

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Streptomyceten.....	2
2.2 Transglutaminasen.....	4
2.3 Proteasen.....	13
2.4 Proteaseinhibitoren.....	20
2.5 Zielsetzung und Strategie.....	21
3 Materialien und Methoden	22
3.1 Materialien.....	22
3.1.1 Mikroorganismen	22
3.1.2 Materialien zur Herstellung von Nährmedien.....	22
3.1.3 Enzyme	23
3.1.4 Materialien zur Bestimmung von Endo-Proteaseaktivität.....	23
3.1.5 Materialien zur Bestimmung von Exo-Proteaseaktivität.....	23
3.1.6 Materialien zur Bestimmung von P1' Endo-Proteaseaktivität.....	23
3.1.7 Materialien zur Bestimmung von Transglutaminaseaktivität.....	24
3.1.8 Materialien für elektrophoretische und proteinchemische Verfahren.....	24
3.1.9 Materialien für immunchemische Verfahren.....	25
3.1.10 Materialien für chromatographische Verfahren.....	25
3.1.11 Materialien für Inhibitionsversuche.....	25
3.2 Geräte.....	26
3.2.1 Kultivierung der Mikroorganismen.....	26
3.2.2 Flüssigkeitschromatographie.....	26
3.2.3 Konzentrierung von Proteinlösungen.....	26
3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität.....	27
3.2.5 Elektrophoretische Verfahren.....	27
3.3 Kultivierung von Streptomyceten.....	27
3.3.1 Nährmedien.....	27
3.3.1.1 GYM-Medium.....	27
3.3.1.2 Komplexmedium.....	28
3.3.2 Kultivierung auf Agarmedien.....	28
3.3.3 Enzymgewinnung aus Agar-Platten.....	29
3.3.4 Enzymgewinnung aus Flüssigmedien.....	29
3.4 Gelelektrophoretische Analyse von Proteinen.....	29
3.4.1 Analytische Tris-Glycin-Gele	30
3.4.2 Boratgele zur Isolierung von Proteinen für die Sequenzanalyse.....	31
3.4.2.1 Protein-Molekulargewichtsstandards.....	32
3.4.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	33
3.4.3.1 Markerproteine für die isoelektrische Fokussierung.....	34
3.5 Visualisierung von Proteinen.....	34
3.5.1 Coomassie-Färbung.....	34
3.5.1.1 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen.....	34
3.5.1.2 Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen	35
3.5.2 Silberfärbung.....	35
3.5.2.1 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE- oder IEF-Gelen.....	36

3.6	Immunchemische Methoden.....	36
3.6.1	Herstellung polyklonaler TAMEP- und TAMEP-Inhibitor-Antikörper.....	36
3.6.2	Isolierung von IgG aus Kaninchenserum.....	37
3.6.3	Dot-Blot.....	37
3.6.4	Western-Blot	38
3.6.5	Immunchemische Färbung.....	39
3.7	Konzentrieren, Entsalzen und Teilreinigen von Proteinlösungen.....	40
3.7.1	EtOH- Fällung.....	40
3.7.2	Ammoniumsulfat-Fällung.....	41
3.7.3	Ultrafiltration	41
3.7.4	Druckfiltration.....	42
3.7.5	Lyophilisation.....	42
3.7.6	Dialyse	42
3.7.7	Entsalzen mittels GPC.....	42
3.8	Molekulargewichtsbestimmungen.....	43
3.8.1	SDS-PAGE.....	43
3.8.2	Gelpermeationschromatographie:.....	43
3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
3.10	Bestimmungen der Enzymaktivität von Transglutaminasen.....	45
3.10.1	Bestimmung der TGase-Aktivität in 1,5 ml Reaktionsgefäßen.....	45
3.10.2	Bestimmung der TGase-Aktivität in Mikrotiterplatten.....	47
3.10.3	Bestimmung der TGase-Aktivität auf bewachsenen Agar-Platten.....	48
3.11	Methoden zur Bestimmung von Proteaseaktivität.....	48
3.11.1	Proteinverdauungstest für Metalloproteasen auf SDS-Gelen.....	48
3.11.2	Transglutaminase-Aktivierungstest.....	49
3.11.3	Bestimmung von Proteaseaktivität mit p-Nitroanilid-Derivaten.....	50
3.11.4	Bestimmung von Proteaseaktivität mit Furylacryloylpeptidyl-Derivaten	51
3.11.5	Spezifischer Nachweis von Proteaseaktivitäten in IEF-Gelen	52
3.12	Reinigung der Enzyme von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	53
3.12.1	Isolierung von ProTGase und TGase	53
3.12.2	Teilreinigung einer Arg-C Endoprotease.....	55
3.12.3	Reinigung von TAMEP.....	56
3.12.3	Reinigung einer Peptidyl-Amino-peptidase.....	58
3.12.5	Reinigung einer Leu/Phe-Protease.....	61
3.12.6	Reinigung von P14.....	63
3.13	Sequenzanalyse der gereinigten Proteine.....	65
3.13.1	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran.....	65
3.13.2	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen der gereinigten Proteine.....	66
3.14	Bestimmung von Proteaseschnittstellen durch Sequenzanalysen.....	67
3.14.1	ProTGase als Substrat für Trypsin, Chymotrypsin und TAMEP.....	67
3.14.2	Trypsin-, Chymotrypsin- und TAMEP-aktivierte TGase als Substrat für die Peptidyl-Amino-peptidase und die Leu-/Phe-Protease.....	67
3.15	Inhibierungsversuche.....	68
3.15.1	Inhibitoren.....	68
3.15.2	Inhibierung der Peptidyl-Amino-peptidase.....	69
3.16.3	Inhibierung der Transglutaminase-aktivierenden Metalloprotease.....	69

4 Ergebnisse	70
4.1 Kultivierung von <i>Streptomyces mobaraensis</i> und Nachweis der TGase.....	70
4.2 Reinigung von ProTGase und TGase.....	77
4.3 TGase-Aktivierungstest in Mikrotiterplatten.....	79
4.4 Bestimmung der Proteaseaktivitäten im Komplexmedium von <i>S. mobaraensis</i>	82
4.5 Teilreinigung einer Arg-C-Protease von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	84
4.6 Identifizierung der TGase-aktivierenden Protease in Extrakten von sporulierenden Kolonien.....	86
4.7 Reinigung der Transglutaminase aktivierenden Metalloprotease.....	91
4.8 Untersuchungen zur Einordnung von TAMEP in eine Proteasefamilie.....	97
4.9 Charakterisierung der TAMEP-Eigenschaften.....	102
4.9.1 Bestimmung des Molekulargewichtes	102
4.9.2 Bestimmung des Isoelektrischen Punktes.....	107
4.9.3 Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit	109
4.9.4 Substratspezifität der TAMEP.....	111
4.9.4.1 Bestimmung der Transglutaminase-Schnittstelle.....	111
4.9.4.2 Hydrolyse synthetischer Furylacryloyl-Derivate durch TAMEP und Thermolysin.....	112
4.9.5 Inhibitorstudien mit TAMEP und Thermolysin.....	113
4.9.5.1 Inhibierung von TAMEP durch EDTA und, o-Phenanthrolin.....	113
4.9.5.2 Inhibierung von TAMEP und Thermolysin durch Phosphoramidon.....	114
4.9.5.3 Inhibierung von TAMEP und Thermolysin durch den Peptidinhibitor (P14).....	115
4.10 Isolierung von Exoproteasen aus dem Komplexmedium.....	118
4.11 Reinigung einer Peptidyl-Amino-peptidase von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	119
4.12 Untersuchungen zur Einordnung der Peptidyl-Amino-peptidase in eine Proteasefamilie.....	122
4.13 Charakterisierung der PAP-Eigenschaften.....	124
4.13.1 Bestimmung des Molekulargewichtes und des Isoelektrischen Punktes.....	124
4.13.2 Temperatur und pH-Wert-Abhängigkeit.....	125
4.13.3 Einfluss von Calcium auf die Enzymaktivität der PAP.....	127
4.13.4 Einfluss von Lösungsmitteln und Detergentien auf die Enzymaktivität von PAP.....	127
4.13.5 Spezifität der PAP.....	129
4.13.6 Verhalten von PAP gegenüber Inhibitoren.....	132
4.14 Reinigung einer Leu/Phe-Protease von <i>Streptomyces mobaraensis</i>	133
4.15 Untersuchungen zur Einordnung der Leu/Phe-Protease in eine Proteasefamilie.....	136
4.16 Reinigung des Peptidinhibitors P14.....	137
4.17 Untersuchungen zur Einordnung des Peptidinhibitors in eine Enzymfamilie.....	139
4.18 Polyklonale Antikörper gegen TAMEP und P14.....	141
4.19 Prozessierung von ProTGase.....	145
4.20 Regulation der TGase-Aktivität durch Inhibierung der TAMEP mit P14.....	149
4.21 Sekretion der Transglutaminase regulierenden Faktoren	150
5 Diskussion	159
6 Literaturverzeichnis	180
Anhang	198