

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER
AMINOPEPTIDASE I DES THERMOPHILEN PILZES
TALAROMYCES DUPONTI**

Abhandlung
zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
ROSE MARIE CHAPUIS–KAUFFMANN
Dipl. Naturwissenschafte^rin ETH
geboren am 1. Januar 1942
von Bonfol (BE)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. Zuber, Referent
PD Dr. H. Dutler, Korreferent

6. Zusammenfassung

Der Carboxy- und Amino-peptidasengehalt einiger thermophiler Pilze sowie die Thermostabilität dieser Enzyme im Extrakt wurde bestimmt. Von den untersuchten Stämmen erwies sich *Talaromyces duponti* (Ascomycetes) als beste Quelle zur Isolierung thermostabiler Carboxy- und Amino-peptidasen. Im Mycel-Homogenat des *T. duponti* wurden 2 Carboxypeptidasen und 3 Amino-peptidasen nachgewiesen.

Die hochmolekulare Amino-peptidase (AP I) wurde mit Gelfiltration, Chromatographie an DEAE-Sephadex und Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 200fach gereinigt. Das isolierte Enzym war einheitlich bezüglich Proteingehalt in der Disc-Gelelektrophorese. In der Ultrazentrifuge wurde neben der AP I eine Komponente nachgewiesen, die Carbohydrate und Aminosäuren enthält und die sich mit Chromatographie an SE-Sephadex entfernen liess, unter Aenderung der kinetischen Parameter der AP I. Die Sedimentationskonstante $s_{20,w}$ der AP I beträgt ca. 18 und nimmt mit der Proteinkonzentration zu. Mit der Gelfiltrationsmethode wurde ein Molekulargewicht von $398'000 \pm 40'000$ bestimmt, mit der Sedimentationsgleichgewichtsmethode nach Yphantis ein \overline{M}_{app} von $516'000 \pm 524'000$.

Die AP I (spezifische Aktivität 10.2 μ Mole LNA hydrolysiert per Minute per mg) ist isoelektrisch bei pH 5.1 und stabil zwischen pH 6.5 und 8.6. Das pH-Optimum für die Hydrolyse von LNA und H-Leu-Gly-OH liegt um den Wert 7.6. Für die Hydrolyse von LNA wurden eine Aenderung der Bindungsenthalpie von -6.42 ± 0.5 kcal.Mol⁻¹ und eine Aktivierungsenergie von 22.7 ± 1.2 kcal.Mol⁻¹ berechnet.

Die AP I ist bei 55°C in 10^{-4} M CoCl_2 mehrere Stunden stabil, in Co^{2+} -freiem Puffer wird sie thermoinaktiviert.

Dialyse gegen EDTA bei pH 5.6 führt zu einem inaktiven, thermo-labilen Apoenzym, das sich mit Co^{2+} vollständig, mit anderen Ubergangsmetall-Ionen teilweise reaktivieren lässt. Methanol, Aethanol, t-Butanol und Harnstoff hemmen die Aktivität der AP I.

Harnstoff und SDS bei saurem pH bewirken die Dissoziation der AP I in 4 verschiedene Typen von Untereinheiten, die in der SDS-Disc-Gelelektrophorese Molekulargewichte um 19'000 - 20'000 bzw. 24'000 - 26'000 aufweisen und deren N-terminalen Aminosäuren Ala, Ser, Gly und Ile sind.

Die AP I bevorzugt in ihrer Substrat-Spezifität hydrophobe Seitenketten als N-terminalen Aminosäuren ihrer Substrate und kann N-Formyl-Peptide deformylieren. In diesen und mehreren anderen Eigenschaften hat sie eine weitgehende Ähnlichkeit mit der AP I des thermophilen Prokarioten *Bacillus stearothermophilus*.

Die Carboxypeptidasen und die zwei niedermolekularen Amino-peptidasen wurden angereichert und teilweise charakterisiert.