

## 2 Einleitung

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zum besseren Verständnis des komplexen Lebenszyklus von *Streptomyces mobaraensis* liefern, der mit einer Reihe morphologischer Veränderungen verbunden ist. Im besonderen Interesse stand hierbei der Nachweis und die Charakterisierung einer Protease, welche in der Lage ist, eine extrazelluläre Transglutaminase durch limitierte Hydrolyse zu aktivieren.

### 2.1 Streptomycceten

Mitglieder der Gattung *Streptomyces*, die zu der heterogenen Actinomyceten-Gruppe gehören, sind aerobe, chemoorganotrophe, Gram-positive Eubakterien mit einem hohen GC-Gehalt von durchschnittlich 74 Prozent (Stackebrandt und Woese [1984]). In der Gattung *Streptomyces* sind derzeit über 500 Arten und Unterarten beschrieben, und sie enthält damit die größte Zahl an kultivierbaren Arten in der Domäne Bacteria (Hain *et al.* [1997]).

Der Bekanntheitsgrad der Streptomycceten beruht vor allem darauf, dass sie eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme wie Cellulasen, Chitinasen, Amylasen, Lipasen und Proteasen bilden, die z.B. eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung organischer Stoffe im Waldboden einnehmen. Außerdem produzieren Streptomycceten verschiedenste bioaktive, niedermolekulare Substanzen, die sogenannten Sekundärmetabolite (Korn-Wendisch und Kutzner [1981]). Unter diesen befinden sich eine Vielzahl von Wirksubstanzen, wie Antibiotika, Anthelmintika, Cytotoxine, Immunsuppressiva ebenso wie Herbizide und Fungizide. Streptomycceten liefern zwei Drittel aller natürlicher Antibiotika, die in der Human- und Veterinär-Medizin sowie in der Landwirtschaft genutzt werden. Ein weiterer bekannter Sekundärmetabolit der Streptomycceten ist das Geosmin. Dieses ätherische Öl verleiht dem Waldboden den typisch frischen Erdgeruch.

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *S. coelicolor* ergab die größte Anzahl mutmaßlicher Gene, die je bei einem Bakterium gefunden wurden. Das etwa 8,7 Mb große, lineare Chromosom enthält eine beispiellose Anzahl regulatorischer Gene, insbesondere solche, die auf äußere Stimuli und Stress reagieren. Das Genom enthält außerdem viele duplizierte Gene, die vermutlich „Gewebe-spezifische Isoformen“ darstellen und bei unterschiedlichen Entwicklungsphasen exprimiert werden. Die große Anzahl an Genen erklärt den komplexen Lebenszyklus und die Befähigung, eine Vielzahl von Sekundärmetabolite zu

bilden und sich im kompetitiven Erdreich durchzusetzen. Streptomyceten können sich vielen Bedingungen anpassen und mehrere Nährstoffquellen nutzen (Bentley *et al.* [2002]).

Der komplexe Differenzierungsmechanismus der faszinierenden Streptomyceten-Gruppe ist noch nicht gut verstanden. Da die Sekretion von Enzymen bei *Streptomyces* oftmals in Abhängigkeit von physiologisch und morphologisch abgegrenzten Entwicklungsstadien zu sehen ist, ist zunächst ein Überblick über den Wachstumszyklus des Bodenbakteriums notwendig.

Streptomyceten weisen ein filamentöses Wachstum auf mit einer Zelldifferenzierung, die Substrat- und Luftmycelwachstum mit anschließender Sporulation umfaßt. Obwohl die zelluläre Organisation prokaryotisch ist, besitzen die Streptomyceten hinsichtlich der strukturellen Komplexität und der multizellulären Differenzierung ähnliche Eigenschaften wie höhere Organismen (Bruton *et al.* [1995], Miquéles *et al.* [2000], Keleman *et al.* [2001]).

Unter guten Wachstumsbedingungen bilden sich aus einer *Streptomyces*-Spore ein oder zwei Keimschläuche aus (Hardisson *et al.* [1978]). Durch Spitzenwachstum und Hyphenverzweigungen entsteht ein Netzwerk aus Filamenten mit einem Durchmesser von 0,5-1,5 µm. Die Filamente besitzen unregelmäßig Zwischenwände, und daher sind Hyphenkompartimente mit mehreren Genomkopien besonders an den Wachstumsspitzen möglich. Die Fähigkeit eng am Substrat zu wachsen ermöglicht eine effektive Nutzung von festem organischen Material besonders in der Erde. Das Geflecht aus vegetativen Filamenten, welches auch Substratmycel genannt wird, entsteht auch bei der Kultivierung in festen Nährmedien und im Flüssigmedium (Chater [1989], Chater [1993]). In belüfteten Flüssigkulturen differenzieren jedoch die meisten Streptomyceten nicht und bilden daher nur Substratmycel aus, das in Form sphärischer Mikrokolonien wächst (Kalakoutskii *et al.* [1976]). Aber auch ohne die Ausbildung des Luftmycels wird bei einigen Stämmen eine Sporulation im Flüssigmedium beobachtet (Kendrick und Ensign [1983], Novella *et al.* [1992], Rueda *et al.* [2001]). Das der Reproduktion dienende Luftmycel weist hydrophobe Eigenschaften auf, lagert häufig Pigmente ein und bildet die Sporen.

Zellen, die am weitesten von den wachsenden Hyphen entfernt sind, produzieren Speicherstoffe wie Lipide, Glycogen und Polyphosphate (Brana *et al.* [1986]). Bei eintretender Nährstofflimitierung beginnt je nach Kultivierung und Streptomycetenart nach ein bis drei Tagen parasitierend auf dem Substratmycel und unter Beteiligung von sogenannten *bld*-Gene<sup>1</sup> die Bildung des Luftmycels (Merrick [1976], Miguéles *et al.* [1992],

---

<sup>1</sup> *Bld*-Mutanten (*bld*, Abk. für bald, nackt) können kein Luftmycel bilden (Chater *et al.* [1989]).

Nodwell *et al.* [1999]). In dieser Wachstumsphase sterben viele vegetative Zellen, und akkumulierte Speicherstoffe dienen der Entwicklung des Luftmycels (Mendez *et al.* [1985], Chater [1993]). Die aus dem Abbau von DNA und Proteinen durch Nucleasen und Proteasen gewonnene Energie und Nährstoffe unterstützen das Luftmycelwachstum (Kim und Lee [1996], Kim *et al.* [1998], Nicieza *et al.* [1999]). Aufgrund der spezifisch und räumlich unterschiedlichen, in Verbindung stehenden Zelltypen dient das Substratmycel dem Aufbau des Luftmycels (Mendez *et al.* [1985]).

Nach der Vervielfachung der Chromosomen an den apikalen Enden der Lufthyphen werden durch Einfügen von Zellwänden die einzelnen Genomkopien auf die neuen Kompartimente verteilt (Chater [1993]). Die Sporophoren werden noch durch oberflächenaktive Proteine (SAP, Surface Active Protein) verstärkt, und Pigmente werden abgelagert, die den Sporen einen hydrophoben Charakter geben und sie vor Austrocknung schützen (Guijaro *et al.* [1988], Coleman und Ensign [1982]) Die Veränderung von Sporenform, Zellwanddicke, Septenbildung und Pigmentierung wird durch sogenannte *whi*-Gene<sup>2</sup> beeinflusst (Chater [1972]). Eine Resistenz der Sporen gegenüber hohen Temperaturen wie bei den Endosporen von Bacillusarten besteht dagegen nicht (Ensign [1978]). Die aus dem wässrigen Milieu herausgewachsenen Hyphen liegen exponiert vor, ideal zur Verbreitung der Sporen, die den Fortbestand garantieren.

Aufgrund morphologischer und biochemischer Unterschiede von Sporophoren und reifen Sporen ist es möglich, Streptomyceten-Arten weiter zu differenzieren. Wegen der markanten, wirtelartig verzweigten Sporophoren-Struktur unterteilte 1958 Baldacci die Familie *Streptomycetaceae* in die Gattung *Streptomyces* und in die taxonomisch eigenständige Gattung *Streptovercillium*. 1990 wurden die *Streptovercillien* aber durch Witt und Stackebrandt aufgrund von 16S rRNA-Analysen wieder in die Gattung *Streptomyces* eingegliedert.

## 2.2 Transglutaminasen

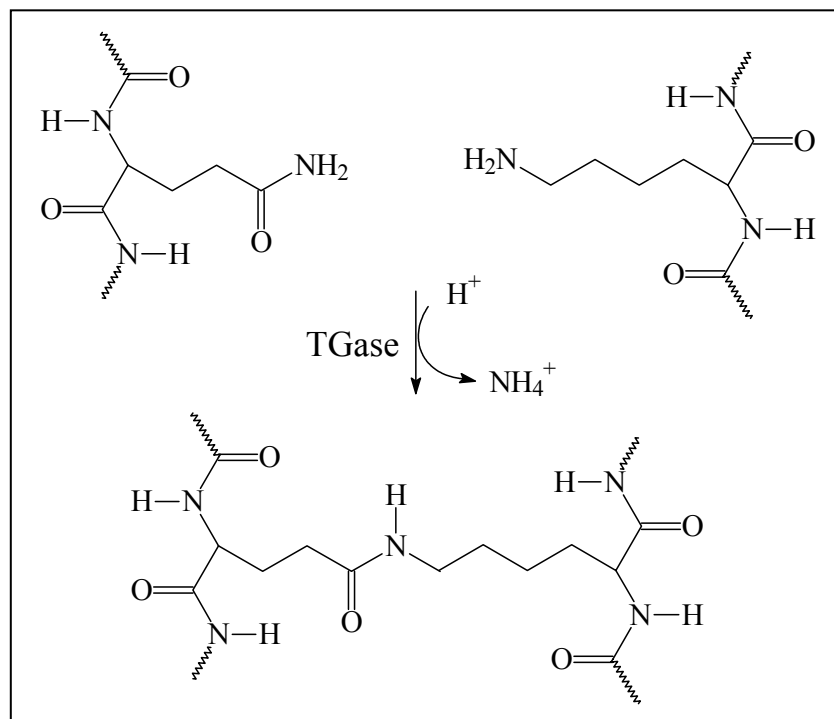
Neben der besonderen Gestalt der Sporenträger weist die ehemalige Gattung *Streptovercillium* aber offenbar noch ein weiteres Unterscheidungsmerkmal gegenüber *Streptomyces coelicolor* auf, nämlich ein Transglutaminasegen. Bei einem Enzym-Screening gelang einer japanischen Arbeitsgruppe zum ersten Mal der Nachweis einer prokaryotischen

---

<sup>2</sup> Bei *whi*-Mutanten (*whi*, Abk. für white, weiß) ist die Sporenreifung gestört (Chater *et al.* [1989]).

TGase mit dem *Streptovercillium*-Stamm S-8112 (Ando *et al.* [1989]). Bis dahin waren nur Transglutaminasen (TGasen) von Eukaryonten bekannt.

TGasen katalysieren den Acyltransfer zwischen der  $\gamma$ -Carboxyamid-Gruppe eines peptid- bzw. proteingebundenen Glutamins mit primären Aminen (Folk *et al.* [1977], Lorand und Conrad [1984]). Fungiert als Acylakzeptor die  $\epsilon$ -Aminofunktion eines ebenfalls proteingebundenen Lysins, resultiert eine inter- bzw. intramolekulare Isopeptidbindung, abhängig davon, ob eine zweite oder dieselbe Peptidkette als Amindonor dient. Abb. 2-1 zeigt die durch Transglutaminase katalysierte Bildung einer  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin-Isopeptidbindung.



**Abb. 2-1: Bildung einer Isopeptidbindung durch Verknüpfung der Seitenketten von Glutamin und Lysin durch eine Transglutaminase.**

Der Trivialname Transglutaminase (Clarke *et al.* [1959]) ist verwirrend, da nicht freies Glutamin, sondern ausschließlich die peptid- bzw. proteingebundene Aminosäure reaktiv ist (Folk und Finlayson [1977]). Die systematische Nomenklatur der Enzymfamilie lautet daher „Protein-Glutamin: Amin  $\gamma$ -Glutamyltransferase“ (EC 2.3.2.13), wird jedoch in der Literatur praktisch nicht verwendet.

Datenbankrecherchen machen deutlich, dass TGasen bei Archaea, Bakterien und Eukaryonten vorkommen und daher eine ubiquitär vorkommende Enzymfamilie bilden (Makarova *et al.* [1999]). TGase von Arthropoden, Invertebraten, Pflanzen und Säugetieren (Ikura *et al.*

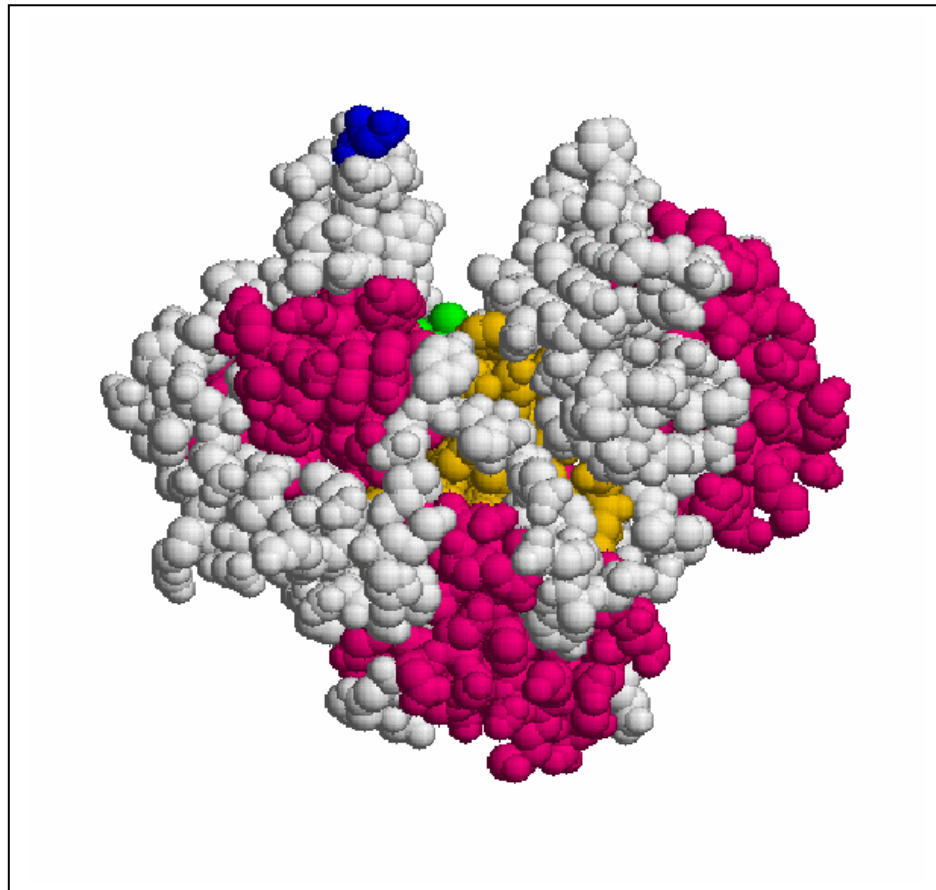
[1987], Klein *et al.* [1992], Singh *et al.* [1995] a und b, Kang und Cho [1996], Yasueda *et al.* [1995]) benötigen in der Regel für die Bildung der Isoeptidbindung Calciumionen. Die große Bedeutung dieser Enzyme wird offensichtlich, da allein beim Menschen bisher neun Isoformen identifiziert wurden, die an einer Reihe unterschiedlicher physiologischer Prozesse und Proteinmodifikationen beteiligt sind. Fehlregulationen humaner TGasen werden immer häufiger als Ursache für eine Reihe von Krankheiten wie z.B. Alzheimer oder dem Grauen Star betrachtet (Kim *et al.* [2002]).

Der wohl bekannteste Vertreter der humanen TGasen ist der Blutgerinnungsfaktor XIII, dessen physiologische Funktion und Regulationsmechanismen gut untersucht sind (Greenberg *et al.* [1991]). Faktor XIII zirkuliert als inaktives Heterodimer im Blut. Im Falle einer Verletzung spaltet die Serinprotease Thrombin die Fibrinopeptide A und B ab, worauf die b-Untereinheiten in Gegenwart von Calcium abdissoziieren können. Die reife, dimere TGase (FXIIIa) ist nun in der Lage, Fibrinmoleküle über Isoeptidbindungen zu vernetzen. Die gebildeten Fibringerinnsel sind unerlässlich für die Wundheilung (Muszbek *et al.* [1996], Lorand [2001]).

Tierische Transglutaminasen besitzen im Aktivzentrum die Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat (alternativ Asparagin), die eine katalytische Triade bilden. Die TGase-Reaktion entspricht annähernd der Umkehr einer Proteolyse, die durch Thiolproteasen mit einer ähnlichen katalytischen Triade durchgeführt wird (Pedersen *et al.* [1994]). Neben der katalytischen Triade und einem ähnlichen Reaktionsmechanismus sind Transglutaminasen mit Papain-artigen Thiolproteasen strukturell verwandt, weswegen beide Enzymfamilien in die gleiche Superfamilie eingeteilt werden (Hubbard *et al.* [1999]).

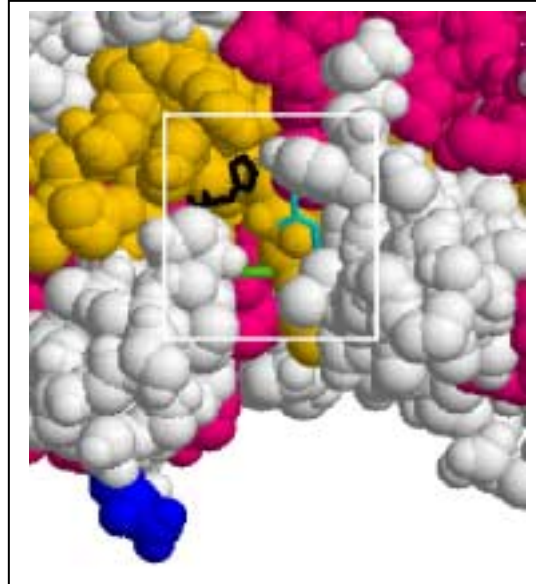
Die meisten TGasen der Domäne Archaea und Bacteria wurden bisher nur durch Genomanalysen identifiziert, und deren enzymatische Aktivität und Funktion konnte experimentell noch nicht gezeigt werden. Neben einer isolierten, intrazellulären TGase von *Bacillus subtilis*, die in der späten Phase der Sporenreifung gebildet wird und an der Bildung der äußeren Sporenhülle beteiligt sein soll, wurden bisher nur bakterielle TGasen von Streptovercillien isoliert und charakterisiert (Ando *et al.* [1989], Duran *et al.* [1998], Pasternack (Dissertation) [1998], Suzuki *et al.* [2000]). Aufgrund der Primärsequenz konnte diese Streptovercillien-TGase in keine bisher bekannte Enzymfamilie eingegliedert werden. Die Gemeinsamkeit mit anderen Transglutaminasen beschränkt sich auf die im Aktivzentrum befindlichen, essentiellen Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat (Kanaji *et al.* [1993], Kashiwagi *et al.* [2002]) und auf die Fähigkeit, Proteine durch Bildung einer  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glutamyl)lysin-Isoeptidbindung zu vernetzen (Sakamoto *et al.* [1994]).

Mit der Aufklärung der TGase-Kristallstruktur von *Streptovorticillium mobaraense* durch Kashiwagi *et al.* [2002] und durch Austausch mutmaßlich an der Reaktion beteiligter Aminosäuren konnten die an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste im Aktivzentrum bestimmt werden. Die TGase ist in Form einer Scheibe aufgebaut, die an einer Seite eine tiefe Spalte aufweist in der die katalytische Triade lokalisiert ist (Abb. 2-2).



**Abb. 2-2:** Vordere Scheibenansicht der bakteriellen TGase von *Streptovorticillium mobaraense* nach Kashiwagi *et al.* [2002]. Die van der Waals-Radien sämtlicher TGase-Atome sind als Kugeln dargestellt und die Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -helicale-Bereiche (rot),  $\beta$ -Faltblattstrukturen (orange) und Turns (weiß) sind farblich hervorgehoben. Das N-terminale Aspartat ist blau, und das im Aktivzentrum befindliche Cys64 ist grün markiert. Die Graphik wurde aus den PDB-Daten mit dem RasMol Graphik-Programm (V 2.6) erstellt.

Die Seitenketten der an der Katalyse beteiligten Aminosäuren Cys64 (grün), Asp255 (cyan) und His274 (schwarz) sind dabei so angeordnet, daß der Protonentransfer zur Ausbildung einer negativ geladenen Thiolatfunktion gewährleistet ist (Abb. 2-3).



**Abb. 2-3: Aufsicht in den TGase-Spalt von *Sv. mobaraense* mit Blick auf die Katalytische Triade.** Die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren, hervorgehoben durch einen weißen Rahmen, Cys64 (grün), Asp255 (cyan) und His274 (schwarz) sind im Stab-Format dargestellt. Der N-Terminus der reifen TGase beginnt mit einem Aspartat, welches blau markiert ist (Graphik-Programm RasMol, V 2.6).

Die Reihenfolge der katalytischen Triade innerhalb der bakteriellen Polypeptidkette Cys64-Asp255-His274 ist gegenüber Faktor XIII (Cys314-His373-Asp396) vertauscht. Nach dem postulierten Reaktionsmechanismus von Kashiwagi *et al.* [2002] erfolgt die Deprotonierung hauptsächlich innerhalb einer Cys-Asp-Diade, wobei His274 nur die Funktion haben soll, Asp255 zu positionieren und dadurch die Konformation des Aktivzentrums zu stabilisieren. Bei Faktor XIII wird hingegen ein Protonen-Relay unter Beteiligung aller Aminosäuren der katalytischen Triade angenommen.

Im Gegensatz zu den bekannten eukaryotischen TGasen ist die katalytische Aktivität der TGasen von Streptovercillien Calcium-unabhängig. Diese Tatsache und die relativ einfache Isolierung der sekretorischen TGase aus dem Kulturmedium verbunden mit der Möglichkeit, schonend und gezielt Proteine zu vernetzen oder Proteinmodifikationen durchzuführen, haben eine hohe biotechnologische Bedeutung (Nielsen *et al.* [1995]). Die Anwendungsgebiete der mikrobiellen TGasen liegen im Ernährungsbereich, wo z.B. die Fleischqualität durch Restrukturierung des Muskelfleisches oder die Cremigkeit und Konsistenz von Yoghurt sowie

Käse verbessert wird (Zhu *et al.* [1995]), ferner in der Kosmetikbranche, um z.B. Haare enzymatisch mit Farbstoffen zu koppeln (Kleen *et al.* [2001]), in der Immundiagnostik, Bioanalytik und Medizin zur Herstellung von Hapten-Protein-Konjugaten, zur Kopplung von Enzymen an eine Matrixoberfläche oder zur Bildung von Polyethylenglykol-Pharmaka-Konjugaten, um eine Resistenz gegenüber Proteasen zu verbessern oder die Zirkulationsdauer im Blut zu erhöhen (Huang *et al.* [1995], Fuchsbauer *et al.* [1996], Josten *et al.* [1998], Sato *et al.* [2001]). Die wirtschaftliche Bedeutung der bakteriellen Transglutaminase steht außer Frage, während über die biologische Funktion der TGase von Streptomyceten nur sehr wenig bekannt ist.

Obwohl die Gattung *Streptomyces* über 500 Arten umfasst, wurden bei der Suche nach Calcium-unabhängigen TGasen zu ihrer industriellen Nutzung Arten herangezogen, die der ehemaligen Gattung *Streptoverticillium* (Sv.) angehören, wie z.B. *Sv. ladakanum*, *Sv. cinnamoneum* CBS 683.68, *Sv. griseocarneum* und *Sv. mobaraense*, *Sv. fervens* subsp. *melrosporus* (Nonaka *et al.* [1989], Motoki *et al.* [1992], Washizu *et al.* [1994], Nonaka *et al.* [1996], Tsai *et al.* [1996], Duran *et al.* [1998], Pasternack [1998]).

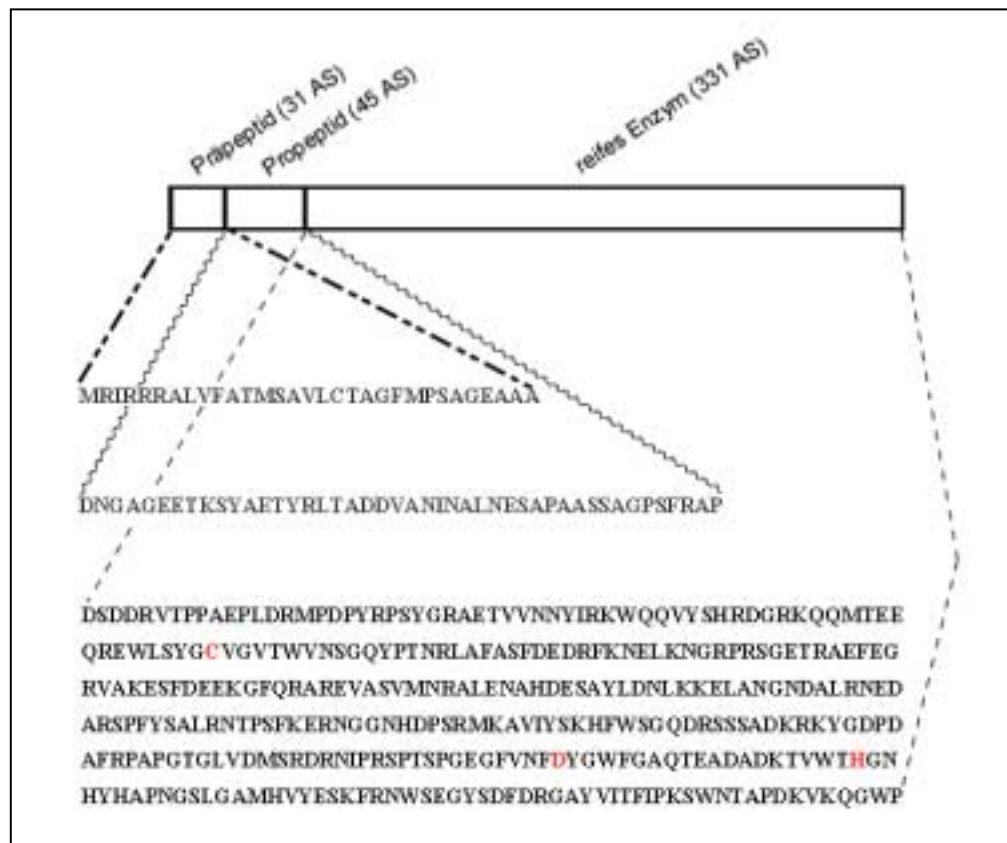
Die Unterscheidung zwischen der ehemaligen Gattung *Streptoverticillium* und *Streptomyces* aufgrund von Oberflächenkulturen ist einfach. Streptoverticillien zeigen ein „baumwollartiges“ Wachstum. Neben der offensichtlichen Fähigkeit TGase zu sekretieren, besitzen die Streptoverticillien als weiteres charakteristisches Merkmal meistens eine Resistenz gegenüber Lysozym und Neomycin (Korn-Wendisch und Kutzner [1981]). Der Zusammenhang zwischen TGase-Produktion und phänotypischen Eigenschaften der Streptoverticillien wurde bisher nicht untersucht.

Nach der Entdeckung der Calcium-unabhängigen mikrobiellen TGase im Jahre 1989 durch Ando wurde vier Jahre später die erste komplette Proteinsequenz der TGase von *Sv.* S-8112, bestimmt (Kanaji *et al.* [1993]). Mit der Klonierung des Transglutaminase-Gens von *Sv.* S-8112, und Expression in *Streptomyces lividans* gelang zum ersten Mal die gentechnische Herstellung der bakteriellen TGase. Die publizierte Genanalyse sollte zeigen, dass die TGase den Sequenzaufbau eines sekretorischen Proteins aufweist mit einem Signalpeptid von 18 Aminosäuren, einer Proregion aus 57 AS und einem reifen Enzym bestehend aus 331 AS (Washizu *et al.* [1994]). Mit der Identifizierung und Sequenzierung der ProTGase von *Sv. mobaraense* wurden in der von Washizu *et al.* [1994] ermittelten DNA-Sequenz, die für das Proenzym codiert, Sequenzfehler nachgewiesen und korrigiert (Pasternack *et al.* [1998]). Die von Duran *et al.* [1998] bestimmte ProTGase-Sequenz - abgeleitet aus der DNA-Sequenz von *Sv. cinnamoneum* CBS 683.68 - enthält die gleichen Sequenzierfehler, die zu einer



Verschiebung im Leserahmen führen (Pasternack *et al.* [2000], unveröffentlicht). In späteren Arbeiten wurde im Arbeitskreis Fuchsbauer der fehlende N-Terminus der TGase von *Sv. mobaraense* auf DNA-Ebene vollständig aufgeklärt (persönliche Mitteilungen). Die Präprosequenz der TGase von *Sv. mobaraense* und die ProTGase von *Sv. fervens* subsp. *melrosporus* und *Sv. cinnamoneum* CBS 683.68 sind im Anhang aufgeführt.

Aufgrund der Eingliederung der Gattung *Streptoverticillium* (*Sv.*) in die Gattung *Streptomyces* (*S.*) durch Witt und Stackebrandt [1990] wird nachfolgend, um Namensverwirrungen zu vermeiden, die neue Nomenklatur übernommen und auf die Bezeichnung Streptoverticillien so weit als möglich verzichtet. Danach heißt der Stamm, mit dem alle Untersuchungen in dieser Arbeit unternommen wurden, *S. mobaraensis*. Die Primärsequenz seiner TGase ist schematisch in der Abb. 2-4 dargestellt.



**Abb. 2-4: Schematische Darstellung der Primärstruktur der Präprotransglutaminase von *S. mobaraensis*.** Die Aminosäuren der katalytischen Triade im reifen Enzym sind rot markiert (Kanaji *et al.* [1993], Kashiwagi *et al.* [2002]).

Die Sequenzstruktur der TGase weist den typischen Aufbau vieler sekretorischer Proteine bei Gram-positiven Bakterien auf, die durch die bakterielle Plasmamembran aus der Zelle transportiert werden (Economou [1999], Braun *et al.* [1999]). Hochmolekulare Vorläufer-

proteine werden mit einem am aminoterminalen Ende gelegenen Zusatzpeptid synthetisiert. Dieses Signalpeptid (Präregion) schleust die sekretorischen Proteine - begleitet durch Helferproteine - zum Sekretionsapparat (Sec-System), welcher in der Cytoplasma-membran lokalisiert ist. Nach Translokation des Proteins unter ATP-Verbrauch wird das Signalpeptid durch eine spezifische Signalpeptidase abgespalten (Simonen und Palva [1993], Nakamura *et al.* [1999]). Signalpeptiden fehlt eine Konsensussequenz auf Ebene der Primärstruktur, sie besitzen aber dennoch charakteristische Strukturmerkmale, die auch auf die Präregion der TGase von *S. mobaraensis* zutreffen. Einem basisch geladenen N-Terminus (n-Region) folgt ein hydrophober Kern (h-Region) und die Spaltstelle (c-Region), die die Erkennungssequenz für die Signalpeptidase aufweist.

Viele Gram-positive, sekretorische Proteine besitzen zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Enzym ein zusätzliches Propeptid. Auch die bakterielle TGase weist dieses Propeptid auf (Abb. 2-4). Über den Strukturaufbau von Proregionen ist wenig bekannt. Propeptide findet man am N-Terminus, aber auch am C-Terminus von reifen Enzymen oder es besteht die Möglichkeit einer Kombination aus beiden (Pohlner *et al.* [1987], Terada *et al.* [1990], Wandersman *et al.* [1989]). So unterschiedlich die Lokalisation der Propeptide ist, so verschieden erscheint auch deren Funktion (Demleitner und Götz [1994], Fu *et al.* [2000], Ohta und Inouye [1990], Baker *et al.* [1993], Navarre und Schneewind [1999]). Bekannte Propeptid-Funktionen bei Gram-positiven Bakterien sind:

- eine Steigerung der Sekretionsgeschwindigkeit durch die Cytoplasmamembran,
- die Verankerung des reifen Enzyms in der Zellwand,
- ein Schutz des reifen Enzyms vor zellassozierten Proteasen,
- eine Faltungshilfe bei der Bildung des reifen Enzyms (Intramolekulares Chaperon) und
- eine intrazelluläre Hemmung der eigenen Aktivität zum Schutz der Zelle.

TGasen sind insbesondere aufgrund ihrer Fähigkeit, Proteine zu vernetzen, gefährliche Werkzeuge für die Zelle. Versuche, das bakterielle TGase-Gen in *E. coli* zu exprimieren, führten zu geringen Ausbeuten, weil vermutlich aktive TGase den Wirtsorganismus durch Vernetzung intrazellulärer Proteine schädigte (Takehana *et al.* [1994], Kawai *et al.* [1997]). Diese Ergebnisse und die bei Pasternack *et al.* [1998] ermittelte Thermostabilität der ProTGase offenbaren zwei Funktionen des Propeptides, die Stabilisierung der Proteinstruktur

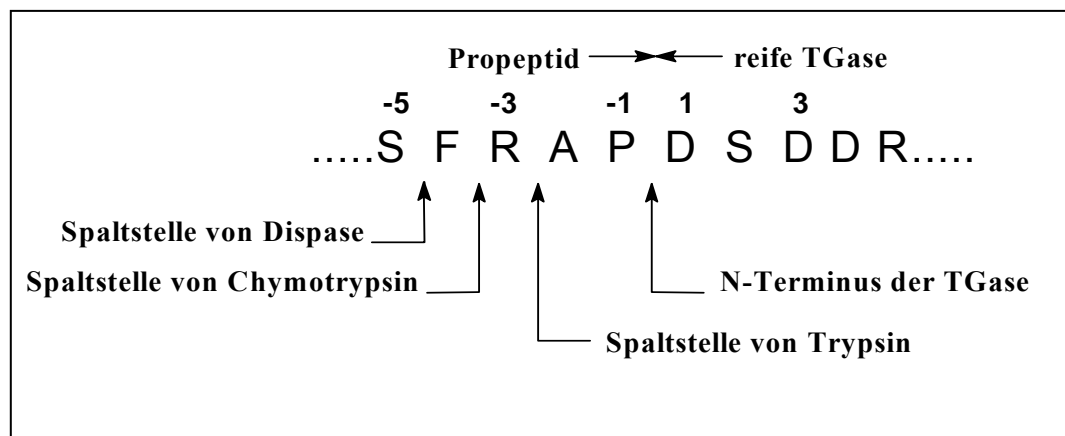
als Intramolekulares Chaperon und die Inaktivierung der enzymatischen Funktion zum Schutz der Zelle vor unkontrollierter Vernetzung.

Häufig handelt es sich bei der Proregion um einen N-terminal verlängerten Bereich, welcher das Aktivzentrum sterisch blockiert und dadurch die Substratbindung verhindert. Die Umwandlung der inaktiven Proteine in die aktive Form kann durch eine pH-Wert-Veränderung, autokatalytisch oder durch extrazelluläre Proteasen erfolgen (Khan *et al.* [1998]).

Obwohl TGase von *S. mobaraensis* sehr wahrscheinlich wie die eukaryotischen Enzyme von Proteasen abstammt, konnte eine autoproteolytische oder pH-abhängige Aktivierung der TGase ausgeschlossen werden (Ando *et al.* [1989], Pasternack *et al.* [1998]).

Die ProTGase mit einer Molekularmasse von 42,5 kDa muss daher durch proteolytische Abspaltung des Propeptides durch eine endogene Protease aktiviert werden. Der Nachweis der ebenfalls von *S. mobaraensis* in das Kulturmedium sekretierten Protease war das wichtigste Ziel der vorliegenden Dissertation.

Mit der Ermittlung der N-terminalen Sequenz reifer TGase durch Kanaji *et al.* [1993] und der Bestimmung des Aktivierungsbereiches innerhalb des Propeptides (Pasternack *et al.* [1998]) durch artfremde Proteasen (Abb. 2-5), war die Grundlage zur Identifizierung der TGase-aktivierenden Protease von *S. mobaraensis* geschaffen.



**Abb. 2-5: Aktivierungsbereich im Pro-Teil der Transglutaminase von *S. mobaraensis*.**  
Die durch Edman-Abbau ermittelten Spaltstellen der Proteasen (Dispase, Chymotrypsin und Trypsin) sowie der N-Terminus des reifen Enzyms (Kanaji *et al.* [1993]) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Sowohl Trypsin und Chymotrypsin vom Rind wie auch Dispase von *Bacillus polymyxa* sind in der Lage durch Hydrolyse einer Peptidbindung im Aktivierungsbereich die ProTGase zu prozessieren (Pasternack *et al.* [1998]).

Bei der Suche nach der TGase-aktivierenden Protease musste deshalb in Betracht gezogen werden, dass eine schrittweise Aktivierung der TGase durch mehrere Proteasen erfolgen konnte, was letztendlich zu der von Kanaji *et al.* [1993] ermittelten N-terminalen Sequenz der reifen TGase führt.

## 2.3 Proteasen

Das Prinzip der Proteolyse ist die hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung, weswegen die Hydrolasen auch als Peptidhydrolasen oder Peptidasen bezeichnet werden oder, wenn sie intakte Proteine hydrolysieren, als Proteasen oder Proteinasen.

Proteasen gehören zu der am besten untersuchten Enzymfamilie, vor allem deshalb, weil sie in allen Organismen und Organellen auftreten. Selbst Viren verfügen meistens über eine eigene Peptidase. Neben der wirtschaftlichen Bedeutung und deren Anwendung in allen Lebensbereichen, wie z.B. in Waschmitteln, Lebensmitteln oder in der Medizin, nehmen Proteasen vielfältige, wichtige physiologische Funktionen ein und werden daher immer häufiger auch in Zusammenhang mit zahlreichen Krankheiten gebracht (Rao *et al.* [1998], Huang und Wang [2001], Hiemstra [2002]).

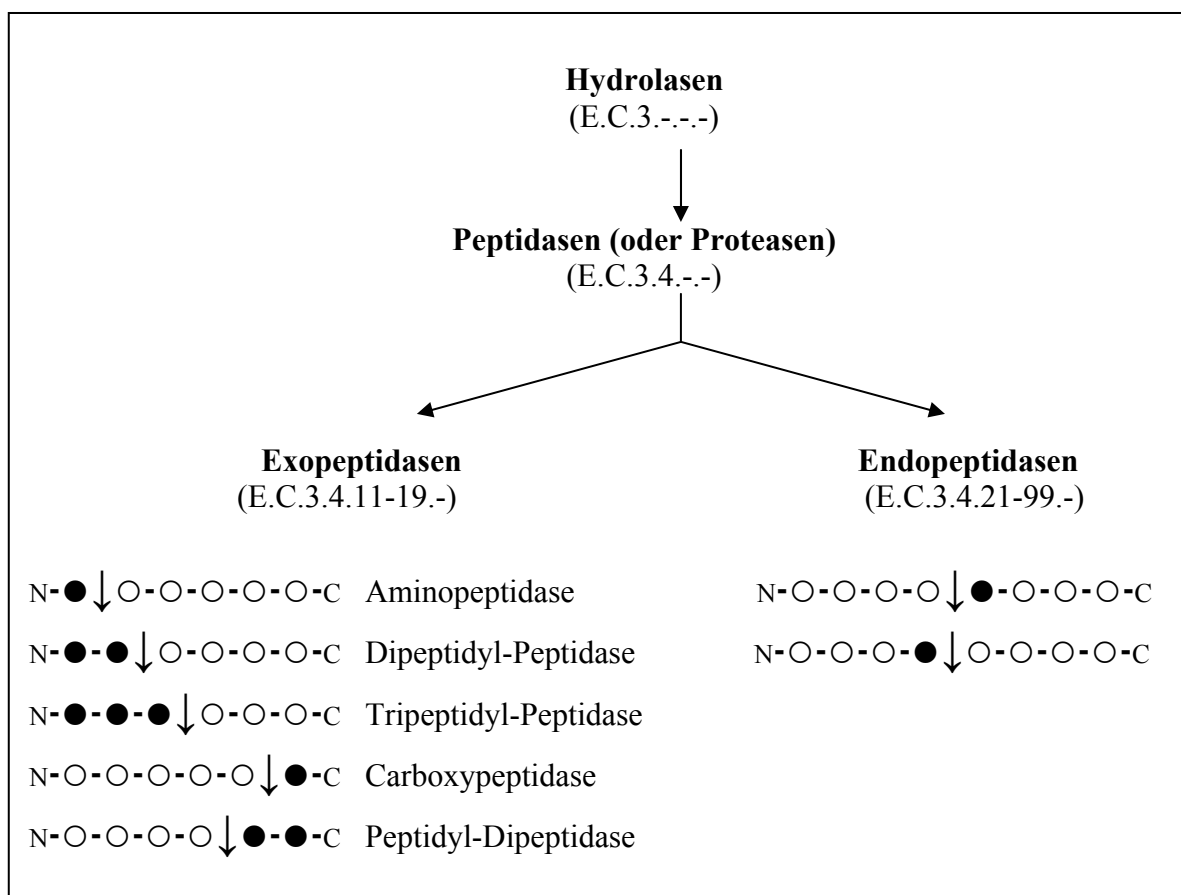
Bei der Hydrolyse von Proteinen wird zwischen limitierter und totaler Proteolyse unterschieden. Bei der totalen Proteolyse werden in der Regel nicht mehr benötigte Proteine, oftmals zur Bereitstellung von Aminosäuren, für die Proteinbiosynthese abgebaut, während bei der limitierten Proteolyse durch gezielte Spaltung einer oder einer geringen Anzahl von Peptidbindungen die Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen, wie z.B. von Enzymen oder Hormonen, erfolgt. Eine der wohl bekanntesten limitierten Proteolysen ist die Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors XIII durch die spezifische Serinprotease Thrombin. Die Abspaltung des Propeptides der alpha-Ketten der Transglutaminase durch die Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Arg37 und Gly38 führt in Gegenwart von Calcium zur Enzymaktivierung (Lorand [2001]).

Die autoproteolytische Aktivierung durch Abspaltung des Propeptides ist bei den meisten prokaryotischen und eukaryotischen Proteasen beschrieben und kommt in allen vier Protease-Gruppen (s.u.) vor (Wandersman [1989], Ohta und Inouye [1990], Wetmore *et al.* [1992], Vernet *et al.* [1995], Braun *et al.* [2001]). Neben der autokatalytischen Reifung (cis-Reaktion) existieren bei Prokaryonten bisher wenige beschriebene Aktivierungsbeispiele, bei denen Proteasen oder andere sekretierte Enzyme in einer trans-Reaktion, also durch eine weitere Protease, prozessiert werden. Im Kulturmedium von *Staphylococcus aureus* V8 wird zum

Beispiel eine Serinprotease durch eine neutrale Metalloprotease aktiviert. Mutanten ohne diese Metalloprotease führen zur Akkumulation der Vorläuferprotease (Drapeau [1978]). Weitere Beispiele für Trans-Aktivierungen durch Metalloproteasen sind die Prozessierung einer Pro-Aminopeptidase von *Aeromonas caviae* (Nirasawa *et al.* [1999]) und einer Pro-Lipase von *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* durch endogene Metalloproteasen.

Die Vielzahl der bereits identifizierten Proteasen machte eine Klassifikation nötig. Die Hauptkriterien der Einteilung richten sich nach dem Wirkort, dem Katalysemechanismus und nach evolutionären Strukturähnlichkeiten der Proteasen. Die Namensgebung erfolgt durch die „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ (IUBMB).

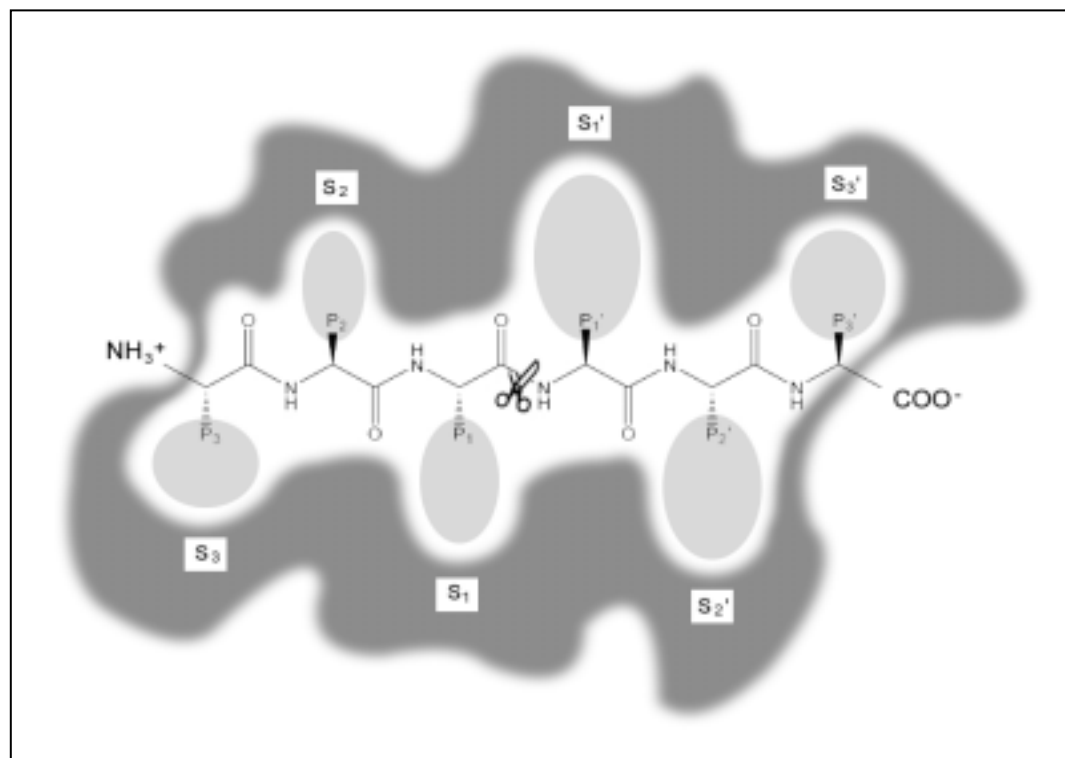
Aufgrund des Wirkortes werden Proteasen in zwei Hauptgruppen unterteilt – in die Exopeptidasen und die Endopeptidasen (Abb. 2-6).



**Abb. 2-6: Einteilung der Proteasen nach ihrem Wirkort.** Schnittstellen in den Aminosäuresequenzen, die durch Exo- und Endopeptidasen erfolgen, sind durch Pfeile markiert. Ausgefüllte Kreise symbolisieren Aminosäuren, die für die Erkennung der zu spaltenden Peptidbindung wesentlich sind.

Die Abspaltung einer oder mehrerer Aminosäuren vom N- bzw. C-Terminus eines Substrates erfolgt durch Exopeptidasen, während Endoproteasen innerhalb einer Polypeptidkette Peptidbindungen hydrolysieren. Exoproteasen, die N-terminal eine einzelne Aminosäure entfernen, nennt man Aminopeptidasen. Daneben gibt es Dipeptidyl- oder Tripeptidyl-Peptidasen, die zwei oder drei Aminosäuren für die Bindung benötigen und das Peptid als Ganzes freisetzen. Entsprechend werden Exoproteasen, die an einem nichtsubstituierten, freien C-Terminus eine Aminosäure entfernen, Carboxypeptidasen genannt oder nach Größe des abgespaltenen Peptids Peptidyl-(Di/Tri/...)peptidasen. Exopeptidasen, die blockierte oder cyclisierte Enden abspalten, werden als Omega-Peptidasen bezeichnet.

Zur Beschreibung der Interaktion von Substraten bzw. Inhibitoren mit Proteasen hat sich die Nomenklatur von Schechter und Berger [1967] durchgesetzt (Abb. 2-7).



**Abb. 2-7: Proteasennomenklatur nach Schechter und Berger [1967].** Aminosäurereste des peptidischen Substrates werden von der Peptidasespaltstelle (symbolisiert als Schere) aus in Richtung N-Terminus mit  $P_1$ - $P_n$  bezeichnet, in Richtung C-Terminus mit  $P_1'$ - $P_n'$ . Die Substratbindetaschen für die Seitenketten der Aminosäurereste werden entsprechend mit  $S_1$ - $S_n$  bzw.  $S_1'$ - $S_n'$  bezeichnet.

Peptidasen, deren Spezifität sich nach den Aminosäuren im Substrat richtet, die N-terminal der zu spaltenden Peptidbindung auftreten, werden P1-spezifische Proteasen genannt, während solche, deren Bindetasche mit Aminosäureseitenketten interagieren, die C-terminal der Spaltstelle lokalisiert sind, als P1'-spezifische Proteasen bezeichnet werden.

Die Seitenkettenspezifität kann durch die Anwendung kommerziell erhältlicher Substrate mit unterschiedlichen Aminosäuren weiter differenziert werden. Insbesondere ermöglichen synthetische Peptide, die Chromophore (z.B. p-Nitroanlid-, p-Nitrophenylester- oder Furylacryloyl-Substrate) oder Fluorophore tragen (z.B. Naphtylamid-Substrate), einfache spektralfotometrische oder fluorimetrische Messungen. Idealerweise besitzt dabei die Modellverbindung die Sequenz an der Schnittstelle des natürlichen Substrats. Für unspezifische Messungen, insbesondere zum Nachweis einer Proteaseaktivität können auch Casein oder Gelatine eingesetzt werden.

Die weitere Unterteilung von Exo- und Endopeptidasen basiert auf der Architektur der Aktivzentren, wobei zwischen Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen unterschieden wird. Neben diesen vier Hauptklassen existieren aber auch Proteasen, die einen unbekanntem Reaktionsmechanismus aufweisen und deshalb in eine eigenständige Klasse eingestuft werden. Im Klassifizierungssystem wird zur Vereinfachung für die Protease-Gruppen der Einbuchstabencode S, C, A, M und U eingeführt. Die große, ständig steigende Anzahl bekannter Proteasesequenzen ermöglicht die weitere Untergliederung und Einstufung in Proteasefamilien aufgrund evolutionärer Verwandtschaft. Vorrangig erfolgt die Zuordnung zu einer Protease-Familie durch Sequenzvergleich und die gleiche Anordnung von Aminosäuren im Aktivzentrum. Die unterste Stufe der Proteasehierarchie ist die sogenannte „Clan“-Mitgliedschaft. Mitglieder eines Clans weisen meist keine hohen Sequenzhomologien auf, besitzen aber ähnliche Tertiärstrukturen oder ein ähnlich oder identisch aufgebautes Aktivzentrum, welches Aussagen über einen gleichen evolutionären Ursprung zulässt (Rawlings und Barrett [1993]).

Serinproteasen, unter denen sich sowohl Exo- und Endoproteasen befinden, sind weit verbreitet bei Viren, Bakterien und Eukaryonten. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind zum Beispiel Chymotrypsin und Trypsin (Clan SA) aus der Bauchspeicheldrüse sowie Subtilisine (Clan SB) von *Bacillus*-Arten. Eine grobe Einteilung der Serinproteasen erfolgt nach ihrer Spezifität. Man spricht von Trypsin-, Chymotrypsin oder Elastase-artigen Proteasen, je nachdem, ob sie Aminosäuren in der Position P1 bevorzugen, die positiv geladen, groß und hydrophob oder klein und hydrophob sind.

Das Aktivzentrum der meisten Serinproteasen besteht aus einem nukleophilen Serin, Histidin (Base) und Aspartat (Elektronendonator), welche eine sogenannte katalytische Triade bilden. Die Peptidspaltung erfolgt in einer Zweistufenreaktion. Bei der Acylierung greift die Hydroxylgruppe des Serins nukleophil die Carboxylgruppe des zu spaltenden Peptides an und bildet ein kovalent gebundenes Enzym-Peptid-Intermediat. Das benachbarte Histidin übernimmt bei der Reaktion das freie Proton, während Aspartat zum einen den Imidazolring des Histidins positioniert und zum anderen die positive Ladung partiell neutralisiert. Nach Freisetzung des C-terminalen Fragments erfolgt die Esterspaltung der Zwischenstufe durch nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls (Rawlings und Barrett [1994] a). Ein ähnlicher Zweistufenmechanismus tritt bei den Cysteinproteasen auf. Die Aktivität dieser Proteasen, zu deren Gruppe z.B. Papain gehört, ist von einer katalytischen Diade abhängig. Das angreifende Nukleophil ist nun das Thiolation des Cysteins und ein Histidin übernimmt wie bei den Serinproteasen die Basenfunktion. Obwohl eine Vielzahl von Cysteinproteasen nur diese beiden Aminosäuren für die Hydrolyse einer Peptidbindung verwenden, unterstreicht bei Papain die Anwesenheit eines konservierten Asparagins, welches vermutlich zur Ausrichtung des Histidins im Aktivzentrum dient, den ähnlichen Katalysemechanismus von Serin- und Cysteinproteasen (Rawlings und Barrett [1994] b).

Bei Aspartat- und Metalloproteasen wird im Gegensatz zu den Serin- und Cysteinproteasen kein kovalent verknüpftes Enzym-Substrat-Intermediat gebildet. In beiden Fällen wird Wasser so polarisiert, dass im Extremfall ein Hydroxylion das angreifende Nukleophil darstellt. Bei Aspartat-Proteasen (z.B. Pepsin) dienen dabei häufig zwei Aspartat-Reste als Brønstedt-Basen, bei Metalloproteasen zweiwertige Ionen wie Zink oder manchmal auch Cobalt und Mangan als Lewis-Säuren.

Metalloproteasen sind die mannigfaltigste Proteasengruppe. Häufig mit einem typischen Zink-Bindemotiv His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH), bei dem die Histidin-Reste neben einem Glutamat und einem Wassermolekül die Zinkliganden darstellen. Neben der Hauptgruppe von Metalloproteasen, die nur ein Metallion für die Katalyse benötigen, existieren auch Peptidasen, die ein zweites Metallion für die Hydrolyse verwenden. Alle Proteasen, mit zwei Metallionen, die bisher beschrieben wurden, sind Exopeptidasen, während Metallopeptidasen mit einem Metallion sowohl Exo- wie auch Endopeptidasen sein können (Rawlings und Barrett [1995] a und b).

Es existieren eine Reihe von Peptidasen, deren katalytischer Mechanismus noch nicht aufgeklärt wurde. Sie werden vorerst in U-Familien eingruppiert, bis weitere biochemische Daten erhältlich sind und der Katalysetyp aufgeklärt ist. Beispiele von Peptidasen mit



unbekanntem Katalysemechanismus sind eine Collagenase von *Porphyromonas gingivalis* oder eine Destabilase von *Hirudo medicinalis*. Die Destabilase ist ein interessantes Enzym, weil sie keine Peptidbindungen in Fibrinogen, Fibrin oder anderen Proteinen hydrolysieren kann, aber  $\epsilon$ -(- $\gamma$ -Glutamyllysin)-Isopeptidbindungen hydrolysiert, die durch Faktor XIII gebildet wurden. Sie besitzt daher eine Isopeptidase-Aktivität (Kato *et al.* [1992], Fradkov *et al.* [1996], Friedrich *et al.* [1998], Rawlings und Barrett [1995b]).

Im vollständig sequenzierten Genom von *S. coelicolor* wurden bisher 180 mutmaßliche Proteasesequenzen durch Homologiestudien identifiziert, was etwa 2 Prozent der proteincodierenden Leserahmen entspricht. Diese beträchtliche Anzahl deutet darauf hin, dass die Proteasene nicht nur zur Verdauung von Proteinen synthetisiert werden. Allerdings wurden bei Streptomyceten bisher nur eine membranständige Aspartat-Protease (SPase II) und eine Cystein-Exopeptidase (Pyroglutamyl-Peptidase I) charakterisiert. Weitere mutmaßliche Aspartat- und Cysteinprotease-Gene (insgesamt 16) sind im Genom von *S. coelicolor* vorhanden, deren Funktionalität aber noch nicht bekannt ist. Die meisten identifizierten und charakterisierten Peptidasen gehören zur Serin- und Metalloproteasen-Gruppe (Rawlings *et al.* [2002]). Allein die Proteasemischung Pronase von *S. griseus* enthält mindestens zehn verschiedene sekretierte Exo- und Endopeptidasen vom Metallo- und Serinprotease-Typ (Awad *et al.* [1972], Vosbeck *et al.* [1973], Lofqvist [1974], Seber *et al.* [1976], Sidhu *et al.* [1995]).

Die Genstruktur der Endoproteasen von *Streptomyces* weist den typischen Aufbau vieler sekretorischer Proteine auf, wie bereits oben bei Transglutaminase von *S. mobaraensis* beschrieben wurde. Nach der Synthese der Präprotease im Cytoplasma und Transport zur Cytoplasmamembran wird das Signalpeptid durch die membranständige Signalpeptidase in der Zellwand entfernt. Nach Translokation durch die Membran und Faltung erfolgt bei Endoproteasen, im Gegensatz zu TGase von *S. mobaraensis*, die Aktivierung autokatalytisch (Henderson *et al.* [1987], Chang *et al.* [1994], Sidhu und Borgford [1996], Chang *et al.* [1997]).

Trotz der beträchtlichen Anzahl isolierter und charakterisierter Streptomyceten-Proteasen ist über deren biologische Funktion bisher nur wenig bekannt. Eine wichtige physiologische Rolle kommt den Proteasen bei der Nahrungsaufnahme zu. Aufgrund der Fähigkeit, Proteine in kleine Fragmente zu zerteilen, sind Serin- und Metalloproteasen bei der Assimilation extrazellulärer Nahrungsproteine wichtig (Gibb und Strohl [1988], Shapiro [1989], Kim und Lee [1995b], Chang *et al.* [1997]). Nicht nur Endoproteasen, sondern vermutlich auch

Exoproteasen wie z.B. eine Tripeptidyl-Peptidase (TPP A) von *S. lividans* sind für die Degradation von Proteinen verantwortlich (Butler *et al.* [1995], Binnie *et al.* [1995]).

Neben der Proteinverdauung ist eine Beteiligung von Proteasen am komplexen Wachstumszyklus der Streptomyceten sehr wahrscheinlich. Die Sekretion der Trypsin-artigen Proteasen (TLP) von *S. exfoliatus* und *S. albidoflavus* wird durch Einschränkung von Kohlenstoff, Stickstoff oder Phosphat ausgelöst. Unter solchen Bedingungen bilden normalerweise Oberflächen- und Flüssigkulturen dieser Stämme Sporen aus. Die TLP-Produktion beginnt mit der Luftmycelbildung und erreicht ihren Höhepunkt bei optimalen Hyphenwachstum. Die Zugabe der Trypsin-Inhibitoren TLCK und Leupeptin verhindert die Luftmycelbildung. Die These, dass die Trypsin-artige Protease Einfluss auf morphologische Veränderungen hat, wurde durch die Tatsache unterstützt, dass Streptomyceten-Mutanten von *S. exfoliatus* und *S. albidoflavus*, die nicht in der Lage waren Luftmycel zu bilden (*bld*-Mutanten), keine TLP produzieren (Kang *et al.* [1995], Kim und Lee [1995] b, Kim und Lee [1996]).

Eine Regulationskaskade während der Differenzierung von Substrat- und Luftmycel konnte eindrucksvoll bei *S. exfoliatus* gezeigt werden, wo eine zeitabhängige Sekretion von Leupeptin, Leupeptin inhibierendem Enzym (LIE) und TLP in Abhängigkeit von der Wachstumsphase beobachtet wurde. In einem komplexen Zusammenspiel von Enzym und Inhibitor wird die Trypsin-artige Protease in der Substratmycel-Wachstumsphase durch das reversibel inhibierende Tripeptid Leupeptin inhibiert. Der Peptidinhibitor wird wiederum in der Wachstumsphase, in der die Luftmycelbildung beginnt, durch LIE inaktiviert. Dadurch erlangt TLP seine proteolytische Aktivität zur Metabolisierung des Substratmycels für die Bildung von Luftmycel bzw. des von Spitzenwachstum in Flüssigkulturen (Kim und Lee [1995] a und b, Kang *et al.* [1996]).

Die Beteiligung von Proteasen und Nucleasen am Abbau von Substratmycel zur Unterstützung der Luftmycelbildung konnte auch bei *S. antibioticus* gezeigt werden. Die Inhibierung von Serinproteasen und Nucleasen führte zu einer Abschwächung der Luftmycelbildung. Interessanterweise wird die Nuclease-Aktivität durch proteolytische Prozessierung von einem weniger aktiven Vorläuferprotein erhöht (Nicieza *et al.* [1999], Fernandez und Sanchez [2002]).

## 2.4 Proteaseinhibitoren

Neben dem bereits erwähnten Leupeptin bilden Streptomyceten eine Vielzahl von Proteaseinhibitoren mit geringer Molekularmasse (Tab. 2-1), was erneut deutlich macht, dass Protease-Inhibitor-Wechselwirkungen für die Regulation unterschiedlicher physiologischer Prozesse wichtig sind.

**Tab. 2-1: Inhibitoren von Streptomyceten mit geringem Molekulargewicht.**

Inhibitor	Herkunft	Inhibitorklasse	Literaturstelle
Bestatin	<i>S. olivoreticuli</i>	Aminopeptidasen	Blomgren <i>et al.</i> [1980]
Lapstatin	<i>S. rimosus</i>	Aminopeptidasen	Lampret <i>et al.</i> [1999]
Amastatin	<i>S. sp.</i>	Aminopeptidasen	Aoyagi <i>et al.</i> [1978]
Pepstatin	<i>S. sp.</i>	Saure Proteasen	Corvol <i>et al.</i> [1973]
Phosphoramidon	<i>S. tanashiensis</i>	Metalloproteasen	Suda <i>et al.</i> [1973]
Leupeptin	<i>S. exfoliatus</i>	Serin- und Cysteinproteasen	Kim und Lee [1995]
Antipain	<i>S. sp.</i>	Serin- und Cysteinproteasen	Umezawa <i>et al.</i> [1972]

Bei Streptomyceten treten auch Proteininhibitoren mit einer Molekularmasse über 10 kDa auf. Die bekanntesten und ubiquitär bei *Streptomyces* vorkommenden Protein-Proteaseinhibitoren gehören zur Familie der *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitoren (SSI). Der erstmals entdeckte Peptidinhibitor von *Streptomyces albogriseolus* aus dieser Gruppe war in der Lage Subtilisin, eine Serinprotease, zu inhibieren. Daher stammt die Namensgebung (Muraio und Sato, [1972]).

Wie Experimente mit SSI-Deletions-Mutanten zeigten, hat der Inhibitor nur einen geringen Einfluss auf das Substratmycelwachstum von Streptomyceten. Die Mutationen bewirkten aber eine starke Abnahme der Luftmycelbildung und eine beträchtlichen Zunahme der Protease-Aktivität bei *S. albogriseolus* S-3253. Vermutlich sind daher die Proteaseinhibitoren der SSI-Familie nicht für das Wachstum essentiell, sondern haben eine Bedeutung bei der Regulation proteolytischer Aktivitäten, die bei morphologischen Veränderungen von Wichtigkeit sind (Kuramoto *et al.* [1996], Taguchi *et al.* [1995] Taguchi *et al.* [1997], Terabe *et al.* [1996]).

Die Beteiligung von Proteasen am Wachstumszyklus der Streptomyceten und den damit verbundenen morphologischen Veränderungen, wie Substratmycel-, Luftmycelbildung und Sporulation, zeichnet sich immer deutlicher ab. Diese biologischen Prozesse benötigen eine exakte Regulation, die vermutlich durch verschiedenste Proteaseinhibitoren vermittelt wird.

Die starke Präsenz der Transglutaminase im Kulturmedium von *S. mobaraensis* mit der ungewöhnlichen Fähigkeit des Enzyms, Proteine über Isopeptidbindungen zu vernetzen, lassen eine Beteiligung an morphologischen Veränderungen bei Streptovercillien, mit ihrem charakteristischen baumwollartigen Koloniewachstum und ihrer besonderen wirtelartigen Sporophoren-Gestalt, vermuten. Da die TGase aber als inaktives Zymogen ins Kulturmedium sekretiert wird, muss die TGase vor Ausübung der biologischen Funktion durch limitierte Proteolyse aktiviert werden.

## **2.5 Zielsetzung und Strategie**

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis und die Charakterisierung einer Transglutaminase-aktivierenden Protease von *S. mobaraensis*. Aus vorangegangenen Arbeiten war bekannt, dass eine „Trypsin-ähnliche“ Arg-C-Protease im Flüssigmedium vorhanden ist. Bei einem Reinigungsversuch der Arg-C-Protease konnte die Aktivität dramatisch gesteigert werden, vermutlich durch Abtrennung eines Inhibitors. Das teilgereinigte Enzym war jedoch nicht in der Lage, TGase zu aktivieren. Insgesamt machten die Untersuchungen deutlich, dass Inhibitoren von *S. mobaraensis* ins Medium abgegeben werden, die Endoproteaseaktivitäten unterdrücken können. Da aber ProTGase während der Submers-Kultivierung vollständig prozessiert wird, wurde zu Beginn dieser Arbeit weiter nach Endoproteasen in Flüssigkulturen gesucht. Nach erfolglosem Nachweis der TGase-aktivierenden Protease im Komplexmedium, wurde die Suche nach einer Endoprotease auf Oberflächenkulturen ausgedehnt, wo im Gegensatz zur Flüssigkultur alle Differenzierungsstadien durchlaufen werden.