

**Neue extrazelluläre Proteinasen des Krankenhauskeims
Stenotrophomonas maltophilia als potentielle
Pathogenitätsfaktoren: Sequenzierung, Klonierung,
rekombinante Produktion und vergleichende
Charakterisierung**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften der Fakultät Biologie an der Universität
Hamburg

vorgelegt von

Sabine Windhorst
aus Hamburg

Hamburg 2002

Referent PD Dr. Weber

Koreferent Prof. Dr. Fortnagel

Tag der Disputation 06. Dezember 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. W. WEBER

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. P. FORTNAGEL

Tag der Disputation: 06. Dezember 2002

Hamburg, den 22. November 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	3
MATERIAL UND METHODEN	10
MATERIALIEN.....	10
METHODEN.....	16
Kulturbedingungen für <i>St. maltophilia</i>	16
Subkultivierung von Lungenepithelzellen.....	16
Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	17
Photometrische Bestimmung der Proteaseaktivität	18
Enzymkinetische Messungen.....	19
SDS-PAGE-Gele.....	20
Zymogramm.....	22
Autoradiogramm.....	22
Gelextraktion aus nicht gefärbten SDS-Gelen.....	22
Bacitracin-Chromatographie.....	23
Immuno-Blotting.....	25
Sequenzierung von Proteinen.....	26
Konzentrierung von Proteinpräparaten.....	26
Kristallisationsansätze.....	27
Nucleinsäure-Isolation.....	28
Hydrolyse von DNA durch Restriktionsenzyme.....	30
Agarose-Gelelektrophorese.....	30
Southern-Blot.....	30
PCR.....	32
inverse.....	32
rag.....	33
semi-nested.....	33
RT.....	33
Sequenzierung von ds-DNA.....	34
Ligation	34
Reinigung von DNA-Fragmenten durch Gelextraktion.....	35
Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	35
Vorbereitung der <i>St. maltophilia</i> -Zellen für die Elektroporation.....	35
Transformation durch Hitzeschock.....	36
Transformation durch Elektroporation.....	36
Selektion von transformierten <i>E. coli</i> -Bakterien.....	36
Expression und Extraktion von rekombinanten Proteinen.....	37
Renaturierung von inclusion-bodys.....	37
Sekretion der rekombinanten Proteine.....	37
Säulenchromatographie	38

ERGEBNISSE	39
Sequenzierung des <i>St. maltophilia</i> -Gens.....	39
Sequenzierung einer weiteren <i>St. maltophilia</i> -Protease.....	43
Expressionsnachweis von StmPr2 durch <i>St. maltophilia</i>	46
Heterologe Expression von StmPr1 und StmPr 2 in <i>E. coli</i>	46
Expression von StmPr1.....	47
Reinigung der rekombinanten StmPr1-Protease.....	52
Prozessierung der StmPr1-Protease.....	55
Kristallisationsversuche mit der rekombinanten StmPr1-Protease.....	58
Expression von StmPr2.....	59
Reinigung der rekombinanten StmPr2-Protease.....	63
Untersuchung der rekombinanten StmPr2-Protease.....	65
Biochemische Charakterisierung der rekombinanten StmPr2-Protease.....	66
Herstellung von StmPr1-Null-Mutanten.....	71
Test der StmPr1-knock-out-Mutanten an Zellkulturen.....	73
DISKUSSION	76
Klassifizierung der <i>St. maltophilia</i> -Proteasen.....	76
Rekombinante Herstellung aktiver <i>St. maltophilia</i> -Proteasen.....	79
Vergleich der biochemischen Eigenschaften der <i>St. maltophilia</i> -Proteasen.....	81
<i>St. maltophilia</i> -Proteasen – ein möglicher Pathogenitätsfaktor?.....	85
LITERATURVERZEICHNIS.....	87
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	95
ANHANG.....	98

ZUSAMMENFASSUNG

Stenotrophomonas maltophilia ist ein aerobes opportunistisch lebendes Bakterium (Pseudomonade), welches sich in den letzten Jahren aufgrund der zunehmenden Zahl anfälliger Wirte und der Entwicklung von multiresistenten Stämmen als ein wichtiger Hospitalismus Keim entwickelt hat. Der Keim befällt in erster Linie den Atmungs-trakt von Mukoviszidose- und stark immunsupprimierten Patienten. Eine solche Infektion verursachte bei einigen Leukämiepatienten schwere Lungenblutungen, welche durch Läsionen entstanden waren, die stark auf proteolytische Aktivität hindeuteten. Dieser Befund führte zu einer näheren Untersuchung entsprechender Proteasen der Patienten-Isolate.

Durch spezielle PCR-Methoden war es möglich, das Gen der dominanten, bereits gereinigten und biochemisch charakterisierten extrazellulären Protease (StmPr1) vollständig zu sequenzieren. Eine zweite, bis dahin unbekannte extrazelluläre Protease konnte ebenso sequenziert und damit erstmals identifiziert werden (StmPr2). Die Aminosäuresequenzen der Proteasen zeigten, dass diese der sehr heterogenen Familie der subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen (Subtilasen) angehören. Die *St. maltophilia*-Proteasen weisen allerdings im Gegensatz zu den klassischen Subtilasen, wie Stubtilisin Carlsberg oder Proteinase K, ein höheres Molekulargewicht auf, und es liegen keine signifikanten Sequenz-Homologien vor. Homologien von > 30% waren nur unter Vertretern der großen Subtilasen zu finden, von denen einige bereits als bakterielle Pathogenitätsfaktoren beschrieben sind.

Im Hinblick auf die Relevanz der Proteasen für die Pathogenität des Keims sollten diese in ihren biochemischen Eigenschaften miteinander verglichen werden.

Beide Protease wurden rekombinant hergestellt, um ausreichende Mengen Protein zu erhalten. Dabei waren umfangreiche Expressionskonstrukte notwendig, bis die korrekte Prozessierung der entsprechenden Vorläuferproteine zu sekretorischen aktiven Proteasen gelang. Die Verfügbarkeit von Milligramm-Mengen an Protein wurde im Fall der StmPr1-Protease für Kristallisationsversuche genutzt. Die nach umfangreichem Screening von Kristallisationsbedingungen erhaltenen Kristallbündel ließen dieses Vorhaben als prinzipiell möglich erscheinen; es hätte aber den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt, eine röntgentaugliche Qualität von Protease-Kristalle zu erzielen.

Die biochemische Charakterisierung der StmPr2-Protease war indes sehr aufschlussreich, denn es zeigte sich, dass sie sich in einer Reihe von Eigenschaften von der zuvor charakterisierten StmPr1-Protease unterschied. Aufgrund ihrer niedrigen Expression in den Wildtyp-Bakterien sowie ihrer geringen proteolytischen Aktivität muss man ihr wahrscheinlich eine untergeordnete Funktion im Vergleich zum StmPr1-Enzym zuordnen. Aus diesem Grund wurde hauptsächlich die StmPr1-Protease in ihrer potentiellen Funktion als Pathogenitätsfaktor untersucht. Durch *in vitro* Versuche konnte gezeigt werden, dass die Protease dazu in der Lage ist, wichtige eukaryontische Plasma-Proteine und Protease-Inhibitoren zu degradieren. Außerdem gelang es, StmPr1-knock-out-Mutanten herzustellen, die in Kulturen von humanen Lungenepithelzellen im Gegensatz zu den Wildtyp-Bakterien keine degradierende Wirkung zeigten.

Diese Versuche deuten darauf hin, dass die StmPr1-Protease für die bei infizierten Patienten beobachteten Gewebe-Läsionen verantwortlich und damit am Krankheitsgeschehen maßgeblich beteiligt ist. Sollte sich dies in weiterführenden Tier-Modellen bestätigen, kann die Protease als Zielmolekül für die Entwicklung von Wirkstoffen (spezifische Protease-Inhibitoren) für zukünftige alternative Therapien dienen. Diese sind gerade für die Behandlung von Infektionen durch multiresistente Erreger wie *St. maltophilia* interessant, welche durch Antibiotika schwer beherrschbar sind.

EINLEITUNG

Stenotrophomonas maltophilia, früher bezeichnet als *Xanthomonas maltophilia* oder *Pseudomonas maltophilia* [1], ist ein aerobes, nichtfermentierendes Gram-negatives Bakterium (Pseudomonade). Die Pseudomonade gilt als typischer Opportunist, welcher im Boden, im Wasser, in Tieren und in Pflanzen verbreitet ist und dort Kohlenstoff- und Stickstoffquellen aufschließt und abbaut. Der verstärkte Einsatz von Antibiotika in Krankenhäusern führte zur Selektion multiresistenter *St. maltophilia* Stämme, was zur Folge hatte, dass sich der Keim dort immer mehr ausbreitete und zum Problem wurde [2]. In den letzten Jahren wurden Infektionen durch multiresistente *St. maltophilia*-Stämme vor allem bei Mukoviszidose-Patienten sowie bei immuninkompetenten Patienten (HIV- und Hepatitis-Patienten, Krebspatienten nach Tumorthherapie) [3,4,5,6,7,8,9] verzeichnet.

Leukämie-Patienten, die chemotherapeutisch und mit unterschiedlichen Antibiotika behandelt wurden, starben in vereinzelt Fällen nach *St. maltophilia*-Infektion des Atmungstraktes an Lungenblutungen [10, 11]. Histologische Untersuchungen zeigten in diesen Fällen Läsionen des Lungenepithels [11]. Da diese Schädigung stark auf die Einwirkung von Proteasen hindeutete [10] und weil bekannt ist, dass Pseudomonaden unterschiedliche Proteasen sezernieren [12], wurde in *St. maltophilia*-Kulturen (gewonnen aus Patienten-Isolaten) nach proteolytischer Aktivität gesucht. Tatsächlich wurde eine solche Aktivität gefunden, und es konnte eine 47 kDa große, bis dahin unbekannte, extrazelluläre Protease (StmPr1) isoliert werden [13].

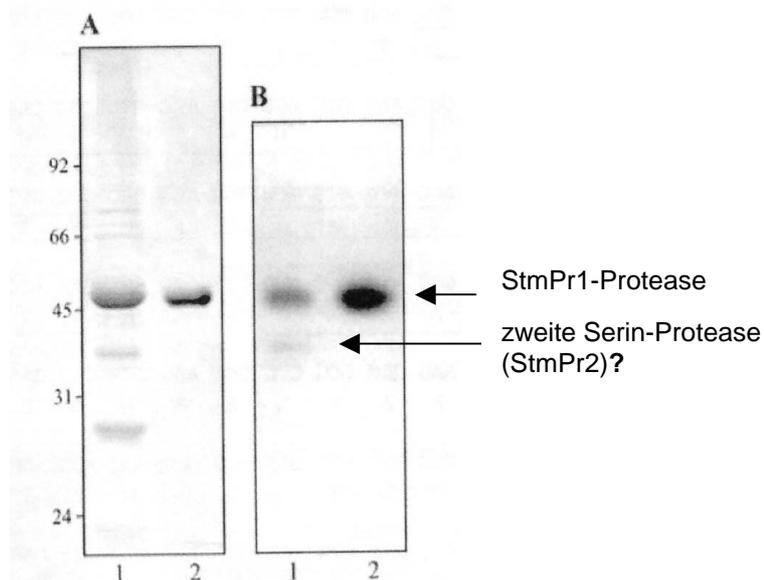


Abbildung 1.1 Nachweis der extrazellulären Serin-Proteasen von *St. maltophilia* durch einen kovalent bindenden radioaktiv markierten Serin-Protease-Inhibitor. (A) SDS-Gel (12%): Spur 1, TCE-Präzipitat aus 1,5 ml *St. maltophilia* Medium; Spur 2, gereinigte StmPr1-Protease (2 µg). **(B)** Autoradiogramm nach Inkubation mit [³H]-Diisopropylfluorophosphat, s. Material & Methoden. Spur 1 TCE-Präzipitat aus 0,1 ml *St. maltophilia* Medium; Spur 2, reine StmPr1-Protease (0,1 µg).

Aus Abbildung 1.1 wird ersichtlich, dass die 47 kDa große Protease ein prominentes Protein im Medium von *St. maltophilia* darstellt und von dem kovalent bindenden Serin-Protease-Inhibitor eindeutig markiert wird. Auf dem Röntgenfilm ist neben der markierten, prominenten Protease-Bande eine weitere schwache Bande bei 38 kDa zu erkennen.

Bei diesem Protein handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine weitere Serin-Protease, weil das Abbauprodukt der prominenten Protease nicht durch DFP markiert wird (s. Ergebnisse Abb. 3.14 A). Während die prominente Protease gereinigt, biochemisch charakterisiert und N-terminal sequenziert werden konnte (diese Arbeiten wurden von E. Frank durchgeführt und in [13] veröffentlicht), war es nicht möglich, eine zweite extrazelluläre Protease zu isolieren. Die dominante Protease zeigte ein Reaktionsoptimum im alkalischen pH und erwies sich als nicht EDTA-hemmbar. Aufgrund des Inhibitorprofils und der Substratspezifität konnte sie den Serin-Proteasen zugeordnet werden.

Die N-terminale Sequenz ließ eine signifikante Sequenzhomologie zu den Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen (Subtilasen) der pathogenen Bakterien *Dichelobacter nodosus* [14] und *Xanthomonas campestris* [15] erkennen. Diese weisen - ebenso wie die *St. maltophilia*-Proteasen - im Vergleich zu den klassischen Subtilasen ein höheres Molekulargewicht (44-57 kDa) auf. Die klassischen Subtilasen [16] besitzen eine Molekülgröße von ca. 27 kDa. Viele dieser klassischen Subtilasen sind aufgrund ihrer technischen Nutzbarkeit als Waschmittelzusatz [17] sehr gut funktionell und strukturell untersucht. Es existieren bereits eine Reihe von Kristallstrukturen [18-20] sowie gentechnisch veränderte Proteine [21]. Die größeren Subtilasen, zu denen auch die *St. maltophilia*-Proteasen zählen (s.o.), sind dagegen weniger gut untersucht; und es liegen bisher keine Kristallstrukturen vor. Es war also zunächst Ziel dieser Arbeit, einen weiteren Vertreter dieser „großen“ Subtilasen zu charakterisieren. Darüber hinaus stellte sich die Frage nach der Relevanz der beiden *St. maltophilia* Proteasen für die Pathogenität des Keims. Dazu wurden die folgenden Teilziele formuliert.

1. **Sequenzierung der prominenten *St. maltophilia* Protease (*StmPr1*).** Nachdem auf Peptidebene bereits N-terminale und interne Aminosäuren sequenziert waren, sollte die weitere Sequenzierung auf DNA-Ebene erfolgen. Die Kenntnis der vollständigen Sequenz der Protease kann zur näheren Klassifizierung beitragen und gleichzeitig die Voraussetzung für die rekombinante Herstellung des Proteins schaffen.
2. **Identifizierung und Sequenzierung einer zweiten, bisher unbekanntes *St. maltophilia*-Protease (*StmPr2*).** Die in Vorversuchen erhaltenen Hinweise auf die Existenz einer zweiten extrazellulären Protease sollten auf Gen-Ebene bestätigt werden.
3. **Heterologe Expression und Reinigung der *St. maltophilia*-Proteasen.** Die rekombinante Produktion und Reinigung der Proteasen sollte die Voraussetzung für ihre Charakterisierung schaffen sowie Kristallisationsversuche als Voraussetzung für eine zukünftige Strukturaufklärung ermöglichen. Diese ist von Interesse, weil von den großen Subtilasen bisher keine dreidimensionalen Strukturen vorliegen; darüber hinaus könnten auf Grundlage der Struktur spezifische Inhibitoren entwickelt werden, die sich später eventuell als Wirkstoffe für alternative Therapien zur Bekämpfung von *St. maltophilia* verwenden lassen.
4. **Herstellung einer *StmPr1*-knock-out-Mutante.** Diese sollte in einem Lungenepithel-Zellkultur-Modell getestet werden und Hinweise auf die Bedeutung der Protease für die Pathogenität des Keims geben.

Theoretische Grundlagen

Serin-Proteasen

Zur Spaltung von Peptidbindungen durch proteolytische Enzyme unterscheidet man bislang vier katalytische Mechanismen. Nach diesen werden die Proteasen den vier Hauptfamilien der *Serin*-, *Zink*-, *Thiol*- (auch als Cystein-Proteasen bezeichnet) und *Carboxyproteasen* zugeordnet, wobei die Serin-Proteasen die am weitesten verbreitete Enzymklasse darstellen [22]. Die Zuordnung einer unbekanntenen Protease in eine der vier Klassen erfolgt durch das klassentypische Substrat- bzw. Inhibitorspektrum sowie durch Sequenz-Homologien.

Serin-Proteasen lassen sich weiter in Trypsin-ähnliche und Subtilisin-ähnliche Serin-Proteasen (Subtilasen) unterteilen. Diese Differenzierung erfolgt aufgrund von Sekundärstrukturunterschieden: Chymotrypsin-ähnliche Serin-Proteasen besitzen nur β -Faltblatt-Strukturen, Subtilisin-ähnliche Serin-Proteasen β -Faltblatt und α -Helix-Strukturen [23,24]. Für die Hydrolyse von Peptidbindungen entwickelten beide Serin-Protease-Typen unabhängig voneinander den Reaktionsmechanismus der sogenannten „katalytischen Triade“ [25], welche aus Serin, Histidin und Aspartat besteht. Diese Aminosäurereste sind konserviert und innerhalb der unterschiedlichen Serin-Protease-Klassen an bestimmten Positionen im Protein lokalisiert.

Der Katalysemechanismus wurde erstmals am Beispiel der Kristallstruktur von Chymotrypsin gezeigt [25]:

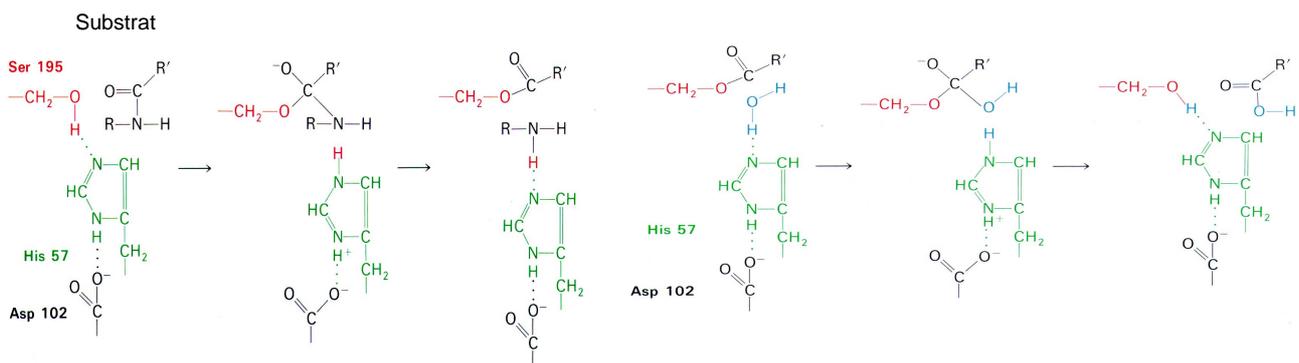


Abbildung 1.2 Hydrolyse von Peptidbindungen durch Serin-Proteasen. Die Hydrolyse der Peptidbindung des Substrates durch Chymotrypsin erfolgt in zwei Schritten: Zunächst wird die Carbonylgruppe des Substrates nukleophil durch Serin¹⁹⁵ angegriffen, wobei Serin den Imidazolring des benachbarten Histidin⁵⁷ protoniert. Aspartat¹⁰² stabilisiert die positive Ladung von Histidin. Serin und das Substrat bilden einen tetraedischen Übergangszustand, in dem die Peptidbindung gespalten wird. Die Aminokomponente diffundiert ab, und es bleibt ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt zurück. Im zweiten Schritt wird das Zwischenprodukt durch Wasser hydrolysiert, wobei eine Deacylierung erfolgt und die OH-Gruppe des Wassers die Aminokomponente des Substrates ersetzt. Das Proton stellt schließlich die OH-Gruppe des Serins wieder her.

Subtilisin-ähnliche Serin-Proteasen. Diese Protease-Klasse ist nach den Proteasen von *Bacillus subtilis* benannt, da sie anhand der Position der konservierten Aminosäurereste im aktiven Zentrum den Serin-Proteasen von *B. subtilis* zugeordnet werden [16]. Sie werden deshalb auch als Subtilasen bezeichnet und stellen eine sehr heterogene Superfamilie dar, die in den meisten prokaryontischen und eukaryontischen Organismen vorkommt [16]. Eine Vielzahl der Subtilasen sind extrazelluläre Enzyme, die als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert und nach Sekretion durch Abspaltung eines Propeptids aktiviert werden [26]. Die Bedeutung der Subtilasen für Eukaryonten liegt vor allem in der Regulation von Enzymen und Peptidhormonen durch limitierte Proteolyse. Wichtige Verdauungsenzyme und Blutgerinnungsfaktoren zählen ebenfalls zu den Serin-Proteasen [27,28]. Die prokaryontischen Subtilasen dienen den Organismen primär zum Substratabbau. Erst wenn Subtilase sezernierende Mikroorganismen andere Organismen befallen, können die Proteasen bedrohlich für den Wirt sein.

Trotz der heterogenen Verbreitung der Subtilasen, weisen viele dieser Enzyme in der Struktur des aktiven Zentrums starke Gemeinsamkeiten auf. Deshalb haben Siezen und Leunissen [29] ein verallgemeinertes Modell aus den Strukturen von Subtilisin BPN' [30], Subtilisin Carlsberg [31], Thermitase [32], Proteinase K [33], Savinase und Esperase [18] entworfen, bei dem graduelle Unterschiede bewusst ausgeschlossen wurden.

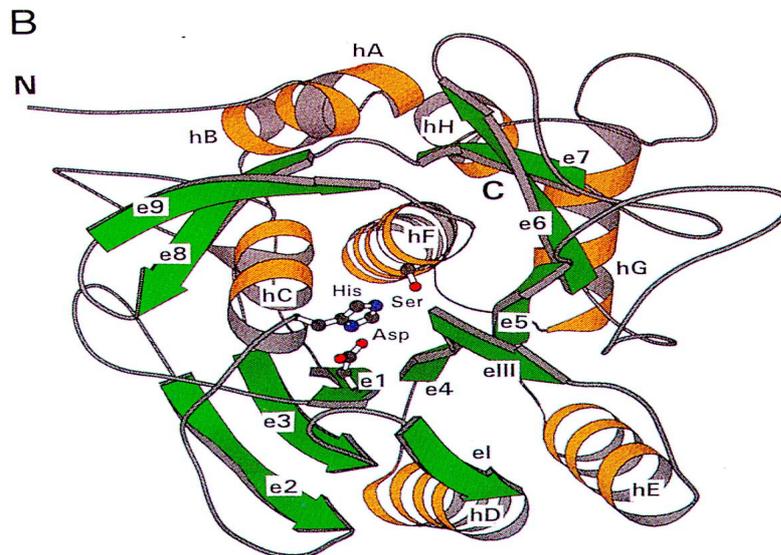


Abbildung 1. 3 Schematische Darstellung der Sekundär-Struktur von Subtilasen nach Siezen und Leunissen 1996 [31]. α -Helices sind als Zylinder dargestellt und β -Faltblätter als Pfeile. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind durch Asp³², His⁶⁴ und Ser²²¹ markiert. Die α -Helices sind durch hA bis hH und die α -Stränge durch e1-e9 beschriftet. Die α -Stränge der Substratbindungsregion werden als eI und eIII bezeichnet.

Die Sekundärstruktur (Abbildung 1.3) verdeutlicht, dass die Aminosäuren der katalytischen Triade räumlich dicht beieinander liegen, obwohl sie in der Primärstruktur weit voneinander entfernt lokalisiert sind. Diese Struktur wird bei den meisten Subtilasen durch Calcium Ionen stabilisiert.

Die Ionen verbinden Oberflächenschleifen, was zu einer erhöhten Thermostabilität und Resistenz gegen Autolyse führt [34]. Disulfidbrücken tragen ebenfalls zur Stabilität von Proteinen bei und sind für einige Subtilasen beschrieben: Für Proteinase K [33], Aqualysin [35], die alkalische Protease von *Dichleobacter nodosus* [14] sowie für Bacillus Subtilase S 41 [36].

Bei Subtilasen, deren Struktur nicht bekannt ist, besteht die Möglichkeit, durch die Bestimmung der Substratspezifität (P_1 - P_4 -Spezifität) auf die Größe und Ladung der Aminosäuren des aktiven Zentrums zu schließen [37,38]. Durch den gezielten Austausch der Aminosäurereste (P_1 - P_4) von Protease-Substraten (chromophore Tetrapeptide) kann durch die Ermittlung der Spezifitätskonstante (s. Material & Methoden) gezeigt werden, welches Substrat durch die Subtilase am effektivsten umgesetzt wird. Es wird davon ausgegangen, dass diese Effektivität auf die hydrophile bzw. hydrophobe Wechselwirkung zwischen den Aminosäureresten des Substrates (P_1 - P_4) und den Aminosäureresten ($S_1 - S_4$) der Bindungstaschen zurück zu führen ist.

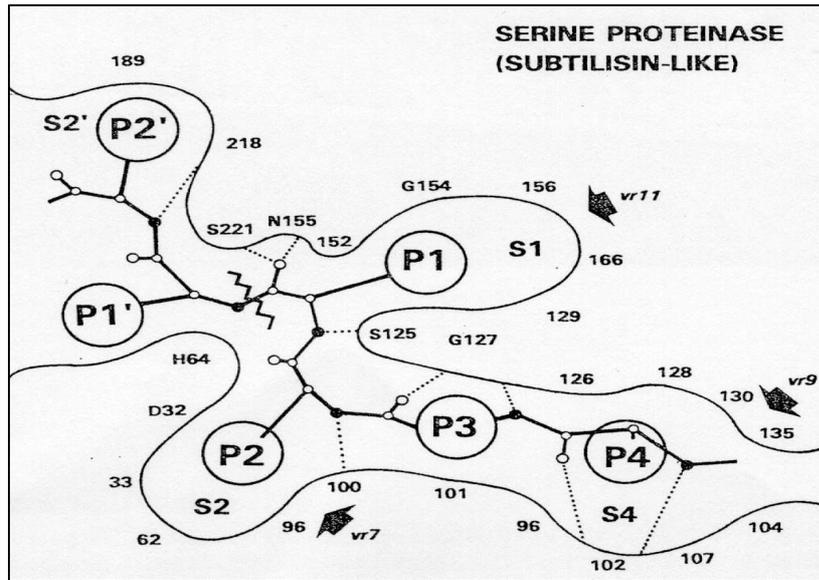


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Bindungstasche des enzymatischen Zentrums von Subtilasen [16]. S₁-S₂ stellen die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren des aktiven Zentrums der Subtilasen dar. Aminosäuren des Substrates sind mit P₁-P₄ bezeichnet. Gestrichelte Linien symbolisieren die Wasserstoffbrücken zwischen Enzym und Substrat; die gezackte Linie stellt die Spaltstelle des Substrates dar. Die Reste S221, H64, D32 sind bei allen bekannten Subtilasen konserviert, ebenso wie die Reste S125, G127 und G 125.

Eine weitere Spezifizierung der Subtilasen lässt sich auf der Grundlage von Sequenz-Homologien durchführen. Siezen [16] hat auf dieser Basis sechs unterschiedliche Familien definiert:

1. Die **Subtilisin-Familie** besteht ausschließlich aus mikrobiellen Enzymen (hauptsächlich von *Bacillus sp.*). Die Vertreter dieser Familie werden auch als klassische Subtilasen bezeichnet. Sie beinhaltet die Subgruppe der echten Subtilasen (Sequenz-Homologien innerhalb dieser Subgruppe: > 64%) ; die hoch alkalischen Proteasen (Sequenz-Homologien innerhalb dieser Subgruppe: > 55%) und die intrazellulären Proteasen (Sequenz-Homologien innerhalb dieser Subgruppe: 37%). Lange C-terminale Extensionen kommen selten vor und es sind einige 3-D-Strukturen ermittelt [s.o. und zur Übersicht 16]. Vertreter der echten und alkalischen Subtilisine werden aufgrund ihrer Hitzestabilität technisch genutzt und sind deshalb besonders gut untersucht [17].
2. Die **Thermitase-Familie** besteht ebenfalls ausschließlich aus mikrobiellen Enzymen, von denen einige thermophile oder halophile Eigenschaften aufweisen. Innerhalb dieser Gruppe gibt es eine Sequenz-Homologie von 55%. Es ist nur eine 3-D-Struktur bekannt (Thermitase) [32].
3. Die **Proteinase K-Familie** ist eine große Familie von Endopeptidasen, die nur in Pilzen, Hefen und Gram-negativen Bakterien vorkommen. Diese Familie ist durch eine starke Sequenz-Homologie zwischen den Familienmitgliedern charakterisiert. Es fehlen Ca²⁺-Bindungsstellen. Nur wenige Vertreter besitzen C-terminale Extensionen. Es ist eine 3-D-Struktur bekannt (Proteinase K) [33].
4. Die **Lantibiotic-Peptidase-Familie** besteht aus einer kleinen Anzahl hoch spezialisierter antibiotisch wirkender Enzyme, die posttranslational stark modifiziert sind und nur in Gram-positiven Bakterien vorkommen [39]. Die Familie ist durch geringe Sequenz-Homologien charakterisiert.
5. Die **Kexin-Familie** ist eine große Gruppe von Proprotein Konvertasen, die alle funktional in die Aktivierung von Peptid-Hormonen, Wachstumsfaktoren, viralen Proteinen etc. eingebunden sind [40, 41]. Es existiert eine starke Präferenz für die Schnittstelle nach bibasischen (Lys-Arg oder Arg-Arg) oder multiplen basischen Resten. Fast alle Kexine sind eukaryontisch und weisen eine starke Sequenz-Homologie auf.
6. Die **Pyrolysin-Familie** ist eine heterogene Gruppe, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vorkommt. Sie ist charakterisiert durch niedrigere Sequenz-Homologie ihrer Mitglieder, lange Peptid-Insertionen und /oder lange C-terminale Extensionen [42].

Bakterielle Virulenz

Bakterielle Virulenz ist definiert als relative Kapazität eines Bakteriums, die Abwehrreaktion des Wirtes zu überwinden, und ist ein Produkt aus vielen interagierenden Variablen, in die das Bakterium und der Wirt involviert sind. Die Virulenz von Bakterien wird durch die 50-prozentige Infektionsdosis (ID^{50}) oder die 50-prozentige letale Dosis (LD^{50}) für ein Tiermodell charakterisiert [43].

Den ersten Schritt der Infektion durch Bakterien stellt die Adhäsion dar. Die Haftung der Bakterien an die Zelloberfläche des Wirtes wird durch Zelloberflächen-Strukturen vermittelt, die als Adhäsine [44, 45] bezeichnet werden und sich der Oberflächenstruktur des Wirtes anpassen. Bakterielle Pili sind bei vielen Bakterien [46] ebenfalls ein wichtiger Faktor für die Adhäsion.

Die erfolgreiche Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle ist Voraussetzung für die Proliferation der Bakterien. Dazu müssen diese in der Lage sein, die Wirtsabwehr zu überwinden. Dies erfolgt häufig durch Proteasen [12] oder durch bakterielle Zelloberflächen-Antigene [47]. Letztere dienen zur Abwehr der wirtseigenen Antikörper.

Die Aufnahme der Bakterien in die Zelle erfolgt in der Regel durch Phagozytose [48] oder lokale Zell-Lyse [49], verursacht durch bakterielle Toxine. Diese Toxine gliedern sich in drei Typen:

- I. A-B Toxine; deren A-Untereinheit Enzymaktivität aufweist und deren B-Untereinheit für die Bindung an die Membran verantwortlich ist (z.B. das Diphtherie-Toxin) [50].
- II. Proteasen und Hyaluronidasen, welche extra- oder intrazelluläre Komponenten schädigen [51].
- III. Membranschädigende Proteasen, Phospholipasen und Poren-bildene Toxine [52].

Es ist mittlerweile bekannt, dass viele Gene solcher Toxine als Cluster in sog. Pathogenitätsinseln auf der genomischen DNA lokalisiert sind. Dies kann dazu führen, dass eine ganze Gruppe von Pathogenitätsfaktoren von einem Stamm in einen anderen transferiert wird und so ein nicht-pathogener Stamm in einen pathogenen Stamm konvertiert wird [49].

Proteasen als bakterielle pathogene Faktoren. Humanpathogene Arten von *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptococcus* und von Bacteroiden exprimieren und sezernieren Proteasen. Durch die proteolytische Auflösung der extrazellulären Matrix breiten sich die Bakterien im Wirtsgewebe aus. Dort können sie aufgrund der Sekretion von Proteasen die Zellen durch Abbau von Adhäsionsproteinen, Oberflächenrezeptoren und Membranproteinen schädigen [12]. Die Zellverwundung hat die Mobilisierung wirtseigener Antikörper sowie die Aktivierung der Komplement-Kaskade und der Blutgerinnungskaskade zur Folge [49]. Die Antikörper können durch viele bakterielle Proteasen abgebaut werden [47], und in einigen Fällen sind spezifische bakterielle Proteasen in der Lage, den potenten chemotaktischen Komplement-Faktor C5 zu inaktivieren und damit die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu reduzieren [49]. Nach Läsion der Zellmembran können Bakterien den Zelltod auslösen, indem sie im Zytoplasma Proteasen sezernieren. Aufgrund des Abbaus zellulärer Protease-Inhibitoren durch bakterielle Proteasen werden letztere nicht gehemmt und zerstören schließlich die Lysosomen, aus denen wirtseigene degradierende Enzyme freigesetzt werden [49].

Drug Design. Insbesondere für die Bekämpfung multiresistenter Bakterien ist es angezeigt, alternative Therapie-Methoden zu entwickeln. Einen solchen Ansatz stellt das sogenannte „computer aided drug design“ dar. Hierbei werden gegen enzymatische Pathogenitätsfaktoren hochspezifische Inhibitoren entwickelt. Auf Grundlage der 3-D-Strukturen des aktiven Zentrums dieser Enzyme können mit Hilfe bestimmter Computerprogramme enzymhemmende Substanzen entwickelt werden, die sich in ihrer Raumstruktur exakt in das aktive Zentrum einpassen, so dass eine hochspezifische Hemmung erreicht wird [53]. Ein Beispiel hierfür ist die HIV-Virus-Protease, deren Kristallstruktur als Vorlage zur Herstellung spezifischer Protease-Inhibitoren diente. Diese Inhibitoren werden bereits als Wirkstoffe in der HIV-Therapie eingesetzt [54].

Protein-Kristallisation

Voraussetzung für die Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse, welche zur Aufklärung der Raumstruktur von Proteinen dient, ist die Gewinnung geeigneter Einkristalle. Für die Kristallisation von Proteinen sind relativ große Mengen (ca. 5-50 mg) sehr reinen Proteins erforderlich, um zuverlässige Kristallisationsbedingungen zu ermitteln. Die Kristallisation von biologischen Makromolekülen beruht darauf, eine Proteinlösung in den Zustand der Übersättigung zu überführen, in dem sich die Moleküle räumlich anordnen statt zu präzipitieren. Im Zustand der Übersättigung befindet sich das Protein in einem metastabilen Status. Beim Übergang zu einem stabilen Zustand tritt Nukleation (Aggregation der Proteinmoleküle unter Wasserverlust) des Proteins ein, und es bilden sich Kristalle. Im ungünstigeren Fall bilden sich Proteinpräzipitate.

Der kontrollierte Übergang vom metastabilen Zustand der Übersättigung zum stabilen Zustand sollte sich langsam vollziehen, damit die Zahl der Nukleationszentren gering gehalten wird und dadurch die Voraussetzung für das Wachstum röntgentauglicher Kristalle gegeben ist. Die Kristallisation wird von unterschiedlichen Parametern beeinflusst. Zu den wichtigsten zählen die Art des Fällmittels (Präzipitant), der pH-Wert der Lösung, ggf. Zusätze von Liganden oder Inhibitoren, die Temperatur, die Ionenstärke des Puffers sowie die Reinheit der Proteinlösung [55,56,<http://www.hamptonresearch.com/techcenter/tips/.html>].

Ein Zusammenspiel der genannten und weiteren Bedingungen nimmt Einfluss auf die Kristallisation. Nur ein Screening über einen weiten Bereich von Parametern ermöglicht die Etablierung von geeigneten Kristallisationsbedingungen.

MATERIAL UND METHODEN

MATERIALEN

Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Produkt	Hersteller	Produkt	Hersteller
Acrylamid	BioRad	Hepes	Merck
Agarose	Merck	IPTG	Boeringer
Ammoniumpersulfat	BioRad	Isoamylalkohol	Merck
Ammoniumsulfat	Merck	Isopropanol	Merck
Ampicillin	Sigma	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
AMV	Promega	Kaliumhydrogenphosphat	Merck
APS	BioRad	Kaliumjodid	Merck
ATP	Roche	Kaliumnatriumtartrat	Merck
Azoalbumin	Merck	Kristallisationsbrücken	Crystal Microsystems
Bacitracin	Merck	Kälberserum, fötal	Gibco
Bacto Trypton	Difco	Kupfersulfat	Merck
Bisacrylamid	BioRad	Linbro Plates®	Flow Laboratories
Blocking-Reagenz	Roche	Lysozym	Roche
Bradford-Reagenz	BioRad	Manganchlorid	Sigma
Bromphenolblau	Merck	Methanol	Roth
BSA	Pierce	Methanol	Roth
Calciumchlorid	Merck	Mercaptoethanol	Merck
Cellophanfolie	BioRad	Microtubes	Eppendorf
Centricon®-Konzentratoren	Millipore	Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schüll
Chloroform	Merck	Mineralöl	Sigma
Crystal-Screening-Kits	Hampton Research	MOPS	Sigma
Cryo-Röhrchen	Nunc	Natriumacetat	Merck
CTAB	Merck	Natriumazid	Merck
Cyanbromid-aktivierte Sepharose	Sigma	Natriumcarbonat	Merck
Deckgläschen	Hampton-Research	Natriumchlorid	Merck
DEPC	Sigma	Natriumcitrat	Merck
Dextranblau	Fluka	Natriumpyrophosphat	Merck
Dialyseschläuche	Roth	Natriumthiosulfat	Merck
DNA Marker	MBI	Natriumacetat	Merck
DNase	MBI	Natriumazid	Merck
dNTP's	Promega	Natriumcarbonat	Merck
DTT	Merck	Natriumchlorid	Merck
Dulbecco's MOD-Medium	Gibco	Natriumpyrophosphat	Merck
Dye Deoxy Terminator Cycle Kit	Applied Biosystems	Natriumthiosulfat	Merck
ECL-Lösung I und II	Roche	NBT	Roche
EDTA	Merck	PEG 400	Sigma
Essigsäure	Merck	PEG 8000	Sigma
Ethanol	Merck	Penicillin/Streptomycin	Gibco
Hefeextrakt	ICN Biomedicals	Plasmid-Präparations-Kit	Machery und Nagel

Produkt	Hersteller	Produkt	Hersteller
PMSF	Sigma	Silbernitrat	Merck
Ponceau-S Lösung	Roche	Sukrose	Sigma
Protease-Inhibitoren	Sigma, Roche	T 4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
Proteinmarker	BioRad	Taq-Polymerase	Qiagen
Puffer Q	Qiagen	TCE	Merck
PVDF-Membran	Millipore	TEA	Merck
QIAquick Gel-Extraktionskit	Qiagen	TEMED	BioRad
Restriktionsendonucleasen	Boeringer, MBI	term. Transferase	Roche
RNase A	Boeringer	Ultrafilter; YM10: 10.000 kDa	Amicon
RNAsin	Promega	Tetra-Peptid-pNA	Bachem
SDS	Merck	X-Phosphat	Roche
Pfu-Polymerase	Stratagene	X-Gal	peqlab
Phenol (TE-gesättigt)	Roth		
Antikörper			
Kaninchen-anti-Digoxigenin mit alkalischer Phosphatase konjugiert	Roche		
Kaninchen-anti-Huhn-IgG Peroxidase konjugiert	Promega		
Huhn-anti-StmPr1	eigene Herstellung (E. Frank)		
Chromatographie-Matrices			
Superdex 200	Pharmacia		
HR/10/30	Pharmacia		
DEAE-650 (s) Fractogel	Merck		

Apparative Ausrüstung

Produkt	Hersteller	Produkt	Hersteller
Mikroskop, Leica DM IRBE	Leica	<u>Zentrifugen</u>	
Digitalkamera	Hamamatsu	RC 5C Plus	Sorvall
Elektroporator, Gene Pulser	BioRad	Superspeed RC2-B	Sorvall
Thermocycler, Mastercycler Gradient	Eppendorf	Biofuge pico	Heraeus
BioLogic-Chromatographie-Anlage	BioRad	Biofuge fresco	Heraeus
Vakuum-Blotter	Pharmacia	Varifuge 3.OR	Heraeus
<u>Elektrophorese</u>		Rotoren für Zentrifugen:	
Agarose-Gel-Kammer, horizontal	MWG-Biotech	SM24, SS34, GSA	Sorvall
SDS-PAGE Kammer, vertikal	Biometra	<u>Autoklav</u>	
Netzteil Biotech EPS 200	Pharmacia	5075 ELV	Systec
Power supply GPS 200/400	Pharmacia	<u>Sterile Werkbank</u>	
<u>Westernblotting</u>		Microflow Biological Safety Cabinet	MDH
Wet-Blot-Kammer	BioRad	<u>Waagen</u>	
<u>Geltrockner</u>		Analysenwaage	Sartorius
Easy Breeze Gel Dryer	Hoefer	<u>pH-Meter</u>	
<u>Video-Dokumentationssystem</u>		pH526	WTW
Kamera: Kappa CF 8/1	FMC	<u>Mikrotiterplatten-Photometer</u>	
Videoprinter UP-890 CE	Sony	Titertek® Multiscan Plus	CN
Monitor	Panasonic	<u>Photometer</u>	
UV-Tisch (312 nm)	Bachofer	LKB-Ultraspec III	Pharmacia
<u>Computerprogramme</u>			
GraphPad Prism™	Windows		
Sigma Gel™	Innotech Software		
BioLogik	Windows		

Verwendete Zelllinie

Typ	Beschreibung	Referenz
Lungenepithelzellen A 549	aus explantiertem Lungentumor eines 58 Jahre alten Mannes	GIARD ET AL., 1973 [57]

Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1, re/A1, endA1, gyr A96, thi-1, hsdR17(rk ⁻ m _k ⁺), supE44, relA1, lac, F'[pro AB; lacI ^q ZΔM15, Tn10 (TET ^r)]	BULLOCK ET AL., 1987 [58]
<i>E. coli</i> JM 109 (DE 3)	recA1, re/A1, supE44, endA1, hsdR17(rk ⁻ m _k ⁺), mcrB ⁺ , gyr A96, relA1, thi-1, Δ(lac-proAB), F'[traD36, pro AB; lacI ^q ZΔM15], (DE3)	YANISCH-PERRON ET AL., 1985 [59]
<i>E. coli</i> BI 21 (DE3)	F- ompT, hsdSb, (r _B ⁻ m _B ⁺), gal dcm (DE3)	STUDIER UND MOFFLATT, 1986 [60]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Wildtyp	Patienten-Isolat

Verwendete Vektoren

Vektor	Verwendungszweck	Hersteller
p-GEM [®] -T-EASY	TA-Klonierungsvektor	Promega
pet 16b	bakterieller Expressionsvektor	Invitrogen
pet 17b	bakterieller Expressionsvektor	Invitrogen
IBA 6	bakterieller Expressionsvektor	Institut für Bioanalytik

Antibiotika-Lösungen

Antibiotikum	Lösungsmittel für Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	H ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	Ethanol	125 µg/ml
Chloramphenicol	Ethanol	30 µg/ml
Antibiotikamix aus Ampicillin Refobacin Claforan	H ₂ O	Ampicillin: 100 µg/ml Refobacin: 40 µg/ml Claforan: 50 µg/ml

Primer für die Sequenzierung der StmPr1- und StmPr2- Gene

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
	StmPr1	StmPr2
1/sense	CCN TAC TAC CAA CAA TAC C T T G G T	GAC CCN TAT TAT CAG CAG CAG TGG T C C A A A
1/antisense	NGT NCT CAT NGC NGC NGG NGCG	AG NAC NCG NAC NGG NAG NAC CTT A T A T
2/sense	GTG CAG AGC GCG CTG ATC GCC	GCT GGC ACG GTA CCC ACG TCG
2/sense/nested	GCA AGG ATV CGC TGG CCC CCG	GTA CTG CGT TCA ATG CCA AGG
2/antisense	CTT TTT TTT TTT TTT TTN	CTT TTT TTT TTT TTT TTN
Bezeichnung	Sequenz in in 3' → 5' Richtung	Sequenz in in 3' → 5' Richtung
	StmPr1	StmPr2
3/sense	GTA TCG AGT ACC GCC ACC ACC	GTC GGT GCC GGC AAC TGC CCC G
3/sense/nested	CCC TGC GAC ACG TCC CAC GCC	CCA ACT ACG GCA CCG GCA TCG
3/antisense	CTT TTT TTT TTT TTT TTN	GGT GTT GCT GTT GCC GGC GGC
4/sense	GGT GCC CAA CCT GCT GGA AGG	CTG CGG CGA TCA ACG GCG GTG
4/sense/nested	GCT TGG CCG AAC GGT CAC CGG	CAA CGG CGG TGG CAA CCC GAA C
4/antisense	CTA CCG GCA CGA TAC TTG ACG	GCC GCG TTG GCG TCG ACG
Bezeichnung	Sequenz in 3' → 5' Richtung	
	StmPr2	
5/sense	CGA TCA CGG CCA CCA CCA CGC	
5/antisense	GAC GCG TTC GAG GTA CCG AAG	
5/antisense	CTT TTT TTT TTT TTT TTN	

Primer für die Klonierung von StmPr1 in die Expressionsvektoren pet 17b, 16b und IBA 6

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
pet 17b	
StmPr1/pet17/α DNA-Abschnitt: Nukleotid 451 - 1854	sense GGG AAA TTC CAT ATG CTG GCG CCG AAT GAT antisense CCG CTG GAG TTA CTG CGT GGC GAG GAT GCT CAC
StmPr1/pet17/β DNA Abschnitt: Nukleotid 81 -1854	sense GGG AAT TCC ATA TGG CTG GAC TGC CGA CCC GCG AAC antisense s.o.
StmPr1/pet17/γ DNA Abschnitt: Nukleotid 1 -1854	sense GGG AAT TCC ATA TGA TCA AGA AGC AGA ACC TTC antisense s.o.
pet 16b	
StmPr1/pet16/α DNA-Abschnitt: Nukleotid 451 - 1854	sense ATG CTG GCG CCG AAT GAT antisense s.o.
IBA 6	
StmPr1/IBA/α DNA-Abschnitt: Nukleotid 451 - 1854	sense ATG CTG GCG CCG AAT GAT antisense TTA CTG CGT GGC GAG GAT GCT CAC

Primer für die Klonierung von StmPr2 in den Expressionsvektor pet 17b

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
StmPr2/pet17/α DNA-Abschnitt: Nukleotid 406 - 1743	sense GGG AAT TCC ATA TGT TGA CCC CGA ATGAC antisense CCG CTC GAG TCA GTA CTG GGC GTT GAG GGT
StmPr2/pet17/α DNA-Abschnitt: Nukleotid 1 -1743	sense GGG AAT TCC ATA TGT CCC AGG TAA CGC AAC CG antisense s.o

Primer für die RT-PCR

Bezeichnung	Sequenz in 5' → 3' Richtung
StmPr1/RT	sense GAA CTG AAG GCC GAC CCT GCG antisense CAC CTTGGCCTT GTGCGCGAC
StmPr2/A/RT	sense GAA CGT GGA ATA CGT CGA AGT C antisense CCC ACA CGA TCG CGT CGG CG
StmPr2/B/RT	sense GAA CGT GGA ATA CGT CGA AGT C antisense CGG TGC TGT TGT TGG TCA CCG

Medien zur Bakterienkultivierung

St. maltophilia-Medium [61]. 5 μM MnSO_4 ; 0,36 mM CaCl_2 ; 0,5 mM L-Methionin; 0,8 mM MgSO_4 ; 2,2 mM K_2HPO_4 ; 3,7 mM KH_2PO_4 ; 6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 50 mM di-Natrium-Succinat; 2 g/L Hefe-Extrakt wurden in 1 L H_2O gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,2 eingestellt und die Lösung danach autoklaviert. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe der steril filtrierten Antibiotika in das abgekühlte Medium: 40 mg/L Refobacin; 50 mg/L Claforan und 100 mg/L Ampicillin.

LB-Medium flüssig. In einem Liter H_2O wurden 10 g Trypton; 5 g Hefe-Extrakt; 10 g NaCl gelöst; der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

M9-Medium. 17 mM Na_2HPO_4 ; 20 mM KH_2PO_4 ; 18 mM NH_4Cl ; 8 mM NaCl und 7 g hydrolisiertes Casein wurden in 1 L H_2O gelöst, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Danach wurden 0,1 mM CaCl_2 und 1 mM MgSO_4 (steril filtriert) hinzugefügt.

LB/Amp-Platten. 7,5 g Agar wurden in 1 L LB-Medium resuspendiert, autoklaviert und nach Abkühlung auf 50 °C 1 ml Ampicillin (50 mg/ml) hinzugefügt.

LB/Milchagar/Chloramphenicol-Platten. wie oben; nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden 100 ml einer 10%-igen, sterilen Milchpulver-Lösung und anstelle von Ampicillin 1 ml Chloramphenicol (30 mg/ml) hinzugefügt.

Allgemein gebräuchliche Puffer

Phosphatpuffer: K_2HPO_4 -Lösung (0,5 M) wurde vorgelegt und mit KH_2PO_4 -Lösung (0,5 M) bis zum gewünschten pH-Wert titriert.

PBS: 20 mM Phosphatpuffer pH 7,2 mit 120 mM NaCl

TBS: 20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit 120 mM NaCl

METHODEN

Kulturbedingungen für *St. maltophilia* [61]

St. maltophilia-Isolate von infizierten Patienten standen bereits zur Verfügung. Zur Kontrolle wurden diese erneut als *Stenotrophomonas maltophilia* identifiziert (UKE/Mikrobiologie). Es erfolgte eine Klonierung des Isolates und eine erneute Bestimmung des Klons K10. Die Langzeitkulturen des K10 wurden als Glycerin-Langzeitkulturen (1 ml Medium und 1 ml 87%-iges Glycerin) bei -80 °C gelagert und ü/N Kulturen aus diesen Stocks angeimpft. Der Klon wurde in *St. maltophilia*-Medium bei 29 °C unter starkem Schütteln (220 rpm) kultiviert.

Subkultivierung von Lungenepithelzellen (A 549)

Die A 549 Zellen wurden in Dulbecco's MOD-Medium, 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C unter 5%-iger CO_2 -Begasung bei 80%-iger Konfluenz gezogen. Der Medienwechsel erfolgte alle drei Tage.

Photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford. Bei dieser Methode werden die Proteine durch Bradford-Reagenz (BioRad) angefärbt, und die Extinktion anschließend im Photometer bestimmt. Anhand einer Eichgerade, die mit einem BSA-Standard erstellt wird, lässt sich die Konzentration der unbekannt Proteine bestimmen. Da sich nicht alle Proteine ebenso intensiv anfärben wie BSA (eigene Vorversuche), ist diese Methode nur für eine Konzentrationsbestimmung von Proteinmischungen geeignet. Es wurden 50 µl der Proteinlösung (in geeigneter Verdünnung mit PBS) mit 200 µl Bradford-Reagenz-Verdünnung (1:3 in PBS) versetzt, 10 min bei RT inkubiert und bei 595 nm im Mikrotiter[®]-Photometer gemessen. Als Leerwert diente Bradford-Reagenz (200 µl) mit 50 µl PBS. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Verdünnungsreihe von 0,5 µg – 2 µg BSA.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret. Durch die Biuret Methode werden die Peptidbindungen der Proteine quantifiziert. Im Vergleich zum Bradford-Reagenz hat diese Methode den Vorteil, dass keine Messfehler durch unterschiedliche Anfärbung der Proteine entstehen. Von Nachteil ist, dass mindestens 30 µg Protein pro Messung eingesetzt werden müssen. 250 µl der Biuret-Reagenz (32 mM KNa-tartrat; 12 mM CuSO₄; 30 mM KJ; 0,2 M NaOH) wurden zusammen mit 250 µl Proteinlösung (in PBS) für 30 min bei RT inkubiert und anschließend bei 547 nm im Photometer gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit einer Verdünnungsreihe von 30 µg – 200 µg BSA (in PBS).

Bestimmung des Proteingehaltes elektrophoretisch getrennter Proteinbanden. Diese Methode eignet sich für die Konzentrationsbestimmung von Zielproteinen, die nicht gereinigt, aber auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel eindeutig zu identifizieren sind. Die Eichreihe wird mit BSA-Standard erstellt, wobei auch hier zu berücksichtigen ist, dass nicht alle Proteine ebenso intensiv angefärbt werden wie BSA.

Durch SDS-Gel-Elektrophorese erfolgte eine Trennung von 0,5 µg; 1 µg; 2 µg; 4 µg; 6 µg und 8 µg BSA sowie einer Proteinprobe unbekannter Konzentration. Nach der Coomassie-Färbung des Gels wurden die BSA-Banden und die Bande des Proteins, dessen Konzentration bestimmt werden sollte, mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und zusammen mit 200 µl H₂O und 100 µl 0,1 M Tris Base für 45 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 200 µl Butanol hinzugefügt, das Mikrogefäß mehrmals invertiert und weiter für 30 min geschüttelt. Nach 1-minütiger Zentrifugation (13.000 g) wurden 200 µl des Überstandes in eine Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei OD₅₉₅ nm im Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt.

Als Eichreihe dienten die BSA-Extrakte, mit deren Hilfe die Konzentration der unbekannt Lösung bestimmt werden konnte.

Bestimmung der Proteinkonzentration durch Extinktionsmessungen. Die Absorption reiner Proteine wurde in einer Quarzküvette bei 280 nm im Photometer bestimmt. Die Konzentration ergibt sich nach dem Lambert-Beer-Gesetz aus:

$$A = \epsilon \times c \times d$$

A = Absorption

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke der Küvette

Photometrische Bestimmung der Proteaseaktivität von Proteinlösungen

Protease-Assay. Die proteolytische Aktivität einer Proteinlösung wurde durch Azoalbumin als Substrat bestimmt. Nach Inkubation von Azoalbumin mit einer Protease wird die Esterbindung zwischen dem Albumin und dem Azofarbstoff gelöst und die Azogruppen werden frei. Nach leichter Zentrifugation bleibt das schwerere Protein im Pellet, während der Farbstoff im Überstand gelöst ist. Die Menge an Farbstoff ist ein Maß für die Aktivität der Protease und kann bei einer Extinktion von 405 nm gemessen werden.

Für die Reaktion wurden 125 μ l Proteinlösung (in PBS) und 125 μ l Azoalbuminlösung (3,2 mg/ml in PBS) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Ausfällung der Proteine mit 10% TCE für 1 h bei 4 °C und eine anschließende Zentrifugation (5000 rpm für 15 min und 4 °C). 200 μ l des Überstandes wurden auf Mikrotiterplatten mit 5 μ l 10 M NaOH gemischt und die Extinktion bei 405 nm im Mikrotiter-Photometer gemessen.

Serin-Protease-Assay. Für die Aktivitätsbestimmung von Serin-Proteasen in einer Proteinlösung wurde das chromophore Tetrapeptid Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA verwendet, welches als unspezifisches Serin-Protease-Substrat gilt [38]. Nach Inkubation einer Serin-Protease mit diesem Substrat werden Nitroaniline freigesetzt, die bei 405 nm absorbieren. Die Menge an freigesetzten Nitroanilinen ist ein Maß für die Aktivität der Serin-Protease.

Für die Bestimmung der Proteaseaktivität wurden 100 μ l einer verdünnten Proteinlösung mit 100 μ l der verdünnten Substratlösung (50 mM) gemischt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Als Reaktions-Puffer dienen 50 mM Tris/HCl pH 9,0; 400 mM NaCl für die StmPr1-Protease und 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0; 200 mM NaCl für die StmPr2-Protease. Die Extinktionsmessungen erfolgten in Zeitintervallen von 5 min bei 405 nm im Mikrotiter-Photometer. Die Enzymaktivitätswerte ergaben sich aus einer linearen Abhängigkeit aus OD₄₀₅ gegen die Zeit.

Enzymkinetische Messungen

Zum besseren Verständnis sollen die wichtigsten Grundlagen der Enzymkinetik stichwortartig dargestellt werden.

Die Enzym-Substrat-Affinität sowie die Umsatzrate von Substraten durch ein bestimmtes Enzym werden durch die folgenden Parameter beschrieben:

- **die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max})** stellt sich ein, wenn alle Moleküle des Enzyms mit Substrat verbunden oder gesättigt sind, d.h. wenn das Substrat im Überschuss vorhanden und das Enzym geschwindigkeitsbestimmend ist.
- **die Michaelis-Menten-Konstante (K_m)** ist die Substratkonzentration bei halb-maximaler Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms.
- **die Wechselzahl (K_{cat})** beschreibt die Anzahl von Substratmolekülen, die jedes aktive Zentrum des Enzyms pro Zeiteinheit (sec) umsetzt:
- $K_{\text{cat}} = V_{\max}/\text{Enzymkonzentration (g/ml) pro sec.}$
- **die Spezifitätskonstante (K_{cat}/K_m)** gilt als eigentliches enzymkinetisches Charakteristikum eines Enzyms und ist für ein gegebenes Substrat günstig, wenn der K_m -Wert niedrig und die Wechselzahl hoch ist.

Man bestimmt V_{\max} und K_m durch Erstellung einer Substratsättigungskurve; dabei stellt die Asymptote die maximale Enzymgeschwindigkeit V_{\max} dar, und K_m gibt die Substratkonzentration bei halb-maximaler Reaktionsgeschwindigkeit ($1/2 V_{\max}$) an:

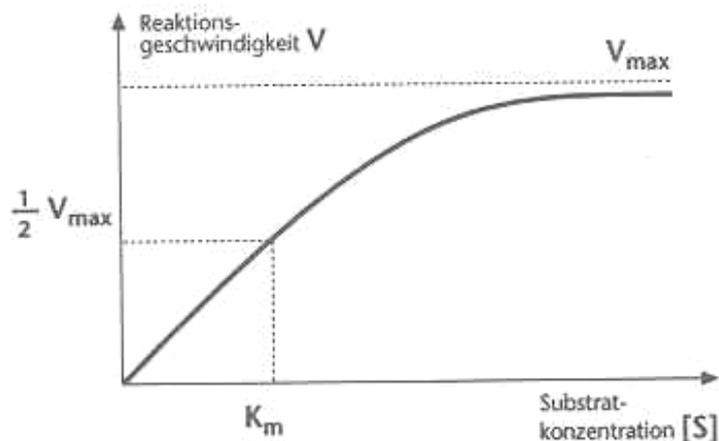


Abbildung 2.1 Substratsättigungskurve

Bestimmung der Substratspezifität. Die Messungen wurden durchgeführt wie für den Serin-Protease-Assay beschrieben. Nachdem der Umsatz von unterschiedlichen chromophoren Tetrapeptiden durch die StmPr2-Protease gemessen und in einer Substratsättigungskurve dargestellt wurde, erfolgte die Bestimmung des K_m -Werts und V_{max} durch das Programm GraphPad Prism®.

Bestimmung des IC_{50} -Wertes für kompetitive Inhibitoren der StmPr2-Protease. Die Affinität von kompetitiven Inhibitoren wird durch den IC_{50} -Wert beschrieben. Dieser Wert bestimmt, welche Inhibitor-Konzentration notwendig ist, um 50% der Enzymaktivität zu hemmen. Der IC_{50} -Wert wurde in dieser Arbeit für die Peptidinhibitoren Chymostatin und Antipain durch eine nichtlineare Regression graphisch dargestellt:

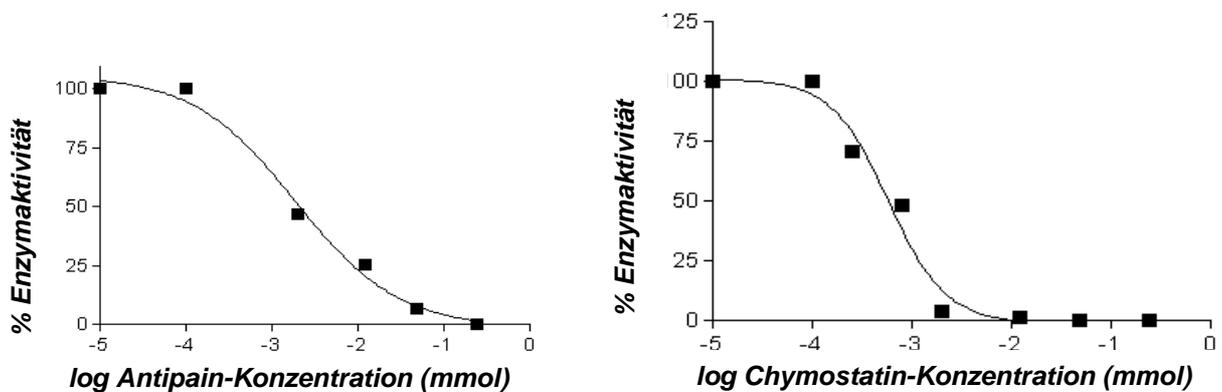


Abbildung 2.2 Hemmung von StmPr2 durch Antipain und Chymostatin. Inhibitor und Protease wurden 20 min bei RT vorinkubiert und der Substratumsatz von 2 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA durch den Serin-Protease Assay bestimmt. Die Enzymaktivitätswerte ergaben sich aus dem Mittelwert von drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen werden von der Symbolgröße erfasst.

Die Auswertung des Diagramms (Bestimmung des IC_{50} -Wertes) erfolgte durch GraphPad Prism®.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) [62]

In der vorliegenden Arbeit wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die aus einem Sammelgel und einem Trenngel bestehen. Bei diesem Verfahren sammeln sich Proteine im Sammelgel mit den größeren Poren und niedrigerem pH abhängig von ihrer Mobilität, die unter diesen Bedingungen nur von der Ladung nicht aber der Molekülgröße beeinflusst wird. Nach Eintritt ins Trenngel mit dem höheren pH-Wert steigt die Nettoladung der Proteine, und die Mobilität ist nun auch vom Molekulargewicht abhängig. Durch das Aufkochen mit SDS haben die Proteine ihre ursprüngliche Konformation verloren und werden entsprechend ihrer Molekulargewichte mit negativer Ladung besetzt. Pro Gramm Protein lagert sich ca. 1,4 g SDS an. Die Proteine wandern gemäß der angelegten Spannung mit einer ihrer Masse proportionalen Geschwindigkeit durch die Poren des Trenngels zur Anode. Die Porengröße des Gels wird durch die Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt.

Zusammensetzung der Gellösungen (Angaben für 2 Gele)

Elektrodenpuffer	25 mM Tris /HCl pH 8,3 192 mM Glycin 1 mM EDTA 0,1% SDS
Acrylamidlösung (30%)	30% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1
Trenngelpuffer (4 X)	1,5 M Tris/HCl pH 8,9 0,6% SDS
Sammelgelpuffer (4 X)	0,5 M Tris/HCl pH 6,7 0,6% SDS
reduzierender Probenpuffer (2 X)	20 mM Tris/HCl 2 mM EDTA 2% SDS 25% Glycerin 0,3% Mercaptoethanol 0,02% Bromphenolblau
Trenngel (12%)	4,2 ml H ₂ O 4,8 ml Acrylamidlösung 3,0 ml Trenngelpuffer 5 µl TEMED 60 µl APS
Sammelgel (4%)	2,84 ml H ₂ O 0,830 ml Acrylamidlösung 1,25 ml Sammelgelpuffer 5 µl TEMED 25 µl APS

Die SDS-Gele wurde in 104 mm X 98 mm X 1 mm großen, homogenen, unterschiedlich prozentigen Gelen in Elektrophoresekammern der Firma Biometra durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:1 in reduzierendem Probenpuffer verdünnt und 4 min bei 95 °C erhitzt.

Von dem eingesetzten Protein-Molekulargewichtsmarker (Verdünnung 1:20 in reduzierendem Probenpuffer) wurden 5 µl aufgetragen.

Die Elektrophoresebedingungen waren wie folgt:

- 100 V bis zum Verlassen des Sammelgels
- 130 V bis zur Beendigung der Elektrophorese

Folgende Proteine wurden als Molekulargewichtsmarker verwendet:

Protein	MW (kDa)
Phosphorylase b	97,4
Ovalbumin	45,9
Carbonanhydrase	31,0
Trypsininhibitor	21,5
Lysozym	14,4

Zymogramm. Zymogramme dienen der Identifikation von proteolytisch aktiven Proteinen im SDS-Gel.

Die Durchführung der SDS-Gelelektrophorese unterschied sich in den folgenden Punkten von der zuvor beschriebenen: Es erfolgte eine Zugabe von 0,01% Gelatine in das Trenngel, und die Probe wurde vor dem Auftragen nicht aufgeköcht. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel für 45 min in einer 2,5%-igen Triton X-100-Lösung bei 4 °C inkubiert und danach drei mal (bei 4 °C) für 10 min mit H₂O gewaschen. Nach einer einstündigen Inkubation des Gels in PBS bei 37 °C fand eine Coomassie-Färbung statt. Die Gel-Zonen, in denen die Gelatine von der Protease abgebaut wurde, sind nicht mehr mit Färbelösung anfärbbar; deshalb traten hier farblose Banden auf.

Autoradiogramm. Durch inkompetitive radioaktiv markierte Inhibitoren (z.B. DFP), welche Serin-Proteasen kovalent am aktiven Zentrum binden, ist es möglich, aktive Serin-Proteasen in einem SDS-Gel nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurden 5 µl [1,3-³H]-DFP (Konzentration, 1.0000 mCi /ml) zusammen mit der Proteinlösung (100 ng Protease) für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 10% TCE gefällt. Die Proben wurden in Probenpuffer für 4 min bei 95 °C erhitzt und auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte eine Fixierung des Gels für 45 min in Fixierlösung. Danach wurde das Gel vier mal für 10 min mit H₂O gewaschen und danach für 1 h in 1 M Natrium-Salicylatlösung inkubiert. Das Trocknen des Gels erfolgte zwischen 2 Cellophanfolien für 1 h bei 50 °C. Die Exposition des Röntgenfilms mit dem Gel wurde bei -80 °C für eine Zeitdauer von fünf Tagen durchgeführt.

Extraktion von StmPr1 oder StmPr2 aus nicht-gefärbten SDS-Gelen. Diese Methode kann angewendet werden, um die hohe Auflösung der Gelelektrophorese für die Präparation kleiner Mengen reinen Proteins zu nutzen. Da die StmPr1- und StmPr2-Proteasen in 1% SDS noch 45% ihrer Aktivität zeigten (eigene Vorversuche), war es möglich, die Proteasen nach Trennung im SDS-Gel aus dem Gel zu extrahieren.

Zwei identische Proteaseproben wurden auf dem SDS-Gel getrennt, wobei die Positionen der Spuren vorher am Glasrand der Gelapparatur markiert wurden. Nach dem Lauf wurden die beiden Gelspuren getrennt und eine Proteinbahn mit Coomassie-Blau gefärbt. Diese Bahn diente als Positionsmarker zur Lokalisierung der ungefärbten Protease. Die andere Proteinbahn wurde 1 h bei 4 °C in 2,5%-igem Triton X-100, und im Anschluss daran drei mal für 10 min mit Wasser gewaschen.

Nach Identifikation der ungefärbten Protease-Bande wurde diese ausgeschnitten und das Gelstück in 1 ml PBS in einem Mikrogefäß zerkleinert und 1 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (10.000 g) des Inkubationsansatzes für 15 min bei 4 °C. 100 µl des Überstandes wurden für den Serin-Protease-Assay eingesetzt.

Herstellung der Bacitracin-Matrix [63]

Bacitracin ist ein antibiotisch wirkendes Cyclohexapeptid mit hoher Affinität zu bestimmten Proteasen. Die Bacitracin-Chromatographie stellt somit eine Art der Affinitätschromatographie dar.

Zur Kopplung dieser Substanz diente eine Cyanbromid-aktivierte Matrix.

1 g Matrix wurde mit 300 mg Bacitracin in 7,5 ml 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl pH 8,3 (= Waschpuffer WP) über Nacht bei 4 °C durch Rotation gemischt.

Der Überstand wurde verworfen und die Matrix zur Absättigung restlicher Bindungsstellen mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 für 2,5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde diese mit mindestens 5 ml WP gewaschen. Die Lagerung erfolgte in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0.

Bacitracin-Chromatographie

Waschpuffer I (WP I) = 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM CaCl₂; 10% Isopropanol

Waschpuffer II (WP II) = wie WP I + 2,5 M NaCl

Elutionspuffer = wie WP II + 10% Isopropanol (gesamt: 20% Isopropanol)

Die Matrix wurde mit 5 ml WP I äquilibriert und danach mit der entsalzten Proteinlösung für 3 h unter Schwenken bei 4 °C inkubiert. Der Durchlauf wurde auf Eis gelagert und die Säule mit je 5 ml WP I und WP II gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 mal 2 ml Elutionspuffer.

Färbung von SDS-Gelen

Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

Färbelösung: 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blau 250
40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig

Entfärber 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig

Gele wurden zusammen mit der Farblösung kurz in der Mikrowelle aufgeköcht und 10 min inkubiert. Dann wurde bis zur Aufhellung des Gelhintergrundes entfärbt – zur Beschleunigung bei erhöhter Temperatur.

Silberfärbung von SDS-Gelen

Fixierlösung	30% (v/v)	Ethanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Inkubationslösung	30% (v/v)	Ethanol
	0,5 M	Natriumacetat
	0,5%	Glutaraldehyd
	0,2%	Natriumthiosulfat
Silbernitrat-Lösung	0,1%	Silbernitrat
	0,02%	Formaldehyd
Entwickler	2,5% (w/v)	Natriumcarbonat
	0,01%	Formaldehyd
Stopp-Lösung	0,5 M EDTA	

Nach einer zweistündigen Inkubation in Fixierlösung wurden die Gele über Nacht in die Inkubationslösung gelegt, am nächsten Morgen dreimal mit H₂O gewaschen und anschließend für 1 h in der Silbernitrat-Lösung inkubiert.

Nachdem die Gele kurz mit H₂O gespült worden waren, konnten die Proteine in der Entwicklerlösung sichtbar gemacht werden. Sobald die gewünschte Färbungsintensität erreicht war, wurde die Farbentwicklung durch Inkubation in Stopp-Lösung abgebrochen. Die Stopp-Lösung wurde nach 10 min durch Waschen mit H₂O entfernt.

Lagerung von SDS-Gelen

Zur Lagerung wurden die Gele 1 h in H₂O inkubiert und danach zwischen zwei Lagen Wasser-getränkter Cellophanfolie für 2 h bei 50 °C getrocknet.

Protein-Blotting

Der Transfer der Proteine erfolgte durch ElektrobloTTing („wet-Blot“) auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen für 2 h bei einer Spannung von 70 V. Die Anordnung des Gels und der Membran wurde nach dem sog. „Sandwich-Verfahren“ durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden Gel und Membran zwischen speziellen Schwämmen und Filterpapieren (Whatman-Papier) eingebettet. Die Gele, Membranen, Schwämme und das Whatman-Papier wurden für 10 min im Blotpuffer (0,02 M Tris/HCl pH 7,5; 0,2 M Glycin; 20% Methanol und 1% SDS) äquiliBriert. Die PVDF-Membran musste vor der ÄquiliBrierung für 5 min in Methanol inkubiert werden. Der Aufbau der Blotkammer wurde wie folgt durchgeführt:

Kathode (+)

1. Schwamm
2. Whatman-Papier
3. Membran
4. Gel
5. Whatmanpapier
6. Schwamm

Anode (-)

Es war zu beachten, dass das Gel zur Anode (+) und die Membran zur Kathode (-) ausgerichtet war.

Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Nach dem Transfer der Proteine auf die NC-Membran wurde diese für 1 h in Blocking Lösung (TBS; 0,5% Tween 20; 5% Trockenmilchpulver) leicht geschwenkt, um überschüssige Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran in der Lösung des ersten Antikörpers (1:15 000 gelöst in Waschlösung) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach folgte dreimaliges Waschen in Waschlösung (TBS; 0,5% Tween 20; 2,5% Trockenmilchpulver) und im Anschluss daran die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Kaninchen-anti-Huhn-IgG-Peroxidase-konjugiert, 1:5000) in der gleichen Lösung für 1 h. Nach dieser Inkubation wurde die Membran 2 mal kurz in TBS; 2 mal 5 min in TBS/0,5% Tween 20; 1 mal 5 min in TBS/3% Tween 20; 2 mal 5 min in TBS/0,5% Tween 20 und 2 mal 5 min in TBS gewaschen. Die Visualisierung der Antikörperbindung durch Chemolumineszenz erfolgte durch einminütige Inkubation der Membran in einer 1:1-Mischung der ECL™-Lösung I und II. Die Membran wurde nach der Inkubation in durchsichtige Folie gelegt und zusammen mit einem Röntgenfilm für 1 min in einer Kassette bei RT inkubiert. Die nach der Filmentwicklung sichtbare Schwärzung lässt die Antikörper-markierten Banden erkennen.

Färbung von Proteinen auf Membranen

Nitrocellulose-Membranen wurden mit 3%-iger Ponceau-Rot-Lösung für 1 min gefärbt und kurz mit Wasser gewaschen.

PVDF-Membranen wurden mit Coomassie-Färbelösung für 2 min gefärbt. Danach erfolgte die Entfärbung: die Membran wurde jeweils 5 min in Entfärber I und in Entfärber II inkubiert.

Färbelösung	0,1% Coomassie Brilliant Blue G 50 50% (V/V) Methanol 7% (V/V) Eisessig
Entfärbelösung I	50% (V/V) Methanol 7% (V/V) Eisessig
Entfärbelösung II	90% (V/V) Methanol 10% (V/V) Eisessig

Sequenzierung von Proteinen

Proteinproben wurden in einem 12%-igen SDS-Gel getrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF Membran erfolgte eine Coomassie-Färbung (s.o) und die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die N-terminale Sequenzierung erfolgte durch Edman-Abbau [64, 65] mit Hilfe eines Sequenzers (Applied Biosystems 476A) (PD Dr. Fritz Buck im Institut für Zellbiochemie).

Konzentrierung von Proteinlösungen

Ultrafiltration. Eine 350 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon) wurde mit einer Membran (Molekulargewichts-Ausschluß = 10 kDa) bestückt. Die Proteinlösung in der Amiconzelle ist durch Druckzufuhr (2 mbar) durch die Membran nach außen geleitet worden. Lösliche Bestandteile, die größer als 10 kDa sind, blieben in der Amiconzelle, während niedermolekulare Stoffe ausgeschlossen werden.

Ultrazentrifugation. Proteinlösungen von geringem Volumen (400 µl) wurden in Mikro-Ultrazentrifugationseinheiten (Centrikon[®]) mit einem Molekulargewicht-Ausschluß von 10 kDa gegeben und bei 10.000 g (4 °C) bis zur Konzentration auf etwa Probenvolumen zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Reinigung durch zwei hintereinander geschaltete Zentrifugationsschritte der mit 400 µl Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5) beladenen Centrikons. Danach wurde solange zentrifugiert, bis die gewünschte Protein-Konzentration erreicht war.

TCE-Präzipitation. Die Proteinlösung wurde mit 10% TCE versetzt, mindestens 30 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min zentrifugiert (13.000 g). Der Überstand wurde verworfen und für die SDS-Gelanalyse das Proteinsediment in Probenpuffer gelöst. Zur Neutralisation restlicher Säure wurde etwas konzentrierte Tris (Base)-Lösung zugesetzt.

Ammoniumsulfat-Präzipitation. Der Proteinlösung wurde 75% Ammoniumsulfat zugesetzt und die Suspension für mindestens 3 h bei 4 °C gerührt. Danach wurde für 30 min bei 4 °C und 15.000 rpm (Sorvall SS-40-Rotor) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Proteinsediment in Puffer gelöst. Überschüssiges Salz wurde durch Dialyse entfernt.

Kristallisationsansätze

Für die Kristallisationsansätze wurde das Verfahren der Dampfdiffusion angewendet: In einem geschlossenen System, welches eine Lösung des sog. Präzipitanten enthält, wird ein Tropfen mit einer stark konzentrierten Proteinlösung in unterschiedlicher Weise („hanging“ oder „sitting drop“) platziert. Bei den Präzipitanten handelt es sich um Substanzen, die sich zur Proteinpräzipitation eignen (Salze, organische Lösungsmittel, Polyethylenglykol); durch Pufferzusätze werden definierte pH-Werte eingestellt. Da diese Präzipitanten-Lösung anteilig (meist 50%) dem Proteintropfen zugesetzt wird, bewirkt die Dampfdiffusion in dem geschlossenen System eine langsame Konzentrierung des Proteins. Unter optimalen Bedingungen, die durch zahlreiche Versuche ermittelt werden müssen, kann es dabei zur Bildung von Proteinkristallen kommen [55, 56].

Für die Durchführung des „hanging drop“ Verfahren wurden Linbro Plates[®] (Kunststoffplatten mit 24 Vertiefungen (= wells)) verwendet:

Präzipitanten-Lösungen (jeweils 1 ml) wurden in die wells gegeben, Protein- und Präzipitanten-Lösung zu gleichen Teilen (2 µl) auf silikonisierte Deckgläschen pipettiert, vermischt und das Reservoir so damit verschlossen, dass der Tropfen nach unten ausgerichtet war. Zur Abdichtung der Ränder der Wells diente Silikonfett. Das sitting drop-Verfahren unterscheidet sich zum hanging drop-Verfahren nur in der Platzierung des Proteintropfens. Hier „hängt“ der Tropfen nicht sondern „sitzt“ in der Vertiefung einer Kristallisationsbrücke.

Folgende Präzipitanten-Lösungen wurden verwendet:

PEG 400 (18%-28%, pH-Werte 7,5-9,5); PEG 8000 (5%-25%, pH-Werte 5-9); Phosphat (1,5-2,5 molar, pH-Werte 5-9); Ammoniumsulfat (1,5-2,5 molar, pH-Werte 5-9); unterschiedliche Lösungen der Firma Hampton Research.

Die StmPr1-Protease wurde für die Kristallisationsexperimente in einer Konzentration von 7,5 mg/ml eingesetzt. Jeder Ansatz wurde mit einem StmPr1/PMSF-Komplex und mit einem StmPr1/Chymostatin-Komplex durchgeführt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 21 °C.

Nucleinsäure-Isolation

Präparation von bakterieller genomischer DNA. 1,5 ml einer gesättigten Bakterien suspension wurden in Mikrogefäße überführt und für 1 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 567 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4; 1mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl 10%-iger SDS-Lösung und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Extraktion von kontaminierenden Makromolekülen und Polysacchariden erfolgte mit 100 µl 5 M NaCl und 80 µl CTAB/NaCl-Lösung (2% CTAB; 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl) für 10 min bei 65 °C. Nach Zugabe von 800 µl Chloroform-Isoamylalkohol 24:1 und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde für 10 min bei 14.000 g (4 °C) zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Mikrogefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion, um die restlichen Proteine zu entfernen. Zur DNA-Fällung diente 0,6 Vol Isopropanol. Die DNA/Isopropanol-Lösung wurde für 1 min bei 14.000 g und RT zentrifugiert, mit 70%-igem Alkohol gewaschen und anschließend getrocknet. Das Lösen der DNA in H₂O erfolgte für 1 h unter Schütteln bei 55 °C.

Plasmid-Präparation. 1,5 ml einer gesättigten *E. coli* Kultur wurden in Mikrogefäße überführt und für 1 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Bakterienlyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH/1% SDS-Lösung und Inkubation (5 min) auf Eis. SDS und kontaminierende Makromoleküle wurden mit 150 µl einer 3 M Kaliumacetatlösung pH 4,8 ausgefällt. Dazu erfolgte eine Inkubation auf Eis (10 min) mit anschließender Zentrifugation (15 min bei 14.000 g und 4 °C). Der klare Überstand wurde in ein sauberes Mikrogefäß überführt. Die Ausfällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 900 µl absolutem Ethanol. Anschließend wurde für 1 min bei RT und 14.000 g zentrifugiert, die DNA mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O über Nacht bei RT gelöst.

Plasmid-Präparation mit dem NucleoSpin® kit. 1,5 ml einer gesättigten *E. coli* Kultur wurden in Mikrogefäße für 30 sec bei 14.000 g zentrifugiert und anschließend in 250 µl Puffer A 1 (enthält TE Puffer und RNase) resuspendiert. Die Bakterienlyse erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer A2 und 5-minütiger Inkubation bei RT. Kontaminierende Makromoleküle wurden durch Zugabe von Puffer A3 ausgefällt und für 10 min bei RT und 14.000 g abzentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in eine NucleoSpin®-Plasmid-Säule wurde für 1 min bei 14.000 g zentrifugiert, der Durchlauf verworfen, die Säule mit 600 µl A 4 Waschpuffer beladen und für 1 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde ebenfalls verworfen und die Säule zum Trocknen 2 min zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte durch Beladen der Säule mit 50 µl H₂O und 1-minütiger Zentrifugation. Der Durchlauf wurde in einem Mikrotube aufgefangen.

Präparation bakterieller RNA. 10 ml einer Bakterienkultur (Dichte 0,5 im Fall von *St. maltophilia*-Bakterien bzw. 2,0 bei *E. coli* – gemessen als OD₆₀₀) wurden für 10 min bei 10.000 rpm (Sorvall SS-34 Rotor) und 4 °C sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Protoplasten-Puffer (15 mM Tris/HCl pH 7,5; 465 mM Sucrose; 8 mM EDTA) resuspendiert. Der Suspension wurden 80 µl Lysozym (50 mg/ml) zugefügt und diese 15 min auf Eis inkubiert. Das Abtrennen der Protoplasten erfolgte durch Zentrifugation (5 min bei 7000 rpm (Sorvall SS-34 Rotor) und 4 °C). Die sedimentierten Protoplasten wurden anschließend in 0,5 ml Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM NaCl; 1 mM Natriumcitrat; 1,5% SDS; 15 µl DEPC) resuspendiert und in ein Mikrogefäß überführt. Die Lyse der Protoplasten erfolgte für 5 min bei 37 °C. Zum Ausfällen von Proteinen, DNA und SDS wurde der Suspension 250 µl gesättigte NaCl-Lösung hinzugefügt, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 14.000 g und 4 °C zentrifugiert. Zur Ausfällung der RNA im Überstand des Zentrifugats diente 1 ml 100%-iger Ethanol und zum Waschen 0,5 ml 70%-iger Ethanol. Nach dem Trocknen wurde die RNA in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert und die Suspension für 5 min bei 60 °C inkubiert, wobei 2 mal für 5 sec gevortext wurde. Die gelöste RNA wurde mit 0,5 µl DNase (10 U/µl) und 11 µl DNase Puffer (10 fach: 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂) für 45 min bei 37 °C inkubiert, um eventuell kontaminierende DNA zu entfernen.

Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

- **genomische DNA.** Die DNA-Konzentration wurde auf einem 0,8%-igen Agarose-Gel anhand eines visuellen Vergleiches mit einem DNA-Standard (Gene Ruler™ Ladder Mix) ermittelt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von 0,1 bis 1 µl der DNA-Lösung aufgestellt und auf das Agarose-Gel aufgetragen.
- **Plasmid DNA.** Die Plasmidkonzentration wurde photometrisch bei 260 nm ermittelt. Zur Erfassung von Proteinverunreinigungen der DNA wurde zusätzlich bei 280 nm gemessen. Das Verhältnis zwischen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gibt Auskunft über die Reinheit der DNA. Ein Quotient von etwa 2 wird angestrebt. Die DNA-Konzentration errechnet sich wie folgt:
$$OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g DNA pro ml}$$
- **RNA.** Die RNA wurde 1:100 mit DEPC Wasser verdünnt und bei 260 nm im Photometer gemessen. Die RNA-Konzentration errechnet sich wie folgt: $OD_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml}$

Extraktion und Fällung von Nucleinsäuren

Zur Entfernung von kontaminierenden Proteinen (nach Inkubation mit Enzymen) können DNA-Lösungen mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und die DNA anschließend ausgefällt werden. Dazu wurde 1 Vol Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zur DNA Lösung gegeben, 30 sec geschüttelt und für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein sauberes Mikrogefäß überführt. Die Extraktion wurde solange wiederholt, bis nach der Zentrifugation keine weiße Interphase mehr zu erkennen war.

Für die Ethanolfällung wurde der gereinigten Nucleinsäurelösung 2,5 Vol 100%-iger Ethanol und 0,3 Vol 3 M NaAC (pH 4,8) hinzugefügt. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte die Ausfällung der DNA für 30 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Danach wurde die DNA für 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 14.000 g pelletiert, das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in H_2O oder TE-Puffer gelöst.

Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonucleasen

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsenzyme verwendet, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und schneiden (Restriktionsenzyme vom Typ II). Die Durchführung der Restriktionsreaktionen erfolgte nach Vorgabe der Hersteller (Temperatur und Puffer). Dabei wurden 10 Units Restriktionsenzym pro μg DNA eingesetzt. Die Inkubationsdauer für Plasmide betrug 2 h und die für genomische DNA 16 h, es wurde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Bei Doppelrestriktionen wurden anhand der von den Firmen verfügbaren Tabellen kompatible Kombinationsmöglichkeiten für zwei Puffersysteme gewählt.

Agarose-Gelelektrophorese [66]

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in TAE-Puffer (0,04 M Tris-acetat, pH7,5; 0,001 M EDTA) durchgeführt. Die Agarose-Gele enthielten je nach Anwendung 0,8-1,5 % Agarose. Die Agarose wurde durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung (ca. $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) auf Gelträger gegossen. Um Taschen geeigneter Größe im Gel zu erzeugen, wurden unterschiedliche Kämmen verwendet. Der Agarose-Lösung wurde vor dem Gießen zur Visualisierung der Nucleinsäuren $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Gelträger in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol FF; 50% Glycerin in 10 X TAE-Puffer) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-100 V. Zum Größenvergleich und zur Quantifizierung diente der DNA-Marker Gene Ruler™ Ladder Mix. Das in die DNA-Moleküle eingelagerte Ethidiumbromid konnte nach Beendigung der Elektrophorese auf einer UV-Durchlichtbank bei 302 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Southern-Blot [67]

In dieser Arbeit wurden Digoxigenin (DIG) markierte Sonden („DIG-Sonde“) zur Detektierung der Ziel-DNA verwendet. Digoxigenin kann mit einem Anti-Digoxigenin-Antikörper, welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, durch eine Farbreaktion detektiert werden. Nach Hybridisierung der auf NC-Folie geblotteten DNA mit der DIG-Sonde wird durch Inkubation der Membran mit NBT®-Lösung (Roche) eine Farbreaktion ausgelöst, durch welche die DIG-markierte DNA direkt auf der Membran gefärbt wird.

Ein StmPr1-DNA-Fragment (s. Anhang Abb. 2) wurde durch PCR mit DIG-markierten Nukleotiden (dNTP-Mix: 2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 1,3 mM dTTP, 0,7 mM Dig-11-dUTP) amplifiziert und als Sonde verwendet.

Die Detektion der Ziel-DNA durch Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde wurde wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurde StmPr1-DNA (5 µg) über Nacht restringiert und der gesamte Restriktionsansatz im Anschluss daran auf einem 0,8%-igen Agarose-Gel getrennt. Der Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran (Hybond™-N) erfolgte durch Vakuum-Blot. Hierzu wurde die Membran mit SSC (6-fach konzentriert) angefeuchtet und auf einen Vakuum-Blotter platziert. Darauf wurde eine Maske gelegt, deren Fenster etwas kleiner ist als die Membran und das Gel. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und mit der Vakuum-Pumpe ein Vakuum von 40 mBar eingestellt.

Die Denaturierung der DNA erfolgte durch Überschichtung des Gels mit 20 ml Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) für 10 min. Im Anschluss daran wurde diese Lösung entfernt, durch Neutralisierungs-Lösung (1,0 M Tris/HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl) ersetzt und für 10 min neutralisiert.

Für den DNA-Transfer (Dauer: 2 h) wurde die Neutralisierungs-Lösung entfernt und das Gel mit 20 ml SSC (20-fach konzentriert: 3,1 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0) überschichtet. Danach wurde die Position des Gels auf der Membran durch Einstechen der Geltaschen mit einer Kanüle markiert, die Membran mit SSC (6-fach konzentriert) gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Zum Fixieren der DNA auf der Membran wurde diese zwischen zwei Glasplatten und zwei Lagen Filterpapier bei 80 °C für 1,5 h gebacken.

Für die Prähybridisierung wurde die Membran mit SSC (6-fach konzentriert) angefeuchtet, mit Hilfe einer 20 ml-Glaspipette aufgerollt und in ein Hybridisierungs-Röhrchen überführt. In dieses wurde vorher 10 ml SSC (6-fach konzentriert) gegeben, damit sich die Membran an der Glaswand gleichmäßig ausrollt. Die SSC-Lösung (6-fach konzentriert) wurde durch auf 42 °C vorgewärmte Prähybridisierungs-Lösung (SSC, 5-fach konzentriert; 0, 2% SDS; 0,1% N-Laurylsarcosin; 2% Blocking-Lösung; 100 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA; 50% Formamid) ersetzt und Heringssperma-DNA (die zuvor für 10 min bei 100 °C denaturiert wurde) der Prähybridisierungs-Lösung zugefügt. Die Prähybridisierung erfolgte in einem Hybridisierungssofen bei 42 °C für mindestens 2 h.

Für die Hybridisierungsreaktion wurde die DIG-Sonde für 10 min bei 68 °C denaturiert, kurz abgekühlt und zur Prähybridisierungs-Lösung gegeben. Dabei entsteht aus dieser die Hybridisierungs-Lösung. Diese kann nach Gebrauch bei -20 °C gelagert und wieder verwertet werden, indem sie aufgetaut und für 10 min bei 68 °C denaturiert wird. Die Hybridisierung erfolgte ü/N bei 42 °C im Hybridisierungssofen.

Für die Färbung der hybridisierten Sonde auf der Membran wurde diese für 5 min in Maleinsäure-Puffer (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5), dann für 30 min in der Blocking-Lösung (10% Blocking-Reagenz (Roche) in H₂O) und im Anschluss daran 30 min in Antikörper-Lösung (anti-DIG-AP-Konjugat, 1:10000-Verdünnung) inkubiert (bei RT). Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in Maleinsäure-Puffer für je 15 min bei RT entfernt und die Membran dann für 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris/HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl₂) bei RT äquilibriert.

Zur Färbung der hybridisierten Sonde, wurde die Membran für 5 min in frisch angesetzter Farblösung (45 µl NBT-Lösung und 35 µl X-Phosphat-Lösung in 10 ml Detektionspuffer) ohne Schütteln im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5-minütiges Waschen mit H₂O gestoppt und die Membran auf Filterpapier getrocknet.

Polymerase-Kettenreaktion [68]

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient dazu, *in vitro* spezifische DNA-Abschnitte in großen Mengen herzustellen. Zunächst werden die DNA-Doppelstränge bei hohen Temperaturen aufgeschmolzen (Denaturierung). Spezifische Primer lagern sich beim Abkühlen des Gemisches an die Bindungsstellen auf den Einzelsträngen an („annealing“). Die annealing-Temperatur der Primer hängt dabei von ihrer Länge und Basenzusammensetzung ab. Eine hitzestabile DNA-Polymerase beginnt nun von der Bindungsstelle der Primer aus mit den zugesetzten dNTPs den Gegenstrang zu synthetisieren (Extension). Dieser Vorgang wird in 30-40 Zyklen wiederholt.

Standard PCR-Protokoll. 100 ng der Matrizen-DNA wurden zusammen mit 15 pmol Primer (je sense und anti-sense), 10 mM dNTP's, 5 µl PCR-Puffer (10-fach konzentriert), 10 µl Puffer Q (Qiagen, 5-fach konzentriert) und 2,5 U Polymerase (taq-Polymerase oder Pfu-Polymerase) in ein Mikrogefäß gegeben, mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt und gut gemischt. Die Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes erfolgte dann im Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler Gradient). Das folgende PCR Programm wurde für alle PCR-Methoden verwendet:

A. Denaturierung	3	min	95 °C	1 Zyklus
<hr/>				
B. Denaturierung	30	sec	95 °C	
annealing	15	sec	55 °C	
Extension	1	min	72 °C	Zyklus B 35 mal
<hr/>				
C. Elongation	10	min	72 °C	1 Zyklus

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zu unterschiedlichen Zwecken eingesetzt. Folgende PCR-Methoden dienten der Ermittlung unbekannter bakterieller genomischer DNA-Sequenzen:

Inverse PCR. Durch zirkulär ligierte DNA-Fragmente kann, durch den Einsatz von bekannten sense- und antisense-Primern, das unbekannte DNA-Fragment zwischen den Primern durch PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

Die zirkuläre Ligation von DNA-Fragmenten wurde wie folgt durchgeführt:

1 µg genomische DNA von *St. maltophilia* wurde mit den Restriktionsenzymen *Hinf I* oder *Eco RI* geschnitten. Die Inkubationsdauer der Restriktion betrug 16 Stunden bei 37 °C. Der Restriktionsansatz wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, die DNA ethanolisch gefällt und mit H₂O auf eine Konzentration von 0,5 ng DNA/ml H₂O eingestellt. Die starke Verdünnung der restringierten DNA sollte die Reaktion zur Eigenligation der DNA-Fragmente fördern und zirkuläre DNA-Fragmente generieren. Die DNA-Ligation erfolgte ü/N bei 16 °C (50 µl DNA-Lösung, 3 Units T7-Polymerase, 6 µl Ligase Puffer (10-fach konzentriert)).

Für die PCR wurden 15 pmol sense- und antisense-Primer nach der bereits bekannten Teil-Sequenz eines Gens hergestellt und 2 µl von der Lösung des ligierten DNA-Fragmentes als Matrize eingesetzt. Der Abstand der beiden Primer betrug ca. 30 bp. Im Anschluss an diese PCR wurde eine „semi-nested“ PCR (siehe unten) durchgeführt.

Rag-PCR (rapid amplifikation of genomic DNA). Für die Amplifikation von unbekanntem DNA-Bereichen kann in einer PCR „geteilte“ DNA verwendet werden. Dazu wird geschnittene genomische DNA mit Deoxy-poly-Adenosin (= A-tailing) versehen, so dass die DNA-Fragmente in der PCR mit Hilfe eines genspezifischen und eines poly-T-Primer amplifiziert werden können. Zunächst musste die DNA fragmentiert werden. Dazu wurden 1 µg genomische *St. maltophilia*-DNA für 16 Stunden bei 37° C mit jeweils 10 Units *Aat II*, *Pst I* oder *Sph I* inkubiert. Diese Restriktionsenzyme generieren DNA-Fragmente mit 3'-Überhängen, welche ein optimales Substrat für die terminale Transferase darstellen. Der Restriktionsansatz wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert, die DNA ethanolisch gefällt und in 20 µl H₂O aufgenommen. Für das A-tailing wurden die DNA-Fragmente (300 ng) mit 2,5 µl ATP (2 mM) und dem Reaktionspuffer für die terminale Transferase versetzt. Dann erfolgte eine Denaturierung der DNA bei 94° C für 5 min. Danach wurden 10 Units terminale Transferase dazugegeben und 30 min bei 37° C inkubiert. Zum Schluß erfolgte eine erneute Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion und Ethanol-fällung der DNA, welche dann in 20 µl H₂O gelöst wurde. Als Matrize für die nachfolgende PCR dienten 2 µl der Adaptor-DNA-Lösung und als Primer ein genspezifisches sowie ein poly-T-Oligonukleotid. Im Anschluss an die erste PCR wurde eine semi nested PCR durchgeführt.

Semi-nested PCR. In dieser PCR wird die zu amplifizierende DNA in die bereits durch PCR produzierte DNA „eingebettet“ (= nested). Die Methode wird angewendet, um aus einem PCR-Produkt bestimmte DNA-Bereiche zu selektieren und zu amplifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde als Matrize eine 1:100-Verdünnung des Produktes einer vorausgegangenen PCR eingesetzt. Ein genspezifischer Primer wurde um ca. 10-20 bp in 3' bzw. in 5' Richtung vor den Primer der ersten PCR platziert. Der gegenläufige Primer war identisch mit dem der ersten PCR. Auf diese Weise wird das DNA-Fragment selektiert, das durch den genspezifischen Primer aus der ersten PCR-Reaktion amplifiziert wurde.

RT- PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction). Zur Herstellung einer cDNA aus mRNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Als reverse Transkriptase diente die AMV, die neben der reversen Transkriptase-Aktivität auch RNase Aktivität besitzt (d.h. direkt nach der cDNA Synthese wird die RNA von der AMV abgebaut). Für die RT-PCR wurden 2 µg Gesamt-RNA zusammen mit einem genspezifischen Primer (15 pmol) für 5 min bei 70 °C inkubiert (Gesamtvolumen 15 µl). Der Reaktionsansatz wurde kurz auf Eis abgekühlt und 2,5 µl dNTPs; 3 Units AMV; 5 µl AMV-Reaktionspuffer (10-fach konzentriert), 1 µl RNasin, und 2,5 µl Natriumpyrophosphat (40 mM, vorgewärmt auf 42 °C) hinzugefügt; das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Dann erfolgte eine Inkubation von 60 min bei 42 °C. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Polymerase für 10 min bei 70 °C denaturiert. Als Matrize für die Standard-PCR dienten 2 µl dieses Reaktionsansatzes.

Sequenzierung von ds-DNA

Für die Markierung der DNA mit fluoreszierenden Farbstoffen wurde der Big-Dye Terminator Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet. In einer asymmetrischen PCR werden fluoreszierende dNTPs in die neu synthetisierten DNA Moleküle eingebaut. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Farbstoffen gekoppelt. Die Emission der Basen kann von einem UV-Detektor registriert werden.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass mit wenig DNA (0,8 µg Plasmid-DNA oder 0,2 µg gereinigtes PCR-Produkt) und jedem beliebigen unmarkierten Primer in einer asymmetrischen PCR ausreichend DNA für die Sequenzierung markiert werden kann. Für die Markierung der DNA wurden 800 ng Plasmid bzw. 200 ng gereinigtes PCR-Produkt mit 15 pmol Sequenzierprimer und 4 µl „Big Dye“ versetzt und mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Temperaturprofil gewählt:

95 °C	1 min	
96 °C	30 sec	
50 °C	5 sec	25 Zyklen
60 °C	4 min	

Der PCR Ansatz wurde ethanolisch gefällt und getrocknet. Die Sequenzierung der DNA erfolgte im Servicelabor, des Instituts für Zellbiologie.

Ligation von PCR Produkten in den TA (Thymin/Adenin)-cloning Vektor

PCR-Fragmente, die später in einen Expressionsvektor ligiert werden sollten, wurden zunächst in den TA-cloning Vektor p-GEM[®]-T-EASY kloniert, um sicher zu stellen, dass eine Restriktion des zu exprimierenden DNA-Fragmentes erfolgen kann. Diese Methode nutzt aus, dass einige Polymerasen, z.B. die Taq-Polymerase, unabhängig von der Matrize an die 3'-Enden der PCR-Produkte ein einzelnes Deoxyadenosin (A) ligiert. Der TA-cloning Vektor liegt in linearisierter Form vor und endet 3' mit einem einzelnes Deoxythymin (T). Dadurch lassen sich PCR-Produkte ohne Schwierigkeiten in diesen Vektor ligieren. Die Ligation erfolgte mit einem molaren DNA/Vektor Verhältnis von 3 zu 1. Es wurden 3 Units T4-DNA Ligase und Ligase-Puffer (2-fach konzentriert) verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Ligation erfolgte bei 4 °C ü/N.

Ligation zwischen Expressions-Vektor und DNA-Fragment

Vektor und DNA-Fragment wurden jeweils mit den gleichen Restriktionsenzymen doppelrestringiert, um eine Eigenligation der DNA zu verhindern. Zum Einbau der DNA-Fragmente in Expressionsvektoren wurde die geschnittene DNA (Fragment und Vektor in einem molaren Verhältnis von 3:1) nach Herstellerangaben mit Ligase-Puffer (10-fach konzentriert) und 3 Units T4 DNA-Ligase versetzt und ü/N bei 16 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 20 µl. Für die Transformation in *E. coli* wurde der gesamte Ligationsansatz eingesetzt (20 µl auf 200 µl kompetente Zellen).

Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen durch Gelextraktion

PCR-Produkte oder geschnittene DNA-Fragmente, die für Ligationen oder für Sequenzierreaktionen eingesetzt werden sollten, wurden durch Extraktion aus Agarose-Gelen gereinigt. Dazu wurde der Gelextraktionskit der Firma Qiagen verwendet. Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten und mit dem 3-fachen Vol Puffer Q solange bei 50 °C inkubiert, bis sich die Agarose aufgelöst hatte (ca. 10 min). Die Lösung wurde in eine Spin Säule geladen und für 1 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule mit 700 µl PE-Puffer versetzt. Nach der Zentrifugation (1 min) wurde der Durchlauf ebenfalls verworfen und die Säule zum Trocknen der DNA 1 min zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte mit 40 µl H₂O durch 1-minütige Inkubation und anschließender Zentrifugation. Der Durchlauf wurde in einem Mikrotube aufgefangen. Die Quantifizierung der DNA erfolgte durch einen visuellen Größenvergleich mit einem DNA-Standard. Dazu wurden 10% der DNA-Lösung zusammen mit dem DNA-Standard (Fermentas Gene Ruler[®] DNA Ladder Mix) auf einem Agarose Gel getrennt.

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Durch Behandlung von Bakterienzellen mit RbCl können diese kompetent gemacht werden, d.h., sie sind nach der Behandlung in der Lage, Plasmid DNA aufzunehmen.

50 ml Medium wurden mit einer ü/N-Kultur des betreffenden *E.coli*-Stammes angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer Dichte von 0,6 (gemessen als OD₆₀₀) inkubiert. Nach Abkühlung der Bakterienkultur für 10 min auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm (Hereaus) für 15 min und 4 °C. Das Pellet wurde in 16,7 ml Puffer RF I (100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM Natriumacetat; 10 mM CaCl₂; 15 % Glycerin, pH-Wert 5,8) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 15 min. Danach wurde erneut bei 2000 rpm (Hereaus) 15 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer RF II (10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 15% Glycerin; pH-Wert 6,8) resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 15 min wurde die Zellsuspension in Mikrogengefäße aliquotiert (200 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Vorbereitung der *St. maltophilia*-Zellen für die Elektroporation [69]

Für die Elektroporation werden Bakterien durch einen kurzen Stromstoß in die Lage versetzt, Plasmid-DNA aufzunehmen. Dazu müssen die Bakterien in eine salzfreie Lösung überführt werden: 100 ml gesättigte Suspension von *St. maltophilia* wurden 30 min auf Eis abgekühlt und danach bei 5000 rpm (GSA Rotor/Sorvall) für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 100 ml eiskaltem H₂O resuspendiert und zentrifugiert. Es folgten Wiederholungen dieses Waschschrittes mit 50 ml und mit 25 ml H₂O. Zum Schluß wurde mit 5 ml 10% Glycerin (in H₂O) sowie ein weiteres Mal mit 1 ml 10% Glycerin gewaschen. Die Bakterien wurden dann in 1 ml 10% Glycerin resuspendiert, aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation von kompetenten Bakterien durch Hitzeschock

Die Durchführung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Johnson [70]: Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und die DNA zu der Zellsuspension gegeben (20 ng Plasmid DNA oder 20 µl Ligationsansatz). Anschließend erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min.

Zur Auslösung eines Hitzeschocks wurden die Bakterien für eine min bei 42 °C inkubiert und danach für 2 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde in ein 12 ml-Gefäß überführt, in 1 ml LB-Medium suspendiert und für 1 h leicht (150 rpm) geschüttelt. Die Selektion der Bakterien erfolgte ü/N bei 37 °C auf LB/Amp-Platten.

Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Diese Methode [69] wurde angewendet, um eine homologe Rekombination zwischen genomischer DNA von *St. maltophilia* und linearisierter Plasmid-DNA zu erreichen.

Dazu wurden 80 µl vorbereiteter *St. maltophilia*-Zellen (s.o) für 10 min auf Eis aufgetaut, mit 450 ng linearisiertem Plasmid gemischt und in eine Küvette (0,1 cm) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Einstellung des Gerätes (Gene Pulser® BioRad) von 25 µF und 200 Ohm. Sofort nach dem Elektroschock wurden die Bakterien in 5 ml LB-Medium resuspendiert und eine Stunde bei 29 °C und 150 rpm geschüttelt. Von dieser Suspension wurden unterschiedliche Volumina auf LB/Milchagar/Chloramphenicol Platten ausgestrichen und für drei Tage bei 29 °C inkubiert.

Selektion transformierter *E. coli*-Bakterien

Selektion durch Antibiotika. Die Selektion erfolgte zunächst durch LB/Amp-Platten. Nur Klone, die ein Plasmid integriert hatten, konnten auf LB/Amp-Platten wachsen, weil die *E. coli*-Stämme ohne Plasmid keine Ampicillinresistenz aufweisen. In einigen Fällen kann es bei der Ligation zwischen Vektor und Ziel-DNA-Fragment zur Re-Ligation des Vektors kommen. Deshalb wurde eine weitere Kontrolle der positiven Klone vorgenommen, der sog. „PCR-proof“.

Selektion durch PCR-proof. Um nachzuweisen, dass die Klone einen Vektor mit Ziel-DNA-Fragment integriert hatten, wurde ein sog. „PCR-proof“ durchgeführt. Dazu wurden ca. 10 Klone ausgewählt und mit einem Zahnstocher in die Kolonien gestochen. Zunächst wurde mit dem Zahnstocher in eine nummerierte „Masterplatte“ (LB/Ampicillin Platte) gestochen und anschließend der Zahnstocher in ein Mikrogefäß mit 20 µl TE-Puffer überführt. Die Inkubation der Masterplatte fand ü/N bei 37 °C im Brutschrank statt. Die Mikrogefäße wurden zusammen mit dem Zahnstocher kurz geschüttelt und der Zahnstocher dann entfernt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 95 °C für 7 min. Für die Standard-PCR wurden 2 µl dieser Lösung eingesetzt. Der Nachweis der insertierten Ziel-DNA erfolgte durch genspezifische Primer.

Aufbewahrung von Bakterien

Kurzzeitkulturen Bakterien wurden auf LB/Amp-Agar-Platten bei 4 °C für maximal 1 Monat gelagert.

Langzeitkulturen ü/N Kulturen des entsprechenden Klons wurden auf 1 ml aliquotiert, jeweils mit 1 ml 87%-igem Glycerin gemischt und bei –80 °C gelagert.

Expression und Extraktion von rekombinanten Proteinen

20 ml einer ü/N-Kultur des gewünschten Bakteriums wurden auf 1 L LB/Amp-Medium verteilt und unter Schütteln (220 rpm) bei 37 °C bis zu einer Dichte von 0,5, gemessen als OD₆₀₀, inkubiert. Die Induktion der rekombinanten Proteine erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM). Nach weiteren 2 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (4.500 rpm, 15 min 4 °C, Sorvall GSA Rotor) geerntet, in 10 ml Lysispuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 1 mM DTT) aufgenommen und 10 mal 45 sec lang bei 100% sonifiziert. Die Zellen wurden nach dem Sonifizieren für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand bei –20 °C gelagert.

Renaturierung von Einschlusskörperchen (inclusion-bodys)

Das Bakterienlysat (s.o) wurde für 10 min bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand bei –20 °C gelagert. Die unlöslichen Proteine des Sediments (= inclusion bodys) wurden zunächst in Harnstoff denaturiert. Dies erfolgte durch Resuspension des Pellets in 1 ml 8 M Harnstoff und einstündiger Inkubation bei RT. Für die Renaturierung der Proteine wurde der Lösung 9 ml KH₂PO₄-Puffer pH 10,5 hinzugefügt und weitere 30 min inkubiert. Der Inkubationsansatz wurde dann mit 1 M HCl auf pH 8,0 eingestellt, 30 min inkubiert und gegen Phosphatpuffer pH 7,5 dialysiert. Zum Schluss erfolgte eine Gelanalyse von Pellet und Überstand des zentrifugierten (15 min 15.000 rpm, Sorvall SS-40 Rotor) Dialysats.

Expression und Sekretion der rekombinanten Proteine durch *E. coli*

Um den Sekretionsapparat der *E. coli*-Bakterien nicht zu überlasten, wurde eine milde Expression angestrebt: 20 ml einer ü/N Kultur des gewünschten *E. coli* Stammes (BL21 (DE3) für StmPr1, bzw. JM 109 (DE3) für StmPr2) wurden auf 1 L M9/Amp-Medium (StmPr1) bzw. LB/Amp-Medium (StmPr2) verteilt und unter Schütteln (220 rpm) bei RT bis zu einer Dichte von 1,0 (gemessen in OD₆₀₀) inkubiert. Die Induktion der StmPr1- bzw. StmPr2-Proteasen erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,05 mM (StmPr1) bzw. 0,5 mM (StmPr2)). Nach 48 h (StmPr1) bzw. 66 h (StmPr2) vorsichtigen Schüttelns (150 rpm) bei RT wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Bakterien für 15 min bei 4.500 rpm (Sorvall, GSA Rotor) und 4 °C sedimentiert. Das Medium wurde anschließend nochmals für 15 min bei 10.000 rpm (Sorvall GSA-Rotor) zentrifugiert, durch einen 20 µm-Filter filtriert und bei –20 °C aufbewahrt. Die Extraktion des Periplasmas erfolgte sofort.

Periplasma-Extrakt

Zur Isolation der Proteasen aus dem Periplasma der *E. coli*-Bakterien wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem Protoplastenpuffer (20% Sucrose; 20 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert, 5 min bei 14.000 rpm (Sorvall SS-40 Rotor) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem H₂O resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 14.000 rpm (Sorvall SS-40 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand stellte die periplasmatische Fraktion dar. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Säulenchromatographie

Das Ausgangsmaterial (Medium, s.o.) zur Proteinreinigung wurde im Wasserbad unter Schütteln aufgetaut und in der Amiconzelle auf ein Volumen von 10 ml bei 4 °C konzentriert. Die weitere Konzentration bis zur Trockne erfolgte ü/N in der „Speed Vac[®]“. Das Lyophilisat wurde in 1 ml TBS-Puffer gelöst und für 10 min bei 14.000 rpm/4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Gelchromatographie verwendet. Der Periplasmaextrakt wurde sofort ü/N in der „Speed Vac[®]“ bis zur Trockne konzentriert und danach genauso behandelt wie das Medienkonzentrat.

Größenausschlußchromatographie (SEC = Size Exclusion Chromatographie)

Diese Methode trennt aufgrund unterschiedlicher Molekülgröße Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei SEC-Säulen verwendet

Superdex[®] 200 Pharmacia

HR 10/30[®] Pharmacia

Ionenaustauschchromatographie (IEC = Ion Exchange Chromatographie)

Diese Methode beruht darauf, dass negativ geladene Proteine negativ geladene Anionen (Cl⁻ Ionen) verdrängen und statt dieser an die Säule binden. Beim Eluieren der Proteine von der Säule durch einen NaCl-Gradienten sind je nach Protein unterschiedliche Salzgradienten erforderlich. In dieser Arbeit wurde die folgende Säule verwendet:

EMD[®] DEAE-650(s) Merck

Alle Chromatographieschritte wurden in einer Mikroprozessor-gesteuerten Anlage (BioLogic[®], BioRad) bei 4 °C durchgeführt.

ERGEBNISSE

Wie bereits einleitend erwähnt, ist das Hauptsekretionsprodukt der *St. maltophilia*-Bakterien eine Protease, von der angenommen wird, dass sie eine wichtige Funktion für die Pathogenität des Keims hat [13]. In dieser Arbeit sollte das Protease-Gen sequenziert werden, um die Voraussetzung für weitergehende molekularbiologische Untersuchungen zu schaffen. Das Enzym war bereits gereinigt und biochemisch charakterisiert. Es lagen außerdem eine N-terminale und vier interne Peptidsequenzen vor, die zeigten, dass es sich bei dieser Protease um ein bis dahin unbekanntes Enzym handelt.

Sequenzierung des *St. maltophilia*-Protease-Gens

Für die Sequenzierung bakterieller Gene gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Die konventionelle Methode ist die Erstellung einer Genbank des fragmentierten Bakteriengenoms in *E. coli* [71].

In der vorliegenden Arbeit wurden PCR-Methoden für die Sequenzierung des Gens der *St. maltophilia*-Protease gewählt. Dieses lag in Anbetracht der vorliegenden Sequenzinformation nahe, da die bereits vorhandenen Peptidsequenzen als Vorlage für die Herstellung degenerierter Primer verwendet werden konnten. Für die Sequenzierung bakterieller Gene sind PCR-Methoden auch deshalb besonders geeignet, weil diese keine Introns besitzen und deshalb die genomische DNA direkt amplifiziert werden kann, so dass die Erstellung einer cDNA entfällt. In den letzten Jahren wurden die PCR-Methoden ständig weiter entwickelt und für die Sequenzierung prokaryontischer und eukaryontischer Gene erfolgreich eingesetzt [72,73].

Als Voraussetzung für die Sequenzierung der *St. maltophilia*-Protease mussten zunächst die bekannten Peptid-Sequenzen (**A**: LAPNDPYYQQY, **B**: VLPVRVLGK, **C**: DGNPGGYVWQSG, **D**: PLAPAAMR, **E**: ETARP) auf ihre Eignung als Vorlage zur Herstellung von degenerierten Primern geprüft werden. Unter der Annahme, dass in der Datenbank homologe Proteasen vorhanden sind, sollte es möglich sein, in etwa die Lokalisation dieser Peptide zu bestimmen.

<i>D. nodosus</i>	MKQSGINGVK	TLTLVVCAAL	ASQAYAAVNY	ESANYIGSQP
<i>X. campestris</i>	MSTA SLRKRTGSL.	TILGASALTS	LLLAMPAFAG	EVYLDGLATA
<i>Alteromonas</i>		MTINKNFKRA	ALSVAVSALF	TATAVTAAPA	QSIGQDAALA
					ATAQKLSSQS
	51				100
<i>D. nodosus</i>		EGSVRFIIKY	KDKSQSQQMM	TNRSTT....SVMNN
<i>X. campestris</i>		QTHQKFIVTY	KDGSTALASP	SALTTS....	.LRTAARAVP
<i>Alteromonas</i>		TLGTQFIIKY	KDASSQMMGL	SAADLAPAKM	QQRAESFVQD
					FKSSKASARA
	101				150
<i>D. nodosus</i>		QFVRTMTIGA	GIFAVPDLK.	TTKEAHLVMD	TIASNPDEVEY
<i>X. campestris</i>		NSVRRALALGP	E.LVRADRAL	DRAEAETLMR	QLAADPNVQS
<i>Alteromonas</i>		QYVRPMALSN	HHVMRADKKL	SAKEAQAFMN	EVVASGNVEY
					IEIDQMLKPF
	151				200
<i>D. nodosus</i>		AAPNDPFYND	QWHYY.SEYG	VKADKVWDRG	ITGKGVTVAV
<i>X. campestris</i>		LTPNDTRLSE	QWAFGTTNAG	LNIRPAWDKA	.TGSGTVVAV
<i>Alteromonas</i>		ATPNDRPYND	QWHYYEAAAG	INAPAAWDKA	.TGQGVVVAV
Peptid A		LAPNDPYYQQ	Y		
					VDTGIVNHPD
					IDTGTITSHAD
					LDITGYPHLD
	201				250
<i>D. nodosus</i>		LNANVIPGSG	YDFIQEAEIA	QDGDGRDSNP	ADAGDWHSNW
<i>X. campestris</i>		LNANILAG..	YDFISDATT	RDGNGRDSNA	ADEGDWYAAN
<i>Alteromonas</i>		LDANILPG..	YDMISNTFVA	NDGGARDNDA	RDPGDAVTRG
					ECGTDSSGQP
	251				300
<i>D. nodosus</i>		PRYEKRNSSS	HGSHVAGTIA	AVTNNRIGVS	GVAYDAKIVP
<i>X. campestris</i>		IPAAS..SSW	HGTHVAGTVA	AVTNNNTGVA	GTAYGAKVVP
<i>Alteromonas</i>		VPRADQDSSW	HGTHVAGTVA	AVTNNNGEGVA	GVAYDAKIVP
Peptid B					VRVLGRCGGY
					VRVLGKCGGS
					VRVLGKCGGL
					VLPV RVLGK
	301				350
<i>D. nodosus</i>		NSDINEGMYW	AAGGHIDGVP	DNKHQAQVIN	MSLGGPGVCG
<i>X. campestris</i>		LSDIADAIW	ASGGTVSGIP	ANANPAEVIN	MSLGGGGSCS
<i>Alteromonas</i>		TSDIADGIIW	ASGGS.DRVP	ANANPAVVIN	MSLGGGGACS
					ATTQNAINQA
	351				400
<i>D. nodosus</i>		TQLGATIIVA	AGNDNIDAYG	VTPASCDNIL	TVGATTSNGT
<i>X. campestris</i>		VSRGTTVVVA	AGNDASNVSG	SLPANCANVI	AVAATTSAGA
<i>Alteromonas</i>		RNNGTVIVIA	AGNDNDNSAN	YNPNCNGV	NVASVGRDGS
					RAYYSNYGAN
	401				450
<i>D. nodosus</i>		VDISAPGAG.IT	STVNSGARYP	SGPSYSLMDG
<i>X. campestris</i>		IDVSAPGSS.IL	STLNSGTTTP	GSASYASYNG
<i>Alteromonas</i>		IDVAAPGGAQ	SFADDPGIL	STHNSGSGAP	SNDSYHYSQG
Peptid C					TSMATPHVAG
					TSMASPHVAG
					TSMAPHVAG
					DGNPGGYVW
					QSG
	451				500
<i>D. nodosus</i>		VAALVISAAN	SVNKEMTPAQ	VRDVLVRTVS	SFNGTPDRRI
<i>X. campestris</i>		VVALVQSVAP	TA...LTPAA	VETLLKNTAR	ALPGACSGGC
<i>Alteromonas</i>		VAALIKQAKP	SA...TPDE	VETILKNTTR	SFAGSCSN.C
Peptid D+E			PLAPAA	MRT	ETAR
					P
	501				550
<i>D. nodosus</i>		VNAVLDGNV	ERPIDELKPQ	AEYRNPQIKL	IRDYQMMFSE
<i>X. campestris</i>		VTAAINGGSG	GGGGGGNTLT	NGTPVTGLGA	ATGAELNYT.
<i>Alteromonas</i>		VNEAL..GDV	VTPPTGNTLE	DGVAKTGLSG	AAGSNQFFT.
					FDVPAGKTNV
	551				600
<i>D. nodosus</i>		KFAVVKADIR	HTDPSQLKLR	LVSPKGYEYA	VDYDNIKNS
<i>X. campestris</i>		TVTTSGG...	.SGDADLYVR	AGSAPT.DSA	YTCRYPYRSGN
<i>Alteromonas</i>		TFTMSGG...	.TGDADLYVK	LGSQPT.SSS	YDCRPYEGGN
					AEVCSFDAQP
	601				650
<i>D. nodosus</i>		QMNGYWRLLKI	VDTKRGV..	GYTRGWSVAF
<i>X. campestris</i>		SGTYVRLKA	YSTFSGVTLR	ASY.....
<i>Alteromonas</i>		AGTYHVMING	YKAYSGVXLV	AATSGSSTGG	PQAGGGTIED
					ISASSGQVWH
	651				700
<i>D. nodosus</i>	
<i>X. campestris</i>	
<i>Alteromonas</i>		YTIEVPEGMS	DFTVKTFFGS	GDADLFVKFG	SQPTTSSYDC
					RPYENGNTET

Abbildung 3.1 Alignment der vorliegenden Peptid-Sequenzen der StmPr1 mit homologen Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen. Mit den bekannten Peptiden der *St. maltophilia*-Protease wurde eine Homologiesuche (EMBL-Datenbank) durchgeführt. Die Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen (Subtilasen) der Bakterien *Dichelobacter nodosus* [14], *Xanthomonas campestris* [15] und *Alteromonas spec.* [71] konnten als homologe Proteine identifiziert werden. Die Aminosäuren der katalytischen Triade (Asp, His und Ser) sind schattiert dargestellt.

Aus Abbildung 3.1 ist zu entnehmen, dass sich Peptid **D** am ehesten als Vorlage zur Herstellung eines degenerierten antisense-Primers eignet, weil es relativ nah am C-Terminus der homologen Subtilasen lokalisiert ist. Das Peptid **E** fand keine Verwendung, weil es zu kurz ist. Als Vorlage für den sense-Primer wurden die am wenigsten degenerierten Aminosäuren des N-terminalen Peptids (Peptid **A**) gewählt.

Nach Durchführung einer PCR mit degenerierten Primern, die aus den Aminosäure-Sequenzen **DPYYQQY** und **APAAMRT** abgeleitet wurden, konnte ein DNA-Fragment von ca. 900 bp amplifiziert werden. Da die Fragment-Größe der Größe des erwarteten Amplifikates entsprach, wurde das PCR-Produkt sequenziert, und es konnten tatsächlich bekannte Peptidsequenzen (VLPVRVLGK; DGNPGGYVWQSG) von der DNA-Sequenz abgeleitet werden. Deshalb war davon auszugehen, dass die erhaltene Sequenz ein Teil des gesuchten Gens darstellte.

Aufgrund der Polypeptidgröße der homologen Subtilasen ließ sich abschätzen, dass bis zum 3'-Ende des Gens noch ca. ein Drittel DNA-Sequenz fehlte. Da es sich bei der *St. maltophilia*-Protease um ein extrazelluläres Enzym handelt, war es notwendig, auch in 5'-Richtung zu sequenzieren, weil dort eine Signalpeptidsequenz zu erwarten war. Es konnte außerdem davon ausgegangen werden, dass eine Propeptid-Sequenz vorhanden ist, weil die homologen Subtilasen als Vorläuferprotein synthetisiert werden. Aus diesen Gründen erfolgte die weitere Sequenzierung des Protease-Gens nicht nur in 3'-Richtung, sondern auch in 5'-Richtung. Das bereits sequenzierte DNA-Fragment der Protease wurde als Vorlage zur Herstellung von genspezifischen sense Primern für die Sequenzierung in 3'-Richtung, bzw. antisense Primern für die Sequenzierung in 5'-Richtung verwendet. Um das Problem des Primerdesigns für den unbekanntem Sequenzbereich zu lösen, wurden spezielle PCR-Methoden eingesetzt: Die inverse PCR [74] sowie die in dieser Arbeit entwickelte Methode der rag-PCR (= rapid amplification of genomic DNA; vergl. Material & Methoden).

Es waren vier Schritte (s. Abb. 3.2) notwendig, um zum Stop-Codon (TAA) in 3'-Richtung und zum Start-Codon in 5'-Richtung zu gelangen. Zur Verifizierung der Sequenzdaten wurde zum Schluß das Gesamtgen amplifiziert und erneut sequenziert. Hierbei erwies sich die Identifikation des Start-Codons als problematisch, da im möglichen Startbereich des Gens kein ATG zu finden war, das als Startcodon in Frage kam. Ein ausführliches Literaturstudium [75,76,77] führte zu der Erkenntnis, dass von einigen Bakterien auch alternative Startcodons verwendet werden. Daraufhin wurde die Sequenz neu überprüft, und es konnte ein GTG in Aminosäure-Position⁻¹⁵⁰ gefunden werden, auf das die folgenden Kriterien zutreffen:

1. Vor diesem Codon ist eine Shine-Dalgarno-Sequenz [77] positioniert.
2. In 3'-Richtung folgt eine für ein Signalpeptid typische Sequenz.

Beides traf für das ATG in Position⁻¹³² nicht zu. Es wurde deshalb angenommen, dass anstelle eines ATG das GTG⁻¹⁵⁰ als Startcodon für das StmPr1-Gen verwendet wird. Diese Annahme wurde durch die erfolgreiche heterologe Expression des Gens zu einem dem WT-Protein entsprechenden aktiven Enzym unterstützt.

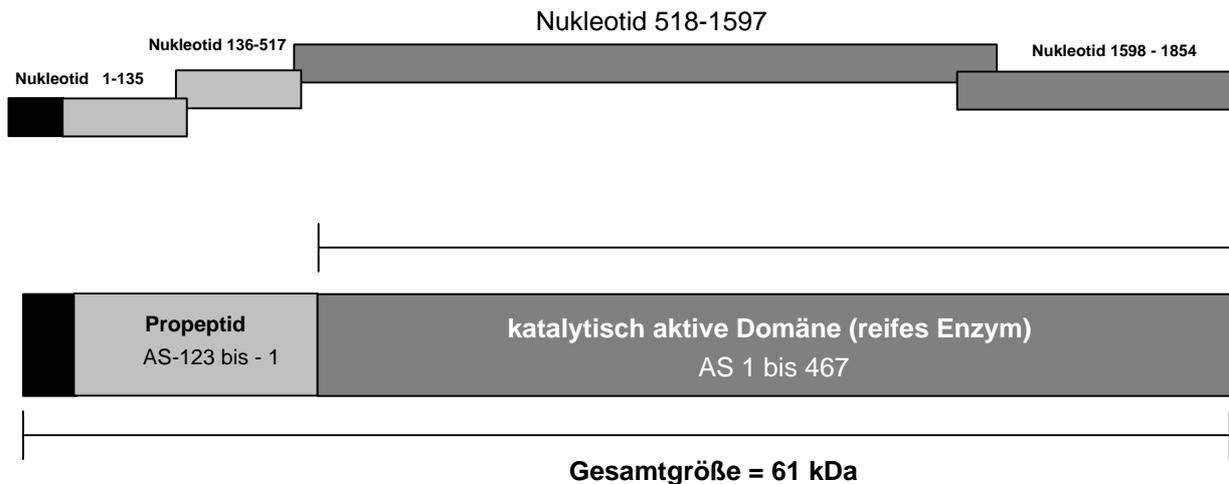


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Sequenzierung der einzelnen DNA-Fragmente der *StmPr1*. Die unterschiedlichen Domänen der *St. maltophilia*-Protease sind in den Farben schwarz (Signalpeptid), hellgrau (Propeptid) und dunkelgrau (reifes Enzym) dargestellt. Außerdem sind die Amplifikate der PCR's dargestellt, die notwendig waren, um das Gesamtgen der Protease zu erhalten (obere Abbildung). Die Anzahl der neu sequenzierten Nukleotide des jeweiligen Amplifikates ist ebenfalls gezeigt (über den Balken). In den Fällen, wo neu sequenzierte und bekannte DNA-Fragmente überlappen, sind die Balken ebenfalls überlappend.

TCGGTTGCGACCGTGCCAAATACGGTGTCCGGTGGGCGAGCGAAGGCAACGAGCGCCAGGTACCAACGTCGCGCGGGGACCACCGCCACCACCGCCGTCACAAAGGGCCAGCTGGATCGT
GCATGGCCACCGCCAACAGCTCACCCGACAGCCGGTCCAGGCGGTTGCCGACAGCTTCGATGTGTTCAAGGGCGAGATCGACGGGGCCCTGCGCCACATGGATCGTCATCGACC
CGAGGGTGGATGAGTGGCGCGATGCTCAACATGGCCACAGTGGCCCGGATCCGCCACCCAGAACCGGGTGGCGCTCGGCATCGGTTCCAGGGCGCGAGTGGCGTGTGCTGGTGGT
ACAGCGTGGATCAGCGATCGCGCCAGGTTACCTTCGGCGGTGCCTTCAGCAGTGACCGAGCTCGGTTGGCGTGGTGGCGCGCTTCGGCTGGTAAGCCAAACCACTGCGCCGGCGCCAC
CCACCGCGCGCCAAACCTGCAACAGGGCTGGGGGAGGTCACGGCAAGGCTGAGGCTCCCGGCTGGCGCGGGGAGTGCCTCAAGTGAATTGTCAGATGGCCGAGTGTGGTTCGATCCA
TGACCCAGAAAGCGAATTGCA

GTGATCAAGAAGCAGAACCTTCGCATCAATGTGCTTCCCGCCCGGTGCTGTCGATGACCGCGTGGGTGCCGTCCACGCGCTGGACTGCCACCCGCAACCGGTGCCCGAGGCCAGT
-150 V I K K Q N L R I N V L A A A V L S M T A V G A V H A++A G L P T R E P V R Q A S

121 GCTGCCAGCCGGGACCACCGCATCATCGTCAAGTATCGTCCGGTAGCGTGCAGCCGGTGACCGTTCCGGCCAAAGTGTCCACCGTGCAGTGGCGCTGACCCGCGCAGCCTGGCC
-110 A A Q P G T D R I I V K Y R A G S A A A G D R S A K L S T V Q S A L T R A S L A

241 GGCGTACCGCGCGCCAGTACGCTGGCCCGCAGTGGTACGCGCGTGGCGTGGCGCGGATGTGATCCGCTGCAGGGCCGCTGGCACCGGCCGAACCTGCAGCGCGTGTGAAG
- 70 G G T A R A S T L G P Q V V R R L G V G A D V I R L Q G R L A P A E L Q R V L K

361 GAACTGAAGCCGACCCTCGGTGACGTACGCGAGGCGACGTGAAGTGCAGCGCGCAACTGCGCGCGGTGACGTGACGCTGCGCTGGCGCGAATGATCCGCTACTACCAGCAG
- 30 E L K A D P A V Q Y A E A D V K L R R S E L R A G D V Q P A L A P N D P Y Y Q Q

481 ACCAGTGGCACCTGCACAACGCCACCGCGGCATCAATGCACCGTCCGGTGGGACGTGTCGCGAGGTGAAGCGTGGTGGTGGCGGTACTCGATACCGGCATCTCTGCGCAGCATCCG
11 Y Q W H L H N A T G G I N A P S A W D V S Q E E G V V A L D T S I L P Q E P

601 GACCTGGTCCGCAACCTGCTGGAAGGCTACGACTTCATCAGTATGTCGAGAGCGTCCGCGGTGCCAACAGATCGCGTCCAGCGCGCAGGACTATGGTACTGGTGCAGAACGAC
51 D L V G N L L E G Y D F I S D A E T S R R A T N D R V P G A Q D Y G D W V E N D

721 AACGAGTGTACACCGGCTCCGTGCGCGAGGACAGCTCCTGGCACCGTACCCAGTGGCCGCGCCCGTGGCGAGCAGCAACAACCGCGTGGCATGGCCGGTGTGCGGCACAAGGCC
91 N E C Y T G S V A E E S S W E G T H V A G T V A E Q T N N G V G M A E V A H K

841 AAGTGTGCTGCCGTGCGCGTGTGCGCAAGTGGCTACCTTTCCGATATCGCGACGCCATCACCTGGGCTCCGGCGCACGGTGGCGGGCGTGGCCCAATGCCAACCCGGCC
131 K V L P V R V L G K C E G Y L S D A D A I T W A S G G T V A G V P A N A N P A

961 GAGTTCATCAACATGAGCTCGCGCGCAGCGCAGCTGCGACGGGACTACCAGGATGCGATCAACGGCGCGATCTCGCGGGCACCCAGTGGTGGTGGCGCGCAGGCAACGAGCCGAC
171 E V I N M S L G G S G S C D G T Y Q D A I N G A I S R E T T V V A A G N E T D

1081 AACGCTCAAGTACCGTCCGGCCAGTTCGACGGCGTGGTACCGTCCGGTGGCCACCCGATCACCGGGCGCATCACTATTACTCCAACCTACCGCAGCCGCGTGGACCTGTCCGGTCCG
211 N A S K Y R P A S C D G V V T V G A T R I T G G I T Y Y S N Y S S R V D L S S P

1201 GGGGTGGCGGCGAGCTCGATGGCAATCCCGCGGCTACGCTGGCAGTCCGGTTCGATGCGGGCACCCACCGCGGAGTGGGCGAGCTACAGCTACATGGGCATGGTGGCACGTCGATG
251 G G G G S V D G N P G G Y V W Q S G S D A A T T P E S G S Y S Y M G M G E T S M

1321 GCCTCGCCGACGTTGGCTGCCGTGCGGGCACTGGTGCAGAGCGCTGATCGCAAGGGCAAGGATCCGCTGGCCCGCGCGATGCGCAGCTGTGAAGGAAACCGCGTCCGTTCC
291 A S E H V A A V A A L V Q S A L I A K G K D P L A P A A M R T L L K E T A R P F

1441 CCGTTCAGCATCCGACCCGCACTCCGATCGGCACCGGCATCGTGCAGCCAAAGCGCGCTGGCCAAAGCACTGGAAGAGCCGTGCACCGAGAAGTCCGGCGCGGTGGCGACGCGCGTG
331 P V S I P T A T P I G T G I V D A K A A L A K A L E E P C T E N C G P V A T P L

1561 ACCAACAAGACCGCGTGGGGGGTGAACGGTACGGCCGCGCAGCAGCCGCTGTACAGCTTCGAGCAGCCGCGGAAAGCAGCTCAGCGTATCACCTACGGTGGCACCGGCAACGCTG
371 T N K T A N G T A N L G T A G S R L Y S F E A A A G K Q L S V I T Y G E T G N V

1681 TCGTCTACATCGCCAGGACGTGAGCCGAGCGCCAGCACAACGATGGCAAGTTCGACCCGCTCCCGCACGTCGAAACGGTACGGGTGAACAAGCGGTGGCAGGCACCTACTACATC
411 S V Y I A Q G R E P S A S D N D G K S T R P G T S E T V R V N K P V A G T Y Y I

1801 AAGTAGTGGCGAAGCGGCTACAACCGCGTGGATCCTCGCCACGAGTAA
451 K V V G E A A Y N G V S I L A T Q *

Abbildung 3.3 DNA-Sequenz des StmPr1-Gens (inklusive des 5'-flankierenden Bereiches) und abgeleitete Aminosäuresequenz. Die putative Shine-Dalgarno-Sequenz ist doppelt unterstrichen. Die beiden Sterne markieren die prognostizierte Schnittstelle für das Signalpeptid (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Das Stop-Codon ist durch einen schwarzen Stern dargestellt. Die vor der Sequenzierung des Gesamtgens bereits bekannten N-terminalen und internen Aminosäurereste sind unterstrichen. Die Nucleotidnummerierung beginnt bei dem putativen Start-Codon, während die Aminosäurenummerierung vom reifen Enzym ausgeht. Die Aminosäuren der katalytischen Triade Asp⁴², His¹⁰⁵ und Ser²⁸⁹ sind durch graue Kästen markiert. Die weißen Kästen stellen die Aminosäurereste der konservierten Regionen dar, die durch ein Alignment mit den Subtilisinen BPN' [32] und Proteinase K [35] ermittelt wurden. Zusätzlich wird der 5' flankierende Bereich vor dem StmPr1-Gen ohne Nummerierung gezeigt; typische Promotormotive konnten in diesem 593 bp großen Abschnitt nicht identifiziert werden (M. Reese, Neural Promotor Prediction, www.fruitfly.org/seq_tools/promotor.html).

Die damit nun vorliegende Sequenz der *St. maltophilia*-Protease umfasst 1854 bp und codiert für ein typisches Vorläuferprotein. Das Protein setzt sich aus einem Signalpeptid, Propeptid und dem reifen Enzym (s. Abb. 3.2) zusammen. Die putative Schnittstelle zwischen Signal- und Propeptid liegt laut Vorhersage zwischen Alanin⁻¹²⁴ und Alanin⁻¹²⁵, während die Subtilisin-typische katalytische Triade durch Alignments an den Positionen Aspartat⁴², Histidin¹⁰⁵ und Serin²⁸⁹ identifiziert werden konnte. Weitere konservierte Aminosäuren bestätigen die Einordnung der Protease in die Superfamilie der Subtilasen. Es ist allerdings bemerkenswert, dass die StmPr1-Protease ein höheres Molekulargewicht (47 kDa) als die klassischen Subtilasen (ca. 27 kDa) [16] besitzt. Dieser Molekulargewichtsunterschied wird durch eine Insertion zwischen den katalytisch aktiven Aminosäureresten Aspartat⁴² und Histidin¹⁰⁵ sowie durch eine C-terminale Extension verursacht; beide kommen bei den klassischen Subtilasen nicht vor. Die Sequenz der *St. maltophilia*-Protease wurde als StmPr1 in der EMBL Datenbank unter der Accession Nummer AJ291488 eingetragen.

Sequenzierung einer weiteren *St. maltophilia*-Protease

Die Produktion einer weiteren Serin-Protease durch *St. maltophilia* war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt; jedoch gab es Hinweise dafür. Ein Experiment, in welchem das *St. maltophilia*-Medium mit einem radioaktiv markierten Serin-Protease-spezifischen Inhibitor inkubiert wurde, weist darauf hin, dass neben der StmPr1-Protease eine weitere, weniger prominente Serin-Protease sezerniert wird (Einleitung Abb. 1.1). Es ist außerdem bekannt, dass die meisten Subtilase produzierenden Bakterien mehrere homologe Enzyme sezernieren [78].

Da trotz umfangreicher Versuche keine zweite proteolytisch aktive Fraktion aus Bakterien-Überständen isoliert werden konnte, wurde versucht, die Sequenz für eine zusätzliche Protease auf DNA-Ebene zu identifizieren. Hierfür wurde ein degenerierter sense-Primer (**DPYYQQQW**) und ein degenerierter antisense-Primer (**KVLPVRVL**) aus N-terminalen und internen Aminosäuren von StmPr1 in Kombination mit subtilisin-typischen konservierten Aminosäuren (vergl. Abb. 3.1) abgeleitet. Das Peptid für den sense-Primer wurde bewusst so gewählt, dass sich die C-terminale Aminosäure (W) von der des StmPr1-sense-Primers (Y) unterscheidet. Die Nukleotide am 3'-Ende der Primer wirken selektiv auf die zu amplifizierende DNA. Durch die o.g. Primer sollte forciert werden, dass eine Sequenz amplifiziert wird, die nicht mit StmPr1 identisch, zu dieser aber homolog ist. So ließ sich in einer PCR aus genomischer *St. maltophilia*-DNA ein 230 bp großes DNA-Fragment amplifizieren, welches diese Merkmale aufwies. Es war bisher in keiner Datenbank veröffentlicht.

Da man davon ausgehen konnte, dass auch eine zweite Protease als Vorläuferprotein synthetisiert wird, wurde hier ebenfalls in 5'-Richtung und 3'-Richtung sequenziert, bis ein Startcodon (ATG) in 5'-Richtung und ein Stop-Codon (TGA) in 3'-Richtung gefunden werden konnte. Das restliche Gen wurde nach der gleichen Methode wie für das StmPr1-Gen beschrieben sequenziert.

Die Identifikation des Start-Codons erwies sich diesmal als unproblematisch, weil vor dem ATG⁻¹³⁶ im möglichen Startbereich eine typische Shine-Dalgarno-Sequenz (AAGG) und im 3'-Bereich eine typische Signalpeptidsequenz lokalisiert ist. Auch hier wurde diese Annahme durch die heterologe Expression des Gens bestätigt. Nach Expression in *E. coli* erfolgte eine korrekte Prozessierung des Proteins zum reifen Enzym. Die spezifische Aktivität konnte nicht mit der des Wildtyp-Proteins verglichen werden, weil sich dieses, wie bereits erwähnt, nicht aus dem *St. maltophilia*-Medium isolieren ließ.

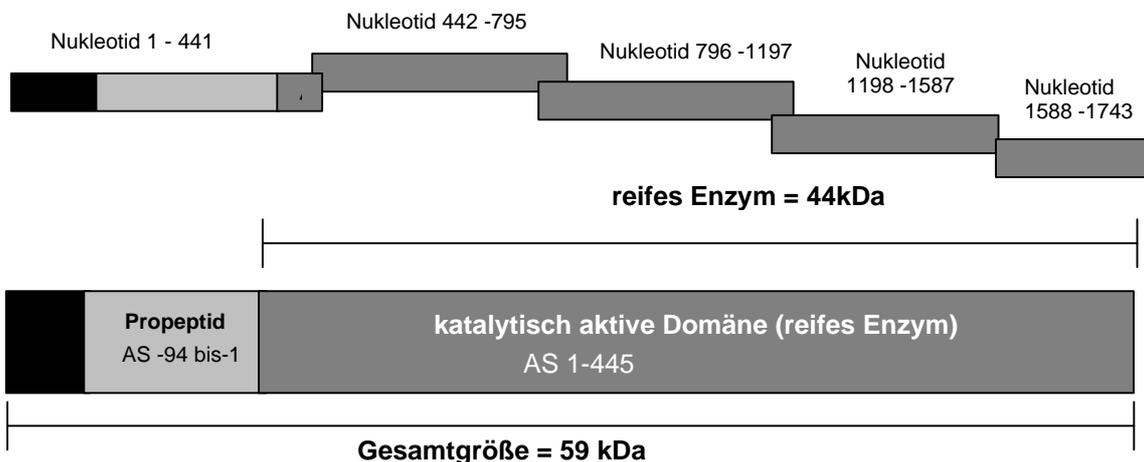


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Sequenzierung der zweiten *St. maltophilia*-Protease. Die unterschiedlichen Domänen der *St. maltophilia*-Protease sind in den Farben schwarz, hellgrau und dunkelgrau zu erkennen. Entsprechend dieser Farben sind die Amplifikate der PCR's dargestellt. Die Anzahl der neu sequenzierten Nukleotide des jeweiligen Amplifikates ist über den Balken dargestellt. In den Fällen, wo neu sequenzierte und bekannte DNA-Fragmente überlappen, sind die Balken ebenfalls überlappend aufgezeigt.

GCAAGCCAGCCAGGGTTCCGGCCGGTGGCT TCT GCC GAT TCC GGC ATT CAC ACC ACA AGA AA GG A AAT ACC

ATGTCCAGGTAACGCAACCGCGTGTGCGTCGAGTGTGGTGGTCTTGGTGGCTCCGTTGTGCATCGCTGTGCTGGCCACGCGCTGCGCTGGCCGGTGCAGTCCACTCAGCGGGCCTG
-136 M S Q V T Q P R V R R V W V V L G A S V L S S L L L A T P A L**A G D V H S A G L

121 CAGTCCGCGCCGACGACCCAGCGCTTCATCGTGAAGTACCGCGAGGTAGTGCAGCGGTGGCCAAACACCACCGCACTGGCCTCTTCGCTGAAGAGTGCAGCCGCGGCTGGCCAGCAGC
-96 Q S A P T H Q R F I V K Y R D G S A P V A N T T A L A S S L K S A A A G L A S S

241 CAGGGCCGCGCTGGGCCTGCAGGAGTCCGCAAGTGGCCGACCCCTGGTCCAGGACCGATCGCCGCTTGACCGGCGAATCCGAGCTGTGATGCGCAAGCTCGCCGCC
-56 Q G R A L G L Q E V R K L A V G P T L V R T D R P L D Q A E S E L L M R K L A A

361 GACCCGAACGTGGAATACGTCGAAGTCGACCCAGATCATCGTGCAGCGTACCCCGAATGACCCCGCTTGAGCGAACAGTGGGGCTTCGGTACTCCAACCGCTCGATCAACGTGCGG
-16 D P N V E Y V E V D Q I M R A T L T P N D T R L S E Q W G F G T S N A S I N V R

481 CCGGCCTGGGACAAGGCCACCGCCAGCGTGGTGGCCGTGATCGATACCGGCATCACCACCATCCCGATCTCAACGCCAACATCCTGCCTGGCTATGACTTCATCAGCGATGCC
25 P A W D K A T E T G V V M A M I D T G I T N E P D L N A N I L P G Y D F I S D A

601 GCGATGGCGCGATGGCCGGCCGCGACAACAACCGAATGACGAGGGCGACTGGTACGCGCCCAACAGTGCAGCTCGGGCATCCCGGCTCCAATCCAGTGGCACGATACCCAC
64 A M A R D G G G R D N N P N D E G D W Y G A N E C G S G I P A S N S S W E S T H

721 GTGCGCGCACCGTGGCGCGGTGACCAACAACAGCACCGCGCTGGCCGCTACTGCGTTCAATGCCAAGTTCGCTCCCGTGGCGTGTGGGCAAGTGCAGCGGTTACACCTCCGACATC
104 V A G T V A A V T N N S T S V A G T A F N A K V V P V R V I G K C G G Y T S D I

841 GCCAGCGATCGTGTGGCCCTCTGCGCGCACCGTCAAGTGGCGTCCGCGCAACCGCAATCCGCGCAAGTTCATCAACATGTCGCTGGGTGGTGGCGCAGCTGTCCACCACTACCCAG
144 A D A I V W A S G G T V S G V P A N A N P A E M I N M S L G S G G S C S T T Y Q

961 AACCCATCAACGCGCGTCAAGCGTGGCACCACCGTGGTGGTCCGCGCGCAACAGCAACCAACATGTCCTCGTGGTCCGCGCAACTGCCGCAACCTGATTGCCGTGGCGCC
184 N A I N G A V S R E T T V V A A G N S N T N V S S S V P A N C P N V I A V A A

1081 ACAACCTCGCGCGTGCAGCTGCTCCCAACTACGGCACCGGCATCGACATCTGGCACCGCGCCAGAGCATCCTGTCCACGCTCAACACCGCCACCAACCGCGCGCAGCGCC
224 T T S A G A R A S F S N Y G T G I D I S A P G Q S I L S T L N T G T T T P G S A

1201 AGTACCGCTGTACAACCGCACCTCGATGGCGCGCCGACAGTGGCGCGCTGGTGGCGTGTGACGAGTCCGCTCGCGCCAAAGCCCGCTGAGCCGCGCAGCTCGAGAGCATCATCAAG
264 S Y A S Y N S T S M A A P H V A G V V A L M Q S V A P S P L S P A Q V E S I I K

1321 AGCACTGCACGCGCGTGCAGCGCGCTGCTCGGGTGGCTGCGCGCGCGCATCGTGCAGCGCAACCGCGCGTGGCTGCGCGATCAACCGCGTGGCAACCCGCGGTGGCAAC
304 S T A R P A T P G A C S G G C G A A N A V A A A I N G G G N P N L G A N

1441 GTGCTGCAAAACAGTGCAGCGTGCAGCGCGTGGCGCTGCAACCGTGGCGAGCTGAACATACCGTCCGCTCCGCTGAGCGGCAACAGCGAGACCTGCACGATCAACAGCCCTGCGCGCGCACG
344 V L Q N N V P V T G L G A A T G A E L N Y T V A V P A G S S Q L R V T I S G G S

1561 GCGATGCCGACCTGTACGTGCCAGGGCAGTGCACCGACCGATACCGTACCGTCCGCTGAGCGGCAACAGCGAGACCTGCACGATCAACAGCCCTGCGCGCGCACG
384 G D A D L Y V R Q G S A P T D T S Y T C R P Y L S G N S E T C T I N S P A A G T

1681 TGGTATGTCGGGTGAAGCGTACAGCACCTTCTCGGGCTGACCCCTCAACGCCAGTACTGA 1743
424 W Y V R V K A Y S T F S G L T L N A Q Y *

Abbildung 3.5 DNA-Sequenz des StmPr2-Gens und die abgeleitete Aminosäuresequenz. Die putative Shine-Dalgarno-Sequenz ist doppelt unterstrichen. Die beiden Sterne markieren die prognostizierte Schnittstelle für das Signalpeptid. Das Stop-Codon ist durch einen schwarzen Stern dargestellt. Die Aminosäurereste, welche als Vorlage für die Herstellung der degenerierten Primer dienen, sind unterstrichen. Die Nucleotidnummerierung beginnt bei dem putativen Start-Codon, während die Aminosäurenummerierung vom reifen Enzym ausgeht. Die grauen Kästen stellen die Aminosäuren der katalytischen Triade Asp⁴², His¹⁰¹ und Ser²⁷³ dar und die weißen die konservierten Regionen, welche durch ein Alignment mit den Subtilisinen BPN' [32] und Proteinase K [35] ermittelt wurden.

Die Sequenz der zweiten *St. maltophilia*-Protease weist eine Größe von 1743 bp auf und codiert ebenfalls für ein Subtilisin-typisches Vorläuferprotein, mit einer putativen Schnittstelle für das Signalpeptid zwischen Leucin⁻¹⁰⁶ und Alanin⁻¹⁰⁵. Hier bilden die Aminosäuren Aspartat⁴², Histidin¹⁰¹ und Serin²⁷³ die katalytische Triade. Diese Protease besitzt Subtilisin-typische Sequenzen und eine C-terminale Extension. Damit zählt sie ebenso wie die StmPr1-Protease zu den großen Subtilasen. Das neue *St. maltophilia*-Gen wurde als StmPr2 bezeichnet und in der EMBL-Datenbank unter Bankit 497347 (vorläufige Nummer) eingetragen.

Nachweis der Expression und Sekretion von StmPr2 durch *St. maltophilia*

Nachdem das StmPr2-Gen auf genomischer Ebene identifiziert war, stellte sich die Frage nach seiner Expression in den *St. maltophilia*-Kulturen. Wie bereits erwähnt, ließ sich aus dem Medium dieser Bakterien keine dem Gen entsprechende Protease reinigen. Zunächst wurde durch RT-PCR überprüft, ob eine Transkription des StmPr2-Gens erfolgt. Die in dieser PCR eingesetzten Primer waren aus Bereichen des StmPr2-Gens konstruiert, die wenig Homologie zu StmPr1 aufwiesen. So wurde die Amplifikation des letzteren Gens ausgeschlossen.

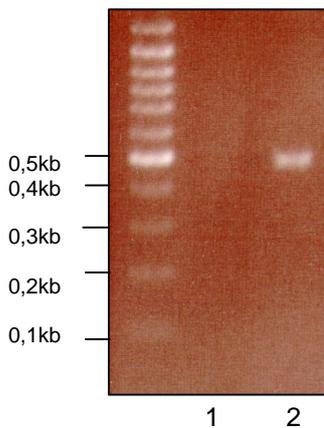


Abbildung 3.6 RNA Nachweis der StmPr2-mRNA per RT PCR. Spur 1, zur Kontrolle wurde die RNA-Lösung mit RNase verdaut und als Matrice in der RT-PCR eingesetzt. Spur 2, als Primer dienten StmPr2-spezifischen Primer (StmPr2/A/RT, s. Material & Methoden) und *St. maltophilia*-RNA als Matrice. 20% des PCR-Ansatzes wurden in einem 1%-igen Agarose/Ethidiumbromid-Gel getrennt.

Die in der RT-PCR erhaltene Bande (Abbildung 3.6) entsprach der erwarteten Größe des Amplifikates von 494 bp, und die Sequenzierung der DNA belegte, dass es sich um ein Fragment des StmPr2-Gens handelte. Das Ausbleiben von DNA-Synthese in einem Kontrollansatz mit RNase-verdauter RNA zeigte, dass die erhaltene DNA tatsächlich aus RNA amplifiziert wurde.

Nach dieser Demonstration der Transkription des StmPr2-Gens, wurde nochmals versucht das Protein im Kulturüberstand zu identifizieren. Nun wurde das 38 kDa-große Protein N-terminal sequenziert, welches neben der StmPr1-Protease durch den spezifischen Inhibitor im Autoradiogramm (vergl. Einleitung Abb. 1.1) markiert wird.

Es zeigte sich, dass diese Sequenz (**LTPNDTRL**) tatsächlich mit dem N-Terminus der reifen StmPr2-Protease identisch ist. Offenbar wird also eine zweite Protease von den *St. maltophilia*-Bakterien sezerniert.

Es sollte nun die Funktion dieser Protease im Vergleich zur StmPr1-Protease aufgeklärt werden. Da sich die StmPr2-Protease nicht reinigen ließ, war es für die Proteincharakterisierung notwendig, diese rekombinant herzustellen.

Heterologe Expression von StmPr1 und StmPr2 in *E. coli*

Eine biochemisch charakterisierte, aus *St. maltophilia*-Überständen gereinigte StmPr1-Protease lag, wie bereits erwähnt, schon vor. Da bei dieser Hauptprotease aber über die biochemische Charakterisierung hinaus Kristallisationsversuche durchgeführt werden sollten, war es geplant, auch diese Protease rekombinant herzustellen.

Folglich galt es nun, für beide *St. maltophilia*-Proteasen heterologe Expressionssysteme zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurde ein Vektor gewählt, der das reine Zielgen ohne anhängendes Peptid bzw. tag exprimiert. Es sollte jede Manipulation der heterolog exprimierten Proteasen vermieden werden, um dem Wildtyp entsprechende Enzyme zu erhalten.

Für die Proteinexpression wurde derselbe Vektor (pet 17 b der Firma Novagen) für (fast) alle im Folgenden beschriebenen Konstrukte gewählt. Das Zielgen steht unter Kontrolle des T7-Promotors und wird durch IPTG induziert. Als Selektionsmarker dient Ampicillin.

Die in den Vektor pet 17b zu ligierenden DNA-Fragmente wurden durch PCR amplifiziert; dabei war der sense-Primer mit einer Restriktionsschnittstelle für *NdeI* versehen und der antisense Primer mit einer Restriktionsschnittstelle für *XhoI*. Es erfolgte ein Doppelverdau des DNA-Fragments und des Vektors (mit *NdeI* und *XhoI*) sowie nach Ligation eine Transformation in den *E. coli* Stamm XL1 blue. Zur Sequenzierung der Plasmide mußten diese isoliert und, nachdem die Sequenz überprüft war, in den Expressions-*E. coli*-Stamm BL 21 (DE3) oder JM 109 (DE3) transformiert werden.

Heterologe Expression von StmPr1 in *E. coli*

Wie bereits beschrieben, wird die StmPr1-Protease nativ als Vorläuferprotein, bestehend aus Signalpeptid, Propeptid und dem Enzym produziert, welches erst zum aktiven Enzym prozessiert werden muß. Diesem Sachverhalt musste bei der Expression des Proteins in *E. coli* Rechnung getragen werden. Hierzu wurden die folgenden Methoden getestet:

Expression der reifen StmPr1-Protease. Zunächst wurde die Möglichkeit getestet, durch die Expression der reifen Protease (ohne Prä-Pro-Peptid) aktives Enzym zu produzieren. Dabei konnte nach Induktion der *E. coli*-Bakterien die Produktion eines entsprechenden Proteins durch einen bereits vorhandenen Anti-StmPr1-Antikörper nachgewiesen werden (Abb.3.7).

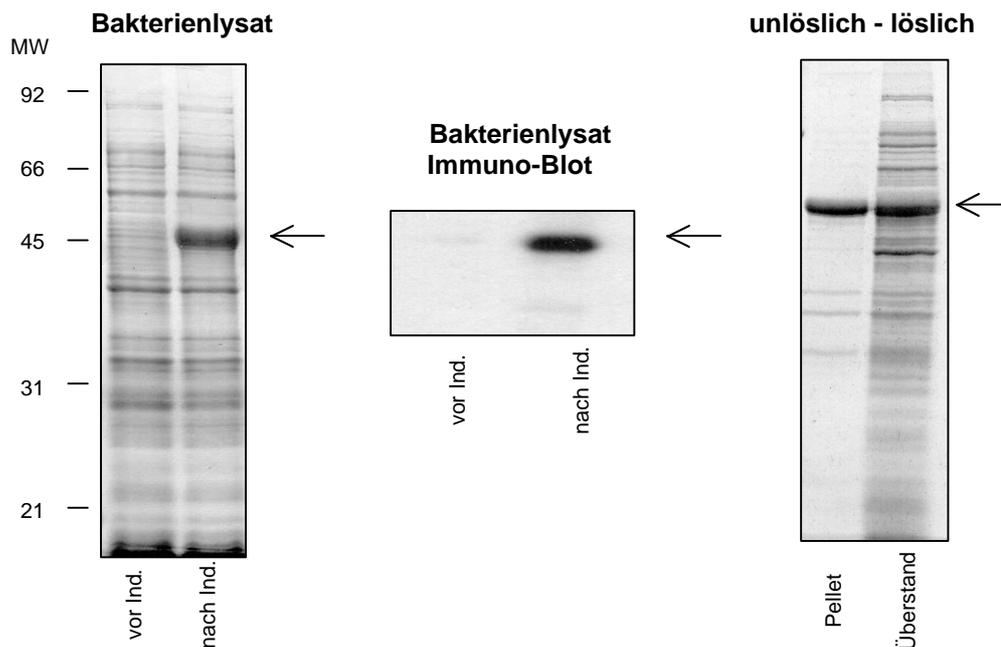


Abbildung 3.7 Expression der reifen StmPr1-Protease in *E. coli* BL 21 (DE3). Pfeil = Protease; MW = Molekulargewicht; Die Bakterien BL 21 (DE3) wurden in LB-Medium für 2 h bei 37 °C mit 0,5 mM IPTG induziert. Es erfolgte eine SDS-Gel (12%)- und Immuno-Blot-Analyse vom Bakterienlysat sowie eine SDS-Gel (12%)-Analyse von löslichen und unlöslichen bakteriellen Proteinen nach Sonifikation. Für die SDS-Gelanalyse wurden 20 µg Protein eingesetzt, für die Immuno-Blot-Analyse 7 µg. Sofern nicht anders beschrieben, gilt dies auch für alle nachfolgend gezeigten SDS-Gele.

Durch nachfolgende Enzymtests ließ sich allerdings keine Proteaseaktivität in der löslichen Fraktion nachweisen, welche etwa die Hälfte des induzierten Proteins ausmachte. Dies zeigt, dass die Expression des Genabschnitts 451-1854 vermutlich nicht zur korrekten Faltung der reifen Protease führt. Auch durch die Expression dieses Genabschnitts in anderen Vektoren (pet 17b, IBA 6) ließ sich keine aktive Protease gewinnen.

Expression der Pro-Form von StmPr1 in *E. coli*. Nachdem dieser Expressionsversuch nicht erfolgreich war, wurde das Prä-Enzym in *E. coli* exprimiert, da möglicherweise die Protease-Domäne nur im Verbund mit ihrem Pro-Peptid die richtige Konformation erlangt. Es gibt Hinweise in der Literatur, nach denen sich mit dieser Expressionsstrategie bakterielle Proteasen erfolgreich exprimieren lassen [79,80].

Zunächst wurde eine Expression des Pro-Enzyms ohne Signalpeptid angestrebt, um eine Akkumulation des rekombinanten Proteins im Cytoplasma zu erreichen. Es ist beschrieben, dass dies zu höheren Proteinausbeuten führen kann als durch eine Sekretion des Proteins ins Periplasma [74]. Ausgehend von der zuvor begründeten Genstruktur wurde der Bereich von Aminosäure Alanin⁻¹²⁵ bis zum C-Terminus in *E. coli* exprimiert (Abb. 3.8).

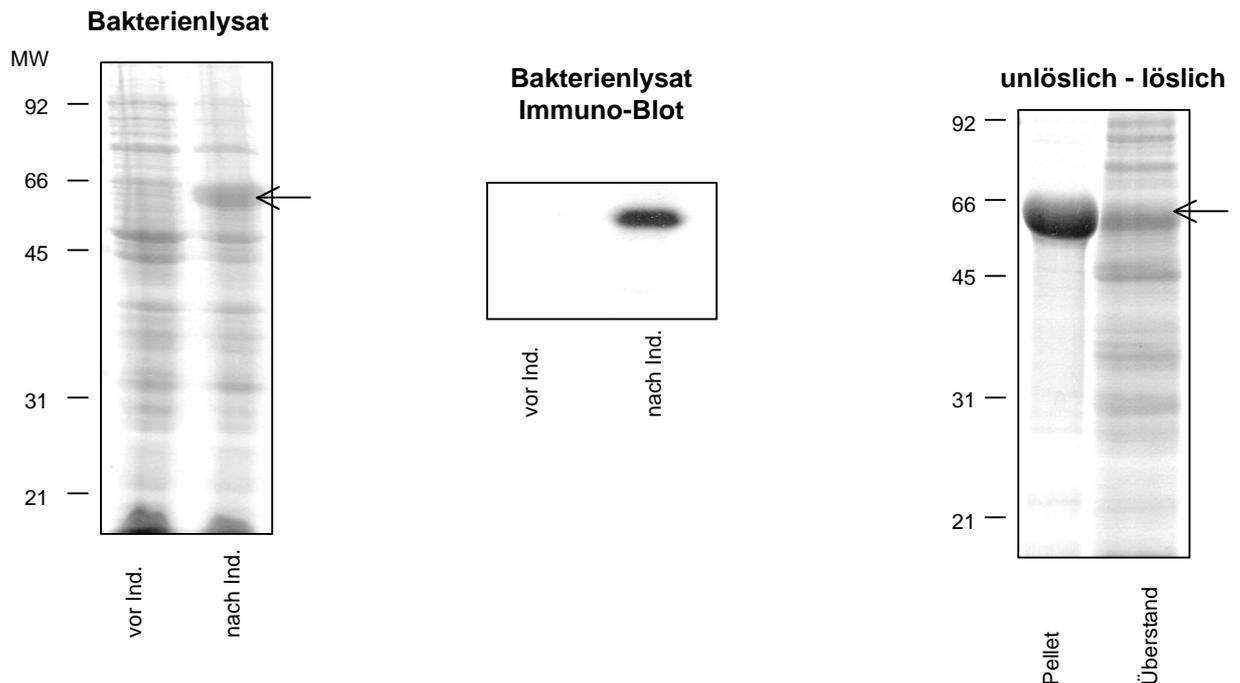


Abbildung 3.8 Expression der Pro-Form von StmPr1 in *E. coli* BL 21 (DE3) Pfeil = StmPr1; Die *E. coli* Bakterien BL 21 (DE3) wurden in LB-Medium für 2 h bei 37 °C mit 0,5 mM IPTG induziert. Es erfolgte eine SDS-Gel (12%)- und Immuno-Blot-Analyse vom Bakterienlysat sowie eine SDS-Gel (12%)-Analyse von löslichen und unlöslichen bakteriellen Proteinen nach Sonifikation.

Das Gesamtlysat der induzierten *E. coli*-Bakterien zeigt im SDS-Gel eine starke Bande bei 66 kDa. Dieser Wert entspricht nicht genau der errechneten Größe des Pro-Enzyms von 61 kDa, aber die Markierung durch den StmPr1-Antikörper spricht dafür, dass es sich um das gesuchte Genprodukt handelt. Auch bei diesem Experiment konnte jedoch weder in der unlöslichen Fraktion, die den Hauptanteil des Proteins ausmachte, noch in der löslichen Fraktion Protease-Aktivität detektiert werden. Dies gelang auch nicht nach zahlreichen Renaturierungsversuchen (s. Material & Methoden). Offenbar fand keine Prozessierung zu einer reifen Protease statt.

Expression des StmPr1-Gesamtgens in *E. coli*. Möglicherweise geht der Prozessierung des Vorläuferproteins eine vom Signalpeptid abhängige Translokation durch die Membran voraus. Deshalb wurde die gesamte StmPr1-Sequenz von Methionin¹⁵⁰ bis zum C-Terminus exprimiert. Nach Induktion (Abbildung 3.9) findet sich erwartungsgemäß im Cytoplasma der induzierten *E. coli*-Bakterien eine 66 kDa-Bande, entsprechend der Größe des Vorläuferproteins. Im Kulturmedium erscheint nur bei den induzierten Bakterien eine 55 kDa-Bande, die von dem StmPr1-Antikörper eindeutig markiert wird. Diese könnte die prozessierte Protease darstellen, wenn auch die Größe von dem errechneten Molekulargewicht (= 47 kDa) abweicht.

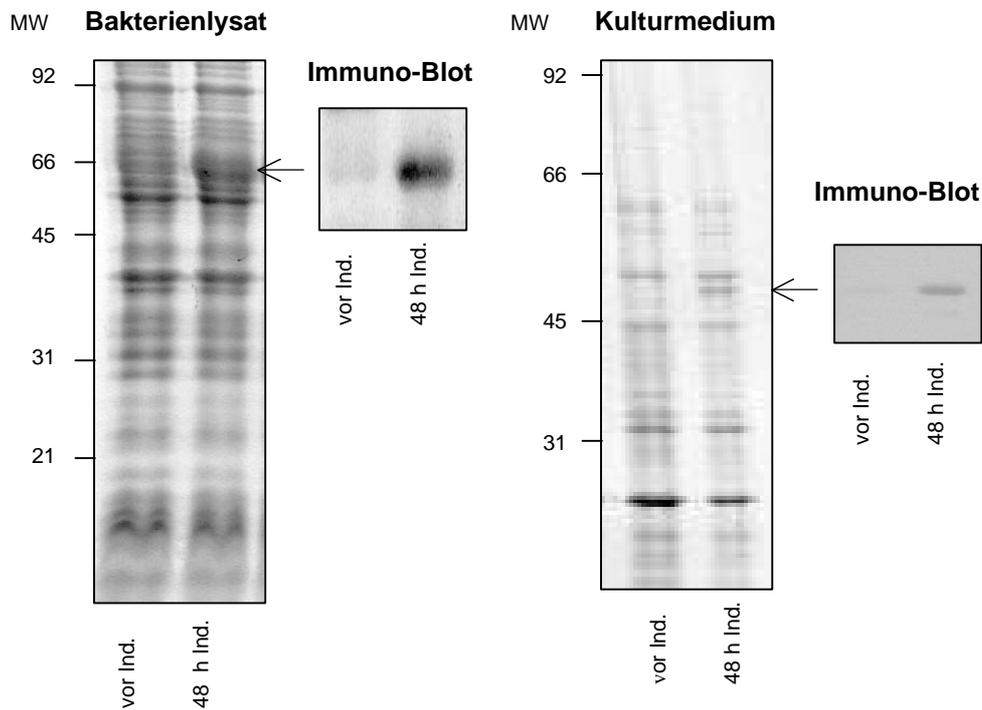


Abbildung 3.9 Expression des StmPr1-Gesamtgens in *E. coli* BL 21 (DE3). Pfeil = StmPr1; Die Bakterien BL 21 (DE3) wurden in M9 Medium für 48 h bei RT mit 0,05 mM IPTG induziert. Anteile des Gesamtlysats der Bakterien sowie 10 μ l des Mediums wurden durch ein 12%-iges SDS-Gel und durch Immuno-Blot analysiert.

Wenn unter diesen Bedingungen also offenbar die Prozessierung des Vorläuferproteins erfolgt, sollte das dabei entstehende Protein Proteaseaktivität aufweisen. Tatsächlich konnte nun solche Aktivität im Medium der induzierten Bakterien nachgewiesen werden.

Mit dem Ziel, die Bedingungen für die stärkste Protease-Akkumulation im Medium zu ermitteln, wurden die *E. coli*-Bakterien mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Protease-Aktivität bestimmt.

Akkumulation der StmPr1-Protease im Medium nach Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen

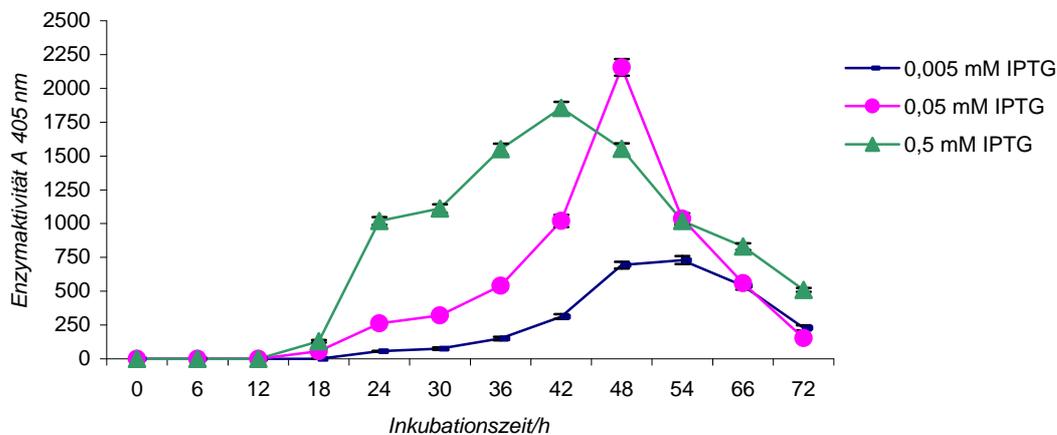


Abbildung 3.10 Enzymaktivität der StmPr1-Protease nach Induktion von *E. coli* BL 21(DE3)

E. coli-Bakterien BL 21 (DE3) wurden bei RT mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen induziert und die Enzymaktivität im Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch den Serin-Protease-Assay (Material & Methoden) bestimmt. Hierzu wurden 5 µl Medium eingesetzt. Die Enzymaktivitätswerte ergaben sich aus dem Mittelwert von drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Streuung um den Mittelwert ist als Standardabweichung dargestellt; geringe Standardabweichungen werden von der Symbolgröße überdeckt.

Im Medium ist erst nach 18 Stunden schwache proteolytische Aktivität zu messen (Abb. 3.10), wobei die stärkste Aktivität zwischen 42 Stunden und 48 Stunden zu verzeichnen ist. Zwischen den mit verschiedenen IPTG Konzentrationen induzierten Bakterien gibt es Unterschiede in der proteolytischen Aktivität. Sie ist am höchsten, wenn mit einer IPTG Konzentration von 0,05 mM für 48 Stunden induziert wird.

Unter Annahme von vergleichbaren spezifischen Enzymaktivitäten der nativen und rekombinanten Protease konnte anhand der Aktivitätsbestimmung eine Abschätzung der durch die Proteinexpression erzielten Proteinmenge vorgenommen werden: Die im Periplasma akkumulierte Proteinmenge war relativ gering und ließ sich auf ca. 2mg/L abschätzen. Im Medium konnten dagegen ca. 25 mg aktive Protease pro Liter Kultur-Medium angenommen werden. Damit war die Voraussetzung für die Reinigung größerer Mengen rekombinanten Proteins gegeben.

Reinigung der rekombinanten StmPr1-Protease

Die aktive Protease sollte aus dem Medium und dem Periplasmaextrakt von Bakterien gereinigt werden, die mit 0,05 mM IPTG für 48 Stunden induziert waren. Die Reinigung erfolgte in zwei Schritten durch Größenausschlusschromatographie (SEC) und Anionenaustauschchromatographie (IEC).

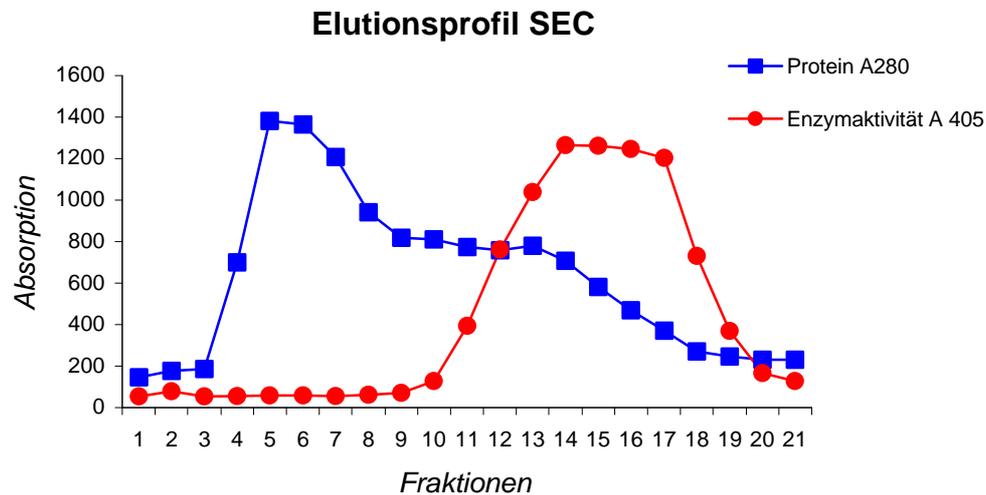


Abbildung 3.11 Reinigung der StmPr1-Protease durch SEC. 2 ml konzentrierte Proteinlösung wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule gepumpt und mit 100 ml TBS von der Säule eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 2,5 ml. Dargestellt ist die Absorption [A 280nm] nach Elution sowie die Enzymaktivität [A 405 nm] der einzelnen Fraktionen. Die Chromatographie wurde bei 4 °C durchgeführt.

Die proteolytisch aktiven Fraktionen der SEC (Abb. 3.11, Fraktionen 12-19) wurden vereinigt und weiter über eine Anionenaustauscher-Säule gereinigt.

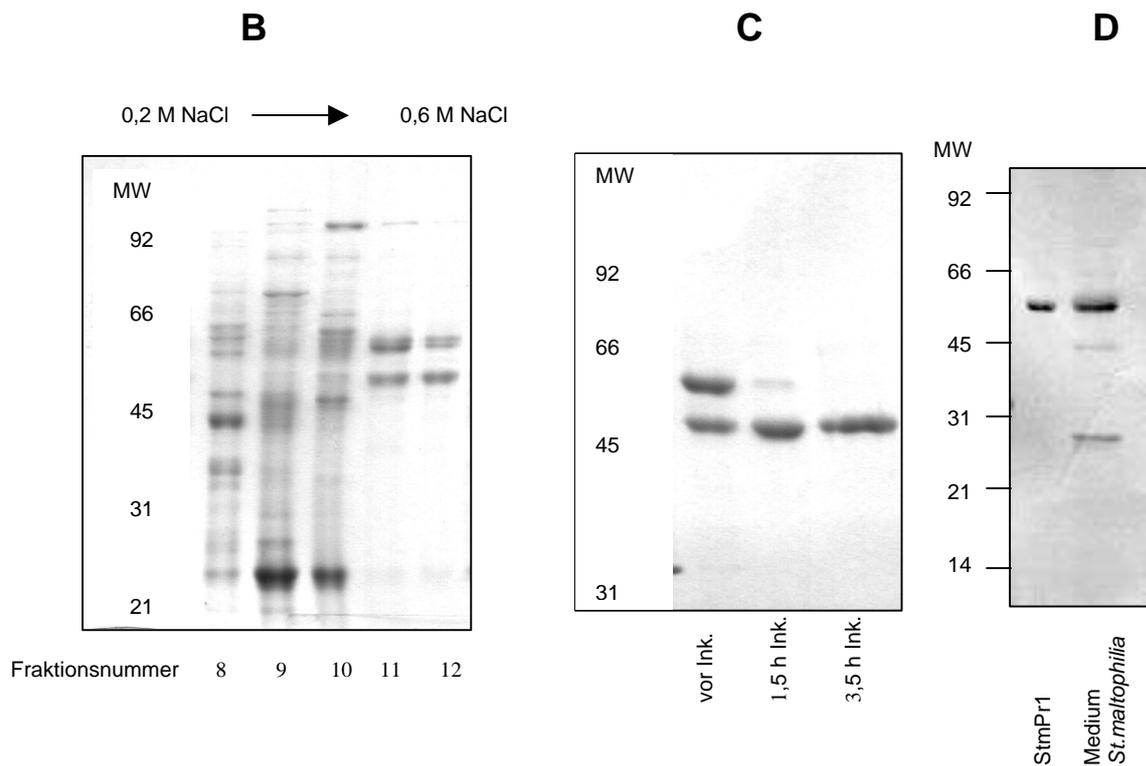
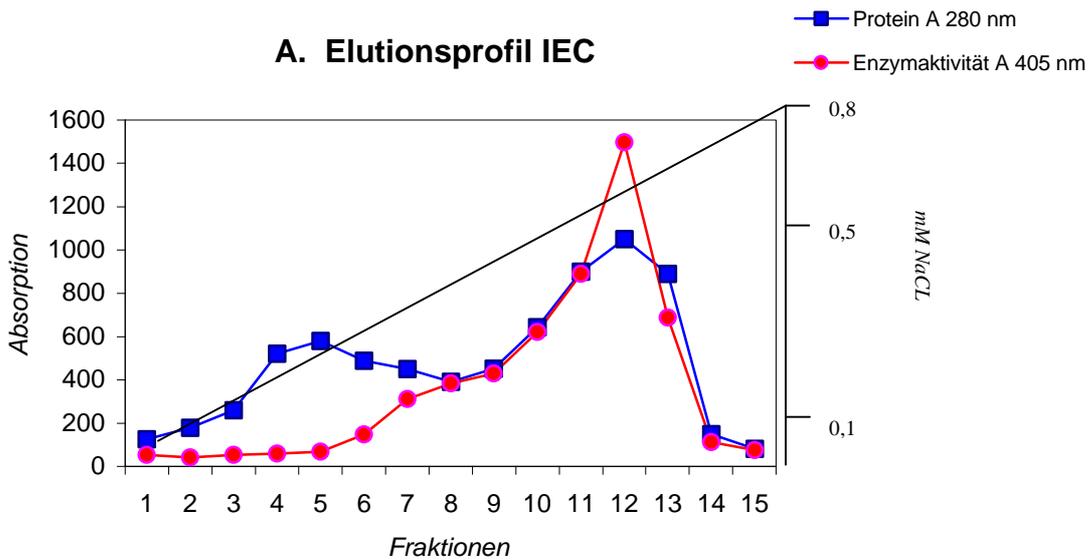


Abbildung 3.12 Reinigung des SEC-Eluates durch IEC. (A) Die Proteinprobe wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule gepumpt. Die Elution erfolgte durch folgenden NaCl Gradienten: Puffer B von 0 auf 100% in 30 min. Puffer A = 20 mM Tris-HCl pH 7,5; Puffer B = 20 mM Tris-HCl /0,8 M NaCl pH 7,5. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml. **(B)** Ca. 5 µg Protein der Fraktionen 7-12 wurden nach der DEAE Chromatographie auf einem 12%-igen SDS-Gel getrennt. **(C)** Die von der DEAE-Matrix eluierten Fraktionen 11 und 12 wurden 1:1 mit PBS verdünnt und bei 37 °C und 150 rpm für 0; 1,5 bzw. 3 Stunden inkubiert. Aliquots davon (Proteingehalt ca. 5 µg) wurden auf einem 10%-igen SDS-Gel getrennt. **(D)** 1ml *St. maltophilia*-Kultur-Medium wurde mit 10% TCE gefällt und zusammen mit 4 µg der rekombinanten, gereinigten StmPr1-Protease auf einem 13%-igen SDS-Gel getrennt.

Die rekombinante StmPr1-Protease eluiert im Salzgradienten (Abb. 3. 12 A) bei einer relativen hohen Salzkonzentration (400 mM), so dass die Ionenaustauschchromatographie einen sehr effektiven Reinigungsschritt darstellt. Die Fraktionen 11 und 12 sind vergleichsweise sauber (Abb. 3.12 B), zeigen allerdings im SDS-Gel zwei Banden. Die N-terminale Sequenzierung dieser Banden brachte jedoch identische Sequenzen. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass der Abbau von der 55 kDa- zur 47 kDa-Bande (Abb. 3.12 C) durch C-terminale Trunkierung der StmPr1-Protease geschieht. Nachdem eine Präparation des 55 kDa-Proteins vollständig zur 47 kDa-Form abgebaut und durch Dialyse von abgespaltenen Peptiden befreit worden war, entsprach das Produkt der StmPr1-Protease, wie sie im Medium von *St. maltophilia* erscheint (Abb. 3.12 D).

Die **Proteinbestimmung** der StmPr1-Protease erfolgte durch die Biuret-Reaktion (s. Material & Methoden). Auf dieser Basis ließ sich eine Ausbeute von etwa 10 mg gereinigter Protease pro Liter Expressionsmedium ermitteln. Enzymaktivitätsbestimmungen von Ausgangs- und Endprodukten ergaben Ausbeuten von ca. 40% StmPr1-Protease. Durch umfangreiche vergleichende Tests konnte gezeigt werden, dass die spezifischen Enzymaktivitäten der rekombinanten reinen StmPr1-Protease und die des nativen reinen Enzyms identisch sind.

Prozessierung der StmPr1-Protease

Bei der Reinigung der rekombinanten StmPr1-Protease hatte sich gezeigt, dass nach der Prozessierung des Vorläuferproteins zur aktiven Protease offenbar eine weitere Abbau erfolgt. Deshalb sollten die unterschiedlichen molekularen Formen der Protease im Prozess der Reifung näher untersucht werden.

Zunächst wurde die Prozessierung der Protease durch Immuno-Blot visualisiert.

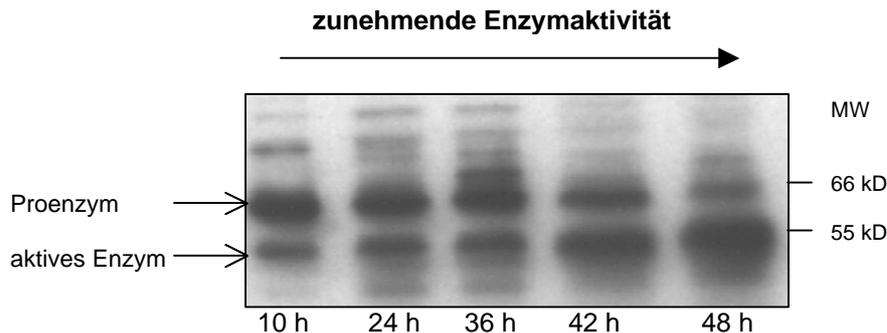


Abbildung 3.13 Prozessierung der StmPr1-Protease

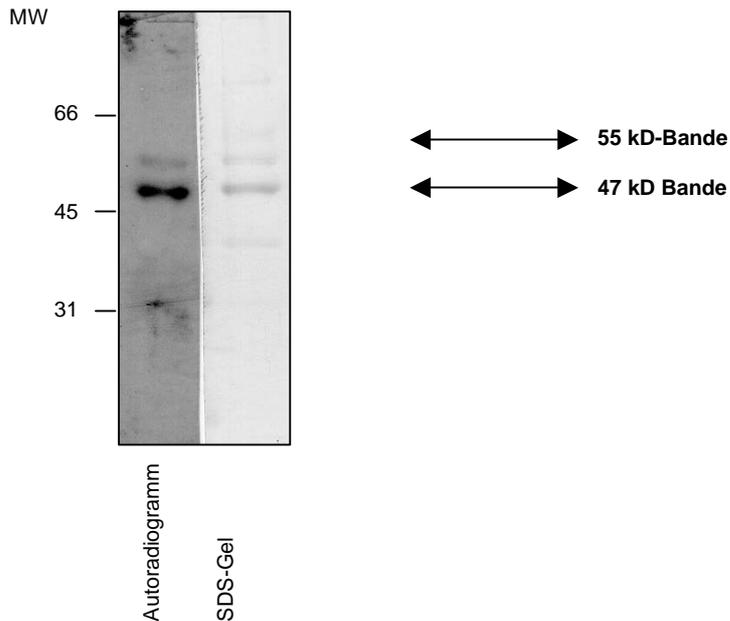
E. coli-Bakterien BL 21(DE3) wurden in M9-Medium bei RT inkubiert und mit 0,05 mM IPTG induziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommene Proben des Mediums (10 μ l) wurden auf einem 12%-igen SDS-Gel getrennt und anschließend im Immuno-Blot durch den Anti-StmPr1-Antikörper analysiert.

Im Immuno-Blot (Abb. 3.13) ist als Hauptprodukt nach 10 Stunden eine 66 kD-Bande zu sehen, welche der Pro-Form der StmPr1-Protease entsprechen könnte. Zu diesem Zeitpunkt ist im Medium noch keine proteolytische Aktivität festzustellen. Nach 48 Stunden stellt dann ein 55 kD großes Produkt die vorherrschende Komponente dar. Die Akkumulation dieser Bande korreliert mit der Zunahme der proteolytischen Aktivität im Medium (s. Abb. 3.10). Da nach 48 Stunden Induktion noch kein 47 kDa-Protein zu detektieren ist, scheint die 55 kDa-Bande der aktiven Protease zugeordnet zu sein.

55 kDa- und 47 kDa-Form der StmPr1-Protease

Durch Immuno-Blotanalyse (Abb. 3.13) konnte gezeigt werden, dass die reife aktive Protease zunächst als 55 kDa Protein im SDS-Gel erscheint. Erst im Verlauf der Reinigung entstand aus dieser Form ein 47 kDa großes Protein. Es wurde dann geprüft, ob beide Formen der reifen Protease die gleiche Enzymaktivität aufweisen. Dazu erfolgte eine Zymogramm- und eine Autoradiogramm-Analyse.

A. Autoradiogramm SDS-Gel



B. Zymogramm



Abbildung 3.14 Nachweis der proteolytischen Aktivität der 55 kD Bande und der 47 kD Bande der StmPr1-Protease. Darstellung (A) zeigt dieselbe Probe (Verhältnis 55 kD-Bande zur 47 kD-Bande ca 1:5) der StmPr1-Protease (400 ng) durch ein 12%-iges Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtes SDS-Gel sowie durch ein Autoradiogramm (s. Material & Methoden,) analysiert. Darstellung (B) zeigt ein Zymogramm (s. Material & Methoden). Hier wurde 100 ng aktive StmPr1-Protease eingesetzt. In dieser Probe waren die Mengen der 47 kDa- und der 55 kDa-Form der reifen StmPr1-Protease identisch.

Abbildung 3.14 zeigt, dass sowohl im Zymogramm als auch im Autoradiogramm die 55 kDa- und die 47 kDa-Bande der reifen StmPr1-Protease gleich stark markiert werden, während die im SDS-Gel schwach zu erkennende StmPr1-Abbau-Bande (bei 36 kDa) nicht markiert wird (Abb. 3.14 A).

Es war nun zu zeigen, ob es sich bei der Umformung um eine C-terminale Trunkierung oder nur um eine Konformationsänderung der 55 kDa-Form handelt. Um diese Frage zu klären, wurde der Effekt einer Enzymaktivitätshemmung durch PMSF während der Umformung getestet (Abb. 3.15).

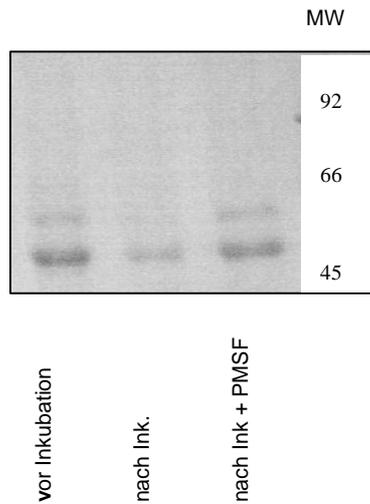


Abbildung 3.15 Inkubationsansatz StmPr1-Protease mit und ohne PMSF. Die gereinigte Protease wurde mit PMSF, einem potenten Serin-Proteaseinhibitor, gehemmt und für 3, 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das gleiche erfolgte mit der nicht inhibierten Protease. Auf einem 12%-igen SDS-Gel wurden 3 μ g der inhibierten und aktiven Protease getrennt.

Abbildung 3.15 zeigt, dass ein Abbau vom 55 kDa- zum 47 kDa-Protein nur erfolgt, wenn die Protease nicht inhibiert wurde. Diese Beobachtung spricht für einen C-terminalen Abbau der StmPr1-Protease, verursacht durch Autokatalyse. Zur Bestimmung der Schnittstelle am C-Terminus wurde das 47 kDa-Protein C-terminal sequenziert. Die Schnittstelle müsste demnach zwischen den Aminosäuren Lysin⁴⁵² und Valin⁴⁵³ liegen.

1751	TCC	GAA	ACG	GTA	CGG	GTG	AAC	AAG	CCG	GTG	GCA	GGC	ACC	TAC	TAC
435	S	E	T	V	R	V	N	K	P	V	A	G	T	Y	Y
1796	ATC	AAG	GTA	GTG	GGC	GAA	GCG	GCC	TAC	AAC	GGC	GTG	AGC	ATC	CTC
450	I	K	↑ V	V	G	E	A	A	Y	N	G	V	S	I	L
1841	GCC	ACG	CAG	TAA	GCC	TGA	CGT	GTC							
465	A	T	Q	*											

Abbildung 3.16 C-Terminus der StmPr1-Protease-Sequenz mit putativer C-terminaler Schnittstelle (durch einen Pfeil markiert).

Die Aminosäuren Lysin⁴⁵² und Valin⁴⁵³ traten zwar bei der Sequenzierung des C-Terminus am häufigsten auf (Abb. 3.16), es wurden aber auch eine Reihe anderer Aminosäuren detektiert. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass eine heterogene Trunkierung am C-Terminus erfolgt.

Kristallisationsversuche mit der rekombinanten gereinigten Stm1-Protease

Durch die erfolgreiche rekombinante Herstellung einer dem nativen Enzym entsprechenden reinen StmPr1-Protease standen nun große Mengen Protein zur Verfügung, so dass es möglich war, ein umfangreiches Screening von Kristallisationsbedingungen durchzuführen. Für diese Versuche wurden eine Reihe von Bedingungen getestet, sowohl mit eigenen als auch mit kommerziellen Lösungen. Nur in einem von insgesamt 600 unterschiedlichen Ansätzen konnte, nach einer Inkubationszeit von zwei Monaten Mikrokristalle identifiziert werden. Die Protease war dazu in einer Konzentration von 7,5 mg/ml eingesetzt worden und mit 1 mM PMSF gehemmt. Die Bedingungen für die Produktion der Mikrokristalle waren 14% PEG 400/200 mM CaCl_2 pH 7,5. Mit dem Ziel, qualitativ höherwertige Kristalle zu züchten, wurden ähnliche Bedingungen getestet. Allerdings konnte auch nach weiteren zwei Monaten nur Kristallbündel (Abb. 3.17) gezüchtet werden, die zwar relativ groß (2 mm), aber für eine kristallographische Analyse ungeeignet waren.

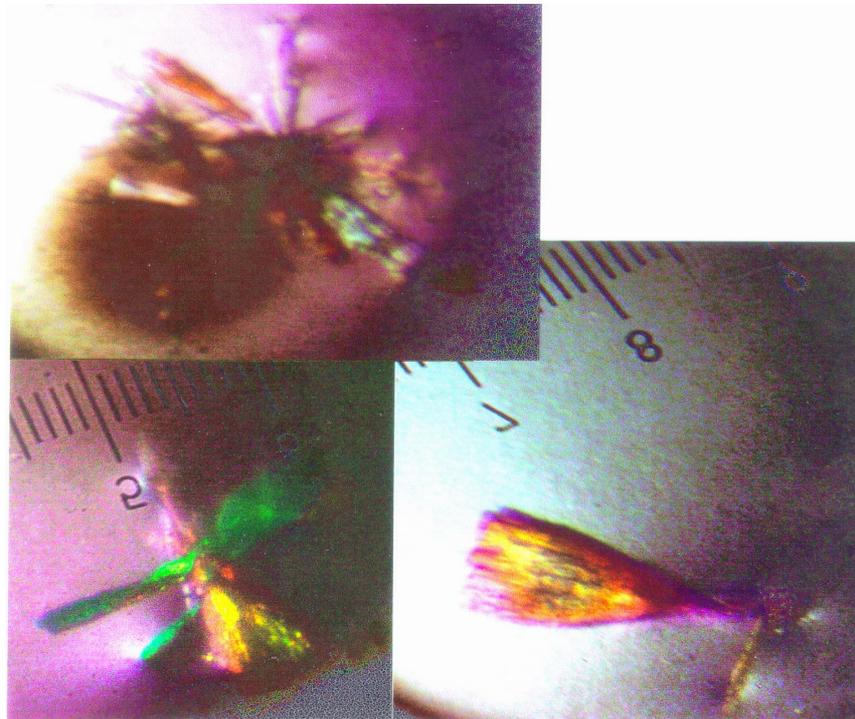


Abbildung 3.17 Kristallbündel der StmPr1- Protease

Kristallisationsansatz: 7,5mg/ml StmPr1-Protease, Phosphatpuffer pH 7,4, 5% Glycerin, 200 mM CaCl_2 , 1 mM PMSF, als Präzipitant PEG 400 (20%). Kristalle wuchsen innerhalb von 2 Monaten bei 21 °C. Die Kristallisationsansätze wurden durch ein Mikroskop mit Polfilter bei 10-facher Vergrößerung kontrolliert.

Für eine kristallographische Analyse sind Einkristalle von mindestens 0,2 mm Durchmesser notwendig. Prinzipiell sollte dies mit der StmPr1-Protease erreichbar sein, könnte allerdings erschwert werden durch die beschriebene C-terminale Trunkierung der Protease, es ist deshalb angezeigt, definiert C-terminal trunke Mutanten zu exprimieren und zu reinigen. Solche Experimente hätte allerdings den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überschritten, deshalb wurden keine weiterführenden Kristallisationsversuche durchgeführt.

Heterologe Expression von StmPr2 in *E. coli*

Nach der erfolgreichen rekombinanten Produktion und Reinigung einer aktiven StmPr1-Protease sollte nun versucht werden, die StmPr2-Protease ebenfalls als aktives Enzym in *E. coli* zu exprimieren. Diese Protease wird ebenso wie die Hauptprotease als Vorläuferprotein synthetisiert.

Expression der reifen StmPr2-Protease. Es wurde zunächst getestet, ob es möglich ist, für diese Protease den Genabschnitt, der für das reife Enzym codiert (Nucleotid 406-1743), in *E. coli* als aktives Enzym zu exprimieren. Die Expression des Proteins wurde nach Induktion der *E. coli*-Bakterien im SDS-Gel und im Immuno-Blot nachgewiesen (s. Abb. 3.18). Für den Nachweis wurde der Anti-StmPr1-Antikörper verwendet, für den eine Kreuzreaktion mit der StmPr2-Protease zu erwarten war.

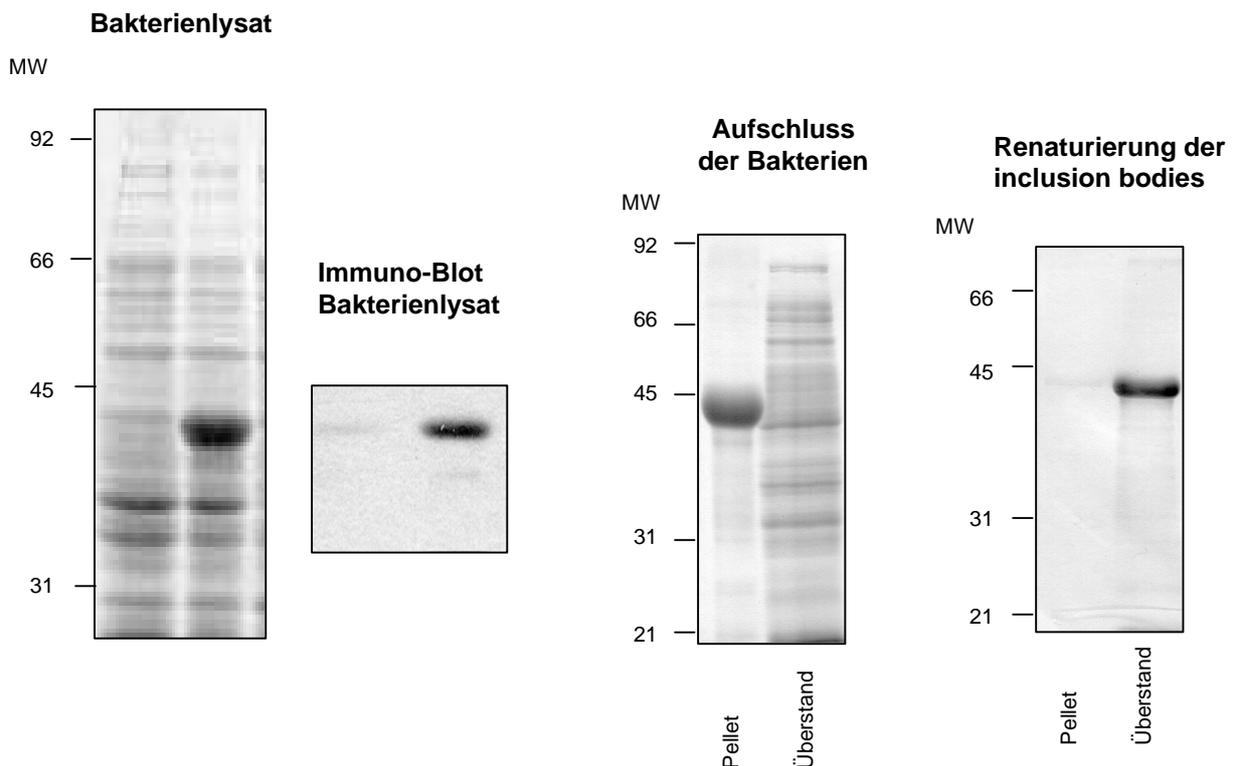


Abbildung 3.18 Expression der reifen StmPr2-Protease in *E. coli* BL 21 (DE3)

Die Bakterien wurden in LB-Medium für 2 h bei 37 °C mit 0,5 mM IPTG induziert. Das Bakterienlysat wurde durch ein 12%-iges SDS-Gel sowie durch Immuno-Blot analysiert. Die lösliche und unlösliche Fraktion nach Aufschluss der Bakterien sowie die Fraktionen nach Renaturierung der inclusion bodies wurden auf einem 12%-igen SDS-Gel dargestellt. Die Proteinmenge des Gesamtllysats betrug 20 µg, die der Proteinlösungen 5 µg.

Die reife rekombinante StmPr2-Protease wurde durch *E. coli* überexprimiert, erwies sich aber nach Aufschluss der *E. coli*-Bakterien als unlöslich. Deshalb wurde das Protein mit Hilfe von Harnstoff aus den inclusion bodies gelöst und anschließend renaturiert. Abbildung 3.18 zeigt, dass es möglich war, auf diese Weise ca. 90% der inclusion-bodys zu renaturieren. In dieser Proteinlösung ließ sich jedoch keine proteolytische Aktivität nachweisen. Nun schien es naheliegend, dass sich die StmPr2-Protease in Bezug auf die Aktivierung des Enzyms ähnlich verhält wie die StmPr1-Protease. Deshalb wurde versucht, das gesamte Prä-Pro-Enzym in *E. coli* zu exprimieren, in der Erwartung, dass auch diese Protease von den *E. coli*-Bakterien zum reifen aktiven Enzym prozessiert wird.

Expression des gesamten StmPr2-Gens in *E. coli*. Zunächst wurden die *E. coli* Bakterien BL 21 (DE3) mit unterschiedlichen IPTG Konzentrationen induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten die proteolytische Aktivität im Gesamtlisat, im Periplasma und im Medium gemessen. In keiner dieser Proben konnte allerdings Protease-Aktivität nachgewiesen werden. Deshalb wurden andere Bedingungen getestet. Da die extrazelluläre Serin-Protease von *Xanthomonas campestris*, welche eine 82%-ige Sequenz-Homologie zur StmPr2-Protease aufweist, durch den *E. coli*-Stamm JM 109 (DE3) erfolgreich exprimiert und prozessiert worden war [81], wurden diese Bakterien nun auch für die Expression des StmPr2-Gens getestet. Tatsächlich gelang es so, die StmPr2-Protease als aktives Enzym in *E. coli* herzustellen. Sowohl im Periplasma als auch im Medium der induzierten Bakterien wurde Protease-Aktivität nachgewiesen. Hierbei ist zu bemerken, dass Aktivität nur dann zu messen war, wenn die Bakterien im Voll-Medium bei Raumtemperatur gezogen wurden. Nach Kultivierung der *E. coli*-Bakterien im Minimal-Medium (bei RT und 37 °C), war keine Aktivität festzustellen (s. Abb. 3.19).

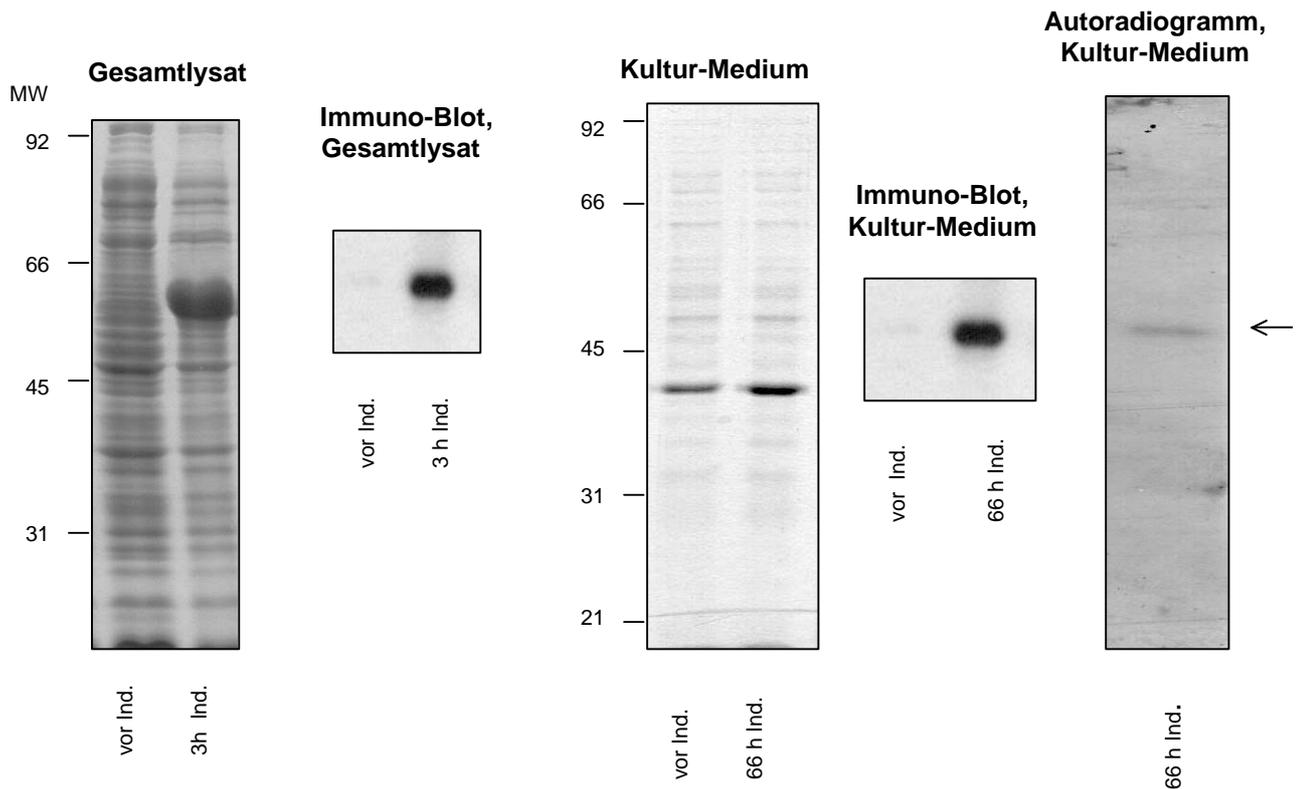


Abbildung 3.19 Expression des StmPr2-Gesamtgens in *E. coli* JM 109(DE3). Pfeil = StmPr2-Protease; Bakterien des *E. coli* Stammes JM 109 (DE3) wurden für 66 h bei RT in LB Medium mit 0,5 mM IPTG induziert. Die cytoplasmatische Produktion sowie die Sekretion von StmPr2 wurden durch SDS-Gel-Analyse und Immuno-Blot-Analyse (12%-ige SDS-Gele) kontrolliert. Es erfolgte außerdem eine Autoradiogramm-Analyse (s. Material & Methoden) des Bakterien-Mediums. Für den Nachweis der StmPr2-Sekretion wurden TCE-Präzipitate von 100 μ l Medium verwendet.

Abbildung 3.19 zeigt, dass ein ca. 60 kDa großes Protein in den induzierten Bakterien akkumuliert. Dieses Protein entspricht der Größe des StmPr2-Vorläuferproteins und ist sowohl im Immuno-Blot als auch im SDS-Gel eindeutig nachweisbar. Die prozessierte 44 kDa-Form kann dagegen im Medium durch Immuno-Blot und Autoradiogramm nachgewiesen werden, nicht aber im Coomassie gefärbten Gel, da offenbar die Produktionsrate sehr niedrig ist. Auch Enzymaktivitätsmessungen bestätigten, dass wesentlich weniger Enzym sezerniert wird als im Fall der StmPr1-Protease.

Mit dem Ziel, die Produktion aktiver StmPr2-Protease zu steigern, wurden die Bedingungen für die Bakterien-Induktion variiert (s. Abb 3.20).

Akkumulation der StmPr2-Protease im Medium nach Induktion mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen

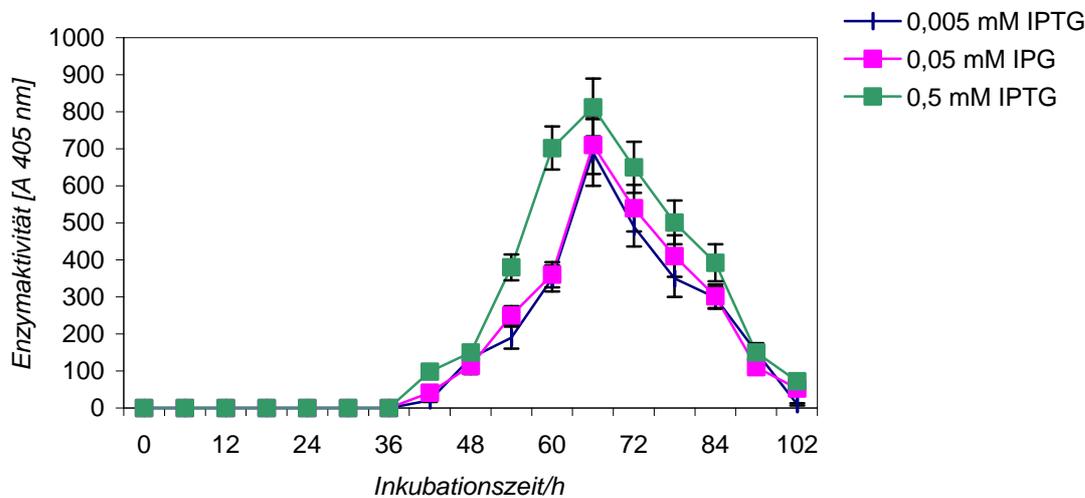


Abbildung 3.20 Enzymaktivität der StmPr2-Protease nach Induktion von *E. coli* JM 109(DE3)

Die Bakterien wurden in LB-Medium bei RT und 150 rpm inkubiert und mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen induziert. Für die Aktivitätsbestimmung (durch den Serin-Protease-Assay) wurden 50 µl Medium eingesetzt. Die Enzymaktivitätswerte ergaben sich aus dem Mittelwert von drei von einander unabhängigen Messungen. Die Streuung um den Mittelwert ist als Standardabweichung dargestellt.

Im Medium der induzierten Bakterien konnte erst nach 38 Stunden schwache Protease-Aktivität detektiert werden. Die stärkste Protease-Produktion erfolgte nach 66 Stunden Induktion, wobei sich kein Unterschied zwischen den getesteten IPTG-Konzentrationen zeigte (Abb. 3.20). Vorversuche hatten bereits ergeben, dass dabei die Temperatur (37 °C versus 25 °C) keinen Einfluss auf die Protease-Aktivität im Medium hatte. Die Produktion aktiver StmPr2-Protease war auf Basis von Enzymaktivitätsmessungen etwa um den Faktor zehn niedriger als die zuvor beschriebene Produktion der StmPr1-Protease. Demnach müsste die Proteinkonzentration ca. 2 mg StmPr2-Protease pro Liter Medium betragen.

Diese Expressionsrate reichte für die beabsichtigte biochemische Charakterisierung dieses Enzyms aus. Es galt nun, das Enzym möglichst schonend aus dem Kulturmedium zu reinigen.

Reinigung der rekombinanten StmPr2-Protease

Die aktive Protease sollte aus der mit 0,5 mM IPTG für 66 Stunden induzierten Expressionskultur gereinigt werden. Die Akkumulation des Enzyms im Periplasma war zu gering, um diese Fraktion für Reinigungsversuche zu verwenden. Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, dass die StmPr2-Protease eine Affinität zu Bacitracin aufweist, deshalb wurde als erster Reinigungsschritt eine Bacitracin-Chromatographie durchgeführt.

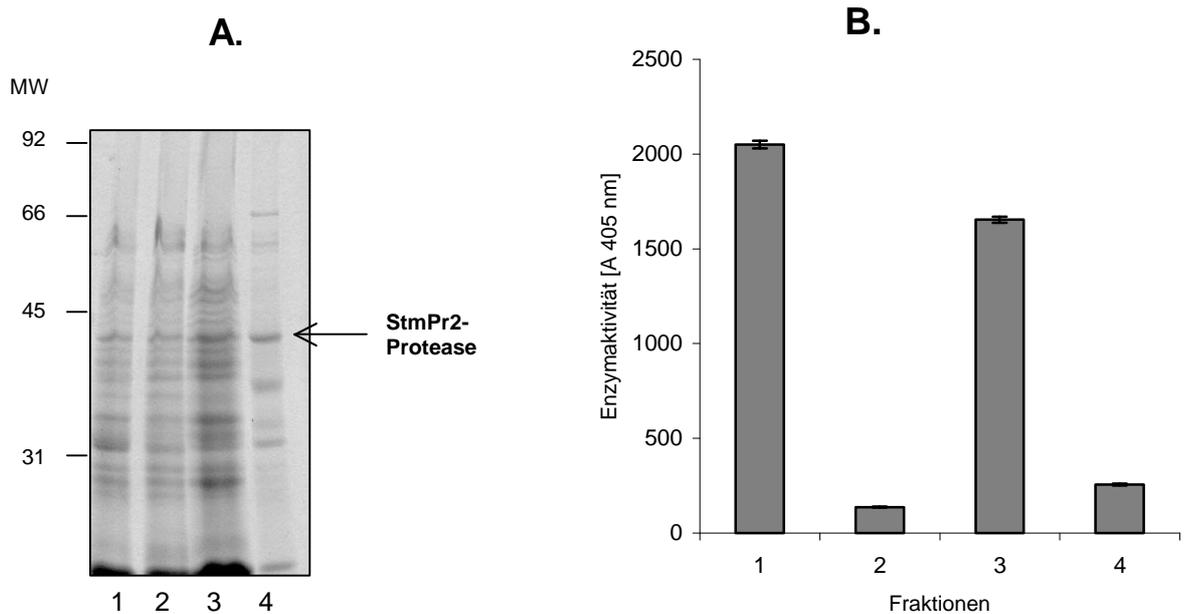


Abbildung 3.21 Reinigung der StmPr2-Protease durch Bacitracin-Chromatographie. **(A)** SDS-Gel ausgewählter Fraktionen der Bacitracin-Chromatographie: Spur 1, Fraktion vor der Säule; Spur 2, Durchlauf; Spur 3, Waschfraktion; Spur 4, Eluat. Aufgetragen wurden äquivalente Anteile der jeweiligen Fraktion. **(B)** Bestimmung der Enzymaktivitäten der in A. beschriebenen Fraktionen.

Wie auf Abbildung 3.21 zu erkennen, wird die StmPr2-Protease durch die Bacitracin-Chromatographie zwar angereichert, aber nicht gereinigt. Deshalb wurde als weiterer Reinigungsschritt eine SEC-Chromatographie durchgeführt (Abb. 3. 22).

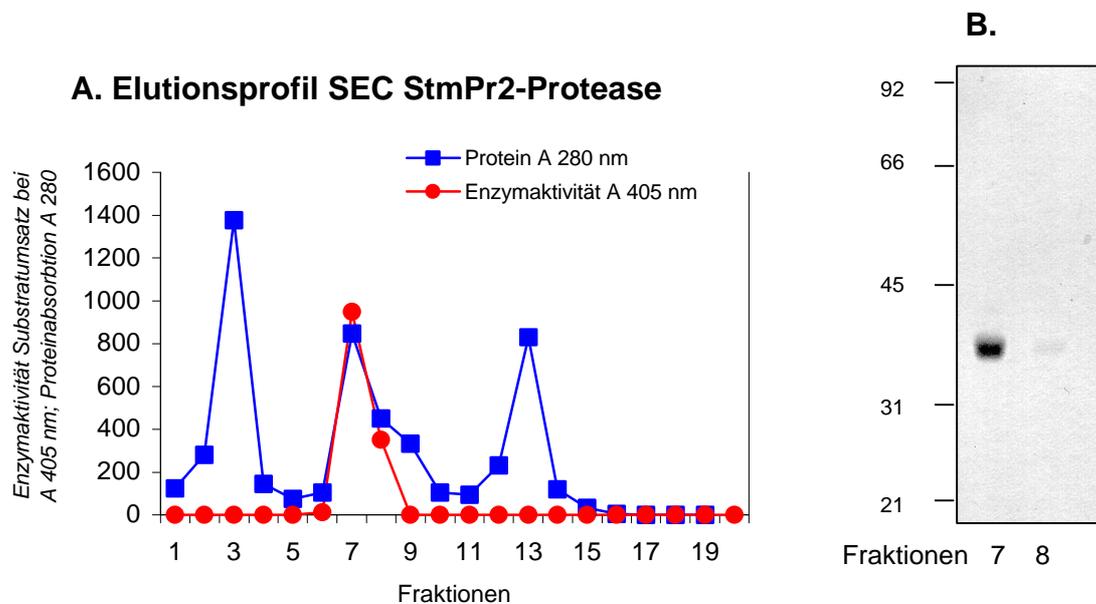


Abbildung 3.22 Reinigung der StmPr2-Protease durch SEC. Das Bacitracin-Eluat wurde kurz gegen H₂O dialysiert, zur Trockne lyophilisiert und in 250 µl TBS resuspendiert. Diese Probe wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule (HR 10/30 Pharmacia) gepumpt und bei gleicher Flussrate von der Säule eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml. **(A)** Absorption der Eluat-Fractionen; Absorption bei 280 nm (Protein) und bei 405 nm (Substratumsatz bei 405 nm]. **(B)** 25 µl von Fraktion 7 und 8 wurden durch ein 12%-iges SDS-Gel analysiert.

Abbildung 3. 22 B verdeutlicht, dass die Trennung durch die SEC-Chromatographie zu einer vergleichsweise sauberen StmPr2-Lösung führt.

Die **Proteinbestimmung** der StmPr2-Protease erfolgte ebenso wie bei der StmPr1-Protease, durch die Biuret-Reaktion. So konnte eine Ausbeute von etwa 0,2 mg gereinigter Protease pro Liter Expressionsmedium ermittelt werden. Enzymaktivitätsbestimmungen von Ausgangs- und Endprodukten ergaben Ausbeuten von ca. 10% StmPr2-Protease.

Untersuchung der StmPr2-Protease

Die molekularen Formen der StmPr2-Protease während der Prozessierung des Vorläuferproteins konnten ebenso wie für die StmPr1-Protease durch Immuno-Blot (Abb.3.23) visualisiert werden.

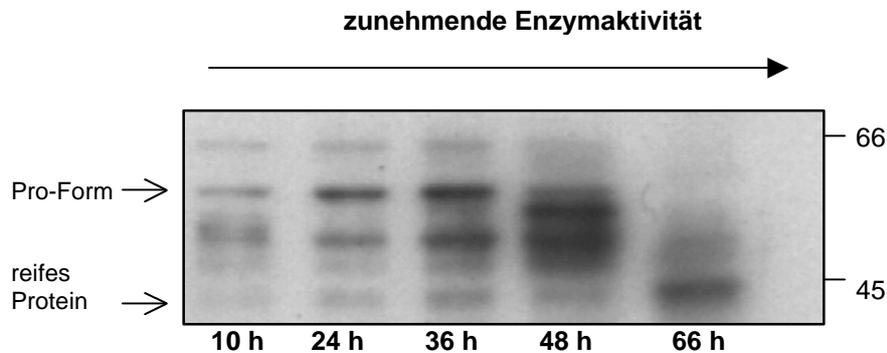


Abbildung 3.23 Prozessierung der StmPr2-Protease. Nach Induktion von *E. coli*-Bakterien wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben (100 µl) aus dem Kulturmedium entnommen, TCE gefällt und durch Immuno-Blot analysiert

Dabei zeigte sich, dass nach 66 Stunden die 59 kD große Pro-Form der StmPr2-Protease über verschiedene molekulare Formen zum 44 kD großen reifen Protein abgebaut wird. Dieser Abbau korreliert mit dem Erscheinen der proteolytischen Aktivität im *E. coli* Medium (s. Abb. 3.20).

Biochemische Charakterisierung der rekombinanten StmPr2-Protease

Nach der Darstellung des reinen StmPr2-Produktes war es nun möglich, dieses Enzym biochemisch zu charakterisieren. Diese Untersuchung sollte dazu beitragen, die Bedeutung der zweiten von *St. maltophilia* sezernierten Protease zu verstehen.

Zunächst wurde die pH- sowie Salz-Abhängigkeit der Enzymaktivität ermittelt:

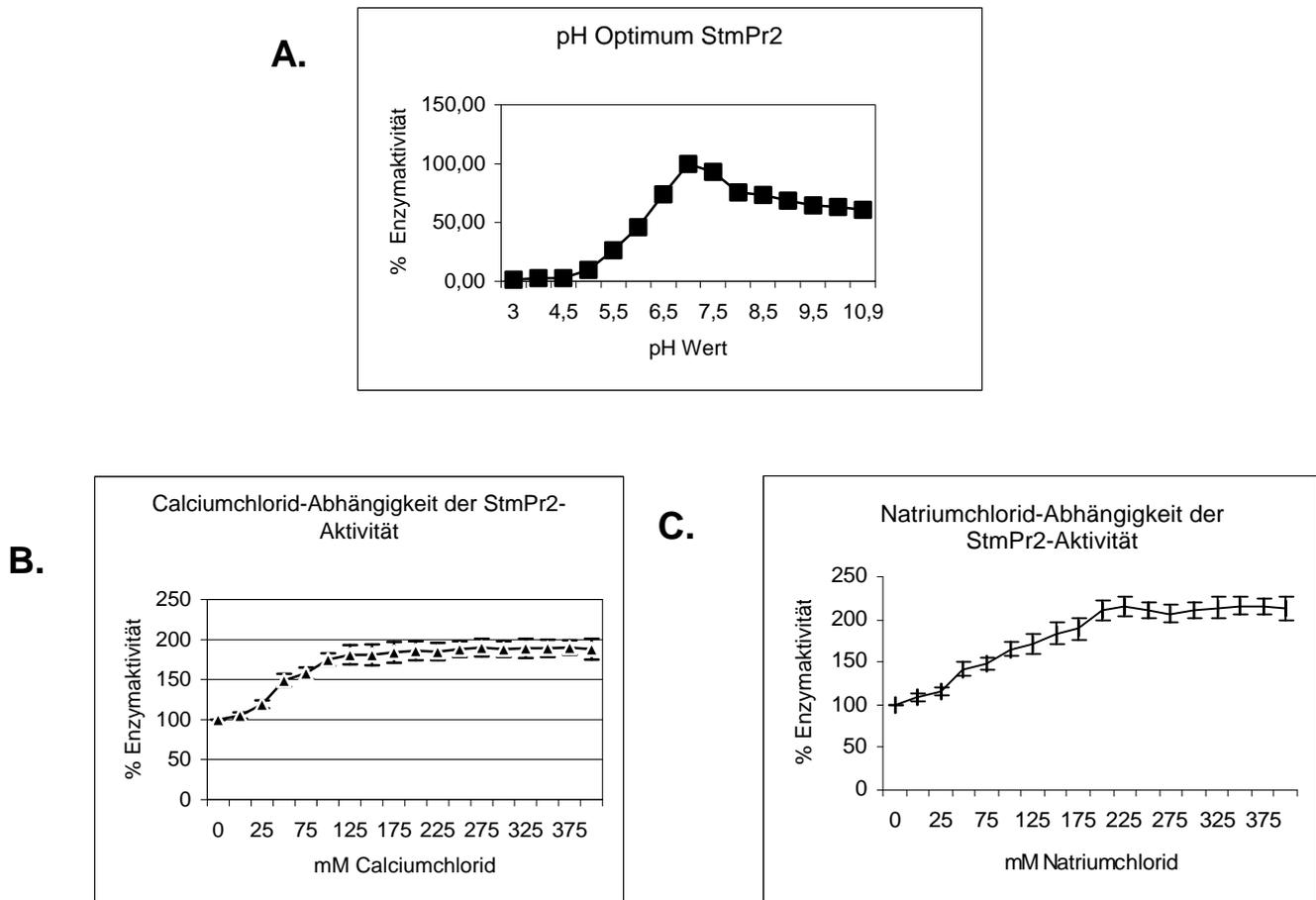


Abbildung 3.24 Bestimmung der StmPr2-Enzymaktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes sowie der Na^+ - bzw. Ca^{2+} -Konzentration. Die Enzymaktivität wurde wie unter Material & Methoden beschrieben gemessen, mit 36 ng Enzym und in Gegenwart von 2 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe als Substrat. **(A)** Für die pH-Wert Bestimmung wurden unterschiedliche Puffer verwendet: pH 3-4: 50 mM Citrat-Puffer; pH 5-7: 50 mM Phosphatpuffer; pH 8-10: 50 mM Tris/HCl Puffer; die Enzymaktivität ist in Prozent angegeben, wobei 0% dem Blindwert der Messung entspricht. **(B und C)** Für die Bestimmung des Salzoptimums wurde die Enzymaktivität ohne Salzzusatz gleich 100% gesetzt.

Die StmPr2-Protease zeigt ihr pH-Optimum im neutralen Bereich. Die höchste Aktivität ist zwar bei pH 7,0 zu verzeichnen; die Protease bleibt aber auch im Alkalischen aktiv. Salz stimuliert die Enzymaktivität der *St. maltophilia*-Protease. Die jeweiligen Maxima wurden bei 200 mM NaCl bzw. 150 mM CaCl_2 erreicht; bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration blieben die Enzymaktivitäten auf diesem Niveau. Der Effekt von NaCl ist ausgeprägter als der von CaCl_2 .

Inhibitorspektrum der StmPr2-Protease. Die Enzymaktivität wurde in Gegenwart gängiger Protease-Inhibitoren getestet. Dabei wurden Konzentrationen gewählt, die nach Angabe des Herstellers (Roche, Proteasen-Inhibitoren-Set) bei responsiven Enzymen deutliche Effekte zeigten sollten.

Inhibitor	maximale getestete Inhibitorkonzentration (μM)	Inhibition	IC_{50} (μM)
Antipain	100	+	1,9
Aprotinin	0,3	-	
Bestatin	130	-	
Chymostatin	100	+	0,77
E-64	28	-	
EDTA- Na_2	1000	-	
Leupeptin	1,1	-	
Pepstatin	0,7	-	
PMSF	1000	+	
TLCK	150	-	
TPCK	150	-	
DFP	300	+	

Tabelle 3.1 Effekt von unterschiedlichen Substanzen auf die Aktivität der StmPr2-Protease

Gereinigtes Enzym (36 ng) wurde für 20 min mit den Substanzen vorinkubiert und dann dem Protease-Assay unterworfen, wie in Material & Methoden beschrieben (2 mM Substrat). Die IC_{50} -Bestimmung ist ebenfalls in Material & Methoden beschrieben. Für den kovalent bindenden Inhibitor PMSF wird kein Wert vom Hersteller empfohlen, er schaltet die Proteaseaktivität aber bei einer Konzentration von 1 mM vollständig aus.

Von den getesteten Substanzen hemmen erwartungsgemäß die typischen Serin-Protease-Inhibitoren PMSF und DFP, welche kovalent an das Enzym binden. Als einzige kompetitive Peptidinhibitoren hemmen Chymostatin und Antipain, wobei Chymostatin den potenteren Hemmstoff darstellt. Andere Serin-Protease-Inhibitoren, wie Leupeptin, Aprotinin, TLCK und TPCK [82] wirken nicht inhibierend.

EDTA zeigt ebenfalls keinen Effekt auf die StmPr2-Proteasesaktivität, obwohl diese Substanz die Enzymaktivität der meisten klassischen Subtilasen hemmt [83]. Die weiteren in Tabelle 3.1 dargestellten Substanzen sind als Inhibitoren für andere Protease-Klassen beschrieben und haben deshalb erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der StmPr2-Protease.

Substratspezifität der StmPr2-Protease. Um Informationen über die Architektur des aktiven Zentrums dieser neuen Protease zu gewinnen, wurden eine Reihe von chromogenen synthetischen Tetrapeptiden auf ihre Eignung als Substrat getestet [84]. Bei diesen Substraten waren einzelne Aminosäuren an gezielten Positionen (P₁ bis P₄) ausgetauscht (vergl. theoretische Grundlagen). Durch enzymkinetische Messungen wurde die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die Wechselzahl (k_{cat}) bestimmt (näheres hierzu, siehe Material & Methoden).

Substrat P ₅ P ₄ P ₃ P ₂ P ₁ P ₋₁	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	0,9 ± 0,12	18	20 ± 8,3
Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA	0,73 ± 0,093	2,9	4 ± 0,8
Suc-Ala-Ala-Pro-Ile-pNA	2,0 ± 0,36	20	10 ± 4,2
Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-pNA	0,33 ± 0,035	5,2	16 ± 5,6
Suc-Ala-Ala-Pro-Asp-pNA	2,1 ± 0,46	1,3	<1
Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA	1,3 ± 0,24	0,16	<1
Suc-Ala-Ala-Pro-Glu-pNA	6,1 ± 1,1	0,45	<1
Suc-Ala-Ala-Pro-Lys-pNA	1,8 ± 0,12	10,9	6 ± 1,9
Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-pNA	1,8 ± 0,50	3,36	2 ± 0,25
Suc-Ala-Ala-Pro-Orn-pNA	5,1 ± 2,96	0,53	<1
Suc-Phe-Leu-Phe-pNA	0,22 ± 0,055	0,16	<1
Suc-Phe-Pro-Phe-pNA	0,52 ± 0,021	1,13	2 ± 0,18
Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA	0,65 ± 0,15	8,9	14 ± 5,3
Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA	0,22 ± 0,011	8,7	40 ± 10
Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA	0,79 ± 0,094	19	15 ± 5,9
Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-pNA	0,69 ± 0,063	5,6	8 ± 3,3
Suc-Phe-Ala-Ala-Phe-pNA	0,15 ± 0,056	2,7	18 ± 7,3

Tabelle 3.2 Bestimmung der P₁-P₄ Spezifität von StmPr2. Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in Gegenwart von 0,025–10 mM der jeweiligen Substrate gemessen. Dabei variierte die Enzymmenge von 65 bis 650 ng. Eine nicht-lineare Regression der erhaltenen Substrat-Sättigungskurven wurde zur Ermittlung von V_{max} und K_m durchgeführt. Die Definition enzymkinetischer Konstanten ist in Material & Methoden beschrieben.

Die Auswertung der Tabelle 3.2 zeigt folgende Substrat-Spezifitäten der StmPr2-Protease:

P₁Spezifität

Phe > Ala > Ile > Lys > Leu > Arg > Asp > Val > Orn > Glu

P₂Spezifität:

Pro > Leu

P₃Spezifität:

Phe > Leu > Gly > Glu

P₄Spezifität:

Ala > Phe

Die Interpretation der Daten aus Tabelle 3.2 wird vor allem im Vergleich zur StmPr1-Protease in der Diskussion besprochen.

Verdau der oxidierten Insulin-B-Kette. Peptidfragmente, die nach Protease-Verdau entstehen, dienen dem Vergleich mit bereits untersuchten Proteasen und können Hinweise auf die Substratspezifität von unbekanntem Proteasen geben. In dieser Arbeit wurde die oxidierte Insulin-B-Kette verwendet und mit der StmPr2-Protease inkubiert. Die Analyse der proteolytischen Fragmente erfolgte durch HPLC und Massenspektroskopie [85,86].

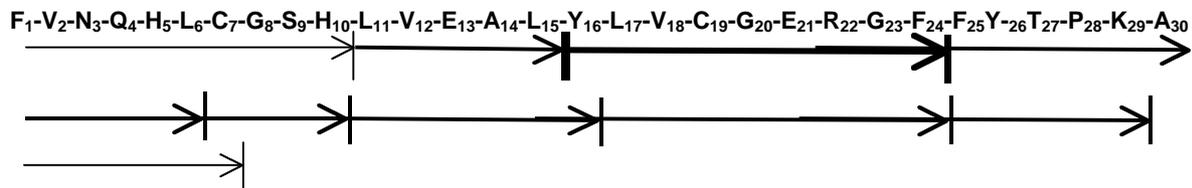


Abbildung 3.25 Fragmente der oxidierten Insulin-B-Kette nach Inkubation mit der StmPr2-Protease. 1 mg der oxidierten Insulin-B-Kette wurde für 4 h mit 5 µg Enzym inkubiert. Als Reaktionspuffer diente 50 mM Phosphatpuffer/200 mM NaCl pH 7,0. Aliquots des Inkubationsansatzes wurden analysiert wie in Material & Methoden beschrieben. Dicke und dünne Pfeile repräsentieren die identifizierten proteolytischen Peptide in starken oder schwachen Mengen. Dicke vertikal orientierte Striche stellen die Haupt-Schnittstellen dar.

Die Hauptschnittstelle auf der Insulin-B-Kette liegt zwischen Leucin¹⁵ und Tyrosin¹⁶. Weitere prominente Schnittstellen treten ebenfalls zwischen hydrophoben Aminosäuren auf. Diese Präferenz war zu erwarten, da sie charakteristisch für Subtilasen ist [38].

Verdau von humanen Plasma-Proteinen. Nach diesen Versuchen mit synthetischen Substraten, erschien es wichtig humane Proteine als Substrat anzubieten, welche bei Infektionen mit *St. maltophilia* betroffen sein könnten. Um zu prüfen, ob die zweite von *St. maltophilia* sezernierte Protease sich dabei in ihrer Wirkung von der StmPr1-Protease unterscheidet, wurden die folgenden Versuche mit beiden Proteasen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

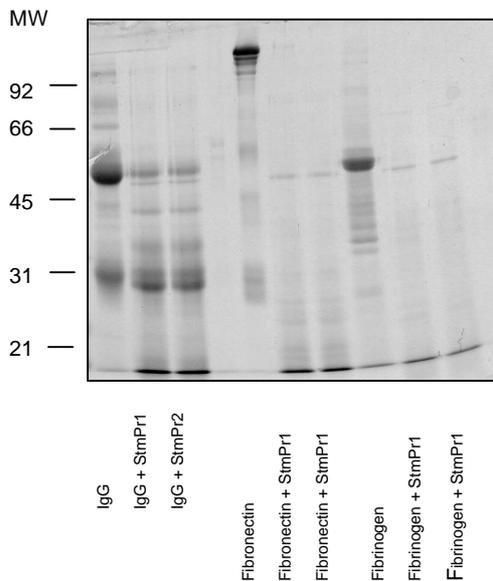


Abbildung 3.26 Verdau von IgG-Antikörpern, Fibrinogen und Fibronectin. 10 µg des jeweiligen Substrat-Proteins wurde zusammen mit StmPr1 oder StmPr2 (200 ng) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationsansätze wurden auf einem 13%-igen SDS-Gel analysiert.

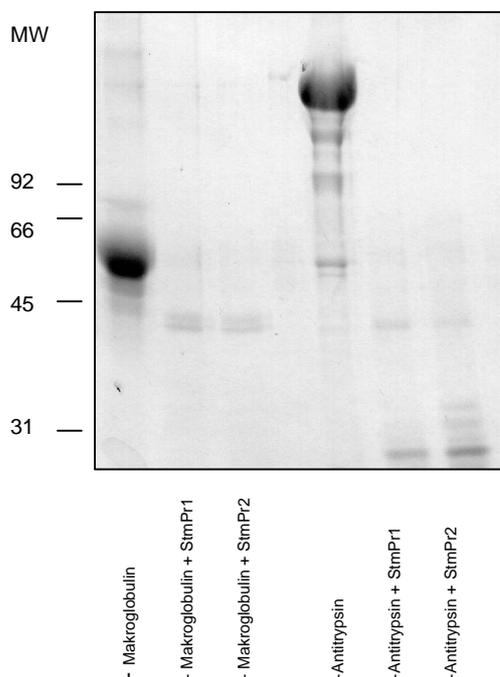


Abbildung 3.27 Verdau der Plasma-Protease-Inhibitoren α -Makroglobulin und α -Antitrypsin

10 µg des jeweiligen Substrat-Proteins wurde zusammen mit StmPr1 oder StmPr2 (200 ng) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationsansätze wurden auf einem 8%-igen SDS-Gel analysiert.

Die Abbildungen 3.26 und 3.27 zeigen, dass die StmPr1-Protease und StmPr2-Protease gleichermaßen in der Lage sind, die getesteten Substrate zu fragmentieren. Hierbei werden, mit Ausnahme des IgG-Antikörpers, alle Substrate weitestgehend abgebaut. Im Fall des Immunglobulins ist die Degradierung von schwerer und leichter Kette deutlich aber nicht vollständig.

Herstellung von StmPr1-Null-Mutanten (knock-out-Mutanten)

Zur Ermittlung der Relevanz der *St. maltophilia* Proteasen für das Krankheitsgeschehen infizierter Patienten sind *in vivo* Versuche unerlässlich. Um zu prüfen, ob diese Proteasen als Pathogenitätsfaktor fungieren, müssten Protease-freie Bakterienstämme in einem *in-vivo*-Modell mit den Wildtyp-Bakterien verglichen werden. Da die StmPr1-Protease das deutlich vorherrschende Enzym ist (Verhältnis StmPr1:StmPr2 etwa 1:10), beschränkte sich folgende Untersuchung darauf, StmPr1-knock-out-Mutanten herzustellen. Die funktionelle Ausschaltung des Gens auf DNA-Ebene sollte durch homologe Rekombination [87,88] erfolgen. Hierzu musste zunächst geprüft werden, ob das StmPr1-Gen als einfache („single copy gene“) oder mehrfache („multi copy gene“) genomische Kopie vorliegt. Dies erfolgte durch Southern-Blot Analyse. Für den Southern-Blot wurde genomische DNA von *St. maltophilia* mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten: eines, das keine Schnittstelle in dem Gen aufweist (*EcoRI*) und ein weiteres, welches das StmPr1-Gen einmal zwischen den Nukleotiden 269 und 270 schneidet (*ApaI*). Die Sonde wurde aus dem StmPr1-Genabschnitt 179-676 (Sequenz siehe Anhang, Abb.2) konstruiert.

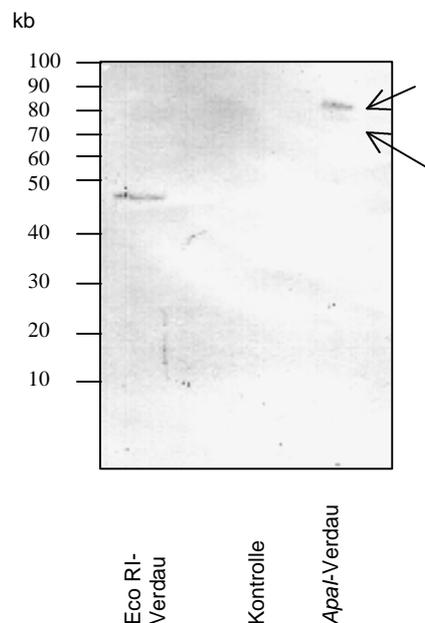


Abbildung 3.28 Southern-Blot. 5 µg genomische *St. maltophilia*-DNA wurde ü/N mit *EcoRI* sowie mit *ApaI* verdaut und, nach dem Blotten auf eine Membran, (s. Material & Methoden) mit einer 497 bp großen StmPr1-spezifischen DIG-markierten Sonde hybridisiert. Als Kontrolle wurde der gleiche Versuchsansatz mit genomischer *E. coli*-DNA durchgeführt.

Abbildung 3.28 zeigt in der ersten Spur (*EcoRI*) eine starke Bande, während in der letzten (*ApaI*) eine starke und eine sehr schwache Bande zu sehen sind. Offenbar wurde das StmPr1-Gen durch *ApaI*-Verdau in ein größeres sondenhomologes Fragment (406 bp) und eines kleineres (91bp) fragmentiert. Durch den *EcoRI*-Verdau blieb das StmPr1-Gen intakt. Aus diesem Bandenmuster ist ersichtlich, dass es sich bei dem StmPr1-Gen um ein „single copy gene“ handeln muss. Läge eine Mehrfachkopie des Gens vor, wären nach *EcoRI*-Verdau mindestens zwei Banden und nach dem *ApaI*-Verdau mindestens drei Banden zu sehen. Damit waren die Voraussetzungen für den Versuch gegeben, das StmPr1-Gen auf genomischer Ebene zu eliminieren.

Um eine homologe Rekombination zu erreichen, sollten die Wildtyp-Bakterien mit einem Plasmid transformiert werden, in welchem das Leseraster des StmPr1-Gens durch das cat-Gen unterbrochen wird. Dieses Plasmid wird als „pet/StmPr1/cat“ (Abb. 3.29) bezeichnet.



Abbildung 3.29 Konstruktion des Vektors pet/StmPr1/cat

Die geraden Striche stellen das Vektorrückgrat des Novagen Vektors pet 17b dar. Die hellgrauen Rechtecke symbolisieren das StmPr1 Gen, das dunkelgraue Rechteck das cat-Gen (welches aus dem Vektor pEVP3 durch PCR amplifiziert und in das StmPr1 Gen insertiert wurde) mit Promotorbereich.

Das insertierte cat-Gen sollte zur Selektion der rekombinanten *St. maltophilia*-Bakterien durch Chloramphenicol dienen. Dies ist zwar prinzipiell problematisch, weil *St. maltophilia* multiresistent ist; es konnte aber gezeigt werden, dass der Keim phänotypisch auf eine Konzentration von 30 µg/L Chloramphenicol empfindlich reagiert. Eine zusätzliche genomische Kopie des Chloramphenicoltransferase-Gens sollte den Bakterien Selektionsvorteile verschaffen.

Herstellung des pet/StmPr1/cat-Plasmides. Als Grundlage für die Konstruktion dieses Plasmids wurde der Vektor pet 17b/StmPr1/γ (siehe Anhang Abb. 1) verwendet.

Für die Integration des cat-Gens in das StmPr1-Gen erfolgte zunächst eine Restriktion des Vektors durch *NarII* und *RsrII* (*NarII* schneidet in Position 398 des StmPr1-Gens und *RsrII* in Position 1139). Das cat-Gen inklusive Promotorbereich wurde aus dem Plasmid pEVP3 (freundlicherweise von Dr. D Morrison zur Verfügung gestellt) durch PCR amplifiziert. Dabei war der sense-Primer mit einer *NarII*-Restriktionsschnittstelle und der antisense-Primer mit einer *RsrII*-Restriktionsschnittstelle versehen. Das Amplifikat wurde zunächst in den pGEM-T-easy-Vektor kloniert und durch chloramphenicolhaltige Medien selektiert. Nach Sequenzierung wurde das cat-Gen, durch *RsrII* und *NarII*, aus dem pGEM-T-easy-Vektor geschnitten und in den bereits verdauten Vektor pet 17b/StmPr1/γ ligiert. Abschließend erfolgte eine Transformation in den *E. coli*-Stamm XL1-blue und eine Sequenzierung des neu konstruierten Plasmids pet/StmPr1/cat.

Transformation des Plasmids pet/StmPr1cat in *St. maltophilia*. Das linearisierte Plasmid pet/StmPr1cAMP wurde durch Elektroporation in die *St. maltophilia*-Bakterien transformiert. Die Selektion erfolgte durch Kultivierung der transformierten Bakterien auf Chloramphenicol-haltigen Milchagarplatten. Bakterien, die keine Protease-Höfe ausbildeten, wurden durch Chloramphenicol-haltiges Flüssigmedium weiter selektioniert. Um zu kontrollieren, ob eine Integration des veränderten StmPr1-Gens in das Bakteriengenom stattgefunden hatte, erfolgte eine PCR-Amplifikation des StmPr1-Gens aus der DNA der selektierten Bakterien und eine anschließende Sequenzierung des Amplifikates. Es wurden insgesamt 20 Klone sequenziert; bei vier dieser Klone konnte die Insertion des cat-Gens in das StmPr1-Gen nachgewiesen werden. Der *St. maltophilia*-StmPr1-knock-out Klon Nummer 1 (Sequenz siehe Anhang Abb.1) wurde weiter in Chloramphenicol-haltigen Medien kultiviert und die Transkription und Expression des StmPr2-Gens durch RT-PCR bzw. Immunoblot kontrolliert.

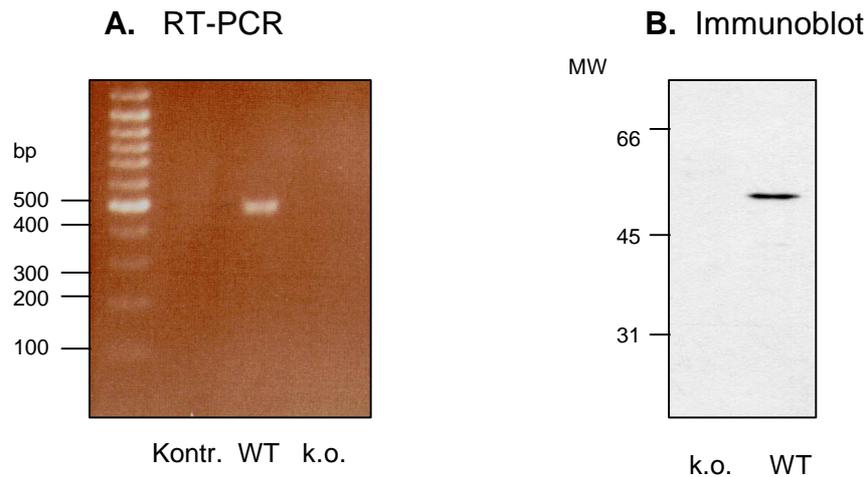
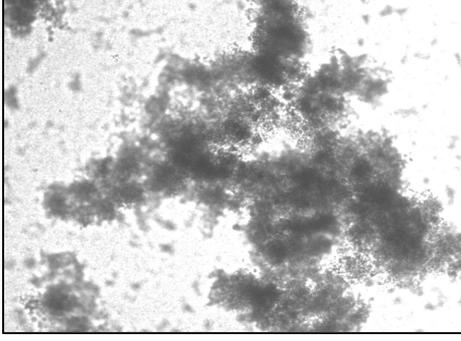
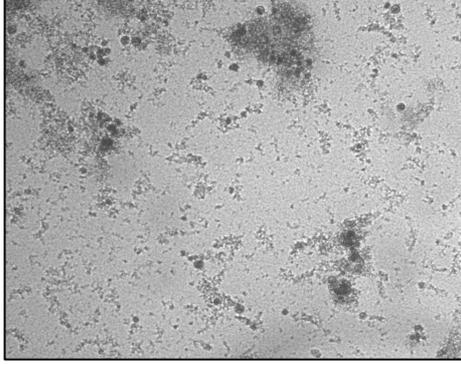
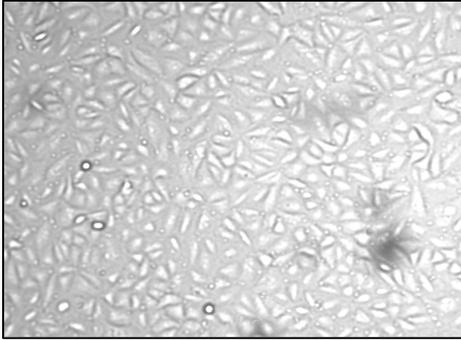


Abbildung 3.30 Nachweis der StmPr1-Expression in WT und knock-out-*St. maltophilia*-Stämmen. (A) Nach 24-stündiger Inkubation der WT und knock-out-Bakterien wurde aus beiden Stämmen die RNA präpariert und eine RT-PCR mit StmPr1-spezifischen Primern (StmPr1/RT) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die RNA mit RNase verdaut und mit den selben Primern amplifiziert. (B) 100 µl des Mediums der selben Bakterien wie in A wurden im Immuno-Blot mit dem Anti-StmPr1-Antikörper analysiert.

Abbildung 3.30 verdeutlicht, dass der Versuch, die Funktion des StmPr1-Gens auf genomischer Ebene auszuschalten, erfolgreich war. In den knock-out-Bakterien konnte weder eine Transkription noch eine Expression dieses Gens nachgewiesen werden.

Test der StmPr1-knock-out-Mutanten an Zellkulturen. Als Test-Modell für die Wildtyp und knock-out-Bakterien wurden humane Lungenepithel-Tumorzellen (A459) verwendet. Dieses Modell sollte zeigen, ob sich die WT und knock-out-Bakterien in ihrer Wirkung auf die Zellen unterscheiden. Dafür wurden die Zellen mit beiden Bakterien-Stämmen inkubiert (Abb.3.31).

I. WT-Bakterien
0 min - 1,5 h - 3 h Inkubation



II. Knock-out Bakterien
0 min - 1,5 h - 3 h Inkubation

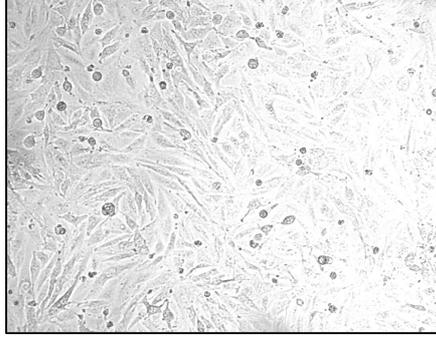
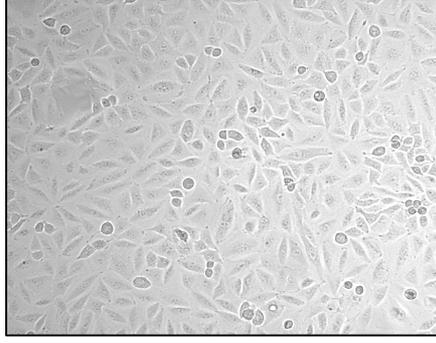
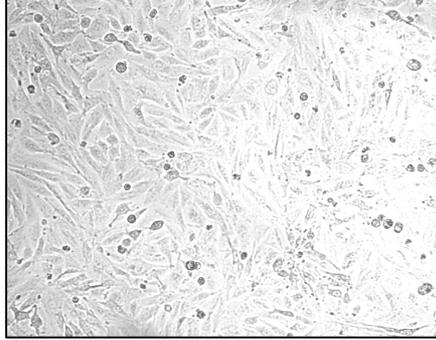


Abbildung 3.31 Inkubation von Lungenepithel-Tumorzellen mit WT und knock-out *St. maltophilia*-Stämmen. 10 μ l einer Bakteriensuspension ($OD_{600} = 1,8$) wurden zusammen mit 1 ml Zellkultur bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Ausschnitte der so behandelten Tumorzellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch ein Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert. Bild 1-4: vor Inkubation, 10 min Inkubation, 1,5 h Inkubation, 3 h Inkubation.

Abbildung 3.34/I zeigt, dass nach 1,5 Stunden eine starke Degradation der Zellen erfolgt, die nach drei Stunden soweit zugenommen hat, dass ca. 90% (visuelle Ermittlung) der Zellen abgestorben sind. Die Inkubation der Lungenepithelzellen mit den knock-out-Bakterien (Abbildung 3.34/II) lässt keine Zellschädigung erkennen.

Der Modellversuch belegt die zellschädigende Wirkung der StmPr1-Protease. Das könnte bedeuten, dass sich diese Eigenschaft auch bei infizierten Patienten auswirkt. Diese Frage müsste allerdings unter Einbeziehung von *in-vivo*-Experimenten (Tierversuche) untersucht werden.

Es zeigt sich, dass die beiden *St. maltophilia*-Proteasen strukturell ähnlich sind und besonders in den katalytischen Domänen homologe Sequenzbereiche aufweisen; die Homologie über die gesamte Sequenz beträgt 49% (identische Aminosäuren).

Vergleicht man nun diese beiden neuen Proteasen mit dem Subtilisin, fällt als erstes die unterschiedliche Größe auf: Während Subtilisin Carlsberg sowie auch die anderen klassischen Subtilisine ca. 250 Aminosäuren beinhaltet, sind die beiden neuen Proteasen mit 467 bzw. 444 Resten um einiges länger. Wie die Abb. 4.1 zeigt, besitzen die beiden *St. maltophilia*-Proteasen C-terminale Verlängerungen, welche die um etwa 20 kDa höheren Molekulargewichte begründen. Auf die Bedeutung solcher C-terminalen Extensionen bei Proteasen wird später eingegangen.

Der Vergleich der beiden neuen Proteasen mit dem Subtilisin zeigt eine weitere Auffälligkeit, nämlich die unterschiedliche Lokalisation der katalytisch wichtigen Aminosäuren der sogenannten "katalytischen Triade": Die Abstände zwischen diesen drei maßgeblichen Aminosäuren sind bei den neuen Proteasen deutlich größer als bei dem klassischen Subtilisin. Im Alignment (Abb. 4.1) ist dies erkennbar an den Lücken (gaps), welche eingefügt werden mussten, um die Consensus-Sequenzen zur Übereinstimmung zu bringen. Dies wird auch deutlich, wenn man die Positionen der drei katalytisch relevanten Aminosäuren ausgehend vom jeweiligen N-Terminus bestimmt:

	Position Asp	Position His	Position Ser
StmPr1	42 ← 66 →	108 ← 181 →	289
StmPr2	41 ← 63 →	104 ← 169 →	273
Subtilisin Carlsberg	33 ← 34 →	67 ← 154 →	221

Tabelle 4.1 Aminosäure-Positionen der katalytischen Triaden von StmPr1, StmPr2 und Subtilisin Carlsberg. Fett gedruckte Ziffern: Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade an, gezählt vom N-Terminus des jeweiligen prozessierten Enzyms; eingerahmte Ziffern: Abstände in Aminosäureresten zwischen obigen Positionen.

Folglich besitzen die beiden *St. maltophilia*-Proteasen eine signifikant andere Architektur des katalytischen Zentrums als die klassischen Subtilasen. Es stellte sich die Frage, ob diese besondere Architektur bereits für weitere Proteasen beschrieben wurde. In der Tat fanden sich durch Homologie-Suche in der Datenbank drei Enzyme mit ähnlichem Aufbau: die Basische Protease von *Dichelobacter nodosus*, welche bereits beim anfänglichen Vergleich von Peptidsequenzen als ein den *St. maltophilia*-Proteasen homologes Enzym aufgefallen war, die Extrazelluläre Protease von *Xanthomonas campestris* sowie die Alkalische Serin-Protease von *Alteromonas spec.*.

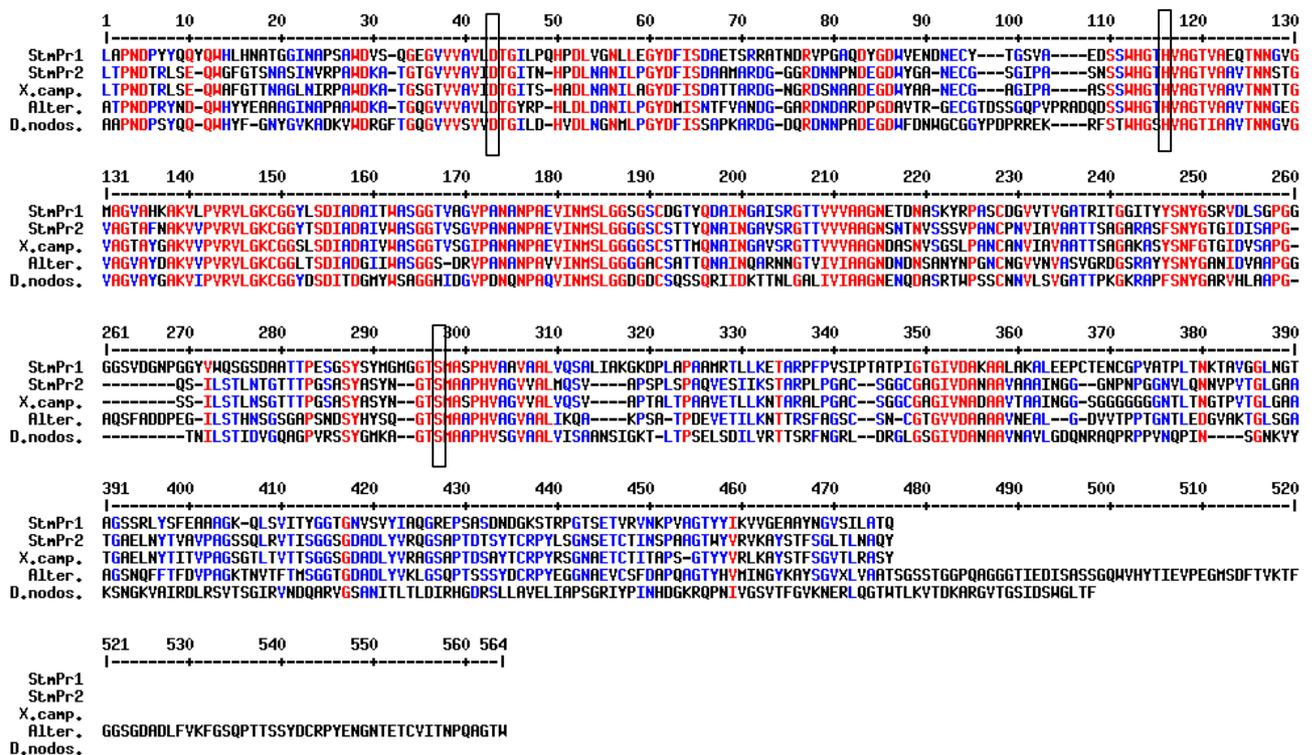


Abbildung 4.2 Alignment der *St. maltophilia*-Protease mit homologen Proteasen. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Proteasen ohne Prä-Pro-Peptid. Konservierte Aminosäuren sind rot markiert. Die Aminosäuren der katalytischen Triaden (Aspartat, Histidin und Serin) sind durch Kästen markiert. D. nodos: basische Protease von *D. nodosus* [14], X. camp: extrazelluläre Protease von *X. campestris* [15], Alter.: Serin-Protease von *Alteromonas spec.* [71]. Erstellt mit <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.

Die hier identifizierten homologen Proteasen besitzen ebenfalls C-terminale Extensionen, wenn auch von unterschiedlicher Länge. Außerdem sind die Abstände zwischen den Aminosäuren der katalytischen Triade gegenüber den klassischen Subtilisinen ebenfalls vergrößert und damit denen der *St. maltophilia*-Proteasen vergleichbar. Alle diese Proteasen sollten entsprechend ihrer besonderen Primärstrukturmerkmale auch von den Subtilisinen deutlich verschiedene dreidimensionale Strukturen aufweisen. Diese Folgerung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Stabilisierung zwischen den *St. maltophilia*-Proteasen und den klassischen Subtilisinen unterschiedlich erfolgt. Während bei den Subtilisinen die Protein-Stabilität und damit die Enzymaktivität von der Besetzung definierter Calcium-Bindungsstellen [34] abhängt, sind die *St. maltophilia*-Proteasen auch ohne Calcium aktiv. Offensichtlich wird die Struktur dieser Proteasen durch andere Faktoren stabilisiert. Für die homologe Basische Protease von *D. nodosus* ist die Bildung von Disulfidbrücken beschrieben [90]. Möglicherweise wird auch bei den *St. maltophilia*-Proteasen die Stabilität primär durch Schwefelbrücken erreicht, denn sie besitzen vier Cysteine im aktiven

Vor diesem Hintergrund fällt es schwer, die beiden neuen *St. maltophilia*-Proteasen in eine von Siezen [16] definierte Familie einzuordnen. Dieser teilt die drei Proteasen von *D. nodosus*, *X. campestris* und *Alteromonas spec.* aufgrund einer, wenn auch geringen, Sequenzhomologie - zwar einer gemeinsamen Subfamilie, nämlich der der Thermitasen, zu; jedoch weisen die Thermitasen weder eine C-terminale Extension, noch eine Verschiebung der katalytischen Triade auf. Den Thermitasen lassen sich die *St. maltophilia*-Proteasen also wegen dieser fehlenden charakteristischen Strukturelemente kaum zuordnen. Zwar weisen die Proteasen einer anderen Subtilase-Familie, nämlich die Pyrolisine, ähnliche Strukturmerkmale (C-terminale Extension; Verschiebung der katalytischen Triade) auf; bei diesen ist jedoch die Sequenzhomologie mit den *St. maltophilia*-Proteasen so gering, dass eine Zuordnung zu dieser Familie schwerfällt. Da die *St. maltophilia*-Proteasen keiner der beschriebenen Familien eindeutig zuzuordnen sind, scheint es sinnvoll, eine eigene Familie für diese Art von Subtilasen zu fordern.

Rekombinante Herstellung aktiver *St. maltophilia*-Proteasen

Die Mehrzahl der klassischen Subtilasen ist aufgrund ihrer technischen Nutzbarkeit strukturell und funktionell sehr gut erforscht [16,17]. Für die *St. maltophilia*-Proteasen sowie für die Subtilasen von *D. nodosus*, *X. campestris* und *Alteromonas spec.* liegen dagegen weitaus weniger Untersuchungen vor, und es existieren keine 3-D-Strukturen. Die Entwicklung heterologer Expressionssysteme für die *St. maltophilia*-Proteasen sollte die Voraussetzung für solche weitergehenden Untersuchungen schaffen.

Die Entwicklung eines stabilen Expressionssystems aktiver *St. maltophilia*-Proteasen in *E. coli* erwies sich allerdings als aufwendig, weil sich durch Expression der Protease-Domänen (ohne Pro-Peptid) keine aktiven Enzyme generieren ließen. Diese Erfahrung hatten auch andere Arbeitsgruppen bei Expressionsversuchen mit anderen Subtilasen gemacht [91,92]. Es scheint also, dass dem Pro-Peptid eine essentielle Funktion bei der Faltung dieser Proteine zukommt [93]. Aus Kristallisations- und NMR-Untersuchungen an zwei klassischen Subtilasen [94,95] hatte man zuvor bereits gefolgert, dass das Pro-Peptid eine Chaperon-ähnliche Funktion ausüben sollte [95]: Pro-Peptid und Enzym bilden zunächst einen hochenergetischen Übergangszustand in der Faltungsreaktion; die Interaktion zwischen beiden bewirkt schließlich die Herabsetzung der Energie des Pro-Enzyms und bedingt die korrekte und stabile Faltung der Enzym-Domäne. Nach dessen Ausbildung wird dann das Pro-Peptid durch Autokatalyse entfernt. Tatsächlich prozessierte sich ein heterolog exprimiertes Pro-Enzym (ohne Signalpeptid) von Subtilisin E zu einer aktiven Protease [80]. Ein aktives Enzym wurde erstaunlicherweise selbst dann erhalten, wenn man separat exprimierte Pro-Peptid- und Protease-Domänen zusammen inkubierte [93]. Ein solches Verfahren, d.h. die Expression der jeweiligen Proformen ohne Signalpeptid, brachte allerdings im hier dargestellten Fall der *St. maltophilia*-Proteasen keinen Erfolg. Erst durch die Expression des gesamten Prä-Pro-Enzyms gelang es, aktive Proteasen in *E. coli* herzustellen. Offenbar erfordert die korrekte Faltung der Protease-Domäne die Ausschleusung aus der Zelle oder erfolgt sogar erst dort. Als Ursache für diese Beobachtung kann man die Ausbildung von Disulfid-Brücken annehmen, welche im reduzierenden Milieu des Bakterieninneren nicht möglich sein sollte [96]. Dass die StmPr-Proteasen Disulfide besitzen, lässt sich aus der Homologie zur *D. nodosus*-Protease folgern (s. oben).

Im zuvor beschriebenen Fall des Subtilisin E ist die Situation bezeichnenderweise anders, da diese niedermolekularen Subtilisine keine Disulfide ausbilden und deshalb bereits im Zytosol ihre korrekte Struktur einnehmen können.

Nicht nur für das Erlangen der nativen Faltung scheinen bei der heterologen Expression die geeigneten Signalpeptide wichtig zu sein; auch das Ausmaß der Sekretion und damit die Proteinausbeuten scheinen von ihnen abzuhängen. Es erwies sich als bemerkenswert, dass die StmPr1- und StmPr2-Proteasen in auffällig unterschiedlichen Mengen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten produziert wurden. Während nach 42 Stunden Inkubation der *E. coli*-Bakterien die unerwartet hohe Menge von 25 mg StmPr1-Protease in 1 L Medium akkumulierten, benötigten die StmPr2-exprimierenden Bakterien 72 Stunden für die Produktion von etwa 2 mg Protein pro Liter Medium. Für die Sekretion korrektprozessierter Proteasen ist also eine effektive Translokation durch den Sekretionsapparat der *E. coli*-Bakterien erforderlich. Dabei scheint die Beschaffenheit des Signalpeptids von Bedeutung zu sein; z. B. werden rekombinante Proteine mit Signalpeptiden von Gram-positiven Bakterien offenbar weniger effektiv von Gram-negativen Bakterien sezerniert und umgekehrt: Die oben bereits erwähnte Basische Protease von *D. nodosus* (Gram-negativ) wurde in *E. coli* (Gram negativ) mit einer Ausbeute von 15-25 mg Protein/Liter Medium produziert [97], in *Bacillus subtilis* (Gram positiv) dagegen nur mit 0,5-2 mg/L [98]. Ähnliche Verhältnisse hat man auch bei der Expression der extrazellulären Protease von *Vibrio proteolyticus* gefunden [99].

Der wesentliche Unterschied von extrazellulären Proteinen Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien liegt in der Größe des Signalpeptids. Die Signalpeptide von Gram-negativen bakteriellen Proteinen sind im Durchschnitt 23 Aminosäuren lang und die von Gram-positiven 34 Aminosäuren. Das Signalpeptid der StmPr2-Protease mit einer Länge von 33 Aminosäuren ähnelt also eher dem eines Gram-positiven Bakteriums; eine computergestützte Signalpeptidvorhersage (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) charakterisiert dieses Signalpeptid auch tatsächlich als typisch für Gram-positive Bakterien, während das Signalpeptid der StmPr1-Protease (27 Aminosäuren lang) auf diese Weise als typisch für Gram-negative Bakterien befunden wurde. Es ist also nicht unwahrscheinlich, dass dies der Grund für die vergleichsweise geringe Produktionsrate der StmPr2-Protease in *E. coli* ist [100,101]. Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass die rekombinante StmPr2-Protease toxisch auf die *E. coli*-Bakterien wirkt und die Proteinproduktion deshalb gering gehalten wird. Eine solche Wirkung ist für die Serin-Protease von *Aquifex pyrophilus* beschrieben, die aufgrund ihrer Toxizität nur in sehr geringen Mengen durch das Wirtsbakterium in der aktiven Form hergestellt wird [102]. Für die Protease von *X. campestris*, welche eine hohe Sequenz-Homologie zur StmPr2-Protease aufweist (vergl. Abb.4.2), war es überhaupt nicht möglich, ein stabiles Expressionssystem zu etablieren [103].

Die Charakterisierung der bakteriell produzierten Proteasen wurde allerdings durch eine weitere Veränderung der Proteinstruktur erschwert, welche sich am ehesten durch eine C-terminale Verkürzung ("Trunkierung") erklären ließ. Dieses Phänomen wurde für beide *St. maltophilia*-Proteasen beobachtet und am Beispiel der StmPr1-Protease näher untersucht. Letztere ging im Verlauf der Reinigung von einer 55 kDa in eine 47 kDa-Form über, also die Form, welche auch aus den nativen *St. maltophilia*-Kulturüberständen isoliert worden war.

Eine solche C-terminale Trunkierung ist ebenfalls für die *D. nodosus*-Protease beschrieben worden [90]; funktionelle Untersuchungen liegen dazu jedoch nicht vor. Dagegen wurde die Funktion des C-Terminus und seine Abspaltung im Fall des Aqualysin I von *Thermus aquaticus* ausführlich untersucht [89]: Das WT-Protein wird ebenso wie die meisten Subtilasen ins Medium abgegeben und erst dort durch Autoproteolyse des Pro-Peptids aktiviert. Bei C-terminal trunkierten Deletionsmutanten von Aqualysin I wurde bereits im Zytoplasma der Bakterien proteolytische Aktivität festgestellt. Diese Beobachtung veranlasste die Autoren zu der Vermutung, dass die C-terminale Extension die Aktivierung des Enzyms im Zytoplasma verhindert; weiterhin könnte der C-Terminus die Translokation und Verankerung an der äußeren Membran vermitteln, da proteolytische Aktivität nur dort detektiert wurde. Eine solche Funktion ist für die C-terminalen Peptide der StmPr-Proteasen unwahrscheinlich, weil sich die aktiven Proteasen aus zellfreien Bakterien-Überständen isolieren ließen.

Während das Phänomen der C-terminalen Prozessierung eines Proteins die Erklärung seiner physiologischen Funktion erschwert, könnte es jedoch von praktischem Nutzen sein, dann nämlich, wenn die Kristallisation dieses Proteins beabsichtigt ist. Die Verkleinerung des Moleküls kann dabei per se als Vorteil angesehen werden; zudem ist es möglich, dass die Abspaltung eines Teils der Polypeptidkette - quasi an einer "Sollbruchstelle" - eine distinkte Domäne kompakterer Struktur hinterlässt. Es gibt zahlreiche Beispiele für die Beobachtung, dass erst die Verkleinerung eines Proteins die Kristallisation der funktionell wesentlichen Domäne ermöglicht [104]. Für Kristallisationsversuche im Rahmen dieser Arbeit wurden dementsprechend solche C-terminal trunkierten Proteine der StmPr1-Protease verwendet. Trotzdem gelang es nicht, röntgen-taugliche Kristalle zu erhalten. Wenn es auch im Bereich dieser eher empirisch als logisch anzusehenden Methode der Kristallzüchtung viele Gründe für ausbleibenden Erfolg geben mag, so ließ sich im Fall der StmPr1-Protease zumindest ein mögliches Hindernis für gleichmäßiges Kristallwachstum ermitteln: Die Auto-Proteolyse dieses Proteins erfolgt offenbar nicht an einer einzigen eindeutigen Position, sondern hinterlässt - wie C-terminales Ansequenzieren ergab - unterschiedliche Produkte. Eine solche Mikroheterogenität der Proteinpräparation wird allgemein als Kristallisationshindernis betrachtet [56]. Wenn es der zeitliche Rahmen dieser Arbeit erlaubt hätte, wäre die Umgehung dieses Problems durch rekombinante Expression eines entsprechend verkürzten Proteins ein folgerichtiger nächster Schritt gewesen.

Vergleich der biochemischen Eigenschaften der *St. maltophilia*-Proteasen

Nachdem die neue StmPr1-Protease bereits biochemisch als alkalische Serin-Protease charakterisiert worden war [13], war es interessant zu untersuchen, in welchen Parametern sich diese durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entdeckte StmPr2-Protease unterscheidet. Man kann davon ausgehen, dass Mikroorganismen unterschiedliche proteolytische Enzyme produzieren, um Nahrungsquellen in verschiedenen Milieus aufzuschließen [16,105]; entsprechend sollten sich die den jeweiligen Umgebungen angepasste Proteasen in bestimmten Eigenschaften unterscheiden. Das scheint auch für die beiden *St. maltophilia*-Proteasen zu gelten; zumindest ließen sich signifikante Unterschiede in den als optimal ermittelten Reaktionsbedingungen sowie in enzymkinetischen Parametern und Substratspezifitäten finden.

Beim Vergleich der pH-Wert-Abhängigkeiten fällt auf, dass die StmPr2-Protease ein ausgeprägteres Optimum bei pH 7 aufweist, während die StmPr1-Protease über einen breiteren Bereich zwischen pH 8 und 9, 5 ihre höchste Aktivität zeigt. Da StmPr1 eine höhere spezifische Enzymaktivität besitzt, ist sie in der Lage, auch im neutralen Bereich der StmPr2-Protease eine absolut vergleichbare Wirkung zu erzielen. Das ist in der Abbildung 4.3 durch die in diesem Bereich fast deckungsgleichen Kurven ersichtlich.

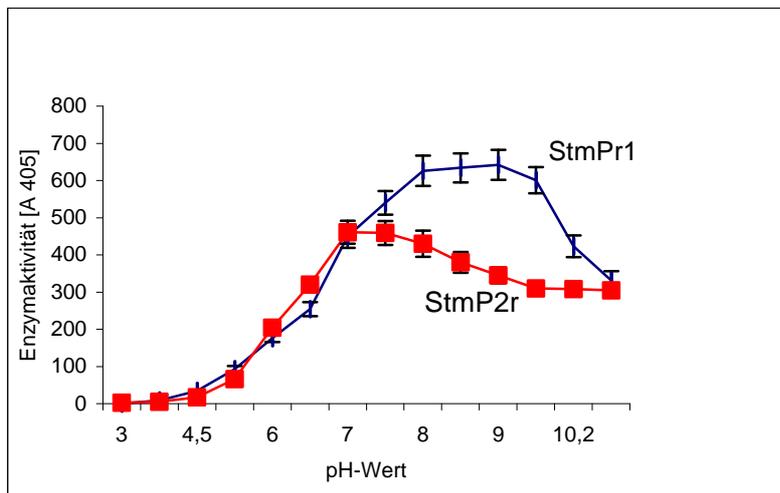


Abbildung 4.3 pH Optimum von StmPr1 und StmPr2

Die StmPr1-Protease scheint damit das Enzym mit dem breiteren Wirkungsspektrum zu sein.

Unterschiede zwischen beiden *St. maltophilia*-Proteasen zeigten sich auch in der Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Präsenz anorganischer Salze. Wie auch für zahlreiche andere Proteasen beschrieben, werden beide Enzyme durch hohe Konzentrationen von Natriumchlorid oder auch durch Calciumchlorid stark stimuliert.

StmPr1 ist bis zu 260% durch NaCl stimulierbar und erreicht bei 400 mM die maximale Enzymaktivität. Durch CaCl₂ ist die Enzymaktivität um 150% stimulierbar und das Maximum ist bereits bei 50 mM erreicht. Die Salz-Stimulierbarkeit der Enzymaktivität von StmPr2 zeigt dagegen einen anderen Verlauf: Dieses Enzym wird durch beide getesteten Salze ähnlich stark (bis zu etwa 100 %) stimuliert und die maximal erreichte Enzymaktivität liegt bei ca. 175 mM NaCl oder CaCl₂ (Abb. 4.4).

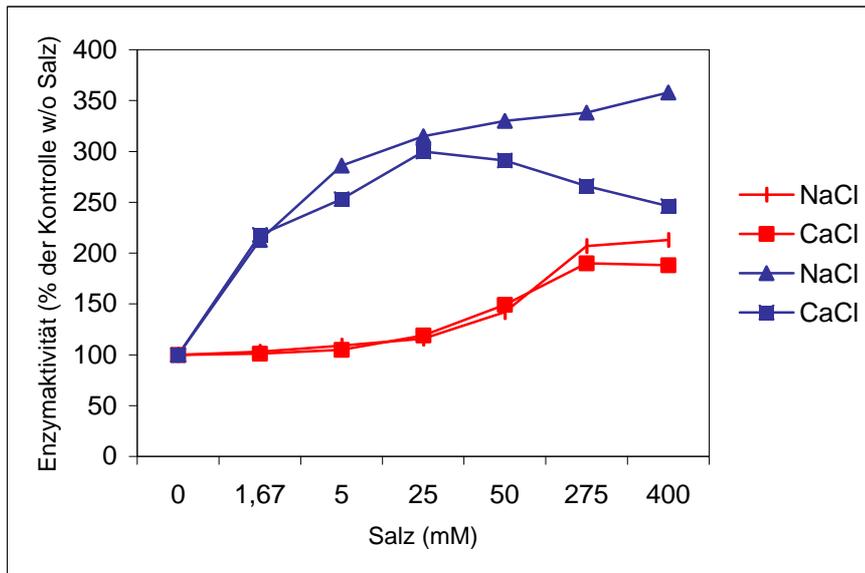


Abbildung 4.4 Salz-Optimum von StmPr1 und StmPr2

Die Substratspezifitäten der *St. maltophilia*-Proteasen wurden in dieser Arbeit an einem für diese Zwecke gebräuchlichen Modellsubstrat, nämlich der oxidierten Insulin-B-Kette, untersucht. Dabei zeigten sich nur geringfügige Unterschiede (Abbildung 4.5): Beide Proteasen haben offenbar eine breite Substratspezifität, indem sie sowohl neben hydrophoben und hydrophilen Reste spalten. Nur im N-terminalen Fragment der Insulin B-Kette gibt es für das jeweilige Enzym eine bzw. zwei charakteristische Schnittstellen. Es ist außerdem ersichtlich, dass keine der *St. maltophilia*-Proteasen das gleiche Spezifitätsmuster wie Subtilisin BPN' [106] aufweist.

StmPr2

F₁-V₂-N₃-Q₄-H₅-L₆-C₇-G₈-S₉-H₁₀-L₁₁-V₁₂-E₁₃-A₁₄-L₁₅-Y₁₆-L₁₇-V₁₈-C₁₉-G₂₀-E₂₁-R₂₂-G₂₃-F₂₄-F₂₅Y₂₆T₂₇-P₂₈-K₂₉-A₃₀

StmPr1

F₁-V₂-N₃-Q₄-H₅-L₆-C₇-G₈-S₉-H₁₀-L₁₁-V₁₂-E₁₃-A₁₄-L₁₅-Y₁₆-L₁₇-V₁₈-C₁₉-G₂₀-E₂₁-R₂₂-G₂₃-F₂₄-F₂₅Y₂₆T₂₇-P₂₈-K₂₉-A₃₀

Subtilisin BPN'

F₁-V₂-N₃-Q₄-H₅-L₆-C₇-G₈-S₉-H₁₀-L₁₁-V₁₂-E₁₃-A₁₄-L₁₅-Y₁₆-L₁₇-V₁₈-C₁₉-G₂₀-E₂₁-R₂₂-G₂₃-F₂₄-F₂₅Y₂₆T₂₇-P₂₈-K₂₉-A₃₀

Abbildung 4.5 Schnittstellen in der oxidierten Insulin B Kette, erzeugt durch die jeweiligen Proteasen (rot markiert). Dicke und dünne Pfeile repräsentieren die identifizierten proteolytischen Peptide in starken oder schwachen Mengen.

Weiterhin wurden die beiden StmPr-Proteasen unter Einsatz zahlreicher Substratpeptide unterschiedlicher Sequenz hinsichtlich ihrer Spezifität genauer verglichen. Dabei betrachtet man die vier Aminosäuren, welche auf die Position der zu spaltenden Amidbindung in den Modellsubstraten folgen (P₁-P₄-Spezifität). Zur Bestimmung der P₁-P₄-Spezifität wurden kinetische Messungen zur Berechnung der Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_m) durchgeführt, deren Ergebnisse eine ungefähre Aussage über die Ladung und Größe der an der Katalyse beteiligten Aminosäuren zulassen (vergleiche theoretische Grundlagen). Man kann dann eine Reihenfolge von in der jeweiligen Position bevorzugten Aminosäuren aufstellen.

Der Vergleich der P₁-Spezifitäten zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen beiden StmPr-Proteasen:

P₁-Spezifität

StmPr1 **Lys** > Phe > Leu = Ile > Ala = Arg > Orn > Asp > Glu > Val

StmPr2 Phe > Ala > Ile > Lys > Leu > Arg > Asp > Val > Orn > Glu

Anders als StmPr2 bevorzugt StmPr1 ein positiv geladenes Lysin in der Position 1 und unterscheidet sich damit deutlich von anderen Subtilasen (Subtilisin BPN, Savinase, Esperase etc.), welche - wie auch StmPr2 - vornehmlich Substrate mit aromatischen Resten proteolysieren. Offenbar ist die betreffende Bindungsstelle am StmPr1-Protein (S₁-subsite) negativ geladen, etwa aufgrund einer hier lokalisierten Carbonylgruppe. Möglicherweise befindet sich hier die negative Ladung in einer tieferen Spalte; denn eine Verkürzung der Kette um eine CH₂-Gruppe wie im Fall von Ornitin verringert den katalytischen Effekt drastisch. Generell zeigt StmPr1 eine eher Trypsin-ähnliche und weniger Subtilisin-ähnliche P₁-Spezifität. Demgegenüber steht StmPr2 in dieser Hinsicht den Subtilisinen näher.

Die Auswertung der P₃-Spezifität von StmPr1 ergab, dass keine ausgeprägte Selektivität für Substrate, die sich in den Aminosäuren in P₃-Position unterscheiden, besteht, bevorzugt werden aber Leucin und Glycin in dieser Position proteolysiert.

P₃-Spezifität

StmPr1 Leu > Gly > Phe = Ala

StmPr2 Phe > Leu > Gly > Glu

Aus den geringen zahlenmäßigen Differenzen in den Spezifitätskonstanten der getesteten vier Substrate lässt sich auf eine geringe Spezifität dieser S₃-subsite schließen. Dies trifft für beide StmPr-Proteasen zu. Möglicherweise liegen diese Teile der Substrat-Bindungsstelle an den jeweiligen Protein-Oberflächen. Die Subtilisintypische Präferenz für die aromatische Gruppe von Phenylalanin in der P₄-Position ist für keine der *St. maltophilia*-Proteasen ausgeprägt:

P₄-Spezifität

StmPr1 Ala = Phe

StmPr2 Ala > Phe

Insgesamt zeigen diese Untersuchungen gewisse Unterschiede zwischen den beiden StmPr-Proteasen, wobei die StmPr2-Protease eher den klassischen Subtilasen verwandt ist. Es fällt außerdem auf, dass die StmPr1-Protease das generell "effektivere" Enzym ist. Als Maß für diese Effektivität kann man den Quotienten aus Wechselzahl und Michaelis-Menten-Konstante, die bereits oben erwähnte Spezifitätskonstante heranziehen. Dieser Wert ist bei der StmPr1-Protease signifikant höher als bei dem StmPr2-Enzym, wenn man das jeweils günstigste Substrat einsetzt:

StmPr1	Suc-Ala-Leu-Pro-Lys-pNA	$K_m = 0,5 \text{ mM}$, $k_{cat} = 92 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 178$
StmPr2	Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA	$K_m = 0,2 \text{ mM}$, $k_{cat} = 9 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m = 40$

Es ist ersichtlich, dass die Affinität der StmPr2-Protease zu ihrem favorisierten Substrat höher ist als im Fall der StmPr1-Protease, welche das Substrat aber wesentlich effektiver umsetzt. Insgesamt ist die Spezifitätskonstante (k_{cat}/K_m) für das jeweils favorisierte Substrat für StmPr1 4,5 mal höher als für StmPr2.

Die enzymkinetischen Daten sowie die Produktionsrate (StmPr1:StmPr2 = 10:1) der beiden Proteasen geben Hinweise auf die Bedeutung der Proteasen für *St. maltophilia*: Die StmPr1-Protease wird nicht nur in deutlich größeren Mengen hergestellt, sondern weist auch eine höhere spezifische Enzymaktivität als die StmPr2-Protease auf. Deshalb ist zu vermuten, dass StmPr2 eine vergleichsweise untergeordnete Bedeutung für die Bakterien hat. Allerdings lässt sich auch nicht ausschließen, dass die gefundenen Unterschiede hinsichtlich der optimalen Reaktionsbedingungen für die Enzymaktivität (pH, Salze) auf eine mögliche Rolle bei der Anpassung der Bakterien an unterschiedliche Milieus zurückzuführen sind; dann sollte eine Regulation der jeweiligen Protease-Produktion in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen erfolgen. Unter den hier untersuchten Bedingungen lässt sich aber eher spekulieren, dass die StmPr1-Protease die evolutionäre Fortentwicklung [vergl. 107] eines älteren, weniger effektiven Enzyms darstellt, welches durch StmPr2 repräsentiert würde.

St. maltophilia-Proteasen - ein möglicher Pathogenitätsfaktor?

Es stellt sich nun die Frage nach der Bedeutung dieser von *St. maltophilia* produzierten Proteasen für das Krankheitsgeschehen in infizierten Patienten. Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass zumindest prinzipiell eine proteolytische Schädigung im Serum eines Menschen möglich ist:

Beide bakteriellen Proteasen werden nicht durch die im Serum vorherrschenden Protease-Inhibitoren α -1-Makroglobulin und α -1-Antitrypsin gehemmt; außerdem werden Immunglobuline degradiert, wodurch Abwehrmechanismen des Wirts unterlaufen werden können [108,109]. Die Ausbreitung der Bakterien im Gewebe kann durch die Degradierung des Adhäsionsproteins Fibronectin begünstigt werden. Nicht zuletzt werden zelluläre Reparaturmechanismen durch den Abbau von Blutgerinnungsfaktoren gestört [110]. Diese experimentellen Befunde sprechen zwar für ein pathogenes Potential der StmPr-Proteasen; allerdings ist es unerlässlich, diese *in-vitro* Daten durch *in-vivo*-Versuche zu ergänzen.

Als ein erster Schritt in diese Richtung wurde ein Lungenepithel-Zellkultur-Modell [111,112] verwendet. Dieser Zelltyp wurde gewählt, weil bei *St. maltophilia*-infizierten Patienten hauptsächlich Gewebeläsionen im Atmungstrakt auftraten [5]. Tatsächlich wurden diese Zellen sowohl durch die gereinigte StmPr1-Protease als auch durch Infektion der Kultur mit *St. maltophilia* degradiert. Dieser Effekt trat bezeichnenderweise dann nicht auf, wenn die Kulturen mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten StmPr1-knock-out-Bakterien infiziert wurden. Dieses Ergebnis liefert einen starken Hinweis auf eine maßgebliche Beteiligung der StmPr1-Protease an der Pathogenität des Keims. Außerdem zeigte sich hier, dass die nicht ausgeschaltete StmPr2-Protease - offenbar aufgrund ihrer geringen Expression - die schädigende Wirkung von StmPr1 nicht kompensieren konnte.

Auch andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die von ihnen untersuchten pathologischen Effekte von Pseudomonaden mit der Produktion definierter Proteasen assoziiert waren: Die Basische Protease von *D. nodosus*, dem Erreger der Huffäule bei Schafen, wird nur von einem virulenten Stamm produziert [113] Protease-knock-out-Mutanten dieses Stammes zeigten keine Virulenz mehr [114].

Ebenso waren *Xanthomonas campestris*-Bakterien, Erreger des „black rot“ bei Kreuzblütlern, nach funktioneller Störung des Protease-Gens nicht mehr in der Lage Pflanzen zu schädigen [81].

Auch bei humanpathogenen Bakterien wurde das Phänomen von Proteasen als Pathogenitätsfaktor gefunden: Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der weit verbreitete Krankenhauskeim *Pseudomonas aeruginosa*. Diese Pseudomonade ist Verursacher von opportunistischen Infektionen und exprimiert drei unterschiedliche Proteasen [115]. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachten Entzündung der Kornea eine der drei Proteasen (Protease IV) essentiell für die Pathogenese ist. Nachdem zunächst festgestellt worden war, dass dieses Enzym *in-vitro* Immunglobuline, Fibrinogen und Plasminogen abbaut, belegten weitere Experimente mit Protease IV defizienten Mutanten an Ratten die Abhängigkeit der Virulenz des Keims von der Protease-Produktion [116,117]. Entsprechendes wurde auch für die Cystein-Protease des Karies-Erregers *Pseudomonas gingivalis* beschrieben [118].

Es ist also davon auszugehen, dass humanpathogene Effekte von Proteasen bei der Beurteilung bakterieller Infektionen durchaus eine wichtige Rolle spielen können. Damit sollte sich in diesen Fällen die Möglichkeit eröffnen, die schädigenden Wirkungen solcher Proteasen durch spezifische Wirkstoffe gezielt auszuschalten. Gerade bei multiresistenten Erregern wie *St. maltophilia*, deren Infektionen durch Antibiotika schwer beherrschbar sind, ließen sich alternative Therapien mit Protease-Inhibitoren entwickeln; so könnten zumindest Protease-bedingte Gewebeschädigungen wie die bei *St. maltophilia* beobachteten letalen Lungen-Blutungen reduziert oder vermieden werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Proteasen können als Zielproteine (drug targets) für die Entwicklung solcher zukünftigen Wirkstoffe dienen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Palleroni NJ, Bradbury JF (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983 *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 606-609.
2. Kingston General Hospital Infection Control Service; Fact Sheet on *Stenotrophomonas*. *Stenotrophomonas maltophilia*. <http://www.kgh.on.ca/kgh/Infection%20Control/steno.htm>.
3. Lechner JF and Nelson SF (2001) Biclonal bacteremia due to *Stenotrophomonas maltophilia* in a cancer patient. *European J. clinical microbiol.* 5, 120-125.
4. Jones RN (2001) Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest.* 119, 397-404.
5. Beringer PM, Appleman MD (2000) Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr. Opin Pulm. Med.* 6, 545-550.
6. Sefcick A, Tait RC, Wood B (1999) *Stenotrophomonas maltophilia*: an increasing problem in patients with acute leukaemia. *Leuk. Lymphoma.* 35, 207-211.
7. Amano K, Maruyama H, Takeuchi T (1999) Nosocomial pneumonia likely caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in two patients with polymyositis. *Intern. Med.* 38, 910-916.
8. Sattler CA (2000) *Stenotrophomonas maltophilia* infection in children. *Pediatr. Infect Dis. J.* 19, 877-878.
9. Watanabe K (1999) Nosocomial infections due to *Stenotrophomonas maltophilia*. *Intern. Med.* 38, 842-843.
10. Elsner HA, Duhrsen U, Hollwitz B, Kaulfers PM, Hossfeld DK (1997) Fatal pulmonary hemorrhage in patients with acute leukemia and fulminant pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Annals of hematology* 4, 155-61.
11. Ohkoshi Y, Ninomiya H, Mukai HY, Mochizuki N, Hori M, Nagasawa T, Jikuya T, Saida Y (1999) Pseudoaneurysm of the subclavian artery due to *Xanthomonas* pneumonia in a patient with acute myeloid leukemia: its rupture treated by transcatheter coil embolization. *Intern Med.* 38, 671-4.
12. Travis J, Potempa J and Maeda H (1995) Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends in Microbiology* 405, 405-407.
13. Windhorst S, Frank E, Georgieva DN, Genov N, Buck F, Borowski P and Weber W (2002) The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Biol Chem.* 277, 11042-11049.
14. Lilley GG, Stewart DJ and Kortt AA (1992) Amino acid and DNA sequences of an extracellular basic protease of *Dichelobacter nodosus* show that it is a member of the subtilisin family of proteases. *Eur. J. Biochem.* 210, 13-21.
15. Tang JL, Gough CL, Barber CE, Dow JM and Daniels MJ (1987) Molecular cloning of protease gene(s) from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: expression in *Escherichia coli* and role in pathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* 210, 443-448.

16. Siezen RJ and Leunissen JAM (1997) The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein science* 6, 501-523.
17. Bott R und Betzel Ch (Hrsg.) (1996) Subtilisin Enzymes: Practical Protein Engineering. *Plenum Press*, New York.
18. Betzel Ch, Klupsch S, Papendorf G, Hastrup S, Branner S und Wilson KS (1992) Crystal Structure of the Alkaline Proteinase Esperase™ from *Bacillus lentus* at 1.4 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 22, 427-445.
19. Koszelak S, Joseph D Ng, Day J, Tzu Ping K, Greenwood A and Mc Pherson A (1997) The crystallographic structure of the subtilisin protease from *Penicillium cyclopium*. *Biochemistry* 36, 6597-6604.
20. Nonaka T, Fujihashi M, Kita A, Saeki K, Itob S and Mikia K (2001) Crystallization and preliminary x-ray diffraction studies of a novel alkaline serine protease (KP-43) from alkaliphilic bacillus sp. Strain KSM-KP 43. *Int. Union of Crystallography* 57, 717-718.
21. Branner S, Hastrup S, Olsen O, Norskov-Lauritsen L, Simonsen M, Aaslyng D, Casteleijn E, Egmond M und Haverkamp J (1991) A mutated subtilisin protease. *Int. Appl.*, page 99. Patent WO 9100345.
22. Polgár, L. (1987) Structure and function of serine proteases. In: *Hydrolytic Enzymes*, Neuberger, A. und Brocklehurst, K. (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam, 159-200.
23. Barret AJ, Rawlings ND (1995) Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem. Biophys.* 318, 247-250.
24. Rawlings ND, Barret AJ (1994) Families of serine peptidases. *Methods Enzymol.* 244, 19-61.
25. Blow D (1976) Structure and Mechanism of Chymotrypsin. *Accounts Chem. Res.* 9, 145-152.
26. Warshel A, Naray-Szabo G, Sussman, F und Hwang JK (1989) How Do Serine Proteases Really Work? *Biochemistry* 28, 3629-3637.
27. Huber R, Bode W (1978) Basics of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.* 11, 114-122.
28. Stubbs MT, Oschikinat H, Bode W (1992) The interaction of Thrombin with Fibrinogen – A structural basis for its specificity. *Eur. J. Biochem.* 206, 187-195.
29. Siezen RJ und Leunissen JAM (1991) Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine-proteases. *Protein Eng.* 4, 719-737.
30. Wright CS, Alden RA und Kraut J (1969) Structure of subtilisin BPN´ at 2.5 Å resolution. *Nature* 221, 235-242.
31. Neidhart DJ, Petsko GA (1988) The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2.5 Å resolution. *Protein-Eng.* 4, 271-6.
32. Teplyakov AV, Kuranova IP, Harutyunyan EH, Vainshtein BK, Frömmel C, Höhne WE und Wilson KS (1990) Crystal structure of Thermitase at 1.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 214, 261-279.
33. Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H (1974) Proteinase K from *Titirachum album* Limber. *Eur. J. Bioch.* 47, 91-97.

34. Voordouw G, Milo C und Roche RS (1976) The role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. Separation of intrinsic and calcium ion contributions to the kinetic thermal stability. *Biochemistry* 15, 3716-3724.
35. Kwon YT, Terada L, Matsuzawa H, Ohta T (1991) Nucleotide sequence of the gene for aqualysin 1 (a thermophilic alkaline serine-protease of *Thermus aquaticus* YT- and characteristics of the deduced primary structure) *Eur. J. Biochem.* 173, 491-497.
36. Davail S, Feller G, Narinx E, Gerday C (1994) Cold adaptation of proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 17448-17453.
37. Burley SK und Petsko GA (1985) Aromatic-Aromatic Interaction: A Mechanism of Protein Structure Stabilization. *Science* 229, 23-28.
38. Georgieva DN, Stoeva S, Voelter W, Genov N, Betzel C (2001) Substrate specificity of the highly alkalophilic bacterial proteinase esperase: Relation to the X-ray structure. *Current microbiol.* 42, 368-371.
39. Burrage S, Raynham T, Williams TG, Essex JW, Allen C, Cardno M, Swali V, Bradley M (2000) Biomimetic synthesis of lantibiotics. *Chemistry A European Journal.* 6, 1455-1466.
40. Barr PJ (1991) Mammalian subtilisins: The long sought dibasic endopeptidases. *Cell* 66, 1-3.
41. Van de VV, Voorberg J, Fontijn R, Pannekoek H, Ouweland AMV, Siezen RJ (1990) Furin is a subtilisin like proprotein processing enzyme in higher eucaryot. *Mol. Biol. Rep.* 14, 265-275.
42. de Vos WM, Voorhorst WG, Dijkgraaf M, Kluskens LD, Van der Oost J, Siezen RJ (2001) Purification, characterization, and molecular modeling of pyrolysin and other extracellular thermostable serine proteases from hyperthermophilic microorganisms. *Methods-Enzymol.* 330, 383-93.
43. Sparling PF (1983) Bacterial Virulence and pathogenesis: An Overview. *Rev. of infectious diseases* 5, 123-130.
44. Leigh L, Spencer A, Wise A, Kim S (2002) Identification and Functional Mapping of the *Mycoplasma fermentans* P29 Adhesin. *Infect Immun.* 70, 4925-30.
45. Craven DE, Pepler MS, Frasch CE, Mocca LF, McGrath PP (1980) Adherence of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and carriers to human buccal epithelial cells. *J. infect. Dis.* 142, 556-68.
46. Elleman TC, Hoyne PA, Emery DL, Stewart DJ and Clark BL (1984) Isolation of the gene encoding pilin of *Bacteroides nodosus* (strain 198), the causal organism of ovine footrot. *Elsevier science publishers b.V* 173, 124-128.
47. Plaut AG, Gilbert JV, Wistar R Jr. (1977) Loss of antibody activity in human immunoglobulin A exposed to extracellular immunoglobulin A-proteases of *Neisseria gonorrhoeae* and *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun.* 17, 130-135.
48. Goren MB (1977) Phagocytosis lysosomes; interaction with infectious agents, phagosomes, and experimental perturbations in functions. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 507-33.
49. Marre, Mertens, Trautmann, Vanek (2000) *Klinische Infektologie Urban und Fischer München Jena* 119-141.

50. Mims C, Dimmock N, Nash A, Stephen M (1995) *J Mim's Pathogenesis of Infectious Diseases*, 4th ed. *Academic Press*, London.
51. Alouf JE, Freer J (eds.) *Sourcebook of Bacterial Toxins Academic Press, London 1991.*
52. Pinghui VL (1974) Extracellular Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect Dis.* 30, 94-99.
53. Kumar A, Nguyen KT, Srivathsan S, Ornstein B, Turley S, Hirsh I, Pei D, Hol WG (2002) Crystals of peptide deformylase from *Plasmodium falciparum* reveal critical characteristics of the active site for drug design. *Structure (Camb)* 10, 357-67.
54. Stoffler D, Sanner MF, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS (2002) Evolutionary analysis of HIV-1 protease inhibitors: Methods for design of inhibitors that evade resistance. *Proteins* 48, 63-74.
55. Ollis D, White S (1990) Protein Crystallization *Methods in Enzymology* 182, 646-660.
56. McPherson A, Malkin AJ, Kuznetsov YG. (1995) The science of macromolecular crystallization. *Structure* 5, 759-68. Review.
57. Giard E (1973) Human lung carcinoma cell: A 549. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 417-1423.
58. Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987) XL-1 blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escheria coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* 5, 376.
59. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequence of the M13mp and PUC19 vectors. *Gene* 33, 103.
60. Studier FW, Moffatt BA. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 5, 113-130.
61. Boethling RS (1975) Purification and properties of a serine protease from *Pseudomonas maltophilia*. *J. of bacteriology* 3, 933-941.
62. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
63. Storm DR and Strominger JL (1973) Binding of bacitracin to cells and protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus*. *Biol Chem.* 249, 1823-1827.
64. Masiarz FR, Malcolm BA. (1994) Rapid determination of endoprotease specificity using peptide mixtures and Edman degradation analysis. *Methods*
65. Shively JE. (2000) The chemistry of protein sequence analysis. *EXS.* 88, 99-117. Review.
66. Sambrook J, Fritsch M, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition *Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.*
67. Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-17.
68. Mullis KB, Falloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzym.* 155, 335-350.

69. Itoh N, Kouzai T, and Koide Y (1994) Efficient transformation of pseudomonas strains with pNI vectors by electroporation. *Biosci. Biotech Biochem.* 58, 1306-1308.
70. Johnson R Spiegelman B, Hanahan D, Wisdom R (1996) Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol. Cell Biol.* 16, 4504-4511.
71. Tsujibo H, Miyamoto K, Tanaka K, Kaidzu Y, Imada C, Okami Y, Inamori Y (1996) Cloning and sequence analysis of a protease-encoding gene from the marine bacterium *Alteromonas sp.* strain O-7. *Biosci Biotechnol Biochem.* 60, 1284-1288.
72. Oshima K, Mukai Y, Kikuchi M (1997) Clonal integration and expression of human T-cell lymphotropic virus type I in carriers detected by polymerase chain reaction and inverse PCR. *Americ, J. Hematol.* 54, 306-312.
73. Joshi L, Steger RJ, Roberts DW (1997) Isolation of a cDNA encoding a novel subtilisin-like protease (Pr1B) from the entomopathic fungus, *Metarhizium anisopliae* using differential display RT-PCR. *Gene* 197, 1-8.
74. Gassen HG, Minol K (1996) Gentechnik 4th ed *Gustav Fischer* Stuttgart Jena.
75. Scherer GFE, Walkinshaw MD, Arnott S and Morr  DJ (1980) The ribosome binding sites recognized by *E. coli* ribosomes have regions with signal character in both the leader and protein coding segments. *Nucleic Acids Res.* 8, 3895-3907.
76. Kozak M (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryote, and organelles. *Microbiol Rev* 35, 11-45.
77. Stormo GD, Schneider, TD and Gold L (1982) Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 10, 2971-2995.
78. Dolaschka P, Genov N, Ermer A, Peters K und Fittkau S (1993) Kinetik characterization of alkaline mesentericopeptidase. Comparison with serin proteinases from different origins. *Int. J. Peptide Protein Res.* 42, 560-564.
79. Eder J, Rheinnecker M and Fersht AR (1993) Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence. *J. Mol. Biol.* 233, 293-304.
80. Ikemura H and Inouye M (1988) In vitro processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 12959-12963.
81. Dow JM, Fan MJ, Newman MA, Daniels MJ (1993) Differential expression of conserved protease genes in crucifer-attacking pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Environ Microbiol.* 59, 3996-4003.
82. Jahreis G, Smalla K und Fittkau S (1986) Synthese von substratanalogen Peptidchlormethylketonen als potentielle irreversible Enzyminhibitoren. *J. prakt. Chem.* 328, 529-538.
83. Abraham LD, Breuil C. (1996) Isolation and characterization of a subtilisin-like serine proteinase secreted by the sap-staining fungus *Ophiostoma piceae*. *Enzyme Microb. Technol.* 18, 133-40.
84. Schechter I, Berger A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 20, 157-62.

85. Domon B, Alving K, He T, Ryan TE, Patterson SD. (2002) Enabling parallel protein analysis through mass spectrometry. *Curr. Opin. Mol Ther.* 4, 577-86. Review.
86. Matern S, Liomin E, Gerok W (1976) Gaschromatographie und Gaschromatographie-Massenspektroskopie Aminosäuren im Serum von Patienten mit alkoholischer Lebercirrhose. *Verh Dtsch Ges Inn Med.* 82, 325-8.
87. Sengelov G, Jessen Kristensen K, Sorensen A.H, Soren NK, Sorensen J (2001) Effect of genomic location on horizontal transfer of a recombinant gene cassette between pseudomonas strains in the rhizosphere and spermosphere of barley seedlings. *Current Microbiol.* 42, 160-16.
88. Stryer L (1991) Biochemie Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford 4th ed.
89. Lee Y-C, Terada TO Matzuzawa (1996) Roles of the N- and C-terminal prosequences of aqualysin precursor in the processing and extracellular secretion of the enzyme. In Bott und Betzel *Plenum Press New York* 155-157.
90. Kortt AA, Caldwell JB, Lilley GG, Edwards R, Vaughan J and Stewart DJ (1994) Characterization of a basic serine proteinase (pI 9.5) secreted by virulent strains of *Dichelobacter nodosus* and identification of a distinct, but closely related, proteinase secreted by benign strains. *Bioch.* 299, 521-525.
91. Yoshimoto T, Oyama H, Honda T, Tone H, Takeshita T, Kamiyama T, Tsuru D (1988) Cloning and expression of subtilisin amylosacchariticus gene. *S. J. Biochem.(Tokyo).* 103, 1060-1066.
92. Zappe H, Blatch GL, Woods DR (1992) Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase and *Vibrio alginolyticus* protease A fusion genes. *J. Gen. Microbiol.* 138, 319-27.
93. Zhu X, Otha, Y, Jordan F und Inouye M (1989) Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature (London)* 339 483-484.
94. Gallagher T, Gilliland G, Wang L und Bryan P (1995) The prosegment-subtilisin BPN complex: crystal structure of a specific "foldase". *Structure* 3, 907-914.
95. Otha Y, Hojo H, Aimoto S, Tobayashi T, Jordan F und Inouye M (1991) Pro-Peptide as an intermolecular chaperone - renaturation of denatured subtilisin-E with a synthetic pro-peptide. *Mol. Microbiol.* 5, 1507-1510.
96. Takase K, Higashi T, Omura T. (2002) Aggregate formation and the structure of the aggregates of disulfide-reduced proteins. *J. Protein. Chem.* 21, 427-33.
97. Vaughan PR, Wang LF, Stewart DJ, Lilley GG, Kortt AA (1994) Expression in *Escherichia coli* of the extracellular basic protease from *Dichelobacter nodosus*. *Microbiology* 140, 2093-100.
98. Wang L-F, Kortt AA and Stewart DJ (1993) Use of a Gram - signal peptide for protein secretion by Gram hosts: basic protease of *Dichelobacter nodosus* is produced and secreted by *Bacillus subtilis*. *Gene* 311, 97-102.
99. David V, Deutsch A, Durham DR (1992) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the extracellular neutral protease, vibriolysin, of *Vibrio proteolyticus*. *Gene* 112, 107-112.

100. Wickner W, Driessen AJ, Hartl FU (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu Rev Biochem.* 60, 101-124.
101. Sung CY, Gennity JM, Pollitt NS, Inouye M (1992) Secretion defect caused by an acidic amino terminus. *J. Biol. Chem.* 267, 997-1000.
102. Choi IG, Bang WG, Yu YG (1999) Extremely thermostable serin-type protease from *Aquifex pyrophilus*. *J. Biol. Chem.* 274, 881-888.
103. Dow JM, Clarke BR, Milligan DE, Tang JL, Daniels MJ (1990) Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. car the black rot pathogen. *Environ Microbiol.* 56, 2994-8.
104. Bufe A, Betzel C, Schramm G, Petersen A, Becker WM, Schlaak M, Perbandt M, Dauter Z & Weber W (1996) Crystallization and preliminary diffraction data of a major pollen allergen: Crystal growth separates a low molecular weight form with elevated biological activity. *J. Biol. Chem.* 271, 27193-6.
105. Hinrichsen LL, Montel MC, Talon R. (1994) Proteolytic and lipolytic activities of *Micrococcus roseus* (65), *Halomonas elongata* (16) and *Vibrio* sp. (168) isolated from Danish bacon curing brines. *Int. J. Food Microbiol.* 22, 115-26.
106. Johanson JT, Ottesen M, Svendsen I, Wybrandt G (1968) Substratspecificity of Subtilisin BPN'. *C.R. Trav Lab Carlsberg* 36, 365-384.
107. Rose T, Di Cera E. (2002) Substrate recognition drives the evolution of serine proteases. *J. Biol. Chem.* 31, 19243-6
108. Maeda H, Molla A, Sakamoto K, Murakami A, Matsumura Y (1989) Cytotoxicity of bacterial proteases in various tumor cells mediated through alpha 2-macroglobulin receptor. *Cancer Res.* 49, 660-664.
109. Salvesen G, Virca GD, Travis J (1983) Interaction of plasma kallikrein with plasma proteinase inhibitors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 156, 121-30.
110. Sack DA, Rhoads M, Molla A, Molla AM, Wahed MA (1982) Carbohydrate malabsorption in infants with rotavirus diarrhea. *Am. J. Clin. Nutr.* 36, 1112-8.
111. De Abreu Vidipó L, De Andrade Marques E, Puchelle E and Plotkowski MC (2001) *Stenotrophomonas maltophilia* interaction with human epithelial respiratory cells *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* 45, 563-569.
112. Cortes G, Alvarez D, Saus C, Alberti S (2002) Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect Immun.* 70, 1075-1080.
113. Department of Agriculture, Pastoral and Veterinary Institute, Hamilton, Victoria, Australia (1984) The thermostability of proteases from virulent and benign strains of *Bacteroides nodosus*. *Vet. Microbiol.* 9, 227-36.
114. Kennan RM, Dhungyel OP, Rood JI (1993) The type IV fimbrial subunit gene (*fimA*) of *Dichelobacter nodosus* is essential for virulence, protease secretion, and natural competence. *Vet. Sci.* 55, 124-129.
115. Nouwens AS, Willcox MD, Walsh BJ, Cordwell SJ. (2002) Proteomic comparison of membrane and extracellular proteins from invasive (PAO1) and cytotoxic (6206) strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics.* 2, 1325-46.

116. Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ (1998) Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 273, 16792-7.
117. Engel LS, Hill JM, Moreau JM, Green LC, Hobden JA, O'Callaghan RJ (1998) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Vis. Sci.* 39, 662-665.
118. Okamoto K, Nakayamama K, Yamamoto K (1998) Involvement of lysine-specific protease in hemoglobin adsorption and heme accumulation in *Prophyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* 33, 21225-21661.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
Amp	Ampicillin
AMV	aviäres myeloblastisches Virus
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cat	Chloramphenicoltransferase
cDNA	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CuSO ₄	Kupfersulfat
ddNTP	Didesoxinukleosid-5'-triphosphat
DEAE	Diethyl-Amino-Ethyl
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DFP	Diisopropylfluoropyrophosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxiribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherechia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
G	Guanosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IEC	Ion-Exchange-Chromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

KJ	Kaliumjodid
Kkat	katalytische Konstante, Wechselzahl (Einheit: 1/sec)
Km	Michaelis-Menten-Konstante
KNa-Tartrat	Kalium-Natrium-Tartrat
M	molar (mol/L)
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NADH	hydriertes Nikotinsäureamidadenindinukleotid
(NH ₄) ₂ HPO ₄	<i>di</i> -Ammoniumhydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NC-Membran	Nitrocellulose
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate Puffered Saline (isotonische Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNA	4-Nitroanilid
PVDF-Membranen	Polyvinylfluorid-Membran
RbCl	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SEC	Size-Exclusion-Chromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>St. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline (isotonische Kochsalzlösung)
TCE	Trichloressigsäure

TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (1 U entspricht 1 μ mol Substratumsatz/min)
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolett
Vmax	maximale Umsatzgeschwindigkeit
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

ANHANG

inhibierende Substanz		Proteasen
Antipain	(N-[N- α -Carbonyl-Arg-Val-Arg-al]-Phe	Serin und Cystein-Proteasen
Aprotinin	Polypeptid aus 58 As	Trypsin-ähnliche Serin-Proteasen
Bestatin	[(2S,2R)-3-Amino-2-hydroxy-4-Phenylbutanoyl]-L-Leucin	Metallo-Proteasen
Chymostatin	(N-[N- α -Carbonyl-Cpd-X-Phe-al]-Phe)	Serin-und Cystein-Proteasen
E-64	Trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino) Butan	Cystein-Proteasen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Ca ₂ ⁺ -Komplexbilder, hemmt Ca ₂ ⁺ -abhängige Enzyme
Leupeptin	(Acetyl-Leu-Leu-Arg-al)	Serin-Cystein-Proteasen
Pepstatin	Isovaleryl-L-val-L-val-statiny-L-ala-statine	Saure Protease inkl. Pepsin
PMSF	(Phenylmethanesulfonylfluorid- α -Toluenesulfonylfluorid)	Serin-Proteasen
TLCK	N- α -p-Tosyl-L-Lysine -Chloromethylketon	Trypsin-ähnliche Serin-Proteasen
DFP	Diisopropylfluoropyrophosphat	Serin-Proteasen

Tabelle 1 verwendete Protease-Inhibitoren

```

1      GTG ATC AAG AAG CAG AAC CTT CGC ATC AAT GTG CTT GCC GCC
42     GCC GTG CTG TCG ATG ACC GCG GTG GGT GCC GTC CAC GCC GCT GGA
86     CTG CCG ACC CGC GAA CCG GTG CGC CAG GCC AGT GCT GCC CAG CCG
131    GGC ACC GAC CGC ATC ATC GTC AAG TAT CGT GCC GGT AGC GCT GCA
176    GCC GGT GAC CGT TCG GCC AAG CTG TCC ACC GTG CAG TCG GCG CTG
221    ACC CGC GCC AGC CTG GCC GGC GGT ACC GCG CGC GCC AGT ACG CTG
266    GGC C/CGCAG GTG GTA CGC CGG CTG GGC GTG GGC GCG GAT GTG ATC
311    GGC CTG CAG GGC CGC CTG GCA CCG GCC GAA CTG CAG CGC GTG CTG
356    AAG GAA CTG AAG GCC GAC CCT GCG GTG CAG TAC GCC GAG GCC GAC
401    GTG AAG CTG CGC CGC AGC GAA CTG CGC GCC GGT GAC GTG CAG CCT
      GCG CTG GCG GCC AAT ATT GAC TTT TAA AAA AGG ATT GAT TCT AAT
      GAA GAA AGC AAC AAG TAA GCC TCC TAA ATT CAC TTT TAG ATA AAA
      ATT TAG GAG GCA TAT CAA ATG AAC TTT AAT AAA ATT GAT TTA GAC
      AAT TGG AAG AGA AAA GAG ATA TTT AAT CAT TAT TTG AAC CAA CAA
      ACG ACT TTT TAG TAT AAC CAC AGA AAT TGA TAT TAG TGT TTT ATA
      CCG AAA CAT AAA ACA AGA AGG ATA TAA ATT TTA CCC TGC ATT TAT
      TTT CTT AGT GAC AAG GGT GAT AAA CTC AAA TAC AGC TTT TAG AAC
      TGG TTA CAA TAG CGA CGG AGA GTT AGG TTA TTG GGA TAA GTT AGA
      GCC ACT TTA TAC AAT TTT TGA TGG TGT ATC TAA ACC ATT CTC TGG
      TAT TTG GAC TCC TGT AAA GAA TGA CTT CAA AGA GTT TTA TGA TTT
      ATA CCT TTC TGA TGT AGA GAA ATA TAA TGG TTC GGG GAA ATT GTT
      TCC CAA AAC ACC TAT ACC TGA AAA TGC TTT TTC TCT TTC TAT TAT
      TCC ATG GAC TTC ATC TAC TGG GTT TAA CTT AAA TAT CAA TAA TAA
      TAG TAA TTA CCT TCT ACC CAT TAT TAC AGC AGG AAA ATT CAT TAA
      TAA AGG TAA TTC AAT ATA TTT GCC GCT ATC TTT ACA GGT ACA TCA
      TTC TGT TTG TGA TGG TTA TCA TGC AGG ATT TGT TAA TAC ATG GGC
1301   ATG GGT GGC ACG TCG ATG GCC TCG CCG CAC GTG GCT GCC GTC GCG
1346   GCA CTG GTG CAG AGC GCG CTG ATC GCC AAG GGC AAG GAT CCG CTG
1391   GCC CCC GCG GCG ATG CGC ACG CTG CTG AAG GAA ACC GCG CGT CCG
1436   TTC CCG GTC AGC ATC CCG ACC GCC ACT CCG ATC GGC ACC GGC ATC
1481   GTC GAC GCC AAG GCG GCG CTG GCC AAG GCA CTG GAA GAG CCG TGC
1526   ACC GAG AAC TGC GGG CCG GTG GCG ACG CCG CTG ACC AAC AAG ACC
1571   GCC GTG GGG GGG CTG AAC GGT ACG GCC GGC AGC AGC CGC CTG TAC
1616   AGC TTC GAG GCA GCC GCC GGA AAG CAG CTC AGC GTG ATC ACC TAC
1661   GGT GGC ACC GGC AAC GTG TCG GTC TAC ATC GCc CAG GGA CGT GAG
1706   CCG AGC GCC AGC GAC AAC GAT GGC AAG TCG ACC CGT CCC GGC ACG
1751   TCC GAA ACG GTA CGG GTG AAC AAG CCG GTG GCA GGC ACC TAC TAC
1796   ATC AAG GTA GTG GGC GAA GCG GCC TAC AAC GGC GTG AGC ATC CTC
1841   GCC ACG CAG TAA GCC TGA CGT GTC

```

Abbildung 1 Insertion des cat-Gens in das StmPr1-Gen. Herstellung des Konstruktes siehe Ergebnisse. Das insertierte cat-Gen (inklusive Promotorbereich) ist rot markiert.

```

1      GTG ATC AAG AAG CAG AAC CTT CGC ATC AAT GTG CTT GCC GCC
42     GCC GTG CTG TCG ATG ACC GCG GTG GGT GCC GTC CAC GCC GCT GGA
86     CTG CCG ACC CGC GAA CCG GTG CGC CAG GCC AGT GCT GCC CAG CCG
131    GGC ACC GAC CGC ATC ATC GTC AAG TAT CGT GCC GGT AGC GCT GCA
176    GCC GGT GAC CGT TCG GCC AAG CTG TCC ACC GTG CAG TCG GCG CTG
221    ACC CGC GCC AGC CTG GCC GGC GGT ACC GCG CGC GCC AGT ACG CTG
266    GGC C/CGCAG GTG GTA CGC CGG CTG GGC GTG GGC GCG GAT GTG ATC
311    CGC CTG CAG GGC CGC CTG GCA CCG GCC GAA CTG CAG CGC GTG CTG
356    AAG GAA CTG AAG GCC GAC CCT GCG GTG CAG TAC GCC GAG GCC GAC
401    GTG AAG CTG CGC CGC AGC GAA CTG CGC GCC GGT GAC GTG CAG CCT
446    GCG CTG GCG CCG AAT GAT CCG TAC TAC CAG CAG TAC CAG TGG CAC
491    CTG CAC AAC GCC ACC GGC GGC ATC AAT GCA CCG TCG GCG TGG GAC
536    GTG TCG CAG GGT GAA GGC GTG GTG GTG GCG GTA CTC GAT ACC GGC
581    ATC CTG CCG CAG CAT CCG GAC CTG GTC GGC AAC CTG CTG GAA GGC
626    TAC GAC TTC ATC AGT GAT GCC GAG ACG TCG CGC CGT GCC ACC AAC
671    GAT CGC GTG CCA GGC GCG CAG GAC TAT GGT GAC TGG GTC GAG AAC
716    GAC AAC GAG TGC TAC ACC GGC TCC GTC GCG GAG GAC AGC TCC TGG
761    CAC GGT ACC CAC GTG GCC GGC ACC GTG GCC GAG CAG ACC AAC AAC
806    GGC GTC GGC ATG GCC GGT GTC GCG CAC AAG GCC AAG GTG CTG CCG
851    GTG CGC GTG CTC GGC AAG TGC GGT GGC TAC CTT TCC GAT ATC GCC
896    GAC GCC ATC ACC TGG GCC TCC GGC GGC ACG GTG GCG GGC GTG CCC
941    GCC AAT GCC AAC CCG GCC GAG GTC ATC AAC ATG AGC CTC GGC GGC
986    AGC GGC AGC TGC GAC GGG ACC TAC CAG GAT GCG ATC AAC GGC GCG
1031   ATC TCG CGG GGC ACC ACC GTG GTC GTG GCC GCA GGC AAC GAG ACC
1076   GAC AAC GCC TCC AAG TAC CGT CCG GCC AGT TGC GAC GGC GTG GTG
1121   ACC GTC GGT GCC ACC CGC ATC ACC GGC GGC ATC ACC TAT TAC TCC
1166   AAC TAC GGC AGC CGC GTG GAC CTG TCC GGT CCG GGC GGT GGC GGC
1211   AGC GTC GAT GGC AAT CCC GGC GGC TAC GTC TGG CAG TCC GGT TCC
1256   GAT GCG GCC ACC ACG CCG GAG TCG GGC AGC TAC AGC TAC ATG GGC
1301   ATG GGT GGC ACG TCG ATG GCC TCG CCG CAC GTG GCT GCC GTC GCG
1346   GCA CTG GTG CAG AGC GCG CTG ATC GCC AAG GGC AAG GAT CCG CTG
1391   GCC CCC GCG GCG ATG CGC ACG CTG CTG AAG GAA ACC GCG CGT CCG
1436   TTC CCG GTC AGC ATC CCG ACC GCC ACT CCG ATC GGC ACC GGC ATC
1481   GTC GAC GCC AAG GCG GCG CTG GCC AAG GCA CTG GAA GAG CCG TGC
1526   ACC GAG AAC TGC GGG CCG GTG GCG ACG CCG CTG ACC AAC AAG ACC
1571   GCC GTG GGG GGG CTG AAC GGT ACG GCC GGC AGC AGC CGC CTG TAC
1616   AGC TTC GAG GCA GCC GCC GGA AAG CAG CTC AGC GTG ATC ACC TAC
1661   GGT GGC ACC GGC AAC GTG TCG GTC TAC ATC GCG CAG GGA CGT GAG
1706   CCG AGC GCC AGC GAC AAC GAT GGC AAG TCG ACC CGT CCC GGC ACG
1751   TCC GAA ACG GTA CGG GTG AAC AAG CCG GTG GCA GGC ACC TAC TAC
1796   ATC AAG GTA GTG GGC GAA GCG GCC TAC AAC GGC GTG AGC ATC CTC
1841   GCC ACG CAG TAA GCC TGA CGT GTC

```

Abbildung 2 DIG-markierte Sonde in der DNA-Sequenz StmPr1. Der Nucleotidbereich des StmPr1-Gens der mit DIG markiert wurde ist kursiv und fett gedruckt. Die Erkennungssequenz für *Apa I* ist rot dargestellt und die Schnittstelle (GGG CC/C) durch einen Querstrich eingetragen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1999 bis Januar 2002 im Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie (IMBM) am UKE durchgeführt.

Für die Überlassung des interessanten Themas danke ich PD Dr. Wolfgang Weber. Außerdem möchte ich mich herzlich für die anregenden Diskussionen und die intensive Betreuung während der Anfertigung der Dissertationsschrift bedanken.

Prof. Dr. Peter Fortnagel möchte ich für die Betreuung dieser Arbeit und sein förderndes Interesse danken.

Dr. Fritz Buck und seinen technischen Angestellten Sönke und Agata danke ich sehr herzlich für die Diskussionsfreude und den Rat in vielerlei Hinsicht.

Ganz besonders möchte ich all meinen Mitarbeitern am IMBM danken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Schließlich gilt mein ganz großer Dank meiner Familie für das Zugeständnis meiner ständigen Abwesenheit und ihr Verständnis dafür!