

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.