

5 Diskussion

Streptovercillium mobaraense wurde wie sämtliche Streptovercillien 1990 aufgrund von 16S rRNA-Analysen durch Witt und Stackebrandt in die Gattung *Streptomyces* eingegliedert, obwohl sich Mitglieder der ehemaligen, eigenständigen Gattung *Streptovercillium* in einer Reihe morphologischer und biochemischer Merkmale unterscheiden.

Makroskopisch können Streptovercillien einfach von den Streptomyceten dadurch unterschieden werden, dass sie beim Wachstum auf Nähragarmedium einen baumwollartigen Phänotyp aufweisen, der durch die Verflechtung von Lufthyphen entsteht. Unter dem Lichtmikroskop erkennt man eine besondere wirtelartige Sporophoren-Form der *Streptovercillien*, die Ähnlichkeiten mit einem Stacheldraht aufweist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen machen eine weitere Besonderheit der Streptovercillien deutlich, denn die reifenden und die fertig ausgebildeten Sporen besitzen eine charakteristische Sporenhüllstruktur (Attwell *et al.* [1973]). Die bei Streptovercillien nachgewiesene, häufige Resistenz gegenüber Lysozym (Kutzner *et al.* [1978]) und Neomycin (Goodfellow und Cross [1984]), die bei *Streptomyces*-Arten nicht zu finden ist, hängt vermutlich mit einer besonderen Zellwandstruktur zusammen, die sich auch in einer schlechteren Durchlässigkeit für bestimmte Antibiotika ausdrückt. Transglutaminase (TGase), ein Protein vernetzendes Enzym, das *Streptomyces mobaraensis* (früher *Streptovercillium mobaraense*) in großen Mengen sekretiert, dürfte dabei die Eigenschaften der Mureinwand weitgehend mitbestimmen.

Bakterielle TGasen von Streptomyceten weisen im Vergleich zu eukaryotischen TGasen eine erhöhte Stabilität und eine Calcium-Unabhängigkeit auf. Da für dieses Enzym vielfältige Anwendungsmöglichkeiten, wie z.B. in der Kosmetikbranche, Medizin, Bioanalytik oder im Ernährungsbereich, naheliegend sind (vgl. z.B. Nielsen *et al.* [1995], Zhu *et al.* [1995]), setzte die Industrie auch nach Entdeckung des Enzyms von *S. mobaraensis* die Durchmusterung unterschiedlicher Organismen auf der Suche nach weiteren TGase-Produzenten fort. Innerhalb der Familie *Streptomycetaceae* wurde überraschenderweise auch eine TGase von *Streptomyces lavendulae* nachgewiesen (Andou *et al.* [1992]). Aufgrund von DNA-DNA-Hybridisierungsexperimenten teilte Williams *et al.* [1983] sämtliche Streptomyceten in Gruppen und Cluster ein. *S. lavendulae* gehört entsprechend dieser Einteilung wie sämtliche

Streptoverticillien, die bisher als TGase-Produzenten identifiziert wurden, in die Gruppe F. Die enge Verwandtschaft von *S. lavendulae* mit Streptoverticillien wird ebenfalls durch phylogenetische Untersuchungen, wie 16S rRNA-Analysen, bestätigt (Witt und Stackebrandt [1990]). Im Unterschied zu den Streptoverticillien besitzt *S. lavendulae* jedoch spiralförmige und keine wirtelartigen Sporophoren, zeigt aber ebenfalls ein baumwollartiges Wachstum auf Nährböden. Eine Beteiligung der TGase-Aktivität an der wirtelartigen Morphologie der Sporophoren ist deshalb vermutlich auszuschließen.

In dieser Arbeit wurde durch Sequenzvergleiche gezeigt, dass das Genom von *S. coelicolor* kein TGase-Gen enthält. Phylogenetisch ist *S. coelicolor* mit den Streptoverticillien wenig verwandt (Witt und Stackebrandt [1990]). Das Fehlen eines baumwollartig wachsenden Luftmycels sowie nicht vorhandene wirtelartige Sporophoren deutet auf eine Einflussnahme von TGase auf das morphologische Erscheinungsbild hin. Wahrscheinlicher ist aber lediglich eine Festigung der Mureinschichten, weil im Gegensatz zu *S. coelicolor* bei *S. mobaraensis* sowohl auf Oberflächenkulturen als auch in Flüssigkulturen ein rigides Substratmycel beobachtet werden konnte, das durch Erhitzen bei 100 °C im Wasserbad nicht zerstört wurde.

Wie aus der bisherigen Diskussion bereits hervorgeht, ist über die physiologische Funktion bakterieller TGase nur wenig bekannt. Im Vergleich zu den bekannten Calcium-abhängigen TGasen der Invertebraten (Tokunaga *et al.* [1993]), Pflanzen (Kang und Cho [1996]) und Vertebraten (Yasueda *et al.* [1995]) weisen die TGasen der Streptomyceten eine vollkommen unterschiedliche Primärstruktur auf, was einerseits die Einzigartigkeit dieses Enzyms unterstreicht, andererseits aber die Möglichkeit mindert, bereits vorhandenes Wissen eukaryotischer TGasen auf die bakteriellen Systeme zu übertragen.

Mit der Aufklärung der TGase-Primärstruktur von *S. mobaraensis* (Pasternack *et al.* [1998]), die den typischen Aufbau vieler sekretorischer, hydrolytischer Enzyme mit einer Prä- und Prosequenz am N-Terminus aufweist, konnte eindeutig bestätigt werden, dass der Bestimmungsort der TGase zumindest außerhalb der Cytoplasmamembran zu suchen ist (Abb. 5-1).

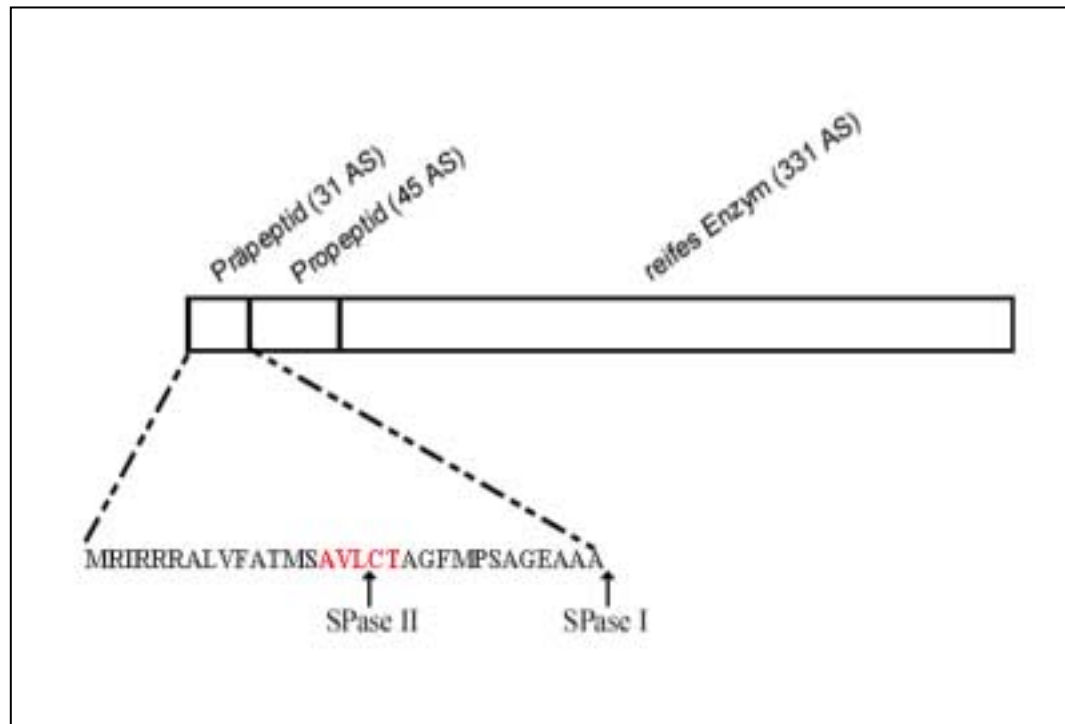


Abb. 5-1: Proteinstruktur der Transglutaminase von *S. mobaraensis* mit mutmaßlichen Signalpeptidase I- und II-Schnittstellen. Schnittstellen der SPasen I und II sind durch Pfeile dargestellt. Die mutmaßliche SPase II-Erkennungssequenz ist rot markiert.

Bisher wurde hauptsächlich davon ausgegangen, dass TGase in das Medium sekretiert wird, weil bei der *Submers*-Kultivierung von *S. mobaraensis* Enzymmengen von 50-100 mg pro Liter erreicht werden. Dennoch besitzt das für die Translokation aus der Zelle verantwortliche aminoternale Signalpeptid neben der Signalpeptidase I- (SPase I) Schnittstelle auch noch eine mutmaßliche SPase II Erkennungssequenz (Abb. 5-1). Sekretorische Proteine mit SPase II-Spaltungsmotiv können durch Ausbildung einer Thioetherbindung zwischen dem Cystein des Signalpeptids und Glycerinphospholipiden in der Cytoplasmamembran verankert werden (Simonen und Palva [1993], Sutcliffe und Russell [1995], Bron *et al.* [1998], Tjalsma *et al.* [2000]). Eine Reihe von Beispielen zeigen sowohl die Membranständigkeit sekretorischer Proteine Gram-positiver Bakterien mit einer Signalpeptidase I- und II-Schnittstelle als auch ihre direkte Sekretion ins Medium. Ein Zusammenhang zwischen der differentiellen Nutzung der verschiedenen Signalpeptidasen und der Zelldifferenzierung in unterschiedlichen

Lebensphasen, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde, könnte auch bei der Sekretion der TGase auftreten (Nielsen und Lampen [1983], Navarre *et al.* [1996], Deak *et al.* [1998]).

Die jüngst ermittelte 3D-Struktur der TGase von *S. mobaraensis* unterstreicht aufgrund gravierender Unterschiede gegenüber den bekannten Kristallstrukturen eukaryotischer TGasen die Sonderstellung der bakteriellen TGase. An der Katalyse sind vermutlich wie bei den eukaryotischen TGasen drei Aminosäuren beteiligt, die in einer katalytischen Triade angeordnet sind. Die Aminosäuren im Aktivzentrum besitzen aber die Reihenfolge Cys64-Asp255-His274 und nicht wie bei den Faktor XIII-Transglutaminasen Cys-His-Asp. Das Histidin kann bei der bakteriellen TGase wegen seiner Entfernung zum Cystein wahrscheinlich nicht als Base fungieren, weshalb die TGase-Reaktion einen anderen Katalysemechanismus aufweisen muss (Kashiwagi *et al.* [2002]).

Das Reaktionszentrum im aktiven Spalt der bakteriellen TGase ist mit vielen negativ geladenen und aromatischen Aminosäuren besetzt, die vermutlich die Spezifität bestimmen, während die Proteinoberfläche viele basische Aminosäuren enthält. Eine Wechselwirkung der insgesamt basischen Oberfläche der TGase mit negativ geladenen Teichon- und Teichuronsäuren in der Zellwand wird durch die vorhandene TGase-Aktivität in der Membran nahe gelegt, die neben eigenen Versuchen auch von Pasternack *et al.* [1998] bei der Aufarbeitung von *Streptomyces*-Zellen in der Zellwandfraktion nachgewiesen wurde. Die Verankerung reifer TGase über ionische oder kovalente Verankerung in der Zellwand oder von ProTGase in der Cytoplasmamembran über das Cystein des Signalpeptids ist in weiteren Arbeiten zu untersuchen.

Neben der Fähigkeit durch Verknüpfung von Glutamin- und Lysinresten, die sich innerhalb einer Polypeptidkette befinden, Proteinaggregate herzustellen, katalysiert bakterielle Transglutaminase weitere chemische Reaktionen. Diese stehen im Zusammenhang mit ihrer biologischen Aufgabe und dürfen bei der Suche nach TGase-Substraten nicht außer Acht gelassen werden. Die Spezifität der Transglutaminase-Reaktion ist vor allem von der Sequenz des Glutamindonors abhängig. Die Proteinstruktur der Aminosubstrate, die als Acylakzeptoren fungieren, muss weniger exakt definiert sein. Die γ -Carboxyamidgruppe eines reaktiven Glutaminrests innerhalb einer Polypeptidkette kann mit einer Reihe von primären Aminen, aber auch mit der α -Aminofunktion von Peptiden und damit vermutlich auch von Proteinen

vernetzt werden. (Boumans *et al.* [2001]). Wenn keine ϵ -Aminogruppe des Lysinrestes oder kein anderes freies Amin zur Verfügung steht, kann in einer langsamen Reaktion ein Wassermolekül die Thioesterbindung des Enzym-Substrat-Komplexes nukleophil angreifen und durch die damit verbundene Desamidierung die negative Ladung eines Proteins erhöhen (Lorand *et al.* [1979], Nonaka *et al.* [1996]). Weitere Acylakzeptoren bakterieller TGasen sind primäre Alkoholgruppen. Dieser Reaktionstyp wurde erstmalig bei einer humanen, membrangebundenen TGase 1 festgestellt. TGase 1 katalysiert dabei die kovalente Bindung zwischen Involucrin und ω -Hydroxyceramiden, die integraler Bestandteil der Epidermis sind (Nemes *et al.* [1999]). Diese Herstellung von Estern mit TGase ist auch in einem Patent beschrieben. Die Erfinder konnten zeigen, dass TGase von *S. mobaraensis* die Verknüpfung von proteingebundenem Glutamin mit primären Alkoholen katalysiert. Zusammenfassend behaupten die Patentautoren, dass TGase in der Lage ist, eine Verknüpfung zwischen peptidgebundenem Glutamin und Alkoholen, Aminosacchariden und Sacchariden herzustellen (Boumans *et al.* [2001]). Lassen sich diese Ergebnisse durch wissenschaftliche Experimente weiter bestätigen, müssen bei der Suche von Substratproteinen und der biologischen Funktion der TGase von *S. mobaraensis* diese Ergebnisse berücksichtigt werden.

ProTGase und die nachfolgend durch Proteolyse aktivierte TGase stellen Hauptproteine des Kulturmediums von *S. mobaraensis* dar, was auf die wichtige Funktion dieses Enzyms für das Bakterium hindeutet. Pasternack *et al.* [1998] wiesen erstmals die Sekretion der inaktiven ProTGase von *S. mobaraensis* nach einer Kultivierungszeit von 24 Stunden mit TGase-Antikörpern nach. Das Zymogen wird im Kulturmedium über einen Zeitraum von 24-40 Stunden durch eine vermutliche ebenfalls sekretierte Protease vollständig in die reife, aktive TGase umgewandelt. In Aktivierungsexperimenten mit isolierter ProTGase von *S. mobaraensis* konnten Pasternack *et al.* [1998] zeigen, dass Proteasen mit unterschiedlicher Spezifität und Herkunft in der Lage sind das Enzym zu aktivieren. Es ist anzunehmen, dass der ProTGase-Aktivierungsbereich (...PSFRAP...) eine Loopstruktur besitzt, die durch die Helixbrecher Prolin und Serin, die den Spaltstellenbereich flankieren, ermöglicht wird. Es existieren eine Reihe von Beispielen, bei denen Zymogene aufgrund der exponierten Lage des Spaltbereiches ebenfalls durch exogene Proteasen aktiviert werden (Winther und Sorensen [1991], Takekawa *et al.* [1991], Kim *et al.* [1993], Vernet *et al.* [1995], Khan und James [1998]).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen, stand im Mittelpunkt dieser Dissertation die Identifikation und der Nachweis der endogenen Protease, die durch Abspaltung des Propeptides die TGase aktiviert. Bei der Suche nach der Protease wurde ProTGase als natürliches Substrat verwendet, außerdem kommerziell erhältliche, chromogene Protease-Substrate, deren Auswahl sich nach der Sequenz der Spaltstelle richtete. Die Kultivierung von *S. mobaraensis* erfolgte sowohl auf GYM-Medium (Oberflächenkulturen) sowie in einem Komplexmedium (Submerskulturen).

Der Nachweis der aktivierenden Protease im Komplexmedium erwies sich als schwierig. *In vitro* Aktivierungsversuche mit zellfreiem und ethanol-gefälltem Kulturmedium ergaben ProTGase-Prozessierungszeiten von 1 bis 3 Tagen; sie waren vergleichbar mit denen, die bei der Kultivierung im Komplexmedium beobachtet wurden. Zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung konnte mit gereinigter ProTGase als Substrat eine erhöhte Proteasesekretion festgestellt werden, so dass eine Reinigung der aktivierenden Protease aus dem Kulturmedium nicht möglich war.

Die Identifizierung eines sekretierten Protease-Peptidinhibitors mit einer Molmasse von 14 kDa (P14), der aufgrund von Sequenzvergleichen in die *Streptomyces*-Subtilisin-Inhibitor (SSI)-Familie eingeordnet werden konnte, liefert eine plausible Erklärung für die langsame Aktivierung der TGase sowohl bei der Kultivierung im Komplexmedium als auch bei Prozessierungsversuchen. SSI-artige Proteine sind bei *Streptomyces* und bei *Streptoverticillium* weit verbreitet und leicht zu isolieren, da sie in großen Mengen sekretiert werden (Taguchi *et al.* [1993], Taguchi *et al.* [1997]). Die Proteininhibitoren sind dafür bekannt, dass sie Serinproteasen inhibieren. Es ist aber auch ein Beispiel beschrieben, bei dem ein SSI-Protein gleichzeitig Serin- und Metalloproteasen hemmt (Hiraga *et al.* [2000]).

Mit dem Nachweis von P14 wurde deutlich, dass dieser Inhibitor auch durch das bereits etablierte ProTGase-Reinigungsverfahren von Pasternack *et al.* [1998] nicht vollständig abgetrennt wird. Da ProTGase als Substrat im Aktivierungstest zum Nachweis für die TGase-aktivierende Protease unerlässlich war, mussten alle Proteine aus dem ProTGase-Pool entfernt werden, um jede Inhibition oder Prozessierung der TGase aktivierenden Protease ausschließen zu können. Mit einem modifizierten Reinigungsverfahren gelang es, Spuren von reifer TGase und P14 abzutrennen und eine hochreine ProTGase zu erhalten.

Trotz der starken Dominanz von P14 im Komplexmedium von *S. mobaraensis* gelang der Nachweis proteolytischer Aktivitäten mit chromogenen Protease-Substraten. Typische Endoprotease-Substrate wie Suc-Ala-Pro-pNA, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA und CBZ-Pro-Phe-Arg-pNA oder Exoprotease-Substrate wie Leu-pNA, Phe-pNA und Ala-Pro-pNA wurden hydrolysiert. Die Spaltung von P1'-Substraten wie FA-Ala-Phe-Amid und FA-Gly-Leu-Amid, die zum Nachweis von z.B. Dispase oder Thermolysin genutzt werden, konnte zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung festgestellt werden.

Mit der Teilreinigung einer Arg-C-Endoprotease (Hydrolyse von CBZ-Pro-Phe-Arg-pNA) und der Reinigung von zwei Exopeptidasen, einer Leu/Phe-Protease und einer Peptidyl-Aminopeptidase, konnten sämtliche proteolytische Aktivitäten des Kulturmediums, die mit den kommerziellen Substraten gefunden wurden, diesen Proteasen zugeordnet werden. Abb. 5-2 gibt einen Überblick über die verwendeten Substrate, die vom ProTGase-Aktivierungsbereich abgeleitet waren, und über die dazugehörigen Proteasen.

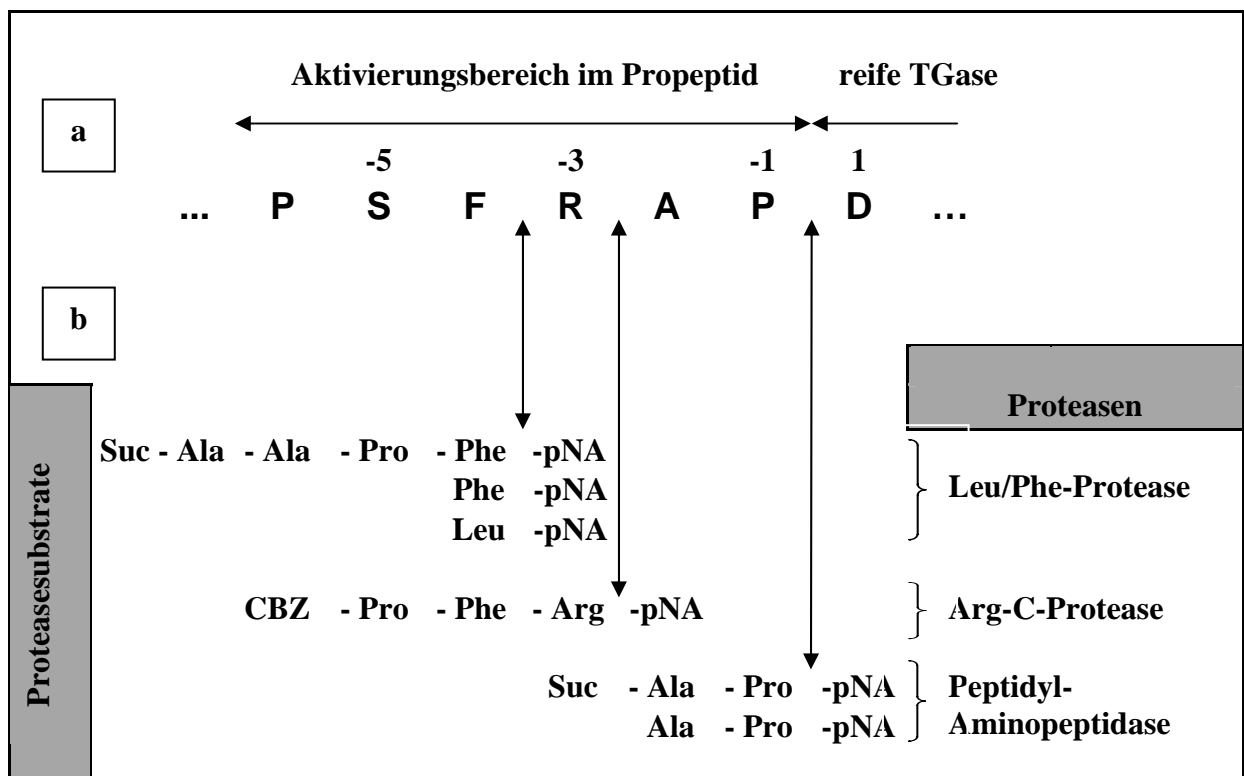


Abb. 5-2: Aktivierungsbereich von TGase (a) und davon abgeleitete, chromogene Substrate, die zur Identifizierung einer Leu/Phe- und Arg-C-Protease sowie einer Peptidyl-Aminopeptidase im Kulturmedium von *S. mobaraensis* führten (b).

In Vorarbeiten des Arbeitskreises konnte bereits gezeigt werden, dass die Arg-C-Protease nicht in der Lage ist, ProTGase zu aktivieren. Dieses Ergebnis konnte im Rahmen dieser Dissertation bestätigt werden. Eine vollständige Reinigung dieser Protease mit Trypsin-Spezifität wurde daher nicht durchgeführt. Die bei der Teilreinigung der Arg-C-Protease durchgeführte Ammoniumsulfat-Fällung führte in vielen Fällen zu einer Verdopplung der Hydrolysegeschwindigkeit, was durch die Abtrennung eines Inhibitors zu erklären ist. P14 kann hierbei weitgehend ausgeschlossen werden, da der Peptidinhibitor weder durch Ammoniumsulfat-Fällung noch durch Hydrophobe-Interaktionschromatographie abzutrennen war. Mit diesen Techniken ließ sich jedoch die Arg-C-Protease-Aktivität erheblich steigern.

Im Kulturmedium von *S. mobaraensis* gelang, wie bereits erwähnt, der Nachweis einer für die Reinigung ausreichenden Menge an TGase-aktivierender Endoprotease nicht. Da aber eine Beteiligung von Exoproteasen an einer schrittweisen Prozessierung sehr wahrscheinlich war, erfolgte die Reinigung der Leu/Phe-Protease und der Peptidyl-Aminopeptidase (PAP) bis zur Homogenität.

Beide Exopeptidasen waren in der Lage N-terminal blockierte Substrate, die normalerweise zum Nachweis von Endoproteasen verwendet werden, in einer langsamen Reaktion zu hydrolysieren. Die Aktivierung von ProTGase konnte aber ausgeschlossen werden.

Die gereinigten Proteasen, Leu/Phe-Protease und PAP, wurden nicht durch P14 inhibiert, wie *in vitro* Versuche zeigten. Das Ergebnis ist nicht überraschend, da bisher keine Exoproteasen beschrieben wurden, die durch SSI-Homologe inhibiert werden.

PAP konnte aufgrund ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz den Tripeptidyl-Aminopeptidasen (TAP) zugeordnet werden (Binnie *et al.* [1995], unveröffentlicht). Neben einer TAP von *S. lividans* wurde durch Datenbankrecherchen eine nahezu identische Sequenz im Genom von *S. coelicolor* identifiziert. Die Proteinstruktur der PAP besteht aus einem Signalpeptid und dem reifen Enzym. Die Sequenz der reifen PAP ist aber unter Einbezug des mutmaßlichen Signalpeptids um sieben Aminosäuren kürzer, was auf Autoproteolyse hindeutet. Die Kürzung der N-terminalen Region durch Exopeptidasen wurde bei sekretierten Proteinen schon häufiger festgestellt (Krieger *et al.* [1994], Binnie *et al.* [1995], Butler *et al.* [1995]). Auch bei der Bestimmung der N-Termini von zwei SSI-Proteinen von *S. lividans* und *S. longisporus* konnte in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit eine N-terminale Aminosäure-Heterogenität gefunden werden, die vermutlich durch sekretierte

Aminopeptidasen verursacht wurde (Strickler *et al.* [1992]). Ähnliches gilt für eine TGase von *S. fervens* subsp. *melrosporus*, bei der TGase-Formen mit unterschiedlichen N-Termini nachgewiesen wurden (Fuchsbauer, persönliche Mitteilung).

Aufgrund der Proteinsequenz und des durch Inhibition nachgewiesenen Serins im Aktivzentrum konnte die monomere PAP in die Serinproteasefamilie S37 eingestuft werden. Die Inhibitorstudien zeigten außerdem, dass die Konformation von PAP vermutlich durch Calciumionen stabilisiert wird, wie dies auch bei den Serinproteasen Trypsin und Subtilisin der Fall ist (Russin *et al.* [1974], Pantoliano *et al.* [1988]).

Die Identifizierung von PAP gelang mit dem Dipeptid-Substrat Ala-Pro-pNA. Der Eintrag des homologen Enzyms von *S. lividans* in die Proteasendatenbank erfolgte als Tripeptidyl-Amino-peptidase, deren Spezifität aber durch keine veröffentlichte wissenschaftliche Arbeit gezeigt wurde (Binnie *et al.* [1995], unveröffentlicht). Mit kommerziell erhältlichen chromogenen Mono-, Di-, Tri- und Tetrapeptiden wurde die Präferenz von PAP für die Hydrolyse von Tripeptiden bestätigt. Besonders hohe Hydrolyseraten wurden erreicht, wenn die Position P1 durch ein Prolin besetzt war, wie sie auch im Aktivierungspeptid von TGase vorhanden ist. Mit einer etwa 30 bis 100fach geringeren Hydrolyserate wurden Di- und Tetrapeptide gespalten. Die Hydrolyse von Ala-Ala-Val-Ala-pNA in mehreren Stufen kann ausgeschlossen werden, da weder Aminosäurenanilide, noch Ala-Ala-pNA durch PAP hydrolysiert werden. Nach der Aktivität zu urteilen ist PAP eine Tripeptidyl-Amino-peptidase, die aber auch vier Aminosäuren in einem Schritt N-terminal entfernen kann. Exopeptidasen, die diese Spezifität besitzen, wurden bisher weder bei Eukaryonten oder Archaea noch bei Prokaryonten beschrieben. Zur vollständigen Charakterisierung von PAP sind neue Tri- und Tetrapeptide zu synthetisieren, mit denen die ungewöhnliche Peptidase weiter untersucht werden kann.

Die zweite Exopeptidase des Kulturmediums, die Leu/Phe-Protease, weist ein apparentes Molekulargewicht von 54.000 (SDS-PAGE) auf. Die N-terminale Sequenz stimmt mit 73 Prozent gut mit einer mutmaßlichen Metalloprotease im Genom von *S. coelicolor* überein. Deren Primärstruktur hat, wie die bereits beschriebene Peptidyl-Amino-peptidase, nur ein Signalpeptid ohne Propeptid, dem direkt die Proteinkette des reifen Enzyms folgt. Die Leu/Phe-Protease gehört zur M1-Familie, die wie die meisten Metalloproteasen ein HEXXH-Motiv hat. Die Heterogenität dieser Gruppe, deren Mitglieder man bei Eu- und Prokaryonten findet, spiegelt sich auch in der unterschiedlichen Substratspezifität wieder. M1-Proteasen

katalysieren die N-terminale Freisetzung von neutralen, basischen oder sauren Aminosäuren. Die Leu/Phe-Protease von *S. mobaraensis* ist eine Aminopeptidase mit der Fähigkeit, hydrophobe Aminosäuren zu entfernen. Bei Streptomyceten wurde bisher keine vergleichbare Aminopeptidase isoliert und charakterisiert. Eine Beteiligung der Leu/Phe-Protease an der TGase-Prozessierung konnte aber ausgeschlossen werden. Die Leu/Phe-Protease war nicht in der Lage, Phenylalanin oder weitere Aminosäuren von einer proteolytisch aktivierten FRAP-TGase zu entfernen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf die weitere Charakterisierung der mit hohem Aufwand isolierten Protease verzichtet.

Die vergebliche Suche nach einer TGase-aktivierenden Protease im Kulturmedium führte zu einer alternativen Screening-Methode. Die Sekretion von Proteinen ist bei *Streptomyces* vom Differenzierungsstadium abhängig. Deak *et al.* [1998] konnte eine β -Lactamase sowohl in der Plasmamembran, wo das Protein noch über ein Cystein des Signalpeptids verankert war, als auch im Kulturmedium nachweisen. Unter Kultivierungsbedingungen, die keine Sporulation zulassen, oder bei einer nicht sporulierenden *S. griseus*-Mutante stellte die Arbeitsgruppe fest, dass die Sekretion des Enzyms ins Medium ausblieb.

Da beim Wachstum von *S. mobaraensis* in Submerskultur keine Sporulation stattfindet, wurde die Suche nach der aktivierenden Protease mit Oberflächenkulturen auf GYM-Agar durchgeführt, die alle Entwicklungsstadien bis hin zur Sporulation durchlaufen. Wasserlösliche, extrazelluläre Proteine wurden dabei mit einem neutralen niedrigmolaren Puffer extrahiert.

In Puffer-Extrakten von unterschiedlich alten Kolonien konnte schließlich eine endogene Protease nachgewiesen werden, die in der Lage war, ProTGase zu aktivieren. Da es sich um eine Metalloprotease handelte, wurde das Enzym als Transglutaminase-aktivierende Metalloprotease (TAMEP) bezeichnet.

TAMEP wurde durch Aktivierung von ProTGase als auch mit dem P1'-Substrat FAAFA nachgewiesen. Weiterhin wurden in den Extrakten von Agarfestmedien proteolytische Aktivitäten gegenüber Leu-pNA, Phe-pNA, Ala-Ala-Pro-pNA ermittelt. Generell war die Hydrolyse von CBZ-Pro-Phe-Arg-pNA und, bei einigen Kultivierungen, auch von Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA zu beobachten. Damit gelang der Nachweis zusätzlicher Proteasen.

Die Aminosäurenanilide wurden durch eine Aminopeptidase (AP) hydrolysiert, die eine 60 °C Erwärmung ohne Aktivitätsverlust 30 min lang überstand. Deshalb konnte es sich bei dieser Exopeptidase nicht um die Leu/Phe-Protease des Kulturmediums handeln. Die Hitzestabilität der AP von *S. mobaraensis* passt zu einer in der Literatur beschriebenen Aminopeptidase von *S. griseus* (Spungin und Blumberg [1989]).

Die Hydrolyse von Ala-Ala-Pro-pNA deutete auf das Vorhandensein einer Peptidyl-Aminopeptidase hin, wie sie im Kulturmedium nachzuweisen war. Da aber eine Reihe von Tripeptidyl-Aminopeptidasen bei *Streptomyces* beschrieben werden (Krieger *et al.* [1994], Binnie *et al.* [1995], Butler *et al.* [1995]), kann die eindeutige Zuordnung erst mit PAP-spezifischen Antikörpern erfolgen.

Die mutmaßlichen Endoproteasen, die die Substrate CBZ-Pro-Phe-Arg-pNA und Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA spalteten, konnten als Serinproteasen klassifiziert werden, da sie vollständig durch PMSF inhibiert wurden. Die Hydrolyse von CBZ-Pro-Phe-Arg-pNA erfolgte vermutlich durch zwei unterschiedliche Trypsin-artige Proteasen, was aufgrund unterschiedlicher Sensitivität gegenüber dem Inhibitor Benzamidin gezeigt wurde.

Die Isolierung und weitere Charakterisierung der verschiedenen Proteasen wurde nicht weiter verfolgt, da der Nachweis der TGase-Aktivierung durch diese Extrakt-Proteasen nicht erbracht werden konnte. Vielmehr wurden alle Anstrengungen unternommen, die Eigenschaften der TGase aktivierenden Protease zu ermitteln.

Die Reinigung von TAMEP zeigte, dass die Aktivität am besten mit einem 39 kDa-Protein korrelierte. Die N-terminale Sequenz dieses Proteins weist eine 61 proz. Sequenzidentität zu der bekannten Zinkmetalloprotease SGMPII von *S. griseus* mit einer Molmasse von 37 kDa auf (Tsuyuki *et al.* [1991], Kojima *et al.* [1998]). Datenbankrecherchen führten außerdem zur Identifizierung von zwei homologen, mutmaßlichen Metalloproteasesequenzen im Genom von *S. coelicolor*. Alle vier Streptomyceten Enzyme wurden aufgrund ihrer Sequenz-homologien der M4-Zinkmetalloproteasenfamilie zugeordnet, deren bekanntester Vertreter Thermolysin von *Bacillus thermoproteolyticus* ist (Rawlings und Barrett [1995]).

Die mutmaßliche Pro-Metalloproteasesequenz SC7A8.13 von *S. coelicolor* besitzt - ohne Signalpeptid - eine theoretische Molmasse von 53,5 kDa, während das reife Enzym - wie auch SGMPII von *S. griseus* - eine errechnete Masse von 35 kDa aufweist. Der zweite Leserahmen, SC3D11.04, von *S. coelicolor*, besitzt ohne Signalpeptid eine theoretische Masse von 66,2 kDa. Neben einem Propeptid am N-Terminus wurde mit dem Domänensuchprogramm CDART vom NCBI ein zusätzliches Propeptid am C-Terminus von SC3D11.04 identifiziert.

Ohne N- und C-terminales Propeptid hat die mutmaßliche Zinkmetalloprotease eine theoretische Molmasse von 37,8 kDa. Analysen zeigten, dass TAMEP im SDS-Polyacrylamidgel neben dem dominanten 39 kDa Protein eine schwache Bande von 66 kDa aufweist. Wie sich in weiteren Untersuchungen herausstellte, handelt es sich bei der 39 kDa-Bande und Proteinen zwischen 14 und 30 kDa um Abbauprodukte des 66 kDa-Vorläuferproteins, die noch während des Erhitzens im Auftragspuffer entstehen. Die bei maßvollem Erhitzen noch beobachtbare Autoproteolyse konnte durch die Zugabe des Chelatbildners EDTA verhindert werden. Ein ähnliches Abbauphänomen konnte auch bei Thermolysin festgestellt werden. Hitzedenaturierung im Auftragspuffer bei niedrigeren Temperaturen und ohne EDTA-Zugabe führte zu einer Vielzahl von Thermolysin Abbaufragmenten, aber nicht zu einem Hauptabbauprodukt, wie dies bei TAMEP der Fall war.

Die Autoproteolyse von TAMEP ist vom pH-Wert und der Temperatur abhängig. Bei pH-Werten, die weit vom pH-Optimum der TAMEP entfernt sind, findet nur eine geringfügige Autoproteolyse statt, während im optimalen Bereich zwischen pH 6 und 7 nahezu ausschließlich das 39 kDa-Protein und viele Abbauprodukte zwischen 14 und 30 kDa nachweisbar sind. Bei Hitzedenaturierungsversuchen der TAMEP im Auftragspuffer und anschließender Durchführung einer Casein-SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die TAMEP mit einer Molmasse von 66 kDa aktiv ist. Weder das 39 kDa-Fragment noch die Abbauprodukte zwischen 14 und 30 kDa wiesen hydrolytische Aktivität gegenüber Casein auf.

Bei Tsuyuki *et al.* [1991] wird kein Hinweis auf die Hitzestabilität von SGMPII gegeben, die bei der TAMEP vermutlich ähnlich wie bei Thermolysin durch Calciumionen beeinflusst wird (Dahlquist *et al.* [1976], Fontana [1988]). Auch wird kein höher molekulares Protein von ca. 66 kDa beschrieben. Trotz dieser Unterschiede besitzen TAMEP und SGMPII viele Gemeinsamkeiten in ihren enzymatischen Eigenschaften. Es ist anzunehmen, dass es sich bei beiden Proteasen um Isoenzyme handelt, die durch Genduplikation entstanden und später unterschiedliche biologische Funktion übernahmen (Bentley *et al.* [2002]).

Aufgrund der Sequenzidentitäten im N-Terminus von TAMEP mit der mutmaßlichen Zinkmetalloprotease SC3D11.04 von *S. coelicolor* und deren nahezu identischen apparenten und theoretischen Molekularmasse von 66 kDa handelt es sich sehr wahrscheinlich um homologe Enzyme. Der endgültige Beweis hierfür kann aber erst durch die Bestimmung der TAMEP-Primärsequenz geliefert werden, der aus zwei Gründen sehr wichtig ist:

- Propeptide am N-Terminus von Endoproteasen verhindern normalerweise die proteolytische Aktivität. TAMEP ist aber offensichtlich trotz dieser N-terminalen Verlängerung aktiv.
- Bisher wurde bei keiner Metalloprotease weder bei Eukaryonten noch bei Prokaryonten eine P-Domäne identifiziert und charakterisiert, wie sie vermutlich TAMEP am C-Terminus aufweist. Die P-Domäne wurde erstmalig bei Subtilisin-artigen Proprotein-Convertasen (SPC) entdeckt (Gluschankof und Fuller [1994], Zhou *et al.* [1998]). SPC's sind für eine Reihe von Hormon- und Zymogenaktivierungen verantwortlich (Seidah *et al.* [1991], Nakayama *et al.* [1997], Lazure [2002]), die wiederum im Zusammenhang mit der TGase-Aktivierung gesehen werden können. Vielleicht ist TAMEP nicht nur für die ProTGase-Aktivierung bei *S. mobaraensis* verantwortlich, sondern nimmt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung einer Vielzahl von Zymogenen ein.

Mit der Zuordnung von TAMEP zur Thermolysin-Proteasefamilie können Aussagen über den Reaktionsmechanismus getroffen werden. Thermolysin von *Bacillus thermoproteolyticus* ist die am besten charakterisierte Zinkmetalloprotease der M4-Familie. Die N-terminale Region des reifen Thermolysins besteht hauptsächlich aus β -Faltblattstrukturen, während die C-terminale Domäne vor allem aus α -helikalen Bereichen aufgebaut ist. Die Spalte zwischen beiden Domänen enthält das Aktivzentrum (Holmes und Matthews [1982]). Die an der Proteolyse beteiligten Aminosäuren konnten durch Kristallographie- und Mutationsstudien ermittelt werden.

Sowohl SGMPII von *S. griseus* als auch die mutmaßlichen Zinkmetalloproteasen von *S. coelicolor* besitzen die Aminosäuren, die beim Thermolysin als essentiell angesehen werden und an der Katalyse beteiligt sind (Abb. 5-3).

Thermolysin	142	HEXXH	146	E	166	H	231
SC3D11.04	139	HEXXH	143	E	163	H	228
SC7A8.13	150	HEXXH	154	E	174	H	240
SGMPII	135	HEXXH	139	E	159	H	224

Abb. 5-3: Bekannte Zinkliganden und reaktive Aminosäuren im Reaktivzentrum von Thermolysin (*B. thermoproteolyticus*) und ihre Analoga in den Sequenzen von SGMPII von *S. griseus* und den mutmaßlichen Zinkmetalloproteasen SC3D11.04 und SC7A8.13 von *S. coelicolor*. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die reifen Enzyme. Mutmaßliche Aminosäuren, die bei der Katalyse als Base fungieren, sind rot, die das Zinkion binden, blau markiert. Beliebige Aminosäuren sind durch ein X dargestellt.

Im nativen Thermolysin ist ein Zinkion durch die drei Aminosäuren, His142 und His146 im HEXXH-Motiv und dem C-terminal gelegenen Glu166, gebunden. Die vierte Koordinationsstelle wird durch ein Wassermolekül besetzt. Vor der Reaktion wird das an das Zinkion gebundene Wassermolekül durch die ankommende Carbonylgruppe im Substrat der zu spaltenden Peptidbindung ersetzt. Durch Protonenakzeptoren wie Glu143 (Matthews [1988]) oder nach einem alternativ vorgeschlagenen Mechanismus von His231 (Mock und Stanford [1996]) wird das Wassermolekül, welches zuvor an das Zink gebunden war, polarisiert und das entstandene Hydroxylion kann den Carbonylkohlenstoff der Spaltstelle nukleophil angreifen, wodurch letztendlich die Hydrolyse der Peptidbindung eingeleitet wird.

Die eindeutige Aufklärung des Proteolysemechanismus steht noch aus. Dennoch wird auch weiterhin Glutamat als Protonenakzeptor präferiert, zumal gezeigt werden konnte, dass der Austausch von His 231 durch Phe oder Ala nur zu einer Reduzierung der Thermolysin-Aktivität führt, während Mutationen von Glu143 einen dramatischen Aktivitätsverlust verursachen (Beaumont *et al.* [1995], Antonczak *et al.* [2000]).

Die nahe Verwandtschaft von TAMEP und SGMPII mit Thermolysin zeigt sich in der Primärsequenz und hier besonders bei den an der Katalyse beteiligten Aminosäuren. Obwohl TAMEP und Thermolysin Peptidbindungen C-terminal von hydrophoben Aminosäuren hydrolysieren, weisen die Proteasen eine unterschiedliche Substratspezifität auf. Bei der Verwendung von Furylacryloylpeptiden konnte gezeigt werden, dass TAMEP bevorzugt Gly-Phe- vor Gly-Leu-Peptidbindungen hydrolysiert, während die Spaltungs-Präferenz bei Thermolysin umgekehrt ist. Die Ergebnisse stimmen mit den Daten früherer Messungen überein, bei denen SGMPII bevorzugt Carbobenzoxypeptide hydrolysiert, deren Position P1' mit Aminosäurereste in der Reihenfolge Phe > Tyr > Leu enthält. Thermolysin hingegen bevorzugt Leu > Phe >> Tyr (Moriyama *et al.* [1968], Moriyama und Tsuzuki [1971]).

Neben einer Präferenz P1'-Substrate mit hydrophoben Aminosäuren zu spalten, weisen TAMEP, SGMPII und Thermolysin eine hohe Sensibilität gegenüber den Inhibitoren EDTA, o-Phenanthrolin und Phosphoramidon auf. Außerdem kann SGMPII genauso wie Thermolysin durch ClCH₂CO-DL-(N-OH)Leu-OCH₃ einem „active-site-directed“-Inhibitor inaktiviert werden (Kumazaki *et al.* [1994]). Der Inhibitor reagiert spezifisch mit Glu143 (Thermolysin) bzw. Glu137 (SGMPII) unter Ausbildung einer Esterbindung, während Leucin in die P1'-Tasche passt und über seine Hydroxylaminfunktion die vierte Koordinationsstelle des Zinks besetzt (Kojima *et al.* [1998], Holmes *et al.* [1983]).

TAMEP und SGMPII werden im Unterschied zu Thermolysin durch SSI-artige Proteine inhibiert. Obwohl *S. griseus* kein SSI-Gen aufweist, bildet SGMPII mit den exogenen Subtilisin Inhibitoren unterschiedlicher *Streptomyces*-Arten wie SSI, Plasminostreptin und API-2c' und dem *Streptomyces* Metalloproteasen Inhibitor SMPI, stabile Komplexe. (Tsuyuki *et al.* [1991], Kajiwara *et al.* [1991], Kuramoto *et al.* [1996]).

Inhibitionsversuche mit P14 und FAAFA als Substrat zeigten, dass Thermolysin gegenüber dem Proteininhibitor um einen Faktor 100 weniger sensitiv ist als TAMEP. Bei einem äquimolaren Verhältnis von Inhibitor zu TAMEP wurden noch 50 Prozent Restaktivität gemessen. Das unterschiedliche Bindungsverhalten für P14 beruht vermutlich auf den ungleichen Substratspezifitäten von Thermolysin und TAMEP. Die P1'-Position der reaktiven Stelle in der P14-Sequenz passt möglicherweise besser in die Substratbindetasche von TAMEP und erlaubt daher eine bessere Bindung im Vergleich zu Thermolysin.

Wie wichtig die P1'-Position für die Inhibierung ist, zeigten Inhibitionsversuche mit Phosphoramidon. Thermolysin wurde durch Phosphoramidon etwa 400fach stärker inhibiert als TAMEP. Der Inhibitor bindet mit seiner Phosphonylgruppe an das Zink, während Leucin

in die S1'- und Tryptophan in die S2'-Substrattasche der Protease passt. Das Leucin vom Phosphoramidon wird vom Aktivzentrum der TAMEP schlecht akzeptiert und der Inhibitor bindet daher weniger gut.

In vitro Aktivierungsexperimente mit gereinigter ProTGase und TAMEP führten zur Aktivierung von TGase durch Hydrolyse der Ser(-5)-Phe(-4)-Peptidbindung (Abb. 5-4).

	-9 ↓ -1 1 9
<i>S. mobaraensis</i>	SSAGPSFRAP <u>DSDDR</u> VT <u>PP</u>
<i>S. fervens</i> subsp. <i>melrosporus</i>	PSAGPSLRAP <u>AFDDDR</u> VT <u>PP</u>
<i>S. cinnamoneus</i> CBS 838.68	PSATAP <u>SRAP</u> <u>SDDRE</u> TPP

Abb. 5-4: Transglutaminase-Aktivierungsbereiche von *Streptomyces*-Stämmen.

Die durch Edman-Abbau ermittelten N-terminalen Sequenzen der reifen TGasen (*S. mobaraensis*, Pasternack *et al.* [1998]; *S. fervens* subsp. *melrosporus*, [unveröffentlicht]; *S. cinnamoneus*, Duran *et al.* [1998]) sind unterstrichen. Der Pfeil zeigt die TAMEP-Schnittstelle im Aktivierungsbereich der TGase von *S. mobaraensis*.

Wie sich herausstellte, war die aus dem Kulturmedium gewonnene Peptidyl-Amino-peptidase PAP nach Aktivierung durch die TAMEP in der Lage, das Tetrapeptid von FRAP-TGase abzuspalten, um die von Kanaji *et al.* [1993] ermittelte N-terminale Sequenz der reifen TGase zu erzeugen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PAP ebenfalls das Tripeptid einer Chymotrypsin aktivierten RAP-TGase entfernen kann, jedoch nicht das Dipeptid Ala-Pro einer Trypsin aktivierten TGase, obwohl die Exopeptidase das kommerzielle Ala-Pro-pNA hydrolysieren konnte. Es ist anzunehmen, dass das Ala-Pro-Peptid bei AP-TGase nicht ausreichend exponiert vorliegt, um noch von PAP entfernt zu werden. Diese Ergebnisse schließen auch eine TGase-Aktivierung durch eine Trypsin-artige Protease, wie beispielsweise durch die Arg-C-Protease des Kulturmediums, aus.

Der Spaltstellenbereich (Abb. 5-4) von *S. fervens* subsp. *melrosporus* ist mit dem von *S. mobaraensis*, vergleichbar und lässt daher einen gleichen Aktivierungsmechanismus vermuten. Die Deletion von Phenylalanin (oder Leucin), wie dies bei der Sequenz von *S. cinnamoneus* der Fall ist, führt zu einem verschobenen TGase-N-Terminus (Duran *et al.* [1998]). Vergleicht man die TGase-Sequenzen von *S. mobaraensis*,

S. fervens subsp. *melrosporus* und *S. cinnamomeus* (siehe Anhang), so findet man besonders im Aktivierungsbereich geringe Sequenzhomologien. Entscheidend für die Aktivierung der TGasen ist vermutlich der exponierte Spaltstellenbereich, der durch helixbrechende Aminosäuren wie Prolin und Serin ermöglicht wird und weniger die genaue Aminosäuresequenz. Die breite P1'-Substratspezifität von SGMPII, die neben den bevorzugten Aminosäuren Phe und Leu auch Ala, Val, Ile, Trp und Tyr akzeptieren (Kajiwara *et al.* [1991], Tsuyuki *et al.* [1991]) unterstützen diese Vermutung. Solange die am N-Terminus reifer TGasen verbleibenden Aminosäuren nicht in der Lage sind, das Aktivzentrum sterisch zu blockieren (Kashiwagi *et al.* [2002]), spielt ihre Anzahl für die Aktivierung keine Rolle. Die weitere Prozessierung der TAMEP-aktivierten TGase durch die Peptidyl-Amino-peptidase führte daher auch nicht zu einer Aktivitätssteigerung, weshalb es sich bei der Entfernung des Tetrapeptides von FRAP-TGase sehr wahrscheinlich um ein Artefakt handelt. Dennoch bleibt die biologische Funktion der PAP interessant, nicht zuletzt deshalb, weil bisher weder bei Pro- noch bei Eukaryonten eine Tetrapeptidyl-Amino-peptidase beschrieben wurde.

Bei Prozessierungsversuchen mit ProTGase und TAMEP konnte der inhibierende Effekt des Propeptides nach der TGase-Aktivierung gezeigt werden. Durch Verlängerung der Inkubationszeit oder Erhöhung der TAMEP-Konzentration im Reaktionsansatz konnte die Aktivität der bereits aktivierten TGase weiter gesteigert werden, vermutlich weil das Propeptid weiter fragmentiert wurde und dadurch seine inhibierende Wirkung verlor. Es existieren eine Reihe von Beispielen, bei denen freigesetzte Propeptide von Proteasen als starke Inhibitoren fungieren (Baker *et al.* [1992], Khan und James [1998], Serkina *et al.* [1999]). Bei *Pseudomonas aeruginosa* wird das Propeptid im Periplasma autokatalytisch abgespaltet, bleibt aber mit der Elastase assoziiert. Erst nach Translokation des Protease-Inhibitorkomplexes durch die äußere Membran wird das Propeptid durch eine extrazelluläre Protease degradiert und dadurch unwirksam. (Braun *et al.* [2000], Braun *et al.* [2001]).

Neben der Degradation des TGase-Propeptides durch TAMEP könnten auch weitere proteolytische Enzyme, wie zum Beispiel Exopeptidasen, die Hydrolyse unterstützen, um die hemmende Wirkung des Propeptides aufzuheben. Vielleicht haben Exopeptidasen unter anderem die Aufgabe Peptid- oder Proteininhibitoren zu inaktivieren. Ein bekanntes Beispiel ist hier die Inaktivierung des Tripeptidaldehyds Leupeptin durch das Leupeptin-inhibierende Enzym (Kim *et al.* [1998]).

Der Abbau von Propeptidfragmenten, wie sie bisher nur in Aktivierungsversuchen gezeigt wurden, stellt vermutlich nur eine Feinregulation der extrazellulären TGase-Aktivität dar oder spielt unter natürlichen Wachstumsbedingungen eine mindergewichtige Rolle. Wesentlich entscheidender ist die regulatorische Funktion des TAMEP-Inhibitors P14. Durch Anwesenheit dieses Proteins konnte bei *in vitro* Aktivierungsversuchen von ProTGase die Prozessierung bei einem molaren Verhältnis P14 zu TAMEP von 2 vollständig unterbunden werden. SSI-artige Inhibitoren liegen als Dimer vor, und deren identische Untereinheiten sind über beta-Faltblattstrukturen assoziiert. Jedes Inhibitor-Monomer ist dabei durch zwei intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert (Sato *et al.* [1978], Terabe *et al.* [1996]). Der gebildete Inhibitor-Enzymkomplex besteht gewöhnlich aus einem Tetramer, zusammengesetzt aus zwei Inhibitor- und zwei Protease-Monomeren. Jedes Monomer weist einen exponierten, flexiblen Loop auf, der für die Wechselwirkung mit Serinproteasen verantwortlich ist. In diesem Loop befindet sich die reaktive Stelle, die von der Protease als Substrat erkannt wird (Laskowski und Kato [1980], Kojima *et al.* [1993]). Der zuerst gebildete, stabile Protease-Inhibitor-Komplex wird bei Serinproteasen anschließend durch limitierte Proteolyse der Peptidbindung C-terminal von P1 wieder gelöst unter Freisetzung des modifizierten Inhibitors. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, die daher reversibel ist. Der modifizierte Inhibitor ist aber ein schlechterer Inhibitor als der ursprüngliche. Die Hydrolyse der SSI's ist nie vollständig und kann Stunden oder Tage dauern (Bode und Huber [1992], Laskowski und Qasim [2000]).

Die Inhibierung der neutralen Metalloprotease ScNP von *Streptomyces caespitosus* zusammen mit der Serinprotease Subtilisin BPN' bei einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:2:2 durch das SSI-artige Protein SCNPI (Hiraga *et al.* [2000]) zeigt, dass die inhibitorischen Vorgänge noch wesentlich komplexer sind. In weiterführenden Arbeiten sollte untersucht werden, ob P14 ebenfalls zwei reaktive Stellen aufweist, die eine Bindestelle für Serin- und Metalloproteasen darstellen. In diesem Zusammenhang kann ferner geklärt werden, warum neben TAMEP sämtliche Endoproteasen im Extrakt von Festmedienkulturen, wie Arg-C-Proteasen und Phe-C-Protease durch P14 inhibiert werden konnten. In der wissenschaftlichen Literatur existieren eine Reihe von *Streptomyces*-Proteasen mit Trypsin-, Chymotrypsin- oder Subtilisin-Spezifität, die durch SSI-artige Proteine inhibiert werden (Terabe *et al.* [1996], Suzuki *et al.* [1997], Taguchi *et al.* [1998]). Da bei drei unterschiedlichen Streptomyceten im Genom nur jeweils ein SSI-Gen nachgewiesen wurde, besitzt *S. mobaraensis* vermutlich auch nur das P14-Gen (Obata *et al.* [1989], Strickler *et al.* [1992]). Das bedeutet, dass P14 in der

Lage ist, mehrere Proteasen von *S. mobaraensis* mit unterschiedlicher Spezifität zu inhibieren, die, wie gezeigt werden konnte, zur Serin- und Metalloproteasengruppe gehören.

SSI-artige Proteine sind vermutlich an der Regulation endogener und nicht exogener Proteasen beteiligt. Die Herstellung einer SSI-freien Mutante von *S. albogrieseolus* hatte vielfältige Auswirkungen wie langsames Wachstum, erhöhte extrazelluläre Proteaseaktivität und Abnahme der Sporulationsfähigkeit. Mit großer Wahrscheinlichkeit haben SSI-artige Proteine eine wichtige Funktion bei physiologischen und/oder morphologischen Regulationsprozessen (Taguchi *et al.* [1995], Taguchi *et al.* [1997]).

Die Beteiligung von SSI-artigen Proteinen an morphologischen Veränderungen steht im Einklang mit der mutmaßlichen Funktion der TGase als strukturgebendes Enzym. Mit polyklonalen Antikörpern konnte erstmals die Transglutaminase-Aktivierung durch TAMEP und ihre Regulation durch P14 während der Kultivierung von *S. mobaraensis* sowohl im Flüssigmedium als auch auf Oberflächenkulturen verfolgt werden. Die ProTGase-Prozessierung findet auf GYM-Medium nach 24-48 Stunden statt, in einem Zeitraum, bei dem der Übergang von der Substratmycel- zum Luftmycelbildung zu beobachten ist. In diesem Zeitfenster gelingt auch der immunchemische Nachweis von TAMEP, auch wenn weder mit ProTGase noch mit FAAFA eine Protease-Aktivität messbar ist. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei den Untersuchungen mit Flüssigkulturen erzielt. Hier gelang der Nachweis von TAMEP-Aktivität während der gesamten Kultivierung nicht. Mit den polyklonalen TAMEP-Antikörpern konnte aber deren Auftreten im Flüssigmedium zweifelsfrei gezeigt werden. Bei diesen Experimenten fand eine geringfügige Proteolyse von ProTGase zwischen 48 und 72 Stunden statt, während nach 96 Stunden die gesamte ProTGase prozessiert war. Zu diesem Zeitpunkt war TAMEP immunchemisch eindeutig nachweisbar.

Die immunchemische Charakterisierung verdeutlichte, dass die Aktivierung von TGase bei Oberflächen- und Flüssigkulturen trotz starker Präsenz von P14 erfolgte. Die hier beschriebenen Studien mit TAMEP und P14 zeigten aber, dass die Inhibierung vollständig ist. Dies muss auch für Extrakte von Agarfestmedien oder Kulturmedien zutreffen, wo ein vielfacher Überschuss des Peptidinhibitors vorlag. Wie bereits oben angeführt können SSI-artige Proteine über einen langen Zeitraum inaktiviert werden. Weiterhin wurde von einer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die SSI-Aktivität durch Abspaltung eines C-terminalen Tetrapeptides mit Hilfe einer Carboxypeptidase reduziert werden kann (Sakai *et al.* [1980]). Da bei *S. mobaraensis* eine Reihe von Exopeptidasen und Endoproteasen nachgewiesen

wurden, könnte vielleicht sogar eine vollständige proteolytische Inaktivierung von P14 auftreten. Genauso könnte P14 durch einen kompetitiven Verdrängungsmechanismus aus dem Aktivzentrum von TAMEP verdrängt werden. Bei der Zinkmetalloprotease von *S. griseus* SGMPII wurde SSI durch Subtilisin BPN' aus dem Komplex verdrängt, wodurch die SGMPII-Aktivität wieder hergestellt wurde (Kajiwara *et al.* [1991]). Möglicherweise werden auf diese Weise Proteasen von Streptomyceten zusätzlich reguliert.

Aktive TAMEP muss zu Beginn der TGase-Aktivierung in so geringer Konzentration vorhanden sein, dass die Prozessierung von ProTGase innerhalb von etwa 24 Stunden vollständig stattfindet, eine Messung der TAMEP-Aktivität aber nicht möglich ist. TAMEP-Aktivität konnte nur in Extrakten der Agarfestmedien nachgewiesen werden. Während der Kultivierung bis zu 4 Tagen wurde vermutlich P14 inaktiviert oder mit anderen Proteasen abgesättigt, dass TAMEP-Aktivität messbar war. Im Flüssigmedium gelang dies nicht, vielleicht weil der Überschuss von P14 zu hoch oder eine ausreichende Inaktivierung nicht möglich war. *S. mobaraensis* sporuliert im Komplexmedium nicht. Womöglich werden bei der Sporulation weitere regulatorische Faktoren gebildet, die die Aktivität von P14 reduzieren. Eine weitere Erklärung könnte darin bestehen, dass TAMEP überwiegend zellwand- oder membranassoziiert oder -gebunden vorliegt. Eine Reihe von Mechanismen sind bekannt, mit denen Enzyme, die nach außen transportiert werden, im Peptidoglykan-Gerüst verankert werden. Suzuki *et al.* [1997] stellten fest, dass eine Subtilisin-artige Protease über basische Aminosäurereste des C-Terminus ionische Wechselwirkungen mit Teichon- und Teichuronsäuren des Mureinsacculus eingeht. Das Bakterium verhindert damit den Verlust durch Diffusion. Bei einem IEP von 5,0 scheint diese Möglichkeit bei TAMEP eher unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen zu sein. Proteasen oder andere sekretierte Enzyme können auch über ein sogenanntes LPXTG-Motiv des C-Terminus kovalent mit der Membran verbunden werden (Ton-That *et al.* [1999], Novak *et al.* [2000]). Die Primärstrukturen der SGMPII von *S. griseus* und Metalloproteasesequenzen von *S. coelicolor* besitzen dieses Motiv aber nicht. Daher ist es wahrscheinlich, dass TAMEP es ebenfalls nicht aufweist. Bisher sind aber noch nicht alle Bindedomänen und -motive von Oberflächenproteasen bekannt, und daher kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden.

Die Kultivierung von *S. mobaraensis* in Flüssigmedien entspricht einer Stress-Situation mit der ständigen Gefahr für das Bakterium nicht ausreichend Sauerstoff zu erhalten. Das Bakterium kann sich offenbar der Sauerstoffschuld durch Flucht aus dem Kulturmedium entziehen, indem es sich bei Schüttelkulturen an der Flüssigkeitsgrenze am Glas festsetzt oder bei nichtgeschüttelten Kulturen durch Ausbildung eines Biofilms auf der Wasseroberfläche schwimmt. Diese Fähigkeit ebenso wie die Ausbildung rigider „Kugel-Mycele“ mit Hohlraum besitzt *S. coelicolor* nicht, eine *Streptomyces*-Art, die keine TGase produziert. Vielleicht führen weitere Ergebnisse dazu, dass die Gattung *Streptoverticillium* wieder als eigenständige phylogenetische Gruppe innerhalb der Streptomyceten angesehen werden muss. Möglicherweise spielt TGase dabei eine Schlüsselrolle. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung weiterer *Streptomyces*- und *Streptoverticillium*-Stämme im Bezug auf den Nachweis von TGase und deren Wachstumscharakteristika interessant.

Das natürliche Habitat der Streptomyceten ist das Erdreich. Das mycelartige Wachstum ermöglicht es dem Bakterium, eng verflochten mit dem Substrat zu wachsen, was eine optimale Nährstoffversorgung garantiert. Mit Aufklärung der TGase-Aktivierung wurden Grundlagen, aber auch vielfältige offene Fragen für weiterführende Arbeiten geschaffen. Die biologischen Prozesse, wie proteolytische TGase-Aktivierung, Vernetzung von Proteinen sowie deren indirekte Regulation durch P14, sollten in der Phase von Substrat- und/oder Luftmycelbildung erfolgen. Mit den im Arbeitskreis etablierten Methoden und vorhandenen Antisera können Fragestellungen zur Membranständigkeit von TGase, TAMEP und P14 gelöst werden.

Neben den noch zu klärenden Primärstrukturen von TAMEP, PAP und P14 stehen proteinchemische Arbeiten zur Identifizierung der TGase-Substrate aus. Weiterhin können durch molekularbiologische Arbeiten wie der gezielten Ausschaltung der TAMEP-, SSI- und TGase-Gene von *S. mobaraensis* deren Auswirkungen auf das Wachstum und charakteristische morphologische Merkmale der Streptoverticillien untersucht werden. Mit den hieraus erzielten Ergebnissen kann voraussichtlich die biologische Funktion der TGase gelöst und dadurch ein Beitrag zum besseren Verständnis des komplexen Wachstumszyklus des multizellularen Streptomyceten geliefert werden.