel Heparin-dependent Processing Pathway for Human Tryptase *J Clin Invest* **97**, 988 – 995.
- Sakai, K., Long, S.D., Pettit, D.A.D., Cabral, G.A. and Schwartz, L.B. (1996) Expression and Purification of recombinant human tryptase in a baculovirus System *Prot. Expr. Purif.* **7**, 67-73
- Sambrook J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harboratory, second edition (1989).
- Sanger, F., Nicklen, S and Coulsen, A (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463 – 5467.
- Saxena V.P. & Wetlaufer D.B. (1970) Formation of three-dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme. *Biochemistry* **9**, 5015-23.
- Schechter, N. M, Eng, G. Y. and McCaslin, D. (1993) Human skin tryptase: kinetic characterization of its spontaneous inactivation, *Biochemistry* **32**, 2617-2625.
- Schechter, N. M, Eng, G. Y., Selwood, T. and McCaslin, D. (1995) Structural changes associated with the spontaneous inactivation of the serine proteinase human tryptase, *Biochemistry* **34** 10628-10638.
- Selwood, T., McCaslin, D, and Schechter, N. M. (1998), Spontaneous inactivation of human tryptase involves conformational changes consistent with conversion of the active site to a zymogen-like struktur *Biochemistry* **37**, 13174-13183.
- Schwarz, L.B, Lewis, R.A. and Austen, K.F. (1981) Tryptase from pulmonary mast cells. Purification and characterisation. *J. Biol Chem.* **256**, 11939 - 11943

- Schwartz L.B., Bradford T.R., Littman B.H., & Wintroub B.U. (1985) The fibrinogenolytic activity of purified tryptase from human lung mast cells. *J Immunol* **135**, 2762-7.
- Schwarz, L.B and Bradford, T.R. (1986) Regulation of tryptase from human lung mast cells by heparin. Stabilisation of the active tetramer, *J Biol Chem* **261**, 7372-7379.
- Schwarz, L.B, Bradford, T.R, Lee, D.C. and Chlebowski, J.F. (1990) Immunologic and physiolchemical evidence for conformational changes occurring on conversion of human mast cell tryptase from active tetramer to inactive monomer. Production of monoclonal antibodies recognising active tryptase. *J Immunol*. **144**, 2304-2311.
- Smith T.J., Hougland M.W., & Johnson D.A. (1984) Human lung tryptase. Purification and characterization. *J Biol Chem* **259**, 11046-51.
- Sommerhoff, C.P., Söllner, C., Mentele, R. Piechotka, G. P., Auerswald, E. A., Fritz, H. (1994) A Kazal Typ inhibitor of human mast cell tryptase: isolation from the medical leech *Hirudo medicinalis* characterization, and sequence analysis. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **375**, 685-694.
- Sommerhoff, C.P, Bode, W., Pereira P.J., Matschiner G., Stubbs, M. T., Stürzebecher, J., Piechotka, G. P., and Bergner A. (1999) The structure of human β II-tryptase tetramer: Fo(u)r better or worse *Proc Natl Acad Sci*, **96**, 10984-10991
- Sommerhoff C.P., Bode W., Matschiner G., Bergner A., & Fritz H. (2000) The human mast cell tryptase tetramer: a fascinating riddle solved by structure. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 75-89.
- Sommerhoff C.P. (2001) Mast cell tryptases and airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* **164** (10 Pt 2), 52-8
- Stassen M., Muller C., Arnold M., Hultner L., Klein-Hessling S., Neudorfl C., Reineke T., Serfling E., & Schmitt E. (2001) IL-9 and IL-13 Production by Activated Mast Cells Is Strongly Enhanced in the Presence of Lipopolysaccharide: NF-kappaB Is Decisively Involved in the Expression of IL-9. *J Immunol* **166**, 4391-4398.

- Stead R.H., Tomioka M., Quinonez G., Simon G.T., Felten S.Y., & Bienenstock J. (1987) Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2975-9.
- Steinhoff M., Vergnolle N., Young S.H., Tognetto M., Amadesi S., Ennes H.S., Trevisani M., Hollenberg M.D., Wallace J.L., Caughey G.H., Mitchell S.E., Williams L.M., Geppetti P., Mayer E.A., & Bunnett N.W. (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* **6**, 151-8.
- Stubbs M.T., Morenweiser R., Sturzebecher J., Bauer M., Bode W., Huber R., Piechottka G.P., Matschiner G., Sommerhoff C.P., Fritz H., & Auerswald E.A. (1997) The three-dimensional structure of recombinant leech-derived tryptase inhibitor in complex with trypsin. Implications for the structure of human mast cell tryptase and its inhibition. *J Biol Chem* **272**, 19931-7.
- Studier F.W. & Moffatt B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.
- Tam E.K., Franconi G.M., Nadel J.A., & Caughey G.H. (1990) Protease inhibitors potentiate smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in isolated human bronchi. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**, 449-52.
- Temann U.A., Geba G.P., Rankin J.A., & Flavell R.A. (1998) Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med* **188**, 1307-20.
- Thomas V.A., Wheelless C.J., Stack M.S., & Johnson D.A. (1998) Human mast cell tryptase fibrinogenolysis: kinetics, anticoagulation mechanism, and cell adhesion disruption. *Biochemistry* **37**, 2291-8.
- Vanderslice P., Ballinger S.M., Tam E.K., Goldstein S.M., Craik C.S., & Caughey G.H. (1990) Human mast cell tryptase: multiple cDNAs and genes reveal a multigene serine protease family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3811-5.

- Wilharm E., Parry M.A., Friebel R., Tschesche H., Matschiner G., Sommerhoff C.P., & Jenne D.E. (1999) Generation of catalytically active granzyme K from *Escherichia coli* inclusion bodies and identification of efficient granzyme K inhibitors in human plasma. *J Biol Chem* **274**, 27331-7.
- Wittwer A.J., Howard S.C., Carr L.S., Harakas N.K., Feder J., Parekh R.B., Rudd P.M., Dwek R.A., & Rademacher T.W. (1989) Effects of N-glycosylation on in vitro activity of Bowes melanoma and human colon fibroblast derived tissue plasminogen activator. *Biochemistry* **28**, 7662-9.
- Wormald M.R. & Dwek R.A. (1999) Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure Fold Des* **7**, R155-60.
- Xia H.Z., Kepley C.L., Sakai K., Chelliah J., Irani A.M., & Schwartz L.B. (1995) Quantitation of tryptase, chymase, Fc epsilon RI alpha, and Fc epsilon RI gamma mRNAs in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Immunol* **154**, 5472-80.
- Yannisch-Perron C., Vieira J., & Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.