

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. rer. nat. habil. T. Hollemann)

**Untersuchungen zur Substrat- und Spaltspezifität einer
insulinspaltenden Membranprotease (ICMP, Imelysin) von
Pseudomonas aeruginosa und einer caseinspaltenden Membranprotease
(CCMP, Camelysin) von *Bacillus cereus***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Katharina Dröbler, geb. Kruse
geboren am 29.06.1975 in Bleicherode

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. habil. T. Hollemann
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. U. Lendeckel
3. Prof. Dr. med. habil. P. Bohley

02.11.2010

18.03.2011

REFERAT

Zielsetzung: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Substrat- und Spaltspezifität einer insulinspaltenden Membranprotease von *Pseudomonas aeruginosa* (Imelysin, ICMP) und einer caseinspaltenden Membranprotease (Camelysin, CCMP) von *Bacillus cereus*, um daraus Aussagen über ihren möglichen Einfluss auf die Pathogenität ableiten zu können.

Methoden: Die Spaltstücke beim Abbau der Insulin A- und B-Kette durch die beiden Enzyme wurden durch Trennung mittels HPLC und massenspektrometrischer Untersuchungen identifiziert. Die Spaltung chromogener und fluorogener Substrate wurde untersucht. Weiterhin wurde die Wirkung der Proteasen auf zahlreiche Proteine getestet und mittels SDS-Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

Ergebnisse: Für die ICMP wurden in der Insulin B-Kette zwei primäre und zwei sekundäre Spaltstellen gefunden, bei denen sich große Aminosäuren mit aromatischen (Tyr, His, Phe) oder sauren Seitenketten (Glu) in der P₁-Position und hydrophobe Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten, mit Ausnahme des Tyrosin in einer der sekundären Spaltstellen, in der P₁'-Position befinden. Von den getesteten p-Nitroanilid-Substraten wurden Substrate von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und Plasminogenaktivator gespalten. Von den getesteten fluorogenen Substraten wurde das Thrombinsubstrat mit der höchsten Aktivität gespalten. Die ICMP besitzt proteolytische Aktivität gegenüber Aktin, Casein, Globin und Laktoferrin. Außerdem fand sich fibrinogenolytische Aktivität mit einem spezifischen Abbau der α - und β -Ketten von Fibrinogen durch die ICMP.

Die CCMP spaltet die Insulin A- und B-Kette. Es fanden sich jeweils vier Spaltstellen, wobei bevorzugt Peptidbindungen zwischen zwei aliphatischen Aminosäuren oder zwischen zwei Aminosäuren mit einer hydrophilen Seitenkette (-OH, -SH, -CONH₂) oder Peptidbindungen zwischen je einer Aminosäure dieser beiden Gruppen gespalten werden. Bei den getesteten fluorogenen Substraten besitzt die CCMP hohe Aktivität gegenüber den Substraten der Matrixmetalloproteasen 2 und 7. Die CCMP führt zu einem Abbau von Aktin, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Antiplasmin, humanem Serumalbumin, Globin, Kollagen Typ I und Laktotferrin. Sie zeigte außerdem fibrinogenolytische und fibrinolytische Aktivität. Mit Plasminogen und Antithrombin III kommt es zur Bildung von unter SDS stabilen Komplexen.

Folgerungen: Als Membranprotease mit fibrinogenolytischer Aktivität könnte die ICMP als Pathogenitätsfaktor von *Pseudomonas aeruginosa* eine Rolle spielen. Für die CCMP ist aufgrund ihrer Substratspezifität und Interaktionen mit Proteinen des Blutgerinnungs- und fibrinolytischen Systems, der Extrazellulärsubstanz und Proteaseinhibitorsystemen eine Bedeutung bei Pathogenität und Ausbreitung von *Bacillus cereus* anzunehmen.

Drößler, Katharina: Untersuchungen zur Substrat- und Spaltspezifität einer insulinspaltenden Membranprotease (ICMP, Imelysin) von *Pseudomonas aeruginosa* und einer caseinspaltenden Membranprotease (CCMP, Camelysin) von *Bacillus cereus*.
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2010

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Proteasen	1
1.1.1 Einteilung von Proteasen	1
1.1.2 Substrat- und Spaltspezifität von Proteasen	2
1.1.3 Sekretion und Funktion von Proteasen	3
1.1.4 Pathogene Wirkungsmechanismen von Bakterienproteasen	5
1.2 Die Bakterienart <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.2.1 Merkmale und Eigenschaften	8
1.2.2 Pathologische Bedeutung	10
1.2.3 Wichtige extrazelluläre <i>Pseudomonas</i> -Proteasen und ihre Bedeutung	12
1.3 Die Bakterienart <i>Bacillus cereus</i>	14
1.3.1 Merkmale und Eigenschaften	14
1.3.2 Pathologische Bedeutung	14
1.3.3 Wichtige <i>Bacillus</i> -Proteasen und ihre Bedeutung	15
1.4 Zielstellung	15
2 Materialien und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.2 Standardmethode zur Enzymreinigung	18
2.2.1 Reinigung der insulinspaltenden Membranprotease (ICMP) von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.2.2 Reinigung der caseinspaltenden Membranprotease (CCMP) von <i>Bacillus cereus</i>	19
2.3. Standardmethoden zur Aktivitätsbestimmung der Proteasen	19
2.3.1 Aktivitätsbestimmung der ICMP	19
2.3.2 Aktivitätsbestimmung der CCMP	20
2.4 Versuche mit Inhibitoren	21
2.4.1 Versuche mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)	22
2.4.2 Versuche mit N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolon (EEDQ)	22
2.5 Untersuchungen zur Spaltspezifität	23
2.5.1 Spaltbedingungen	23

2.5.2	Trennung der Bruchstücke mit High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	23
2.5.3	Identifikation der Bruchstücke durch Massenspektrometrie und N-terminale Sequenzierung	23
2.6	Abbau synthetischer Proteasesubstrate	24
2.6.1	Abbau von chromogenen Proteasesubstraten	24
2.6.2	Abbau von fluorogenen Proteasesubstraten	24
2.7	Enzymkinetische Messungen für die CCMP	27
2.8	Abbau von Proteinen	27
2.8.1	Spaltbedingungen	27
2.8.2	SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.9	Untersuchung des Einflusses der CCMP und ICMP auf die Plasminogenaktivität	30
2.10	Untersuchung des Einflusses der CCMP auf die Antithrombin III - Aktivität	31
2.11	Versuche zur Aktivierung von Progelatinasen durch die CCMP	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Charakterisierung der ICMP von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
3.1.1	Spaltspezifität der ICMP	33
3.1.2	Abbau synthetischer Proteasesubstrate	34
3.1.3	Abbau von Proteinen	36
3.1.4	Interaktionen mit Plasminogen	38
3.1.5	Versuche mit Inhibitoren	39
3.2	Charakterisierung der CCMP von <i>Bacillus cereus</i>	40
3.2.1	Spaltspezifität der CCMP	40
3.2.2	Abbau synthetischer Proteasesubstrate	41
3.2.3	Abbau von Proteinen	44
3.2.4	Versuche zur Aktivierung von Progelatinasen durch die CCMP	48
3.2.5	Interaktionen mit Antithrombin III	49
3.2.6	Interaktionen mit Plasminogen	51
3.2.7	Versuche mit Inhibitoren	52

4	Diskussion	53
4.1	ICMP von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
4.1.1	Vergleich mit anderen insulinspaltenden Enzymen	53
4.1.2	Vergleich mit anderen <i>Pseudomonas</i> -Proteasen	55
4.1.3	Einfluss auf das Gerinnungssystem und das fibrinolytische System	57
4.2	CCMP von <i>Bacillus cereus</i>	58
4.2.1	Vergleich mit anderen Proteasen von <i>Bacillus</i> sp. und Fragilysin	58
4.2.2	Einfluss auf das Gerinnungssystem und das fibrinolytische System	60
4.2.3	Interaktionen mit Proteaseinhibitorsystemen	62
4.2.4	Zusammenhänge mit Matrixmetalloproteasen	62
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
7	Thesen	79

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
AT III	Antithrombin III
Aqua tridest.	Aqua tridestillata
B. cereus	Bacillus cereus
Boc-	Bocyl- (butyloxycarbonyl-)
Bz-	Benzoyl-
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	Cycloadenosinmonophosphat
CAT	Chloramin-T
CCMP	Casein-cleaving membrane protease
Chromozym ® PL	Tos-Gly-Pro-Lys-pNA
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
CRP	C-reaktives Protein
CTFR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnp-	N-2,4-Dinitrophenyl-
Dpa	3-(2,4-)Dinitrophenyl-L-2,3-Diaminopropionsäure
E. coli	Escherichia coli
EC	Enzyme Commission
ECM	Extracellular matrixproteins
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEDQ	N-Ethoxycarbonyl-2-Ethoxy-1,2-Dihydroquinolon

EF	Elongationsfaktor
et al.	et alii
FAGLA	N-(3-[2-furyl]acryloyl)-Gly-Leu-NH ₂
g	Gramm
g	Schwerkraft (bei Angaben zur Zentrifugation)
h	Stunde
HIV	Human immunodeficiency virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
ICMP	Insulin-cleaving membrane protease
IDE	Insulin-degrading enzyme
Ig	Immunglobulin
k_{cat}	Wechselzahl eines Enzyms
K_m	Michaeliskonstante
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LW	Leerwert
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MAC	Membrane attack complex
MBq	Megabecquerel
MCA	7-Methoxycoumarin-4-hydroxyessigsäure
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mM	Millimol pro Liter
µM	Mikromol pro Liter
MMP	Matrixmetalloprotease
mol	Mol
n. b.	nicht bestimmt
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
nkat	Nanokatal
nm	Nanometer

nM	Nanomol pro Liter
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p-CMB	4-Chlormercuribenzoessäure
Pefabloc	4-(2-Aminoethyl)-Benzoylsulfonyl-fluoridhydrochlorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	para-Nitroanilid
PU	Proteolytical unit
PW	Probenwert
R-	Rest
RFU	relative fluorescence unit
S.	Seite
s.	siehe
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SB-12	Sulfobetain (N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammino-1-propansulfat)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sp.	Spezies
subsp.	Subspezies
Suc-	Succinyl-
Tab.	Tabelle
TACE	Tumor necrosis factor- α converting enzyme
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIMP	Tissue inhibitors of matrixmetalloproteases
TNF	Tumornekrosefaktor
t-PA	Tissue-type plasminogen activator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) ₉₋₁₀
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
w/v	weight/volume (Verhältnis Masse zu Volumen)
v/v	volume/volume (Verhältnis Volumen zu Volumen)
vgl.	vergleiche
Z-	Carbobenzoxy-
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Proteasen

Proteasen sind als eiweißspaltende Enzyme ein wesentlicher Bestandteil des Proteinstoffwechsels. Sie sind in jeder lebenden Zelle enthalten und dort in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert. Man findet proteolytische Enzyme im Zytoplasma, in den Lysosomen, im endoplasmatischen Retikulum, in Transportvesikeln, als Membranproteine in der Zellmembran verankert oder in extrazellulären Flüssigkeiten. Sie sind essentielle Bestandteile aller Funktionssysteme von Zellen, Zellverbänden und Organismen aufgrund ihrer Schlüsselstellung im Stoffwechsel der Proteine, welche ubiquitär vorkommende Grundbausteine und Funktionsbestandteile des Lebens sind.

Die Vielfalt innerhalb dieser Enzymgruppe ist sowohl in Bezug auf den Aufbau der Moleküle als auch hinsichtlich ihrer Funktionen enorm. Die Molekülgröße variiert zwischen 20.000 und 800.000 Da. Es gibt kleine monomere Proteasen wie z.B. die lysosomalen Proteasen und viele sekretierte bakterielle Proteasen. Andere Enzyme sind aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzte Oligomere [1].

1.1.1 Einteilung von Proteasen

Bei der Klassifikation von Proteasen stößt man wegen ihrer großen Vielfalt auf Schwierigkeiten. Die allgemein verbindliche Einteilung legt den katalytischen Mechanismus zugrunde. In dieser Nomenklatur des Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) sind unter 3.4. Enzyme mit der Beschreibung „Acting on Peptide Bonds (Peptidases)“ zusammengefasst. Eine umfassende Darstellung aller bekannten Proteasen enthält das „Handbook of Proteolytic Enzymes“, das die Grundlage für das Arbeiten mit Proteasen bildet [2] und verbindlich für die Zuordnung der Proteasen zu den verschiedenen Protease-Familien ist.

Je nach Angriffspunkt des Enzyms unterscheidet man Exopeptidasen (EC 3.4.11.19), die von den Enden des Proteins her spalten, und Endopeptidasen (EC 3.4.21.24 und 3.4.99), die im Inneren des Proteins spalten. Die Exopeptidasen unterteilt man weiterhin in Aminopeptidasen, die ein Protein bzw. Peptid vom freien N-Terminus her abbauen, und Carboxypeptidasen, welche den Abbau am Carboxyende beginnen. Die Endopeptidasen werden entsprechend der Art der katalytisch aktiven Aminosäure-Reste bzw. Metallionen in ihrem aktiven Zentrum in verschiedene Untergruppen (s. Tab. 1) eingeteilt. Eine weitere Unterteilung erfolgt in Clans und Familien [3].

Tab. 1 Klassifikation der Endopeptidasen und typische Vertreter

Untergruppe	Typische Vertreter
Serinendopeptidasen (EC 3.4.21)	Thrombin, Plasmin, Trypsin, Subtilisin
Cysteinendopeptidasen (EC 3.4.22)	Cathepsin B, Papain
Aspartatendopeptidasen (EC 3.4.23)	Pepsin, Cathepsin D
Metalloendopeptidasen (EC 3.4.24)	Kollagenase, Thermolysin, Matrixmetalloproteasen

Manche Endopeptidasen konnten bisher keiner der oben genannten Gruppen zugeordnet werden. Diese sind unter dem Begriff „Peptidasen mit unbekanntem katalytischen Mechanismus“ (EC 3.4.99) zusammengefasst. Die Zuordnung zu einer bestimmten Klasse von Endopeptidasen erfolgt entsprechend der Wirkung von Proteaseinhibitoren auf die Enzymaktivität (s. Tab. 2).

Tab. 2 Inhibitoren von Endoproteasen

Untergruppe	Typische Inhibitoren
Serinproteinasen	Diisopropylfluorophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Benzamidinhydrochlorid, 4-(2-Aminoethyl)-Benzoylsulfonylfluoridhydrochlorid (Pefabloc)
Cysteinproteinasen	Iodacetamid, 4-Chlormercuribenzoessäure (p-CMB)
Aspartatproteinasen	Pepstatin
Metalloproteinasen	Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1,10-Phenanthrolin

Diese Zuordnung entsprechend der Wirkung von Proteaseinhibitoren muss nach Ermittlung der Gensequenzen durch Mutation der potentiell am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäurereste abgesichert werden.

1.1.2 Substrat- und Spaltspezifität von Proteasen

Die Begriffe Substrat- und Spaltspezifität werden in wissenschaftlichen Darstellungen nicht scharf voneinander getrennt. In der englischsprachigen Literatur wird überwiegend der Begriff Substratspezifität (substrate specificity) verwendet. Unter Substratspezifität versteht man die Eigenschaft eines Enzyms, die Reaktion eines bestimmten Substrates bzw. einer bestimmten Substratgruppe zu katalysieren. Die Anforderungen einer Protease an die spaltbare Peptidbindung können sehr unterschiedlich sein. Die Bezeichnung der Spaltstelle und der angrenzenden Aminosäuren eines Substrats erfolgt nach der Definition, die Schechter und Berger bei der Beschreibung der Substratspezifität von Papain 1967 benutzt haben [4]. Hiernach werden die Aminosäurereste, die von der Spaltstelle in Richtung des N-Terminus liegen, mit P1, P2, P3 usw. bezeichnet, die in Richtung des C-Terminus mit P1', P2', P3' usw.

Die Substratspezifität einer Protease wird im Wesentlichen vom Aufbau des aktiven Zentrums (active site), das von einer oder mehreren Seiten von bestimmten Aminosäuren begrenzt wird (subsites), und damit von ihrer Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmt. Die an das katalytische Zentrum angrenzenden Aminosäuren (subsites) werden ausgehend vom katalytischen Zentrum mit S1, S2, S3 usw. in Richtung N-Terminus und mit S1', S2', S3' usw. in Richtung C-Terminus bezeichnet. Bei den Serinproteasen wird das aktive Zentrum durch die Aminosäuren Asp, Ser und His gebildet [5]. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip passen bestimmte Substrate in das aktive Zentrum einer Protease. Substratspezifität oder auch Spaltspezifität meint auch die Voraussetzungen, die das Substrat erfüllen muss, damit eine Reaktion durch eine bestimmte Protease katalysiert wird. Im einfachsten Fall richtet sich die Substrat- oder Spaltspezifität bei Serinproteasen nach der Aminosäure, die N-terminal von der Spaltstelle im Substrat liegt. Bei Trypsin sind dies

Lysin oder Arginin, bei Chymotrypsin Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten (z.B. Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) und bei der Elastase Aminosäuren mit einer kurzen ungeladenen Seitenkette. In der vorliegenden Arbeit wird als Spaltspezifität die Spaltung von Peptidbindungen in den Modellpeptiden Insulin A- und B-Kette durch die beiden untersuchten Proteasen bezeichnet. Aus den so erhaltenen Ergebnissen abgeleitete Versuche mit verschiedenen Substraten dienen zur Bestimmung der Substratspezifität.

1.1.3 Sekretion und Funktion von Proteasen

Man unterscheidet sowohl in eukaryontischen als auch in prokaryontischen Organismen entsprechend ihrer Lokalisierung intrazelluläre Proteasen, extrazelluläre Proteasen und Membranproteasen. Intrazelluläre Proteasen entfalten ihre Wirkung im Inneren der Zelle. Extrazelluläre Proteasen haben ihren Wirkungsort außerhalb der Zelle und werden, ebenso wie andere Sekretproteine, in den meisten Fällen mit einem Signalpeptid synthetisiert, das entsprechend dem typischen Signalpeptid-Erkennungsmechanismus bei der Translokation an die Membran gebunden wird. Die Sekretion von Proteasen erfolgt über die für die Sekretion von Proteinen zur Verfügung stehenden Mechanismen und zeigt bei grampositiven und bei gramnegativen Bakterien Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Hauptkomponenten beim Transport durch die Zytoplasmamembran (Sec-System). Jedoch bestehen auch Unterschiede, die aus dem verschiedenen Aufbau der Zellhüllen resultieren. Sekretproteine grampositiver Bakterien müssen lediglich die Zytoplasmamembran überwinden und werden dann, nachdem sie die Zellwand passiert haben, in die Umgebung abgegeben. Die Proteine werden als Vorstufen mit einem N-terminalen Signalpeptid in ungefaltetem Zustand synthetisiert. Chaperone verhindern eine vorzeitige Faltung der Proteine. Eine Passage der Zytoplasmamembran in gefaltetem Zustand ist nicht möglich. Vermittelt durch das Signalpeptid erfolgt eine Bindung des Proteins an das Translokationssystem in der Zytoplasmamembran. Das Signalpeptid wird während oder unmittelbar nach dem Transport durch die Membran durch Signalpeptidasen abgespalten. Danach erhält das Protein durch Faltung seine biologisch aktive Form und wird durch die Zellwand transportiert [6].

Bei gramnegativen Bakterien muss außerdem ein Transport durch die äußere Bakterienmembran erfolgen. Hierfür sind sechs verschiedene Mechanismen bekannt, wovon sich vier unmittelbar an das Sec-System anschließen. Die Systeme zeigen eine Bandbreite von einem Ein-Komponenten-System bis zu hochkomplexen Mehrkomponentensystemen und sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. Beim Autotransporter-System erfolgt die Translokation durch die äußere Bakterienmembran durch eine von der C-Domäne des Proteins gebildete Pore autokatalytisch unter Beteiligung der im Protein enthaltenen proteolytischen Aktivität. Das Chaperon/Usher-System benötigt ein periplasmatisches Chaperon, das an die einzelnen Untereinheiten des Proteins bindet, und eine Pore (usher=Pförtner) in der äußeren Membran. Die Typ I-Sekretion erfolgt unabhängig vom Sec-System. Hierbei werden Proteine ohne periplasmatisches Zwischenstadium direkt aus dem Zytoplasma durch die Zellhüllen sekretiert. Der Kanal besteht aus drei Proteinen und erstreckt sich von der inneren Membran durch das Periplasma und die äußere Membran. An der Typ II-

Sekretion sind 12 bis 16 Proteine beteiligt, die einen Komplex bilden, der in seiner Gesamtheit als Sekreton bezeichnet wird. Die Mehrzahl der Proteine ist in der inneren Membran verankert. Mit dem Typ III-Sekretionssystem sind Bakterien in der Lage, Proteine direkt in eukaryontische Wirtszellen zu sezernieren. Das Sekretionssystem arbeitet wie das Typ I-System Sec-unabhängig und ist ein Multiproteinkomplex, der innere Membran, Periplasma und äußere Membran durchzieht und sich bis in die Zellmembran der Wirtszelle hinein erstrecken kann. Mit Hilfe der Typ IV-Sekretion können Proteine (Sec-abhängig) und DNA (Sec-unabhängig) transportiert werden. Die hierbei beteiligten VirB-Proteine bilden einen Komplex, der als Transportkanal dient und mit der inneren und äußeren Bakterienmembran assoziiert ist [7].

Membranproteasen besitzen neben einem entsprechenden Signalpeptid zusätzliche hydrophobe Aminosäuresequenzen und werden deshalb nicht durch die Membran hindurchtransportiert, sondern integrieren sich in die Membran. Sie können in dieser Membranbindung sowohl intrazellulär als auch extrazellulär wirken. Einige wenige Beispiele für die Aktivität dieser Proteasen innerhalb der Membran, gerichtet gegen Membranproteine, wurden ebenfalls beschrieben [8-11]. Primär- und Sekundärstruktur einer Protease entscheiden über die Integration in die Zellmembran oder den Transport durch die Membran und Sekretion der Protease. So führen zum Beispiel Aminosäuresequenzen in der Primärstruktur, die eine hydrophobe α -Helix bilden, zu einer Integration in die Membran. Andere Strukturelemente, die eine Membranbindung ermöglichen, sind die helical wheel-Struktur, bei der durch die alternierende Folge hydrophober Aminosäurereste in einer α -Helix eine hydrophobe äußere Teilregion entsteht, sowie β -Faltblattstrukturen, die sich zu so genannten β -barrel-Strukturen falten können, die außen hydrophob und innen hydrophil sind. Weist ein Protein keine solche durch Primär- oder Sekundärstruktur gebildeten hydrophoben Regionen auf, wird es nach Abspaltung eines Signalpeptids und häufig auch einer Proregion in den Extrazellulärraum abgegeben [12-15].

Zu den extrazellulären Proteasen bei eukaryontischen Organismen gehören beispielsweise Trypsin und Chymotrypsin, die im Gastrointestinaltrakt mit der Nahrung aufgenommene Proteine spalten. Andere extrazelluläre Proteasen sind am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt (z.B. Kollagenasen) oder sind Bestandteile der Blutgerinnungskaskade sowie des Komplementsystems. Proteasen kontrollieren die Aktivität von Enzymen und Hormonen, indem sie einerseits biologisch aktive Moleküle durch limitierte Proteolyse bilden können und andererseits biologisch aktive Moleküle abbauen und damit inaktivieren können. Proteasen sind an Phagozytoseprozessen und somit an der Immunantwort beteiligt. Sie regulieren Stoffwechselprozesse und stellen aus nicht mehr benötigten Proteinen Aminosäuren zur Energiegewinnung oder Neusynthese von Proteinen zur Verfügung.

Die Proteaseaktivität wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Diese Regulation ist für den Ablauf komplexer biologischer Vorgänge unerlässlich, da eine unkontrollierte proteolytische Aktivität zu schweren Stoffwechselstörungen führen kann. Die korrekte Funktion von Proteasen wird beispielsweise durch Kompartimentbildung gewährleistet. Das heißt, Proteasen sind außerhalb ihrer typischen Lokalisation, z.B. Lysosomen oder Membranen, inaktiv, weil ihre Aktivität von

bestimmten äußeren Bedingungen (z.B. pH-Wert, Zusammensetzung des Umgebungsmilieus) abhängt. Proteaseinhibitorsysteme sind ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus.

Bei Bakterien sind einige der sekretierten Proteasen als Toxine wirksam. Bekannte Beispiele hierfür sind die Clostridientoxine Botulinus-Toxin und Tetanus-Toxin. Diese Metalloproteasen spalten Synaptobrevin, ein Membranprotein synaptischer Vesikel. Dadurch wird die Neurotransmitterfreisetzung gehemmt, und es kommt zu schwerwiegenden Paresen [16]. Weitere Proteasen von verschiedenen Clostridienarten sind ebenfalls hochwirksame Toxine [17].

Wichtige Membranproteasen sind z.B. Signalpeptidasen, die eine Signalsequenz von Sekretproteinen abspalten und diese Signalpeptide abbauen. Eine in ihrer Struktur und Funktion gut untersuchte Protease in der Außenmembran von *Escherichia coli*, das Omptin, ist vermutlich an der Pathogenität dieser Bakterienart beteiligt und kann Plasminogen zu Plasmin aktivieren [18]. Wahrscheinlich besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von Omptin und der Pathogenität von *E. coli* bei Harnwegsinfekten [19]. Homologe Proteasen zu Omptin werden von *Yersinia pestis* [20] und *Salmonella typhimurium* [21] gebildet und tragen entscheidend zur Invasivität dieser Erreger bei. Yoshihara et al. fanden heraus, dass das Porin D2 in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* nicht nur am Peptidtransport beteiligt ist, sondern auch Peptidaseaktivität besitzt und zu den Serinproteasen gehört [22]. Intrazelluläre Proteasen dienen auch bei Prokaryonten der Regulation von Stoffwechselfvorgängen und der Bereitstellung von Aminosäuren zur Neusynthese von Proteinen. Bei sporenbildenden Bakterien sind intrazelluläre Proteasen wesentlich an den Prozessen der Sporenkeimung beteiligt [23].

1.1.4 Pathogene Wirkungsmechanismen von Bakterienproteasen

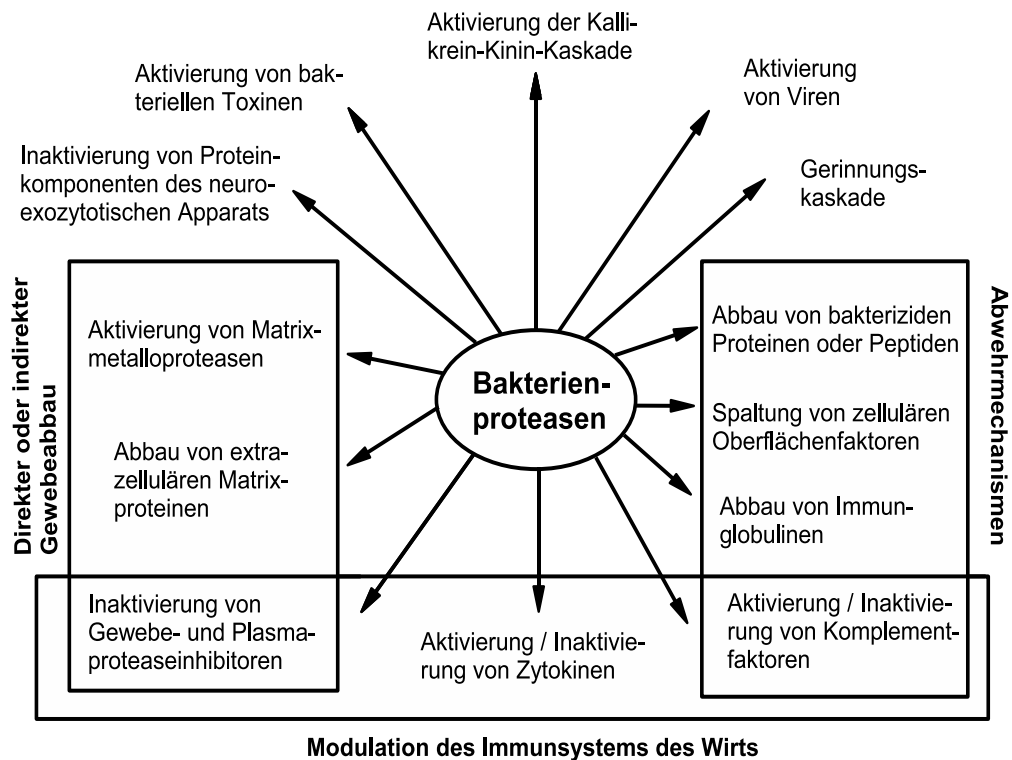


Abb. 1 Pathogenitätsmechanismen von Bakterienproteasen, modifiziert nach [24]

Bakterienproteasen können ihre pathogene Wirkung direkt entfalten, indem sie im Wirtsorganismus Proteine des Binde- und Stützgewebes abbauen. Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang auch die Induktion und Aktivierung von Matrixmetalloproteasen (MMPs) durch Bakterienproteasen sowie deren Eingreifen in die Regulationssysteme von MMPs. Eine weitere Schlüsselstelle für die Wirkung pathogener Bakterien sind Gefäßwände. Bei den hierbei ablaufenden komplexen Vorgängen spielen auch Proteasen eine Rolle [25]. Bakterienproteasen können außerdem über eine Reihe von Mechanismen in verschiedene Funktionssysteme des Wirtsorganismus eingreifen.

(a) Beeinflussung des Blutgerinnungssystems

Für verschiedene Bakterienproteasen konnte nachgewiesen werden, dass sie die Gerinnungskaskade durch direkte Aktivierung von Faktor XII (Hagemann-Faktor), Faktor X (Stuart-Prower-Faktor) und Faktor II (Prothrombin) in Gang setzen und so zur Bildung von Fibrin aus Fibrinogen führen [26]. Die Aktivierung von Faktor XII ist ebenfalls Ausgangspunkt für die Aktivierung der kininbildenden Kaskade (siehe hierzu unter c). Eine gefürchtete Komplikation bei Infektionskrankheiten mit dem Bild einer Sepsis ist die disseminierte intravasale Koagulopathie (disseminated intravascular coagulation, DIC). Hierbei kommt es zu einer Aktivierung des Blutgerinnungssystems, wobei Bakterienproteasen vermutlich eine wichtige Rolle spielen [27]. Zu einer Störung des Gerinnungsgleichgewichts kommt es auch indirekt über die Inaktivierung von Proteaseinhibitoren wie Antithrombin III durch Bakterienproteasen, wodurch es zu erhöhten Thrombinkonzentrationen und vermehrter Thrombenbildung kommt [28].

(b) Beeinflussung des fibrinolytischen Systems

Im fibrinolytischen System wird Plasminogen zu Plasmin aktiviert. Plasmin spaltet mit hoher Aktivität Fibrin. Eine Beeinflussung des fibrinolytischen Systems durch Bakterienproteasen ist vielfältig [29] und kann direkt durch die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin oder indirekt über die Aktivierung oder Inaktivierung von Plasmininhibitoren erfolgen. Für zahlreiche Bakterienproteasen ist außerdem eine direkte fibrinolytische Aktivität beschrieben worden. Durch die Bindung von Plasminogen an Rezeptoren der Bakterienoberfläche und nachfolgende Aktivierung durch Bakterienproteasen kann eine rasche Penetration durch fibrinbelegte Oberflächen erfolgen, die der Wirtsorganismus bildet, um Infektionsherde einzugrenzen [30]. Das gebundene Plasmin entzieht sich den physiologischen Regulationsmechanismen [16]. Ferner erhöhen die durch Einwirkung der plasminogenaktivierenden Bakterienproteasen entstandenen Fibrinspaltprodukte die Gefäßpermeabilität und führen zur Akkumulation von Entzündungszellen [31, 32]. Plasmin ist außerdem in der Lage, Proteine der ECM wie Laminin und Fibronectin direkt zu spalten [33, 34], die Komplementkaskade und die Proformen von Matrixmetalloproteasen zu aktivieren [35]. Aureolysin, eine Metalloprotease von *Staphylococcus aureus*, die zur Thermolysinfamilie gehört, führt zu einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems [36]. Für die extrazelluläre Protease von *Bacillus* sp. InhA konnte eine prothrombotische Wirkung durch erhöhte Aktivität des Plasminogenaktivatorinhibitors gezeigt werden [37].

(c) Beeinflussung des Bradykininsystems

Eine Entzündung ist klassischerweise gekennzeichnet durch Schmerz, Schwellung, Rötung und Überwärmung. An der Entstehung dieser Phänomene ist Bradykinin, ein endogenes Nanopeptid, wesentlich beteiligt. Es entsteht am Ende einer Kaskade aus verschiedenen Vorstufen. Bradykinin führt zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und so zu Ödembildung. Durch eine relaxierende Wirkung auf glatte Muskulatur kommt es zu Blutdruckabfall und dem klinischen Bild des Schocks. Die Einwirkung der Bakterienproteasen zur Aktivierung dieses Systems erfolgt auf verschiedenen Stufen [38, 39]. Dies verdeutlicht Abb. 2.

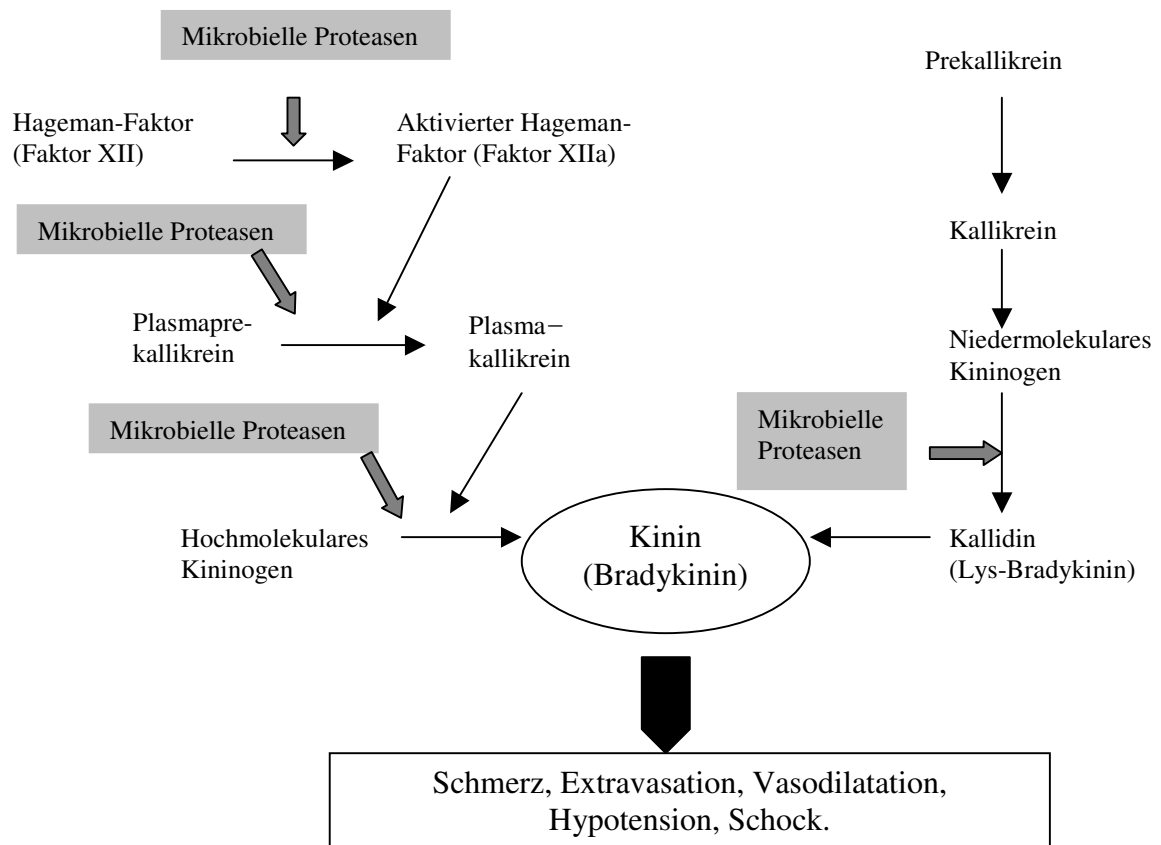


Abb. 2 Angriffspunkte bakterieller Proteasen bei der Aktivierung des Bradykininsystems, modifiziert nach [27]

(d) Beeinflussung des Immunsystems und Komplementsystems

Das Komplementsystem ist eine Komponente der angeborenen Abwehr (innate immunity). Durch limitierte Proteolyse entstehen auf drei verschiedenen Wegen die aktiven Komponenten des Komplementsystems. Diese besitzen chemotaktische Wirkung (C5a), locken Phagozyten (Makrophagen und Neutrophile) an und triggern so die Entzündungsreaktion. Aus den Komponenten C5b, C6 und C7 bildet sich ein stark lipophiler Komplex, der sich in der Lipiddoppelschicht der Bakterienzelle oder Virushülle verankert. Durch Bindung von C8 und mehreren C9 Molekülen entsteht der „membrane attack complex“ (MAC). Beim Einbau der C9 Moleküle bilden sich in der Zellhülle

des Mikroorganismus Poren, durch die das osmotische Gleichgewicht gestört wird, was zur Lyse der Bakterienzelle führt.

Vielfältige Interaktionen von Bakterienproteasen mit Komponenten des Komplementsystems sind bekannt [40, 41]. Bakterienproteasen können einerseits durch Proteolyse oder Inaktivierung des C1-Esterase-Inhibitors das Komplementsystem unkontrolliert aktivieren und so die Entzündung verstärken. Andererseits werden Komplementfaktoren durch bakterielle Proteasen inaktiviert, indem sie abgebaut werden, sodass eine Schwächung des Abwehrsystems erfolgt. Dies konnte beispielsweise für Proteasen von *Serratia*, *Pseudomonas* und *Candida* gezeigt werden [38, 42, 43].

Viele Bakterien besitzen extrazelluläre Proteasen, die in der Lage sind, Immunglobuline, insbesondere IgG und IgA zu spalten, damit zu inaktivieren und so das Immunsystem zu unterlaufen. Nachgewiesen wurde dies zum Beispiel für die *Pseudomonas*-Elastase (Pseudolysin, EC 3.4.24.26) [44, 45], die *Serratia* 56K Protease (Serralysin, EC 3.4.24.40) [46] und die saure Protease von *Candida* (Candidapepsin, EC 3.4.23.24) [42]. Die Spaltstelle befindet sich jeweils zwischen dem Fab- und dem Fc-Fragment der schweren Kette des Immunglobulinmoleküls.

(e) Beeinflussung von Proteaseinhibitorsystemen

Die meisten Bakterienproteasen sind nicht nur resistent gegenüber plasmatischen Proteaseinhibitoren des menschlichen Organismus, sondern sind in der Lage, diese so genannten Serpine abzubauen und zu inaktivieren. Damit werden Regulationsmechanismen des Wirtsorganismus außer Kraft gesetzt und körpereigene Proteasen aktiviert.

Bereits 1979 konnten Morihara et al. nachweisen, dass durch die alkalische Protease und die Elastase von *P. aeruginosa* eine Inaktivierung des α_1 -Proteaseinhibitors erfolgt [47]. Es liegen zahlreiche Untersuchungen für Proteasen verschiedener Mikroorganismen vor, z.B. *Staphylococcus aureus* [48], *Vibrio vulnificus* [49], *Porphyromonas gingivalis* und *Treponema denticola* [50]. Alle diese Untersuchungen zeigten einen proteolytischen Abbau und somit eine Inaktivierung des α_1 -Proteaseinhibitors. Weitere Proteaseinhibitoren, die in ihrer Aktivität durch Bakterienproteasen beeinflusst werden, sind Antithrombin III, α_2 -Makroglobulin und α_2 -Antiplasmin. Dadurch kommt es zu Dysregulationen körpereigener Proteasesysteme, woraus eine Aktivierung der Blutgerinnung, entzündliche Prozesse, eine erhöhte vaskuläre Permeabilität, Fibrinolyse und schließlich eine disseminierte intravasale Koagulopathie resultieren.

1.2 Die Bakterienart *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Merkmale und Eigenschaften

Pseudomonas aeruginosa ist der für die Medizin wichtigste Vertreter der Gattung der Pseudomonaceae, die mehr als 100 Spezies gramnegativer sporenloser aerober Stäbchenbakterien umfasst. Die Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* sind bis auf einen Vertreter (*Pseudomonas mallei*) durch eine oder mehrere polare Geißeln beweglich. Bei *P. aeruginosa* handelt es sich um 1,5 bis 4 μm lange, ubiquitär vorkommende Stäbchen mit überwiegend aerobem Stoffwechsel.

Der Erreger bevorzugt das feuchte Milieu. Aus diesem Grund kommen in Krankenhäusern Beatmungsgeräte, Luftbefeuchter, Waschbecken, Blumenvasen usw. als mögliche Erregerreservoir in Betracht, sodass hygienische Maßnahmen in der Prophylaxe von *Pseudomonas*-Infektionen eine wesentliche Rolle spielen. Die Erreger sind äußerst anspruchslos und können sich schon bei Vorhandensein geringster Spuren organischer Nährstoffe vermehren.

Die charakteristische Wachstumsform auf einfachen Nährböden sind grünliche, metallisch glänzende, gelappte Bakterienkolonien. Wachstum auf Blutagar führt meist zu relativ großen grauen Kolonien und zur α -Hämolyse. Bei der α -Hämolyse auf Blutagar entstehen Aufhellungen um die Bakterienkolonien durch die Schädigung von Erythrozyten. In flüssigen Medien bildet sich neben einer grünlichen Verfärbung und einer diffusen Trübung ein dünnes Oberflächenhäutchen.

P. aeruginosa ist in der Lage, verschiedene Farbstoffe zu bilden: häufig das blaugrüne Pyocyanin und das gelbgrüne Pyoverdin (Siderophor, alte Bezeichnung: Fluorescein), seltener das rötliche Pyorubin und das bräunliche Pyomelanin. Durch die von den meisten Stämmen gebildeten Phenazinpigmente ist eine schnelle Identifizierung von *P. aeruginosa* möglich. Außerdem scheint Pyocyanin als Exotoxin zu wirken und die Apoptose von neutrophilen Granulozyten zu induzieren [51, 52]. Hierdurch wird die lokale Entzündungsreaktion gehemmt, was ein längeres Überleben der Bakterien und damit eine persistierende Infektion zur Folge haben kann. Für Pyoverdin ist eine Funktion bei der Aufnahme von Eisen in die Bakterienzelle nachgewiesen worden [53].

Der Zellwandaufbau entspricht dem anderer gramnegativer Bakterien. Die Zellhülle besteht aus mehreren Schichten: einer Cytoplasmamembran, dem Periplasma-Raum, der Peptidoglycan- oder Mureinschicht und der Außenmembran. Die Zytoplasmamembran ist als typische Phospholipid-doppelschicht aufgebaut und enthält integrale und periphere Membranproteine, z.B. Enzyme der Atmungskette und Permeasen für den Transport von Nährstoffen und Bausteinen von Makromolekülen. Der bei gramnegativen Bakterien einschichtige Mureinsacculus ist für die Aufrechterhaltung der Form verantwortlich. Die äußere Membran ist durch eine besonders ausgeprägte Asymmetrie gekennzeichnet. Ihre äußere Schicht besteht vorwiegend statt aus normalen Phospholipiden aus Lipopolysacchariden (Endotoxinen). In dieser Membran enthaltene Proteine sind vorwiegend unspezifische Pore, die eine passive Diffusion niedermolekularer Verbindungen zulassen, oder spezifische Transport- und Bindungsproteine, die in Abhängigkeit von der Wachstumsphase variieren können. Zusätzlich sind auf der äußeren Schicht Fimbrien vorhanden, die der Adhäsionsvermittlung und damit der Kolonisation dienen [54, 55]. Zwischen Zytoplasmamembran und äußerer Membran befindet sich der Periplasma-Raum als Bestandteil der Zellhülle. Hierin spielen sich vielfältige Stoffwechselprozesse ab. Das Periplasma enthält vorwiegend katabole Enzyme und Oligosaccharide. Beispielsweise können hier alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, cyclische Phosphodiesterase, β -Laktamasen, Proteasen, Aminopeptidasen und Endonucleasen lokalisiert sein. Bei der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *P. aeruginosa* hat sich gezeigt, dass es sich hierbei um das umfangreichste und komplexeste aller bisher entschlüsselten Bakteriengenome handelt. Darin enthalten sind zahlreiche Regulations- und Transportsysteme, die es der Bakterien-

zelle ermöglichen, sich an Umgebungsbedingungen anzupassen und sich gegen andere Mikroorganismen durchzusetzen [56].

1.2.2 Pathologische Bedeutung

Infektionen mit *P. aeruginosa* entwickeln sich vor allem bei abwehrgeschwächten Patienten in Form nosokomialer Infektionen. Gefährdet sind Patienten mit malignen Erkrankungen, großen Wundflächen (z.B. Verbrennungen), intensivmedizinische Patienten sowie Früh- und Neugeborene. Das Vorliegen von Resistenzen gegenüber zahlreichen Antibiotika und die Bildung von hoch wirksamen Toxinen und Virulenzfaktoren durch den Erreger führen zu schwer beherrschbaren Infektionen und häufig letal endenden septischen Krankheitsbildern. *P. aeruginosa* besiedelt bevorzugt Wunden, den Respirationstrakt sowie den Urogenitaltrakt. Gefürchtet sind ebenso posttraumatische Augeninfektionen, Infektionen des Mittelohres und des äußeren Gehörganges, Meningitiden, Endocarditiden und bei Früh- und Neugeborenen Infektionen des Magen-Darm-Traktes. Pathologisch-anatomisch handelt es sich um fibrinös-eitrige, hämorrhagische oder ulzerös-nekrotisierende Entzündungen.

Bei Patienten mit zystischer Fibrose ist *P. aeruginosa* einer der Keime mit der größten Bedeutung als Ursache rezidivierender bronchopulmonaler Infektionen. Die zystische Fibrose (Mukoviszidose) ist die häufigste genetische Erkrankung bei Eurasiern. Es handelt sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit mit einer Dysfunktion exokriner Drüsen. Durch vermehrte Produktion und erhöhte Viskosität des Sekrets der mukösen Drüsen kann es zu schweren Komplikationen im Bereich der Atemwege, zu intestinaler Maldigestion und Malabsorption kommen. Ursache ist ein genetischer Defekt des CFTR-Gens (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) am Chromosom 7, der zu einer fehlerhaften Funktion eines Chloridionenkanals führt. In einer Studie fanden sich bei mehr als 80% der Patienten mit zystischer Fibrose und chronischen pulmonalen Infekten erhöhte Antikörpertiter gegen Pseudolysin und Aeruginolysin. In mehr als 90% der Sputumproben dieser Patienten waren beide Proteasen nachweisbar [57]. Insbesondere im Erwachsenenalter ist der Respirationstrakt von Patienten mit zystischer Fibrose mit *P. aeruginosa* besiedelt. Diese Besiedlung scheint ein Risikofaktor für schwere und chronische pulmonale Infekte zu sein. Es gibt Versuche, mit einer frühen Eradikation das Infektionsrisiko zu senken [58]. Untersuchungen zeigen, dass die Serinprotease Protease IV von *P. aeruginosa* in der Lage ist, Proteine des Surfactant in den Alveolen der Lunge abzubauen. Das hat eine verminderte Oberflächenspannung und ein erhöhtes Infektrisiko zur Folge [59].

Unter den *Pseudomonas*-Infektionen haben die Infektionen der Atemwege aus klinischer Sicht die größte Bedeutung. Infektionen des Respirationstraktes mit *P. aeruginosa* sind im Vergleich zu Infektionen mit anderen gramnegativen Bakterien mit einer besonders hohen Letalität behaftet. Zunehmend wird das Augenmerk darauf gerichtet, dass es auch ambulant erworbene pulmonale Infekte mit *P. aeruginosa* gibt. Insbesondere ist bei Patienten mit Risikofaktoren wie strukturellen Lungenerkrankungen daran zu denken. Bei den nosokomialen respiratorischen Infektionen mit *P. aeruginosa* steht die Pneumonie bei beatmeten Patienten im Vordergrund [60].

Infektionen des Auges mit *P. aeruginosa* treten im Rahmen von Allgemeinerkrankungen oder isoliert, z.B. nach Verletzungen oder beim Tragen weicher Kontaktlinsen, auf. Hervorzuheben ist insbesondere die *Pseudomonas*-Keratitis. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene *Pseudomonas*-Proteasen an der Entstehung einer nekrotisierenden Entzündung der Hornhaut direkt durch Abbau kornealer Proteine und indirekt durch die Aktivierung von kornealen Proteasen beteiligt sind [61-63].

P. aeruginosa spielt bei Patienten mit AIDS und AIDS-assoziierten Erkrankungen eine wichtige Rolle. Hinsichtlich Morbidität und Mortalität ist der Mikroorganismus als ein wesentlicher Faktor anzusehen. Auch hier kommt das ganze obengenannte Spektrum an Infektionen vor. Insbesondere Infektionen der Atemwege sind wegen ihrer Häufigkeit von Bedeutung. Septische Krankheitsbilder haben eine besonders hohe Mortalitätsrate. In einer französischen Studie lag diese bei fast 50% [64]. Bei den nosokomialen Pneumonien von AIDS-kranken Patienten ist *P. aeruginosa* der mit fast 50% am häufigsten ursächliche Keim. In Sputumproben können in selteneren Fällen auch andere *Pseudomonas*-Spezies (*Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas putida*) als Erreger einer Pneumonie nachgewiesen werden. Außerdem ist eine *Pseudomonas*-Infektion häufig mit der Infektion anderer opportunistischer Erreger (*Pneumozystis carinii*, Cytomegalie-Virus, atypische Mykobakterien) assoziiert [65]. Insgesamt bleibt abzuwarten, wie sich die Infektionsraten nach flächendeckender Einführung der antiretroviralen Therapie entwickeln.

Die Pathogenität von *P. aeruginosa* beruht auf dem Zusammenwirken einer Reihe von Virulenzfaktoren. Man unterscheidet hierbei zelluläre Bestandteile und extrazelluläre Produkte. Zu den zellulären Faktoren zählen Lipopolysaccharide, welche ihre Wirkung als Endotoxine entfalten und pathophysiologisch am Geschehen des septischen Schocks wesentlich beteiligt sind. Weiterhin gehören zu den zellulären Faktoren die Fimbrien, die als Haftorgane dienen. Ebenfalls von Bedeutung sind die lophotrich angeordneten Flagellen, welche für die Motilität und damit für die Invasivität eine Rolle spielen. Außerdem scheint das in den Flagellen enthaltene Flagellin proinflammatorische Wirkung zu besitzen [66]. Bei vielen Stämmen kommt es bei der Umstellung auf die mucoide Wachstumsform zur Bildung des extrazellulären Polysaccharids Alginat. Alginat produzierende Stämme besiedeln häufig den Respirationstrakt von Patienten mit zystischer Fibrose [67]. Das Polysaccharid hat eine toxische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, eine antiphagozytäre Wirkung und ist einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix der von *P. aeruginosa* gebildeten bakteriellen Biofilme. Biofilme entstehen, wenn Mikroorganismen sich an Grenzflächen ansiedeln. In diesen hochkomplexen multizellulären Wachstumsformen schützen sich die Bakterien vor dem Einfluss des Immunsystems und antibiotisch wirksamen Substanzen. Besonderheiten von Biofilmen sind horizontaler Gentransfer der Mikroorganismen innerhalb des Biofilms, synergistische Wechselwirkungen durch Anreicherung von Nährstoffen, hohe mechanische Stabilität und und langsamere Bakterienwachstumsraten aufgrund eines Ruhezustands [68]. In diesem Wachstums-Phänotyp sind die Bakterien um bis zu 1.000-fach resistenter gegen Antibiotika [69]. Die Ursachen hierfür sind noch nicht eindeutig geklärt. Durch die erhöhte Antibiotika-Resistenz werden chronisch persistierende Infektionen sowie die Selektion resistenter Bakterienstämme begünstigt.

Bei den extrazellulären Faktoren ist zunächst das von ca. 90% der Stämme gebildete Toxin A, das als Exotoxin wirkt, zu nennen. Es entfaltet seine Wirkung durch die Hemmung der Proteinbiosynthese, indem es einen inaktiven ADP-Ribosyl-EF-2-Komplex bildet [70]. Der Wirkungsmechanismus entspricht damit weitgehend dem des Diphtherietoxins. Verschiedene Hämolsine (Phospholipase C, Rhamnolipid), verschiedene Pigmente und das Non-Pilus-Adhäsins Exoenzym S sind als weitere Virulenzfaktoren anzusehen [71].

Verschiedene extrazelluläre Proteasen mit unterschiedlichem Substratspektrum und Eigenschaften sind ebenfalls in erheblichem Maß an der Pathogenität beteiligt. Hierauf soll in Kapitel 1.2.3 eingegangen werden.

1.2.3 Wichtige extrazelluläre *Pseudomonas*-Proteasen und ihre Bedeutung

Pseudomonas-Stämme produzieren verschiedene extrazelluläre Proteasen. Die bekanntesten und am besten untersuchten sind die alkalische Protease (neuere Bezeichnung Aeruginolysin; EC 3.4.24.40) und Elastase (neuere Bezeichnung Pseudolysin; EC 3.4.24.26). Außerdem sind zwei weitere Proteasen von Bedeutung. Diese sind das Staphylolysin (=LasA) und die Protease IV.

Aeruginolysin wurde erstmals 1957 von Morihara aus *Pseudomonas*-Kulturmedium isoliert und beschrieben [72]. Die Molmasse von Aeruginolysin wurde durch DNA-Sequenzierung des entsprechenden Gens bestimmt und beträgt 49.500 Da [73]. Das aktive Zentrum ist in einer dem N-Terminus nahen Aminosäuresequenz lokalisiert und enthält ein Zinkion. Das Molekül ist homolog zu Serralysin aufgebaut (55% Identität). Auch hinsichtlich der Substratspezifität bestehen Gemeinsamkeiten [74].

Die pathogenen Effekte von Aeruginolysin sind vielfältig. Sie umfassen die Destruktion von Gewebe, die Inaktivierung von Proteinen der Infektabwehr (Lysozym, Immunglobuline, Transferrin) sowie die Beeinflussung von Proteaseinhibitorsystemen. Dadurch werden die Ausbreitung von Infektionen mit *P. aeruginosa* und die Entstehung einer Sepsis begünstigt [75].

Die Elastase von *P. aeruginosa* wurde 1965 erstmals von Morihara et al. isoliert und charakterisiert. Die Molmasse von Pseudolysin beträgt 33.000 Da. Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,9. Das reife Molekül besteht aus 301 Aminosäureresten. Pseudolysin gehört zu den Metalloproteasen und enthält im aktiven Zentrum ein Zinkion. Ein Calciumion wird für die Stabilität des Enzyms benötigt [76]. Bever und Iglewski publizierten 1988 die Nukleotidsequenz des kodierenden Gens [77]. Pseudolysin gehört zur Thermolysinfamilie und zeigt im Molekülaufbau sowohl in der Primär- als auch in der Sekundär- und Tertiärstruktur große Ähnlichkeiten mit Thermolysin. Die höchste Homologie findet man im Bereich 136 bis 180 von Pseudolysin, der das aktive Zentrum mit dem für Zink-Metalloproteasen typischen HEXXH-consensus Motiv enthält [78].

Die Funktion von Pseudolysin besteht zum einen in der Versorgung der Bakterienzelle mit Nährstoffen; zum anderen ist diese Protease von *P. aeruginosa* ein Pathogenitätsfaktor und die Ursache für direkte und indirekte Schädigung des Wirtsorganismus. Die direkte Schädigung entsteht durch den Abbau von Proteinen des Bindegewebes (Elastin, Laminin [79] und Kollagen [80]), die auch

Bestandteile von Basalmembranen sind. Pseudolysin kann so zur Invasivität von *Pseudomonas aeruginosa* und zur Entstehung einer Sepsis beitragen. Indirekte Schädigungsmechanismen sind die Beeinträchtigung der Funktion von Abwehrmechanismen des Wirtes durch Abbau von Immunglobulinen [81], Komponenten des Komplementsystems sowie anderen chemotaktischen Faktoren [31], die Aktivierung des Kininsystems [27] und das Eingreifen in Proteaseinhibitorsysteme des Wirtes und infolgedessen eine gestörte Funktion körpereigener Proteasen [47]. Pseudolysin und Aeruginolysin beeinflussen die Entzündungsreaktion durch Interaktionen mit Interleukin-6 und -8 [82].

Staphylolysin ist ein neuer Name für die als LasA-Endopeptidase bekannte Protease von *P. aeruginosa*. Die Protease wurde erstmals 1969 von Lache et al. mit der Bezeichnung „bakteriolytisches Enzym“ beschrieben. Die extrazelluläre Protease ist in der Lage, *Staphylococcus aureus*-Zellen durch Spaltung von Pentaglycinbrücken in der Peptidoglycanschicht zu lysieren [83]. Die Protease hemmt das Wachstum von *S. aureus* und führt dadurch zu einem Überlebensvorteil für *P. aeruginosa* [84]. So kann sich *P. aeruginosa* beispielsweise bei Pneumonien in Konkurrenz zu *S. aureus* besser durchsetzen. Eine Rolle scheint Staphylolysin bei Infektionen der Kornea mit *P. aeruginosa* zu spielen [85]. Außerdem konnte die Fähigkeit von Staphylolysin, den Abbau von Elastin durch andere Proteasen zu stimulieren, in vitro gezeigt werden [86, 87]. Daraus lässt sich eine Beteiligung bei gewebezerstörenden Infektionen durch *P. aeruginosa* ableiten. Staphylolysin selbst besitzt nur geringe elastinolytische Aktivität.

Die 1998 von Engel et al. charakterisierte Protease IV scheint ebenfalls ein wichtiger Virulenzfaktor zu sein. Die Molmasse beträgt 26.000 Da. Der isoelektrische Punkt liegt bei 8,7. Das Enzym hat sein Aktivitätsmaximum bei pH 10,0 und einer Temperatur von 45°C. Die Protease IV spaltet eine Reihe biologisch wichtiger Proteine (vollständiger Abbau von Fibrinogen, Plasminogen und C3, unvollständiger Abbau von Plasmin, C1q und IgG). Aufgrund ihrer Eigenschaften bei Versuchen mit Inhibitoren liegt eine Einordnung der Protease in die Klasse der Serinproteasen nahe [88]. Es liegen insbesondere Untersuchungen vor, in denen die Wirkung der Protease IV bei Infektionen der Kornea nachgewiesen wurde. Hier zeigte sich, dass die Protease IV durch Hervorrufen von epithelialen Erosionen eine Schädigung der Kornea verursacht. Außerdem haben *Pseudomonas*-Stämme, die selbst keine Protease IV produzieren, eine höhere Virulenz, wenn sie zusammen mit Protease IV auf die Kornea einwirken, was durch direkte Reaktion der Protease IV mit der Kornea und Einwirkung auf andere bakterielle Virulenzfaktoren, die dadurch aktiviert werden, erklärbar ist [61, 89]. Neueste Untersuchungen lassen pathogene Effekte der Protease IV auch in der Lunge vermuten. Das Enzym ist in der Lage, Proteinkomponenten des Surfactant abzubauen und damit dessen physiologische Funktion (Herabsetzung der Oberflächenspannung und Infektabwehr) zu beeinträchtigen [59].

1.3 Die Bakterienart *Bacillus cereus*

1.3.1 Merkmale und Eigenschaften

Bacillus cereus ist ein grampositives aerob oder fakultativ anaerob lebendes, durch eine peritriche Geißel bewegliches Stäbchenbakterium. Es hat eine Länge von 1,2 bis 10 µm und eine Breite von 0,5 bis 2,5 µm. Wie für andere Bacillusarten und für die Gattung der Clostridien typisch, ist auch *B. cereus* in der Lage, Endosporen zu bilden. Sporen zeigen eine hohe Resistenz gegenüber chemischen und physikalischen Noxen. Diese Dauerform ermöglicht es dem Mikroorganismus, auch unter extremen Umweltbedingungen zu überleben und bedingt die ubiquitäre Verbreitung. *B. cereus* kommt sowohl im Boden und in der Luft als auch im Wasser vor. In einem günstigen Umgebungsmilieu kann die Keimung der Sporen und ein Übergang in die vegetative Zellform erfolgen.

1.3.2 Pathologische Bedeutung

In der Gattung *Bacillus* sind mehr als 50 Arten sporenbildender Stäbchen zusammengefasst. Sie spielen als Saprophyten, Insektenpathogene (z.B. *B. thuringiensis*) und Erreger von opportunistischen Infektionen beim Menschen eine Rolle. In der Infektionspathologie des Menschen sind *B. anthracis*, der Erreger des Milzbrandes, und *B. cereus* bedeutsam.

B. cereus ist als Erreger verschiedenster Krankheitsbilder beschrieben worden. Die am weitesten verbreitete Symptomatik ist eine nach Vermehrung des Erregers in Lebensmitteln hervorgerufene Nahrungsmittelvergiftung. Sie ist unter zwei klinischen Bildern bekannt. Zum einen kann sie als emetische Verlaufsform in Erscheinung treten, zum anderen mit den klinischen Symptomen einer Diarrhoe. Das Erbrechen tritt nach einer Inkubationszeit von lediglich 1 bis 6 Stunden auf. Das emetische Toxin ist seiner Struktur nach ein Dodekadepsi-peptid und wird Cereulid genannt. Der Wirkungsmechanismus entfaltet sich durch Bindung an den 5-HT₃-Rezeptor und Stimulation des Vagus. Außerdem ist das Toxin in der Lage, die mitochondriale Fettsäureoxidation in der Leber zu hemmen und so ein Leberversagen hervorzurufen. Das Toxin ist extrem hitzestabil (90 min bei 121°C) und toleriert pH-Wert-Schwankungen zwischen 2 und 11 [90, 91].

Die mit wässrigen Durchfällen und Bauchschmerzen einhergehende Verlaufsform hat Inkubationszeiten zwischen 10 und 12 Stunden. In der Regel sistieren die Diarrhoen nach 12 bis 24 Stunden und bedürfen keiner speziellen Therapie. Ursache für diese Krankheitssymptome ist die Bildung eines nekrotisierenden Enterotoxin. Das Toxin aktiviert nach oraler Aufnahme im Bereich der Darmmukosazellen die Adenylatzyklase und setzt eine Kaskade in Gang. Dieser Wirkmechanismus ähnelt dem des Enterotoxins von *Vibrio cholerae*, dem Cholera-toxin. Hierbei kommt es nach Eindringen des Toxins in die Mukosazelle zu einer irreversiblen Aktivierung des G-Proteins, welches die Adenylatzyklase stimuliert. Das hat eine intrazelluläre Anhäufung des „second messengers“ cAMP zur Folge. In intestinalen Villuszellen hemmt cAMP das absorptive Natriumtransportsystem und in Kryptenzellen aktiviert cAMP das exkretorische Chloridtransportsystem. Dadurch

akkumulieren Natrium- und Chloridionen im Darmlumen. Aufgrund des osmotischen Gradienten folgt Wasser nach. Die Folge ist wässriger Durchfall mit dem Verlust von Wasser und Elektrolyten. In letzter Zeit wurde zunehmend nachgewiesen, dass *B. cereus* auch schwere, zum Teil letal endende Infektionen mit sehr unterschiedlicher Symptomatik besonders bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem, beispielsweise durch hämatologische Erkrankungen oder HIV-Infektion, hervorrufen kann. Dazu gehören Wundinfektionen [92], Augeninfektionen [93], Endokarditiden [94], Meningitiden [95-97], bronchopulmonale Infekte [98, 99] und Septikämien [100-102].

1.3.3 Wichtige *Bacillus*-Proteasen und ihre Bedeutung

Bacillolysin (EC 3.4.24.28) bezeichnet eine Gruppe extrazellulärer zinkhaltiger Metalloendoproteasen, die von *Bacillus*-Arten produziert werden. Sie gehören zur Familie M4 der Metalloproteasen, welche auch die Thermolysine umfasst. Eine eindeutige Nomenklatur, die die Beziehung dieser zwei Enzymgruppen (Bacillolysin, Thermolysin) untereinander verdeutlicht, existiert bisher nicht. Eine andere Bezeichnung für das Bacillolysin von *B. cereus* ist „Neutrale Protease“. Die Beschreibung erfolgte 1971 durch Feder et al. [103]. Das Enzym ist in der Lage, Hämoglobin, Albumin und Casein zu spalten.

Bei in der Mundflora vorkommenden *B. cereus*-Stämmen konnte kollagenolytische Aktivität nachgewiesen werden. Die hierfür verantwortlichen Kollagenasen tragen möglicherweise zur Entstehung von Periodontitiden bei. Eine weitere Gruppe gut erforschter extrazellulärer *Bacillus*-Proteasen sind die Subtilisine, z.B. Subtilisin Carlsberg (EC 3.4.21.62). Sie gehören zu den alkalischen Serinproteasen [104]. Auch Proteasen mit keratinolytischer Aktivität werden von *B. cereus* produziert [105].

Ivanova et al. haben im Genom von *B. cereus* ATCC 14579 insgesamt 53 Sequenzen identifiziert, die Proteasen kodieren. Darunter sind 9 Metalloproteasen und 12 Serinproteasen. Diese im Vergleich zu anderen Bakterienarten große Zahl an Proteasen führt dazu, dass *B. cereus* gut an eine proteinreiche Umgebung angepasst ist [106]. Die extrazellulären Proteasen haben für die Versorgung von Bakterien mit Nährstoffen eine Bedeutung. Außerdem scheinen einige Proteasen von *B. cereus* vor allem bei nicht gastrointestinalen Infektionen eine Rolle zu spielen.

Insgesamt ist jedoch festzustellen, dass die Mehrzahl der bisher bekannten, direkt für die Pathogenität von *Bacillus cereus* verantwortlichen Virulenzfaktoren nicht den Proteasen zuzuordnen sind. Relevante Virulenzfaktoren sind ein Enterotoxin, das emetische Toxin Cereulid, verschiedene Hämolysine, Phospholipase C, β -Laktamasen und das S-Protein der Zelloberfläche.

1.4 Zielstellung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchungen standen eine insulinspaltende Membranprotease von *Pseudomonas aeruginosa* (Imelysin, ICMP) und eine caseinspaltende Membranprotease (Camelysin, CCMP) von *Bacillus cereus*. Hierbei handelt es sich um bisher unbekannte Enzyme, die sich in ihrer Lokalisation und ihrem Inhibitorprofil von den schon untersuchten Enzymen dieser

Bakterienarten unterscheiden und mit keinem der beschriebenen chromogenen Substrate der bekannten Enzyme reagieren.

Die Aufgabe bestand zunächst darin, die Spaltstellen der ICMP bzw. CCMP in der Insulin A- und Insulin B-Kette zu identifizieren, um daraus Aussagen über mögliche synthetische Substrate ableiten zu können. Es sollte dann, ausgehend von den ermittelten Spaltstellen, die Aktivität der Proteasen gegenüber verschiedenen Proteasesubstraten getestet werden, um geeignete Substrate für die Aktivitätsbestimmung im Rahmen weiterer Untersuchungen zu finden, die Proteasen in ihren enzymkinetischen Parametern zu charakterisieren und die Protease-Gene zu identifizieren.

Als nächster Schritt sollten der Abbau verschiedener Proteine des menschlichen Organismus durch die ICMP bzw. CCMP überprüft werden. Das Ziel war, Aussagen über mögliche Interaktionen zwischen der ICMP bzw. der CCMP und Faktoren des Blutgerinnungssystems und des fibrinolytischen Systems, Komponenten der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr, Regulatoren der Proteaseaktivität sowie Proteinen der extrazellulären Matrix treffen zu können, um daraus Schlussfolgerungen über eine Beteiligung der untersuchten Proteasen an der pathogenen Wirkungsweise der Mikroorganismen abzuleiten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Acrylamid	Ferak
Aktin (Rindermuskel)	Sigma
AMC	Paesel und Lorei
Aminopeptidase M	Calbiochem
α_2 -Antiplasmin (Mensch)	Sigma
Antithrombin III (Mensch)	Calbiochem
α_1 -Antitrypsin (Mensch)	Sigma
Azokasein	Prof. Langner, Institut für Immunologie
Bisacrylamid	Ferak
Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC	Sigma
Boc-Glu-Ala-Arg-AMC	Sigma
Boc-Glu-Lys-Lys-AMC	Sigma
Boc-Gly-Lys-Arg-AMC	Sigma
Boc-Leu-Gly-Arg-pNA	Serva
Boc-Leu-Leu-Met-AMC	Dr. Willhardt, Inst. für Physiol. Chemie, Halle
Boc-Leu-Met-AMC	Dr. Willhardt, Inst. für Physiol. Chemie, Halle
Boc-Met-Met-AMC	Dr. Willhardt, Inst. für Physiol. Chemie, Halle
Boc-Val-Gly-Arg-AMC	Bachem
Boc-Val-Leu-Lys-AMC	Bachem

Bromphenolblau	Poch, Gliwice/ Polen
Bz-Phe-Val-Arg-AMC	Sigma
Bz-Phe-Val-Arg-pNA	Sigma
C-reaktives Protein (Mensch)	Calbiochem
Casein (Rindermilch)	Serva
Chromozym ® PL (Tos-Gly-Pro-Lys-pNA)	Boehringer
DEPC	Sigma
EEDQ	Sigma
Fibrinogen (Mensch)	Calbiochem
Fibronectin (Mensch)	Prof. Iwig, Inst. für Physiol. Chemie, Halle
Globin (Mensch)	Sigma
Haptoglobin (gemischter Typ, Mensch)	Calbiochem
Humanes Serumalbumin	Serva
Hydroxylamin	Sigma
¹²⁵ I-Natriumiodid, carrier-free	NEN-Du Pont, USA
Immunglobulin A (Mensch)	Calbiochem
Immunglobulin G (Kaninchen)	Dianova
Insulin (Schwein)	Serva
Insulin A-Kette (Rind)	Sigma
Insulin B-Kette (Rind)	Sigma
Kollagen Typ I (Rind)	Chemicon
Lactoferrin (Mensch)	ICN
Laminin (Mensch)	Serva
Lysozym (Hühnerei)	Serva
α_2 -Makroglobulin (Mensch)	Calbiochem
MCA	Sigma
MCA-Pro-Leu Gly	Sigma
MCA-Pro-Leu	Sigma
MCA-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(Dnp)- Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH ₂	Calbiochem
MCA-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	Calbiochem
MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	Calbiochem
MCA-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp)-OH	Calbiochem
Plasminogen (Mensch)	Sigma
Progelatinasen	Dr. Arkona, Inst. für Biochemie I, Jena
SDS	Serva
Standardproteinmischung Nr. 8	Merck
Suc-Ala-Ala-Phe-AMC	Novabiochem
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Calbiochem/Novabiochem

Suc-Leu-Tyr-AMC	Novabiochem
Sulfobetain (SB-12)	Boehringer
TEMED	Ferak
Thrombin (Mensch)	Calbiochem
Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA	Boehringer
Transferrin (Mensch)	Calbiochem
Triton X-100	Boehringer
Z-Arg-Arg-AMC	Calbiochem
Z-Phe-Arg-AMC	Bachem
Z-Phe-Arg-pNA	Serva

Alle anderen verwendeten Chemikalien, die hier nicht aufgeführt sind, waren von höchstmöglicher analytischer Reinheit.

2.2 Standardmethode zur Enzymreinigung

2.2.1 Reinigung der insulinspaltenden Membranprotease (ICMP) von *Pseudomonas aeruginosa*

Hierbei wurde der von Fricke et al. beschriebenen Methode gefolgt [107]. Die verwendeten Stammkulturen *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 bezogen wir von der Stammsammlung des Biochemischen Instituts der Universität Leipzig. Die Bakterien wurden auf einem 1%igen Hefeextrakt-Medium (Difco, Detroit, USA) bei 37°C, pH 7,0 und einer Belüftung von 6 l/min bei einer Sauerstoffsättigung von 70% in einem Fermentor (Biostat S, Braun, Melsungen) kultiviert und anschließend in Natriumchloridlösung und Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M) gewaschen. Mittels Glasperlenaufschluss (Glasperlen mit Durchmesser 0,1-0,11mm, Braun, Melsungen) wurden die Bakterien lysiert. Lösliche Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation (1 Stunde 90 000 x g) von den Zellhüllen getrennt. Das Zellhüllsediment wurde in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M) aufgenommen, gewaschen und bei -20°C gelagert. Um die Proteine aus den Zellhüllen zu lösen, wurde eine Solubilisierung mit dem Detergens Triton X-100 durchgeführt. Der Detergensgehalt des Solubilisates betrug ca. 4% w/v.

Die Reinigung der Membranprotease erfolgte mittels chromatographischer Verfahren. Auch hier war die Anwesenheit von Detergens notwendig, da es sonst zu einer irreversiblen Bindung der proteolytischen Aktivität an die chromatographische Matrix kam. Zunächst wurde eine Kupfer-Chelat-Chromatographie an einer Fractogel-Chelat-Säule (3,5 x 10cm, Merck) durchgeführt. Für die zweite und dritte Reinigungsstufe wurde eine Chromatographie an Red-Sepharose CL 4B-Säulen (2,5 x 6cm, Pharmacia) durchgeführt, wobei für den ersten Red-Sepharose-Reinigungsschritt ein Natriumchlorid-Gradient und bei dem zweiten ein Ammoniumsulfat-Gradient verwendet wurden. Die Enzymaktivität aller Fraktionen wurde mit radioaktiv markiertem Insulin (siehe Kapitel 2.3.1) bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität wurden vereinigt und an einer YM-10 Membran (Amicon) konzentriert. Die Proben wurden zur Entfernung von Ammoniumsulfat

dialysiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Reinigung der caseinspaltenden Membranprotease (CCMP) von *Bacillus cereus*

Die Reinigung erfolgte entsprechend der bei Fricke et al. beschriebenen Methode [108]. Die verwendeten Stammkulturen wurden von Dr. Verborg (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen, Braunschweig) als *Bacillus cereus* charakterisiert. Die Kultivierung erfolgte in einem Fermentor (Biostat S, Braun, Melsungen) bei 37°C, pH 7,0 und einer Belüftung von 7 l/min bei 70% Sauerstoffsättigung auf einem 1%igen Hefeextrakt-Medium (Difco, Detroit, USA). Nach Waschen mit Natriumchloridlösung und Zentrifugation wurden die Zellen mit Hilfe von Glasperlen (Durchmesser 0,1-0,11mm, Braun, Melsungen) aufgeschlossen. Durch mehrmalige Ultrazentrifugation wurden die Zellhüllen isoliert, anschließend gewaschen und in Tris-HCl-Puffer aufgenommen.

Die Solubilisierung erfolgte mit dem zwitterionischen Detergens Sulfobetain SB-12 (Zwittergent 3-12) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Zur Verringerung der hohen Detergenskonzentration im Solubilisat (4% w/v) wurde die Probe gegen Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M) dialysiert. So wurde das Solubilisat auf eine Detergenskonzentration von 0,2% w/v SB-12 eingestellt. Nur durch dieses zwitterionische Detergens war eine effiziente Solubilisierung der CCMP ohne Inaktivierung möglich. Eine Reihe von getesteten nicht-ionischen und anionischen Detergentien waren dafür ungeeignet [109].

Die Reinigung wurde an Fractogel TSK Butyl 650 (Merck) wie unter [108] beschrieben durchgeführt.

2.3 Standardmethode zur Aktivitätsbestimmung

2.3.1 Aktivitätsbestimmung der ICMP

Zur Bestimmung der Aktivität der ICMP von *Pseudomonas aeruginosa* wurde der Abbau von radioaktiv markiertem Insulin gemessen.

(a) Herstellung von ¹²⁵I-Insulin

Die Herstellung von ¹²⁵I-Insulin erfolgte mit der Chloramin-T (CAT)-Methode analog zur Herstellung von ¹³¹I-markiertem menschlichen Wachstumshormon nach Greenwood et. al. [110].

Ansatz:

- 20µl Sörensen-Puffer (pH 7,4; 0,05M)
- + 5µl ¹²⁵I-Natriumiodid (ca. 74 MBq)
- + 40µl Insulinlösung (enthält 5µg Schweineinsulin)
- + 20µl CAT 0,05% w/v, frisch gelöst, 20sec schütteln,
- 200µl HSA 5% w/v zum Abstoppen.

Die Trennung von ¹²⁵I-Insulin von der ungebundenen Radioaktivität erfolgte an einer Sephadex G 50 Säule (Pharmacia) nach Äquilibration der Säule mit Sörensen-Puffer (pH 7,4; 0,05M mit 0,1% w/v NaN₃). Unter diesen Bedingungen wurden ca. 95% des Iods an Insulin gebunden. Die Fraktio-

nen wurden gesammelt und die Radioaktivität von Aliquoten an einem γ -Counter (LB 2104, Berthold) bestimmt. Die ^{125}I -Insulin-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und der Tracer auf einen normierten cpm-Wert von ca. 1×10^6 cpm/ml mit Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M, mit 0,1% HSA) eingestellt.

(b) Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die Aktivität der Membranprotease von *P. aeruginosa* wurde mit Hilfe der Insulinmethode bestimmt [111]. Radioaktiv markiertes Insulin wird von dem untersuchten Enzym gespalten. Die Einstellung der Insulinkonzentration auf 100nM im Messansatz erfolgte mit kaltem (unmarkiertem) Insulin. Die Reaktion lief bei einer Temperatur von 37°C über eine Zeit von einer Stunde ab und wurde durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) und humanem Serumalbumin (HSA) als Cofällungsmittel (bessere Ausfällung von Insulin und größeren Peptid-Bruchstücken) im Eisbad abgestoppt. Die durch den Insulinabbau entstandenen Oligopeptide sind in TCA löslich und enthalten durch die Markierung von Tyrosinresten eine messbare Radioaktivität, die dem Anteil an abgebautem Insulin entspricht. Durch Zentrifugation wurden die Spaltpeptide von dem noch intakten Insulin und den Trägerproteinen getrennt.

Ansatz:

- 100 μl Enzymlösung
- + 200 μl Insulin-Tracer-Gemisch (bestehend aus 1 Teil ^{125}I -Insulin-Tracer und 1 Teil 400nM kaltem Insulin)
- + 100 μl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
- 1h bei 37°C im Wasserbad inkubieren, im Eisbad abstoppen,
- + 200 μl HSA 10% w/v in Aqua dest.
- + 200 μl TCA 40% w/v in Aqua dest.

nach 15min bei 10.000 x g für 5min zentrifugieren (Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg),
Radioaktivität im Überstand messen (Multi-Crystal Counter LB 2104, Berthold).

Die erhaltenen Werte wurden durch Substratleerwerte für die spontane Radiolyse des Tracers korrigiert und auf einen 100%-Wert (ungefällter Tracer) bezogen. Die proteolytische Aktivität wurde als μg gespaltenes Insulin pro Stunde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\mu\text{g Abbau}}{\text{h x ml}} = \frac{\Delta\text{PW} \times \text{Verdünnung} \times 2,296}{100\% - \text{LW}} \quad \begin{array}{l} \text{PW} \quad \text{Probenwert [cpm]} \\ \text{LW} \quad \text{Leerwert [cpm]} \\ \Delta\text{PW} \quad \text{PW} - \text{LW [cpm]} \end{array}$$

Der Faktor 2,296 ergibt sich aus der eingesetzten Konzentration an kaltem Insulin (100nM) und der Molmasse von Insulin.

2.3.2 Aktivitätsbestimmung der CCMP

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Membranprotease von *Bacillus cereus* erfolgte durch Messung des Abbaus von Azokasein [112]. Die Reaktion lief über eine Zeit von einer Stunde

bei einer Temperatur von 37°C ab und wurde durch TCA-Fällung im Eisbad unterbrochen. Die durch den Abbau von Azokasein entstandenen gefärbten Peptide waren in TCA löslich und konnten durch Zentrifugation im Unterschied zu größeren Peptiden nicht sedimentiert werden. Die Spaltpeptide zeigten ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 366nm.

Ansatz: 100µl Enzymlösung
 + 100µl Azokaseinlösung 1% w/v in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
 1h bei 37°C im Wasserbad inkubieren, im Eisbad abstoppen,
 + 200µl TCA 10% w/v in Aqua dest.
 nach 15min bei 10.000 x g für 5min zentrifugieren (Laborzentrifuge
 TH 12, Janetzki, Engelsdorf),
 Extinktion im Überstand bei 366nm gegen Aqua dest. messen (Digitalfotometer 6115, Eppendorf, Hamburg).

Es wurde jeweils die Extinktion der Hauptwerte sowie der Enzym- und Substratleerwerte in mehreren Parallelbestimmungen gemessen. Die proteolytische Aktivität wurde in proteolytischen Einheiten pro Volumeneinheit (PU = nkat/ml) angegeben. Die Berechnung wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\text{Proteolytische Aktivität (PU/ml)} = \frac{\Delta E \times 10^6 \times V}{\epsilon \times d \times \Delta t \times v}$$

ΔE	Extinktionsänderung
V	Gesamtvolumen
ϵ	Extinktionskoeffizient
d	Schichtdicke
Δt	Zeitspanne
v	Probenvolumen

Die Schichtdicke der verwendeten Küvette betrug 1cm. Der mittlere Extinktionskoeffizient von Azokasein beträgt 95.300 l x mol⁻¹ x cm⁻¹ [112]. Eine proteolytische Einheit (PU) entspricht 1nmol abgebautem Azokasein im TCA-Überstand pro ml eingesetzter Enzymlösung und Sekunde.

2.4 Versuche mit Inhibitoren

Zur Charakterisierung der Aminosäurereste im aktiven Zentrum wurden bei Versuchen mit Camelysin DEPC (Diethylpyrocarbonat) sowie bei Versuchen für Camelysin und Imelysin EEDQ (N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolon) eingesetzt. EEDQ wurde in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M) gelöst. DEPC wurde in Aqua dest. gelöst, da die Substanz in Gegenwart von Tris eine Halbwertszeit von 1,25min hat [113]. Um die Tris-Ionen zu entfernen, wurde die Membranprotease von *B. cereus* vor den Versuchen mit DEPC über Nacht gegen Phosphatpuffer (pH 7,5; 0,05M) dialysiert. Bei Bedarf wurde zum Anlösen der Substanzen eine geringe Menge an organischem Lösungsmittel (DMSO) verwendet, die 5% v/v des Gesamtvolumen im Ansatz nicht überschritt.

2.4.1 Versuche mit Diethylpyrocarbonat

Diethylpyrocarbonat (DEPC), das spezifisch mit Histidinresten reagiert, wurde in einer Stammlösung mit einer Konzentration von 40nM eingestellt. Der hemmende Einfluss wurde in Konzentrationsabhängigkeit und Zeitabhängigkeit bestimmt. Dazu wurden jeweils verschiedene Konzentrationsbereiche und Einwirkzeiten gewählt. Nachdem Enzym und Inhibitor bei Raumtemperatur vorinkubiert worden waren, wurde die Restaktivität des Enzyms im Vergleich zu Enzym-, Substrat- und Inhibitorleerwerten mit der Azokaseinmethode (siehe 2.3.2) gemessen.

Ansatz: 50µl Enzymlösung CCMP
 + 50µl DEPC (10-40mM) in Aqua dest.
 0-30min bei Raumtemperatur inkubieren, danach Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit der Azokaseinmethode.

Nachdem die Membranprotease von *B. cereus* gehemmt worden war, wurde durch Zugabe von Hydroxylamin (NH₂OH) die Reversibilität der Reaktion getestet. Der pH-Wert von Hydroxylamin wurde durch Zugabe von Natronlauge zur Vermeidung von Störungen durch einen sauren pH-Wert auf 7 eingestellt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

Ansatz: 50µl Enzymlösung CCMP
 + 50µl DEPC 40mM in Aqua dest.
 bei Raumtemperatur 30min inkubieren,
 + 100µl NH₂OH (pH 7,0; 0,4M) in Phosphatpuffer (pH 7,5; 0,05M)
 bei Raumtemperatur 10, 20, 30, 40, 50 und 60min inkubieren, danach Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit der Azokaseinmethode.

2.4.2 Versuche mit N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolon (EEDQ)

EEDQ, das spezifisch mit Carboxylgruppen reagiert, wurde mit einer geringen Menge DMSO angelöst und dann mit einem Phosphatpuffer (KH₂PO₄/NaOH; pH 6,0; 0,05M) versetzt. Es wurden Konzentrationen von 0 bis 1,5mM eingesetzt.

Ansatz: 50µl Enzymlösung
 + 50µl Inhibitorlösung (0-1,5mM)
 bei Raumtemperatur 30min inkubieren,
 dann Aktivitätsbestimmung in den jeweiligen Ansätzen für die beiden Enzyme nach der Azokaseinmethode für die CCMP und nach der Insulinmethode für die ICMP.

2.5 Untersuchungen zur Spaltspezifität

2.5.1 Spaltbedingungen

Als Substrat mit einer bekannten Aminosäuresequenz wurden die Insulin A-Kette und die Insulin B-Kette verwendet. Diese wurden in einer Konzentration von 3mM in einem Ammoniumcarbonatpuffer (pH 7,0; 0,05M) gelöst.

Ansatz: 720µl Insulin A- oder B-Kette 3mM in Ammoniumcarbonatpuffer (pH 7,0; 0,05M)
 + 180µl Enzymlösung
 bei 37°C im Wasserbad für 1h inkubieren,
 + 90µl TFA 10% w/v zum Ausfällen
 10min bei 10.000 x g zentrifugieren (Laborzentrifuge TH 12, Janetzki, Engelsdorf).

Durch Zentrifugation entstand ein Sediment, das größere Peptide sowie das Enzym enthielt. Der Überstand mit den kleineren Spaltbruchstücken wurde weiter verarbeitet.

2.5.2 Trennung der Bruchstücke mit High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Mittels reversed-phase HPLC (Merck-D-6000 HPLC Manager) wurden die durch Einwirkung des Enzyms auf die Insulin A- bzw. Insulin B-Kette entstandenen Spaltbruchstücke getrennt. Dazu wurde eine 250 x 4mm LiChroSpher 300 RP-18 (10µm)-Säule (Merck) eingesetzt. Es wurde ein Merck-Hitachi-Lichro-Graph-System mit einer L-6200 Niedriggradientenpumpe und einem 655-A UV-Detektor verwendet. Wegen der unterschiedlichen Hydrophobizität und Größe der Insulin A- und B-Kette wurden zwei verschiedene Acetonitrilgradienten eingesetzt. Für die Insulin A-Kette wurde mit einem Gradienten von 2% bis 60% Acetonitril (ACN) mit 0,1% TFA in 60min gearbeitet. Für die längere und stärker hydrophobe Insulin B-Kette wurde ein Gradient von 2% bis 70% ACN mit 0,1% TFA in 70min verwendet. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 220nm. In einem präparativen Lauf wurden mit kleineren Volumina die Zeiten bestimmt, bei denen die Peaks der Spaltpeptide auftreten. Danach wurden die Hydrolyseprodukte in getrennten Fraktionen gesammelt. Bei der Durchführung der HPLC unterstützten mich dankenswerterweise Frau Dr. Menge (†) und Frau Thielemann (Institut für Biochemie, Abteilung Pflanzenbiochemie, Halle).

2.5.3 Identifikation der Bruchstücke durch Massenspektrometrie und N-terminale Sequenzierung

Die massenspektroskopischen Analysen wurden freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (jetzt Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) durchgeführt. Damit konnten die Bruchstücke und damit die Spaltstellen in den Insulinmolekülen identifiziert werden. Hierfür wurde ein Reflektron-Typ Time-of-flight (TOF) Massenspektrometer (Reflex,

Bruker-Franzen Analytik, Bremen) benutzt. Die Spaltpeptide wurden in Form von Ionen, die durch Laseranregung bei 337nm entstanden, mit einer Beschleunigungsspannung von 28,5kV aufgenommen. Die resultierenden Daten wurden mit der Software XMASS ausgewertet.

In Zweifelsfällen wurde nach Spaltung durch die CCMP eine N-terminale Sequenzierung der Bruchstücke durchgeführt. Diese wurde freundlicherweise von Herrn Dr. P. Rücknagel (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) vorgenommen.

2.6 Abbau synthetischer Proteasesubstrate

2.6.1 Abbau von chromogenen Proteasesubstraten

Als chromogene Substrate dienten Aminosäuresequenzen mit einer para-Nitroanilid-Gruppe am C-Terminus. Erfolgt eine Freisetzung dieser chromogenen Gruppe durch die Spaltung der Amidbindung zwischen Peptidrest und pNA, entsteht eine meßbare Farbänderung. Von dieser kann auf eine Spaltung des Substrats durch die ICMP bzw. CCMP geschlossen werden.

Von den Peptidsubstraten wurden Lösungen mit einer Konzentration von 1mM in Tris-HCl Puffer (pH 7,5; 0,05M) hergestellt, wobei die Substanzen in DMSO angelöst wurden. Der Ansatz wurde auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt.

Ansatz: 50µl Enzymlösung
 + 50µl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
 + 100µl Substratlösung 1mM

Inkubation bei 37°C über 30 bis 120min

Die Messung der Extinktion erfolgte nach jeweils 30min bei einer Wellenlänge von 405nm am Digitalphotometer 6115 (Eppendorf, Hamburg) in je drei Parallelbestimmungen gegen Aqua dest. und wurde um den Wert für die spontane Hydrolyse der Substrate als Substratleerwert korrigiert.

Der Extinktionskoeffizient für p-Nitroanilin beträgt $9.900 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Es wurden folgende

Substrate verwendet:	Bz-Phe-Val-Arg-pNA	Substrat für Thrombin
	Boc-Leu-Gly-Arg-pNA	Substrat für C3-Konvertase
	Z-Phe-Arg-pNA	Substrat für Kallikrein
	Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA	Substrat für Plasmin

2.6.2 Abbau von fluorogenen Proteasesubstraten

Fluorogene Substrate bestehen aus einer kurzen Aminosäuresequenz und einer fluorogenen Gruppe. Wird diese Molekülgruppe durch Spaltung freigesetzt, kann mit Hilfe spektrometrischer Methoden eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden. Die Intensität ist direkt proportional zur Menge des gespaltenen Substrats. Der fluorogene Bestandteil der hier verwendeten Substrate ist ein C-terminal gebundener 7-Amino-4-methylcoumarin-Rest. Die Messungen erfolgten an einem Fluoreszenzspektrometer Hitachi Typ F 2000 bei einer Anregungswellenlänge von 365nm und einer Emissionswellenlänge von 440nm.

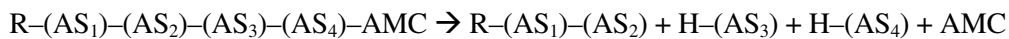
Die Zugabe von Aminopeptidase M diente zur Unterscheidung einer Spaltung zwischen der fluorogenen Gruppe und dem benachbarten Aminosäurerest von einer Spaltung zwischen zwei Aminosäureresten im Innern des Substrates. Eine Zunahme der Fluoreszenz kann bei der oben angegebenen Anregungs- und Emissionswellenlänge nur gemessen werden, wenn das 7-Amino-4-methylcoumarin als freie Substanz vorhanden ist. Eine Spaltung an einer anderen Stelle des Substrats würde unerkannt bleiben. Um auch solche Spaltstellen zu erfassen, wurde Aminopeptidase M eingesetzt. Dieses Enzym spaltet die entstandenen Bruchstücke vom freien N-Terminus her und führt so zu einer verzögerten Freisetzung der fluorogenen Gruppe und damit zu einer meßbaren Zunahme der Fluoreszenz.

ohne Aminopeptidase:



→ keine Zunahme der Fluoreszenz meßbar

mit Aminopeptidase:



→ Zunahme der Fluoreszenz meßbar

Die verwendeten AMC-Proteasesubstrate sowie die Proteasen, die diese Substrate typischer Weise spalten, sind in Tab. 4 (S. 35) zusammengestellt. Eine Messung der Aktivität gegenüber fluorogenen Substraten war erst nach Minimierung der Detergenskonzentration in der Messlösung auf 0,01% möglich. Gründe hierfür könnten sein, dass bei zu hoher Detergenskonzentration das Substrat aus dem aktiven Zentrum verdrängt wird oder die Protease reversibel inaktiviert wird.

Eine weitere Möglichkeit, den Abbau von synthetischen Peptiden zu bestimmen, ist die Verwendung von intramolekular gequenchten Substraten. Solche Substrate werden eingesetzt, wenn die zu untersuchende Protease nur zur internen Spaltung von längeren Peptidketten befähigt ist und C-terminal stehende größere aromatische Reste (fluorogene oder chromogene aromatische Gruppen) nicht bei der Substratbindung akzeptiert werden. Bei diesen Substraten trennt eine Peptidsequenz eine fluoreszente Gruppe, die als Donor fungiert, von einer anderen Gruppe, die als Akzeptor dient. Die Fluoreszenz wird in diesem Zustand unterdrückt. Wenn eine Peptidbindung zwischen diesen beiden Gruppen gespalten wird, kommt es zu einer Freisetzung der fluorogenen Gruppe und so zu einer Zunahme der Fluoreszenz. Diese ist proportional zu der Menge des hydrolysierten Peptids [114]. Vertreter dieser Substrate enthalten z.B. eine 2,4-Dinitrophenyl-Gruppe, durch die eine fluorogene N-terminale MCA-Gruppe gequench wird. Die verwendeten Substrate können ebenfalls Tab. 4 (S. 35) entnommen werden.

Die Messungen für die fluorogenen Substrate erfolgten am Fluoreszenzspektrometer Hitachi Typ F2000 bei einer Anregungswellenlänge von 328nm und einer Emissionswellenlänge von 393nm [114].

Ansatz:	50µl	Enzymlösung
	+	940µl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
	+	10µl Substrat 2mM in DMSO gelöst
bzw.	50µl	Enzymlösung

- + 100µl Aminopeptidase M
- + 840µl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
- + 10µl Substrat 2mM in DMSO gelöst

Um einen Vergleich der Umsatzraten von Substraten mit zwei verschiedenen fluorogenen Gruppen durchführen zu können, wurden für die zwei verwendeten fluorogenen Gruppen AMC und MCA jeweils Eichkurven am selben Fluoreszenzspektrometer erstellt. Hierfür wurden in mehreren Parallelmessungen die relativen Fluoreszenzwerte (RFU) für definierte Konzentrationen bestimmt. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden entsprechend dem benutzten Substrat mit einem aus den Eichkurven ermittelten Faktor korrigiert. Der Korrekturfaktor beträgt für die Umrechnung von mit AMC-Substraten gemessenen Werten in mit MCA-Substraten gemessene Werte 1,085.

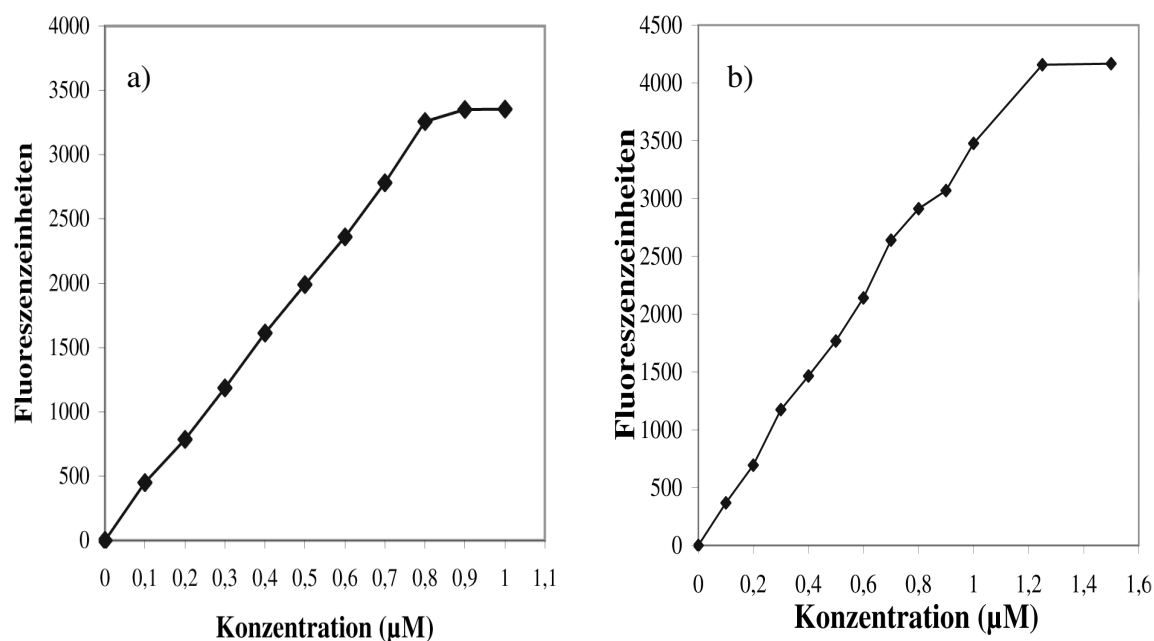


Abb. 3 Eichkurven für die Zuordnung von Konzentrationen (x-Achse) zu gemessenen Fluoreszenzeinheiten (y-Achse) zur Ermittlung des Korrekturfaktors zum Vergleich der Aktivitäten der ICMP und CCMP gegenüber den Substraten mit verschiedenen fluorogenen Gruppen a) AMC b) MCA

Zur Ermittlung der Spaltstelle bei der Spaltung des MMP-2- und des TACE-Substrates durch die CCMP wurden die Spaltprodukte mit reversed-Phase-HPLC (RP18-Säule, isokratische Elution Wasser/Acetonitril 75:25) getrennt und durch ihre Fluoreszenz mit einem Fluoreszenz-Detektor (RF-551, Shimadzu, Tokio, Japan) bei λ_{ex} 328nm und λ_{em} 393nm identifiziert. Die HPLC wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Willhardt (Institut für Physiologische Chemie, Halle) durchgeführt. Für die Proben wurden Inkubationszeiten zwischen 0 und 60min gewählt. Es wurde nach dem oben angegebenen Ansatz verfahren.

2.7 Enzymkinetische Messungen für die CCMP

Die maximale Geschwindigkeit V_{\max} und die Michaelis-Konstante K_m sind wichtige kinetische Parameter eines Enzyms. Sie lassen sich durch Variation der Substratkonzentration und der Messung des Substratumsatzes pro Zeiteinheit bestimmen. Um einem bestimmten Wert gemessener Fluoreszenzeinheiten eine bestimmte Konzentration zuordnen zu können, wurden die unter 2.6.2 in Abb. 3 gezeigten Eichkurven verwendet. Für folgende Substrate wurden die Untersuchungen nach dem unter 2.6.2 beschriebenen Ansatz mit Substratkonzentrationen zwischen 1 und 40 μM in dreifacher Bestimmung durchgeführt:

Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC + Aminopeptidase M

Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC + Aminopeptidase M

MCA-Pro-Leu-Ala-Nla-Dpa-Ala-Arg-NH₂

MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂

MCA-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(Dnp)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂

Die Reaktionen folgen einer normalen Michaelis-Menten-Kinetik. Bei der Auswertung wurden verschiedene Linearisierungsverfahren (Lineweaver-Burk-Diagramm, Eadie-Hofstee-Diagramm und Hanes-Diagramm) angewendet und V_{\max} und K_m graphisch sowie mit der dem entsprechenden Buch von Bisswanger [115] beiliegenden Enzymkinetiksoftware ermittelt.

2.8 Abbau von Proteinen

2.8.1 Spaltbedingungen

Es wurde untersucht, welche im menschlichen Körper vorkommenden wichtigen Proteine von der ICMP bzw. CCMP gespalten werden. Dazu wurde in folgender Ansatz verwendet:

Ansatz: 50 μl Proteinlösung 2mg/ml
 + 16,6 μl Enzymlösung
 + 33,4 μl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
 bei 37°C im Wasserbad für 1 und 2h inkubieren,
 + 10 μl SDS 10% w/v zum Abstoppen der Reaktion.

Folgende Proteine wurden verwendet:

Komponenten des Immunsystems	Ig G, Ig A, Lysozym
Komponenten des Gerinnungs- und fibrinolytischen Systems	Fibrinogen, Fibrin, Antithrombin III, Plasminogen
Proteine des Binde- und Stützgewebes	Kollagen Typ I, Laminin, Fibronectin, Aktin
Akute-Phase-Proteine	C-reaktives Protein, Haptoglobin
Plasma-Protease-Inhibitoren	α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, α_2 -Antiplasmin
Eisenbindungsproteine	Lactoferrin, Transferrin
Sonstige Serum- und andere Proteine	Serumalbumin, Globin, Casein-Gemisch

Bei folgenden Ansätzen wurden längere Inkubationszeiten gewählt:

Lactoferrin (4h und 8h für ICMP), α_2 -Makroglobulin (4h und 8h für ICMP), Fibrinogen (2h und 4h für beide Enzyme), Fibrin (2h und 4h für CCMP, 4h und 8h für ICMP).

Um den Abbau von Fibrin zu untersuchen, war es zunächst erforderlich, ein unlösliches Fibringerinnsel herzustellen. Dazu wurde wie folgt verfahren [116]:

Ansatz: 100 μ l Fibrinogen 2mg/ml
 + 25 μ l Thrombin 1 μ M
 + 7,5 μ l CaCl₂ 0,2M
 bei 37°C 1h im Wasserbad inkubieren,
 10min bei 10.000 x g zentrifugieren (Laborzentrifuge TH 12, Janetzki, Engelsdorf), Überstand verwerfen,
 sichtbares festes weißes Gerinnsel mit Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M) waschen, sofort weiter verarbeiten oder einfrieren.

Um das Enzym auf das Fibrin einwirken zu lassen, wurden zu dem Gerinnsel hinzu gegeben:

 100 μ l Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
 + 20 μ l Enzymlösung

Nach der Inkubation bei 37°C im Wasserbad für die oben angegebenen Zeiträume wurden 100 μ l Überstand abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l SDS 10% w/v abgestoppt. Die Entstehung von Spaltstücken wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft.

2.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit Bisacrylamid als Quervernetzer entstehen Polyacrylamidgele. Sie zeichnen sich durch ihre hohe chemische und mechanische Stabilität sowie eine äußerst geringe Elektroosmose aus. Zum Start der Polymerisation wurde Ammoniumpersulfat eingesetzt. Bei der SDS-Elektrophorese werden Proteine ausschließlich nach unterschiedlichen Molekülgrößen getrennt. In Gegenwart von SDS dissoziieren die meisten oligomeren Proteine in ihre biologisch inaktiven Untereinheiten. Durch die Bindung von SDS über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen an die Proteine werden fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen innerhalb der Proteine zerstört und damit deren Sekundär- und Tertiärstruktur weitgehend aufgehoben. Das Erhitzen der Proben führt zu einer weiteren Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Sollen auch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten aufgespalten werden, um so verbundene Untereinheiten zu trennen, so kann zusätzlich 2-Mercaptoethanol oder ein anderes Reduktionsmittel hinzugegeben werden. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergens SDS werden die Eigenladungen von Proteinen so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Peptideinheit entstehen. Durch die Poren des Polyacrylamidgels werden größere Moleküle stärker behindert und bewegen sich so langsamer als kleine Moleküle [117-120].

Mit dem elektrophoretischen Nachweisverfahren konnte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß ein Protein durch die ICMP bzw. CCMP abgebaut wurde. Dazu wurden auf die Gele stets

ein Substratleerwert, ein Enzymleerwert und Proben mit Werten nach Reaktion von Substrat und Enzym aufgetragen.

Probenvorbereitung: Proben aus dem unter 2.8.1 beschriebenen Ansatz für 5min kochen
+ 1 Spatelspitze Saccharose
+ 5µl Bromphenolblau 1% w/v

Die Bearbeitung der Proben, die Fibrinogen enthalten, wurde modifiziert, indem vor dem Kochen 5µl Mercaptoethanol 2% w/v zur Reduktion hinzugefügt wurde.

Als Elektrophoreseapparatur wurde eine MiniProtean Elektrophoresekammer (Bio Rad, Berkeley, USA) verwendet. Zur Herstellung der Gele fanden folgende Pufferlösungen Verwendung:

Trenngelpuffer: Tris-HCl-Puffer (1,5M; pH 8,8); 0,4% SDS

Sammelgelpuffer: Tris-HCl-Puffer (0,5M; pH 6,8); 0,4% SDS

Laufpuffer: 0,025M Tris-0,192M Glycin-Puffer; pH 8,3; 0,1% SDS

Je nach Molekülgröße der Proteine wurden Gele mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt und daraus resultierender unterschiedlicher Porengröße verwendet.

7,5%ige Gele wurden verwendet für: Fibrinogen, Fibrin, α_2 -Makroglobulin

15%ige Gele wurden verwendet für: α_1 -Antitrypsin, Lysozym, Globin, CRP, Casein

Für die übrigen Substrate wurden 10%ige Gele verwendet. Als Sammelgel diente ein 6,6%iges Gel.

Die Gele wurden wie folgt hergestellt:

4,9ml (7,5%iges Gel)	Acrylamidlösung
6,5ml (10%iges Gel)	(Gemisch Acrylamid und Bisacrylamid Verhältnis
9,8ml (15%iges Gel)	37,5:1)
2,5ml (6,6%iges Gel)	
+ 5,0ml	Trenn- bzw. Sammelgelpuffer
	mit Aqua tridest. auf 20ml auffüllen, entgasen.
+ 20µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
+ 200µl (für Trenngele)	10% w/v Ammoniumpersulfatlösung
30µl (für Sammelgel)	

Als Eichproteine wurde die Standardproteinmischung Nr.8 von Merck verwendet. Diese enthält: Ovalbumin (42.700Da), Glutamat-Dehydrogenase (56.000Da), Ovotransferrin (78.000Da), Phosphorylase b (97.400Da), β -Galactosidase (116.300Da), Myosin (200.000Da). Die Maße der 1mm dicken Gele betragen 9,3 x 6,0cm. Der Lauf erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 7mA im Sammelgel und 13mA im Trenngel bei maximaler Spannung bis die Bromphenolblau-Front das Ende der Platte erreicht hatte. Anschließend wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt. Es erfolgte eine Fixierung für 30min in einer Fixierlösung und danach eine Färbung in Coomassieblau. Die Gele wurden anschließend mit Entfärbelösung behandelt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Alle verwendeten Lösungen wurden mit Aqua tridest. hergestellt.

Fixierlösung: 300ml Methanol + 700ml Aqua tridest. + 34,5g Sulfosalicylsäure + 115g TCA

Färbelösung: 500ml Methanol + 1g Coomassie + 500ml Essigsäure 10%, dann filtrieren

Entfärbelösung: 500ml Methanol + 160ml Essigsäure 10%

2.9 Untersuchung des Einflusses der ICMP und CCMP auf die Plasminogenaktivität

Das pNA-Substrat Tos-Gly-Pro-Lys-pNA (Chromozym ® PL) wird unter der Einwirkung von Plasmin zu Tos-Gly-Pro-Lys und pNA gespalten. Die von uns untersuchten Membranproteasen bauen dieses Substrat nicht ab. Die Extinktionszunahme ist der Menge des gebildeten pNA proportional und lässt so auf die vorhandene Plasminaktivität schließen. In den Ansätzen sollten zunächst die Membranprotease und Plasminogen miteinander reagieren, und es sollte geklärt werden, ob dadurch eine Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin erfolgt. Die Bestimmung einer Änderung der Plasminaktivität wurde an Hand der Spaltung des pNA-Substrats verfolgt. Plasminogen wurde mit einer Konzentration von 2,5 units/ml (entspricht 7mg Protein/ml) in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M) gelöst. Das Substrat wurde in einer geringen Menge DMSO angelöst und dann mit Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M) auf eine Konzentration von 1mM eingestellt.

Ansatz: 50µl Plasminogen 2,5 units/ml in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
 + 50µl Enzymlösung
 Inkubation bei 37°C für 60min
 + 100µl Chromozym ® PL 1mM
 30, 60, 90min bei 37°C inkubieren.

Danach erfolgte die Extinktionsmessung bei 405nm am Digitalphotometer 6115 (Eppendorf, Hamburg) in je vier Parallelmessungen nach den entsprechenden Zeitintervallen. Leerwerte wurden jeweils bestimmt für das Substrat Chromozym ® PL, für die Reaktion zwischen Plasminogen und Substrat sowie für die beiden Bakterienenzyme.

Für die Bestimmung der Plasminaktivität mit einem fluorogenen Substrat wurde das spezifische fluorogene Plasminsubstrat Boc-Glu-Lys-Lys-AMC verwendet, gegen das die Vorstufe Plasminogen keine Aktivität zeigt. Durch eine zeitlich gestaffelte Messung sollte überprüft werden, ob es unter Einwirkung der Bakterienproteasen zu einer Aktivierung von Plasminogen kommt, d.h. der Anteil von wirksamem Plasmin im Ansatz steigt.

Ansatz: 25µl Enzymlösung
 + 25µl Plasminogen 1µM gelöst in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
 bei 30°C für 0, 1 und 2h inkubieren,
 + 940µl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
 + 10µl Substrat 2mM in DMSO
Leerwert: 25µl Plasminogen 1µM
 + 965µl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
 + 10µl Substrat 2mM in DMSO

Die Messungen der Aktivitätsänderungen des Plasminogens wurden am Fluoreszenzspektrometer Hitachi Typ F2000 bei einer Anregungswellenlänge von 365nm und einer Emissionswellenlänge von 440nm durchgeführt.

Bei allen Untersuchungen war es wichtig, dass sie zügig hintereinander durchgeführt wurden. Des Weiteren musste darauf geachtet werden, dass die verwendeten Biochemikalien, insbesondere Thrombin und AT III, nach dem Herstellen der 1µM Lösungen im Eisbad aufbewahrt wurden, da sonst ein rascher Aktivitätsverlust eintrat.

2.11 Versuche zur Aktivierung von Progelatinasen durch die CCMP

Es sollte überprüft werden, ob die drei Progelatinase B-Formen von der *B. cereus* Membranprotease aktiviert werden, nachdem von Dr. Arkona (Institut für Biochemie I, Jena) im Gelatine-Zymogramm gezeigt werden konnte, dass alle drei Formen der Progelatinase B unter der Wirkung der *B. cereus*-Protease zu kleineren Molekulargewichten abgebaut wurden, das heißt, eine partielle Proteolyse erfolgte, die möglicherweise eine Aktivierung bewirkte.

Dazu wurden die Progelatinasen, die uns freundlicherweise von Dr. Arkona überlassen wurden, und die *B. cereus*-Protease zusammen inkubiert. Danach ließen wir die möglicherweise aktivierten Progelatinasen auf ihr bevorzugtes Substrat Kollagen Typ I einwirken. Es wurden entsprechende Leerwerte für das *B. cereus*-Enzym, die Progelatinasen, Kollagen Typ I und die Reaktion zwischen der Bakterienprotease und Kollagen zur Kontrolle von autolytischen Prozessen durch die Progelatinasen bzw. für die Eigenaktivität der Membran-Protease in der Kollagenspaltung angesetzt. Mittels SDS-Elektrophorese wurde nach der unter 2.8.2 beschriebenen Versuchsanordnung mit den dort erwähnten Puffern und Lösungen getestet, ob ein Kollagenabbau durch die Progelatinasen nach Reaktion mit der *B. cereus* Protease und damit eine Aktivierung stattgefunden hatte.

Folgender Ansatz wurde für die Reaktion verwendet:

Ansatz 1:	20µl Progelatinasen aus buffy coat in Tris-HCl-Puffer (pH 7,4; 0,02M; 0,2M NaCl; 5mM CaCl ₂)
	+ 4µl Enzymlösung CCMP
	Inkubation bei 37°C über 2h
Ansatz 2:	5µl aus Ansatz 1
	+ 30µl Kollagen Typ I (1mg/ml) in Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
	Inkubation bei 37°C über 1h und 2h
Leerwert 1	30µl Kollagen Typ I (1mg/ml)
	+ 5µl Enzymlösung CCMP
	+ 25µl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
Leerwert 2	30 µl Kollagen Typ I (1mg/ml)
	+ 30µl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)
Leerwert 3	5µl Enzymlösung CCMP
	+ 55µl Tris-HCl-Puffer (pH 7,5; 0,05M)

Danach erfolgte eine Weiterverarbeitung der Proben wie unter 2.8 beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der ICMP von *Pseudomonas aeruginosa*

3.1.1 Spaltspezifität der ICMP

Die Spaltspezifität einer Protease wird ermittelt, um bei Proteinen mit komplexen Anforderungen an eine Spaltsequenz, für die sich entsprechende Substrate nur schwer durch bloßes Probieren finden lassen, Rückschlüsse auf sinnvolle synthetische Substrate ziehen zu können. N-terminal geschützte Substrate mit einem Aminosäurerest und einer chromophoren Gruppe wurden durch die von uns untersuchten Membranproteasen nicht gespalten.

Insulin ist ein Substrat, das von der ICMP mit hoher Aktivität gespalten wird. Es liegt daher nahe, bei der Bestimmung der charakteristischen Spaltstellen der ICMP auf dieses Substrat zurückzugreifen. Bei den Versuchen zeigte sich, dass lediglich die Insulin B-Kette abgebaut wird. Die Insulin A-Kette bleibt unter Einwirkung der ICMP unverändert. Die Inkubation der Insulin B-Kette mit der ICMP erfolgte über verschieden lange Zeiträume. Die entstandenen Spaltstücke wurden mittels HPLC getrennt. Der Peak der Insulin B-Kette zeigte sich nach einer Retentionszeit von ca. 47min. Er zeichnete sich dadurch aus, dass er bei zunehmender Inkubationszeit an Größe abnahm, wohingegen die Größe der Peaks, die den einzelnen Spaltstücken entsprechen, zunahm.

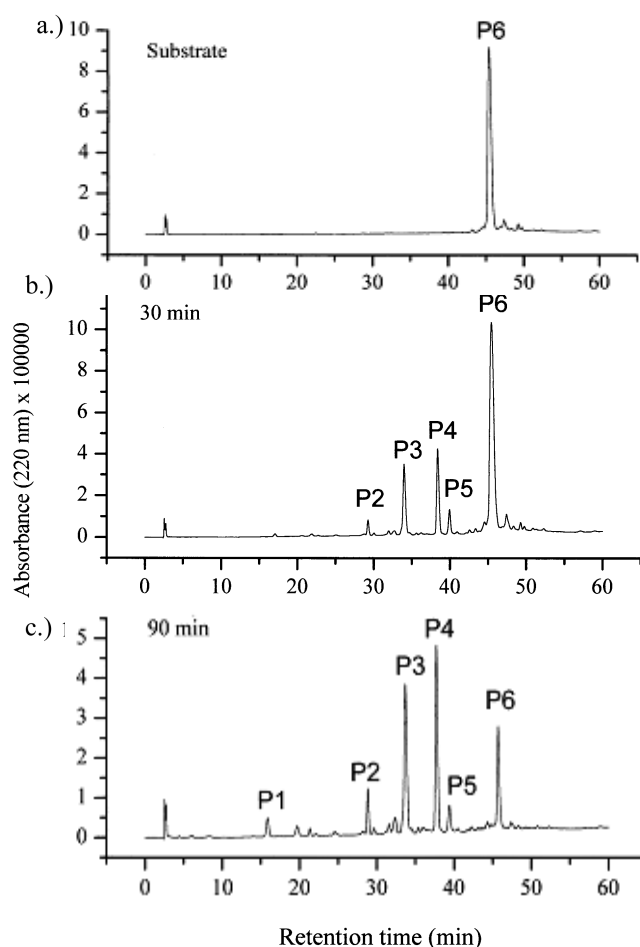


Abb. 4 Trennung der Bruchstücke durch HPLC nach Spaltung der Insulin-B-Kette durch die ICMP (P1-P5: entstehende Spaltprodukte, P6: Insulin B-Kette)

- a) Leerwert der Insulin B-Kette
- b) nach 30min Inkubationszeit der Insulin B-Kette mit der ICMP
- c) nach 90min Inkubationszeit der Insulin B-Kette mit der ICMP

Von einem präparativen Ansatz mit einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden bei Durchführung der HPLC bei den entsprechenden Retentionszeiten die Eluate der Peaks, die den einzelnen Spaltstücken entsprechen, gesammelt. Hieraus wurden massenspektrometrisch die Molekulargewichte bestimmt, sodass den einzelnen Peaks einzelne Spaltstücke bzw. die Insulin-B-Kette zugeordnet werden konnten.

Es fanden sich folgende Spaltstellen der ICMP beim Abbau der Insulin B-Kette: Glu¹³ -↓- Ala¹⁴, Tyr¹⁶ -↓- Leu¹⁷, His¹⁰ -↓- Leu¹¹, Phe²⁵ -↓- Tyr²⁶. Die beiden zuerst Genannten (Glu¹³ -↓- Ala¹⁴, Tyr¹⁶ -↓- Leu¹⁷) sind als primäre Spaltstellen anzusehen, da bereits nach kurzen Inkubationszeiten hohe Peaks bei den entsprechenden Retentionszeiten entstehen. Die beiden letztgenannten Spaltstellen (Phe²⁵ -↓- Tyr²⁶, His¹⁰ -↓- Leu¹¹) sind demnach sekundäre Spaltstellen. Die Peaks erscheinen erst nach längeren Inkubationszeiten und sind wesentlich niedriger.

Als allgemeine Aussage zu den Charakteristika der Spaltstellen der ICMP lässt sich formulieren, dass die ICMP in der P₁'-Position hydrophobe Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten bevorzugt, mit Ausnahme des Tyrosin in der P₁'-Position in einer der sekundären Spaltstellen. In der P₁-Position befinden sich große Aminosäuren mit aromatischen (Tyr, His, Phe) oder sauren Seitenketten (Glu).

3.1.2 Abbau synthetischer Proteasesubstrate

(a) Abbau von chromogenen Proteasesubstraten

Von den getesteten synthetischen pNA-Proteasesubstraten wurde Boc-Leu-Gly-Arg-pNA am besten gespalten. Allerdings war die Aktivität gegenüber diesem Substrat nur gering. Das Peptid ist ein typisches Substrat für die C3-Konvertase, den Blutgerinnungsfaktor Xa sowie den Plasminogenaktivator. Andere Substrate, die ebenfalls für Proteasen des Blutgerinnungssystems (Thrombin, Plasmin) benutzt werden, sowie ein Kallikreinsubstrat werden in geringerem Ausmaß abgebaut. Die relativen Abbauraten sind in Tab. 3 zusammengefasst. Substrate von Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen und Dipeptidasen wurden nicht abgebaut.

Tab. 3 Abbau chromogener pNA-Substrate durch die ICMP

Substrate	relative Abbaurate (%)
Boc-Leu-Gly-Arg-pNA (C3-Konvertase, Faktor Xa, Plasminogenaktivator)	100,0%
Z-Phe-Arg-pNA (Kallikrein)	75,8%
Bz-Phe-Val-Arg-pNA (Thrombin)	30,9%
Tosyl-Gly-Pro-Lys-pNA (Plasmin)	25,3%

(b) Abbau von fluorogenen Proteasesubstraten

Gegenüber den sensitiveren fluorogenen Substraten zeigte die ICMP deutlich höhere proteolytische Aktivität. Alle Substrate mit mehr als zwei Aminosäuren in der Peptidkette wurden mit und ohne Zugabe von Aminopeptidase M getestet.

Tab. 4 Abbau synthetischer fluorogener Substrate durch die ICMP

Substrat	Typisches Substrat für	Relative Abbaurate %	
		ohne Amino- peptidase M	mit Amino- peptidase M
Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC	Furin, Kex2 Endoprotease	3,09	14,71
Boc-Glu-Ala-Arg-AMC	Faktor XIa, Plasmin	3,07	12,31
Boc-Glu-Lys-Lys-AMC	Plasmin	0,59	1,07
Boc-Gly-Lys-Arg-AMC	Kex2 Endoprotease	13,08	12,81
Boc-Leu-Leu-Met-AMC	Calpain	-	-
Boc-Leu-Met-AMC	Calpain	-	-
Boc-Met-Met-AMC	Calpain	-	4,13
Boc-Val-Gly-Arg-AMC	Faktor Xa, Plasminogenaktivator	16,24	22,87
Boc-Val-Leu-Lys-AMC	Plasmin	2,31	3,36
Bz-Phe-Val-Arg-AMC	Thrombin	3,49	100,00
MCA-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(Dnp)- Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH ₂	TNF- α -converting enzyme (TACE), Matrixmetalloprotease	24,70	n.b.
MCA-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	Matrixmetalloprotease-2	9,19	n.b.
MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	Matrixmetalloprotease-2/7	2,92	n.b.
MCA-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp)-OH	Thimet-Oligopeptidase	1,80	n. b.
Suc-Ala-Ala-Phe-AMC	Subtilisin, Thermolysin	-	16,87
Suc-Leu-Tyr-AMC	Calpain, E. coli Protease Ti	-	2,23
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Chymotrypsin, Papain, Calpain	-	11,26
Z-Arg-Arg-AMC	Cathepsin B	8,28	22,99
Z-Phe-Arg-AMC	Kallikrein	1,11	2,22

Die höchste Aktivität wurde für das Thrombinsubstrat Bz-Phe-Val-Arg-AMC unter Zugabe von Aminopeptidase M gefunden. Die dabei gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten wurden als 100%-Werte gesetzt. Ohne Aminopeptidase M beträgt die Abbaurate nur 3%. Als Spaltstellen kommen Phe - \downarrow - Val oder Val - \downarrow - Arg in Frage. Ebenfalls mit relativ hoher Aktivität werden das Faktor Xa- bzw. Plasminogenaktivator-Substrat Boc-Val-Gly-Arg-AMC (22,87%) und das Cathepsin B-Substrat Z-Arg-Arg-AMC (22,99%) unter Einwirkung von Aminopeptidase M gespalten. Das Substrat Z-Arg-Arg-AMC wird demzufolge an der Stelle Arg - \downarrow - Arg gespalten. Für das Substrat Boc-Val-Gly-Arg-AMC ergeben sich zwei mögliche Spaltstellen (Val - \downarrow - Gly, Gly - \downarrow - Arg). Bei den Ansätzen ohne Aminopeptidase M fand sich nennenswerte Aktivität nur bei Substraten mit einem Arginylrest vor der fluorogenen Gruppe, wobei die Substrate dann besonders stark gespalten wurden, wenn sich Glycin in P₂- oder P₃-Position befand. Substrate, die Phe, Met oder Tyr in der P₁-Position enthielten, wurden nicht gespalten. Die Substrate der Matrixmetalloproteasen 2 und 7 wurden nur in geringem Umfang gespalten. Das intramolekular gequenchte TACE-Substrat MCA-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(Dnp)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂ wurde mit höherer Aktivität gespalten. Eine das Ergebnis beeinflussende Reaktion der Aminopeptidase M mit den Substraten ohne Einwirkung der ICMP ist nicht anzunehmen, da keines der Substrate einen freien N-Terminus

hat und der niedrigste unter Einwirkung der ICMP gemessene Wert bei Reaktion mit dem Plasminsubstrat Boc-Glu-Lys-Lys-AMC ca. 1% der Maximalspaltung betrug.

3.1.3 Abbau von Proteinen

Nach den Versuchen mit synthetischen Substraten war es von Interesse, welche im menschlichen Körper vorkommenden Proteine durch die ICMP gespalten werden. Hierfür wurden die in Tab. 5 aufgeführten Proteine als Substrate verwendet.

Tab. 5 Abbau von im menschlichen Körper vorkommenden Proteinen durch die ICMP

Protein	Abbau durch die ICMP
Aktin (Rindermuskel)	(+)
α_2 -Antiplasmin (menschliches Plasma)	-
Antithrombin III (menschliches Plasma)	-
α_2 -Antitrypsin (menschliches Plasma)	-
C-reaktives Protein (menschliches Aszites)	-
Casein-Gemisch (Rindermilch)	+
Fibrin (menschliches Plasma)	-
Fibrinogen (menschliches Plasma)	(+)
Fibronectin (Mensch)	-
Globin (menschliches Hämoglobin)	(+)
Haptoglobin (menschliches Plasma)	-
Humanes Serumalbumin	-
Ig A (menschliches Plasma)	-
Ig G (Kaninchenplasma)	-
Kollagen Typ I (Rind)	-
Lactoferrin (menschliche Milch)	(+)
Laminin (Mensch)	-
Lysozym (Hühnerei)	-
α_2 -Makroglobulin (menschliches Plasma)	-
Plasminogen (menschliches Plasma)	-
Transferrin (menschliches Plasma)	-

- kein Abbau; (+) unvollständiger Abbau; + vollständiger Abbau

In der SDS-PAGE war ein unvollständiger Abbau durch eine Abnahme der Intensität der Bande des Substratleerwertes und/oder durch neu entstandene Banden bei kleineren Molmassen gekennzeichnet. Bei vollständigem Abbau des Substrats war die Bande des Substratleerwertes nach Zugabe der ICMP nicht mehr sichtbar. Bei fehlendem Abbau blieb die Bande des Substratleerwertes unverändert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt.

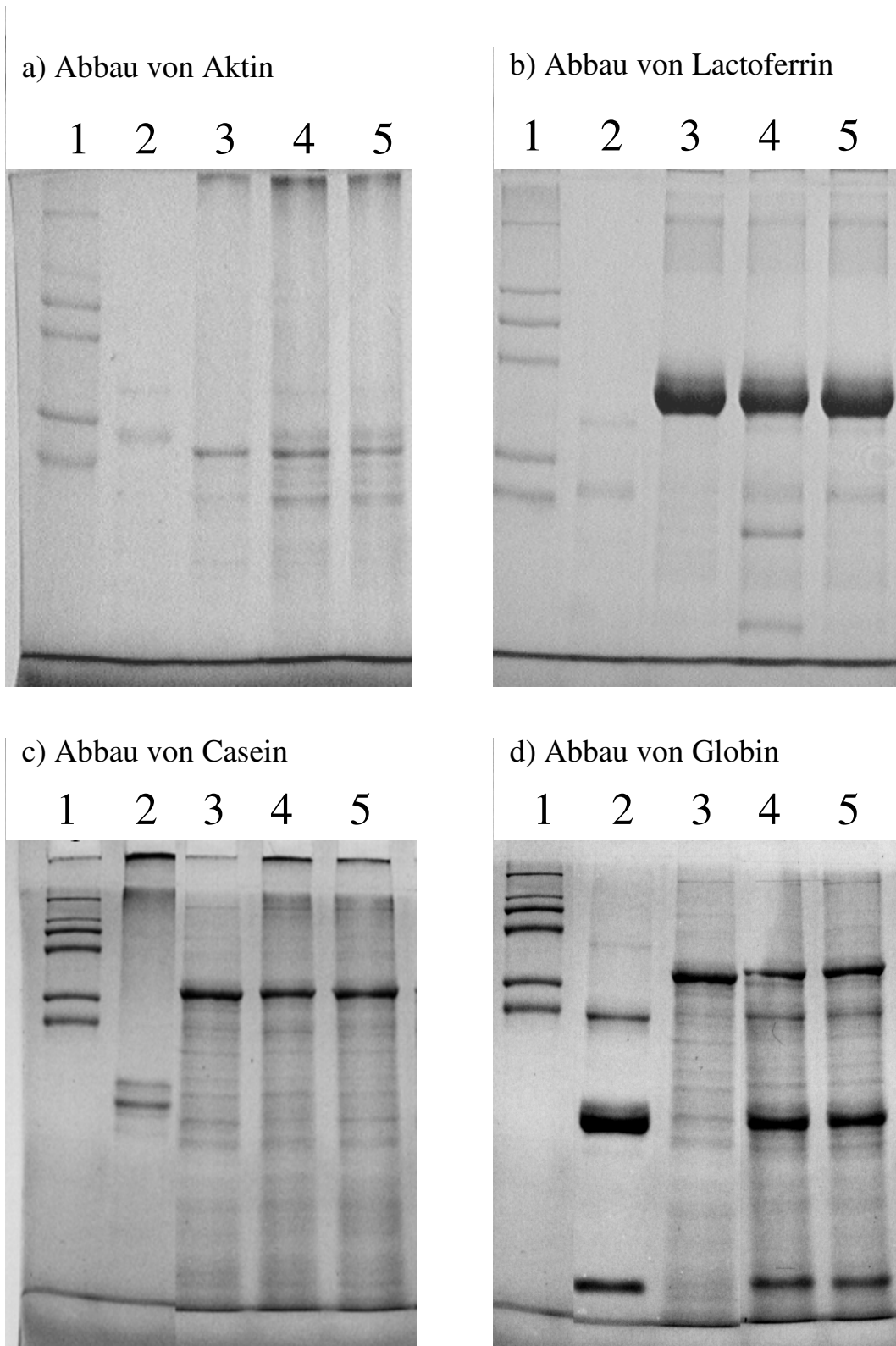


Abb. 5 Abbau von Proteinen durch die ICMP in der SDS-PAGE nach Coomassiefärbung

a) Aktin (10% Acrylamid), b) Lactoferrin (10% Acrylamid), c) Casein-Gemisch (15% Acrylamid), d) Globin (15% Acrylamid). Spuren a) und b): 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Enzymleerwert ICMP, 3 Substratleerwert, 4 Hauptwert a) 1h Inkubation, b) 4h Inkubation, 5 Hauptwert a) 2h Inkubation, b) 8h Inkubation. Spuren c) und d): 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Substratleerwert, 3 Enzymleerwert ICMP, 4 Hauptwert 1h Inkubation, 5 Hauptwert 2h Inkubation.

Der Abbau von Fibrinogen wurde unter nicht reduzierenden und unter reduzierenden Bedingungen untersucht. Unter nicht reduzierenden Bedingungen war eine Verschiebung der Bande des Substrates hin zu einer kleineren Molmasse zu beobachten (siehe Abb. 6a)). Außerdem waren im mittleren Bereich des Gels nach Einwirkung der ICMP weitere Banden sichtbar, u.a. im Bereich des Enzymleerwertes. Eine eindeutige Interpretation war nicht möglich, da das intakte Fibrinogenmolekül aufgrund seiner hohen Molmasse nicht in das Trenngel einwanderte und im Sammelgel verblieb. Nach Zugabe von Mercaptoethanol zur Reduktion von Disulfidbrücken nach Abstoppen der Reaktion waren die einzelnen Ketten des Fibrinogenmoleküls als Banden in der SDS-PAGE sichtbar. Das Fibrinogenmolekül besteht aus zwei α -, zwei β - und zwei γ -Ketten. Wie in Abb. 6b) zu sehen, sind die α - und β -Ketten nach zwei Stunden Inkubationszeit in der SDS-PAGE nicht mehr nachweisbar, wohingegen die γ -Ketten als schmale Bande sichtbar bleibt. Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich demzufolge ein vollständiger Abbau der α - und β -Ketten sowie in ihrer Größe unveränderte γ -Ketten.

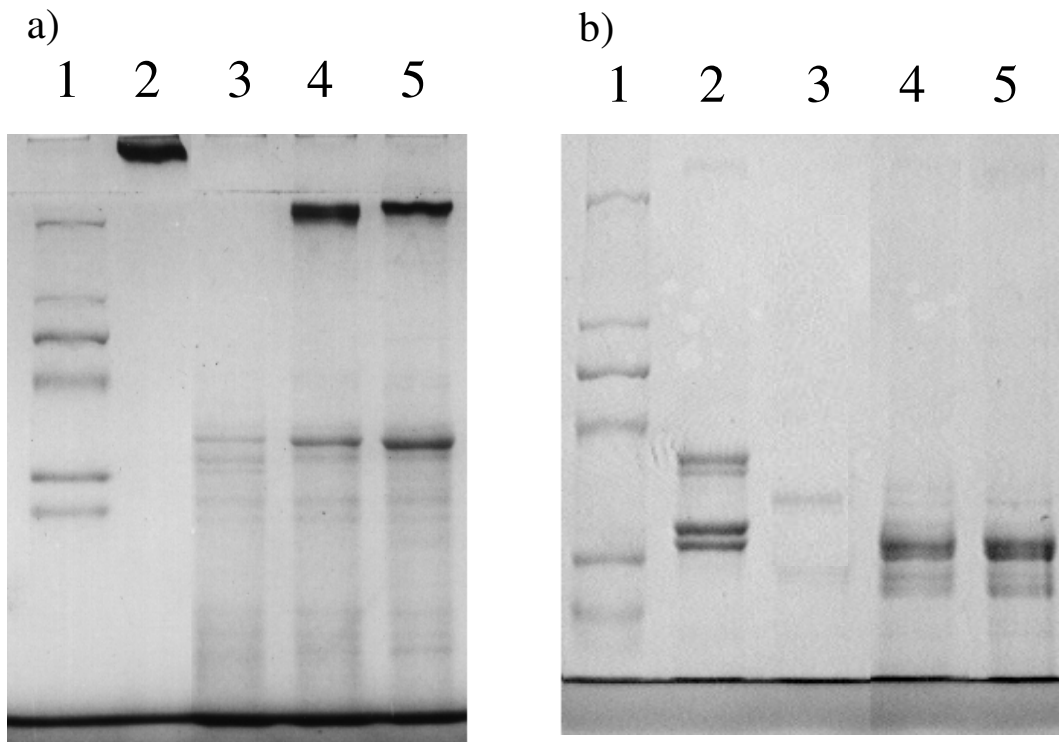


Abb. 6 Abbau von Fibrinogen durch die ICMP in der SDS-PAGE nach Coomassiefärbung

a) unter nichtreduzierenden Bedingungen (10% Acrylamid), b) unter reduzierenden Bedingungen (7,5% Acrylamid). Spuren: 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Substratleerwert Fibrinogen, 3 Enzymleerwert ICMP, 4 Hauptwert 2h Inkubation, 5 Hauptwert 4h Inkubation

3.1.4 Interaktionen mit Plasminogen

Das chromogene Plasminsubstrat Chromozym[®] PL mit der Struktur Tos-Gly-Pro-Lys-pNA wird durch Plasmin hydrolytisch zu Tos-Gly-Pro-Lys und p-Nitroanilin gespalten. Es sollte so überprüft werden, ob die ICMP Plasminogen zu Plasmin aktivieren kann. Bei den Versuchen zeigte sich, dass

das verwendete Plasminogen eine relativ hohe Plasminaktivität besitzt. Es war eine deutliche Zunahme des pNA-Gehaltes nach der Reaktion von Plasminogen mit dem Substrat allein (Substratleerwert) zu beobachten. Bei der Reaktion der ICMP mit dem Substrat (Enzymleerwert) kam es ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme des pNA-Gehaltes der Proben. Diese war geringfügig höher als bei dem Substratleerwert. Die ICMP könnte demzufolge selbst Plasmin-Aktivität besitzen. In den Proben, in denen zunächst eine Inkubation der ICMP mit Plasminogen stattfand, war eine höhere Aktivität messbar als im Substrat- und Enzymleerwert. Hier kam es möglicherweise zu einer additiven Wirkung der beiden Einzelaktivitäten. Eine eindeutige Aussage über eine Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch die ICMP kann aus den Versuchen mit diesem chromogenen Substrat nicht abgeleitet werden.

Die Plasminogenaktivierung wurde mit dem fluorogenen Plasminsubstrat Boc-Glu-Lys-Lys-AMC untersucht, weil damit eine Beurteilung mit höherer Empfindlichkeit möglich war. Ein weiterer Vorteil war, dass die ICMP gegenüber diesem Substrat nur eine sehr geringe proteolytische Aktivität besitzt. Plasminogen selbst verursachte keine Zunahme der Fluoreszenz bei Einwirkung auf dieses Substrat. Nach Inkubation der ICMP mit Plasminogen kam es zu einer geringen, aber eindeutigen Zunahme der Fluoreszenz (Abb. 7). Diese war im Verlauf von 1 und 2 Stunden weiter leicht ansteigend. Unter Einwirkung der ICMP auf Plasminogen erfolgt demnach eine gering ausgeprägte Zunahme der Plasminaktivität und damit eine Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin.

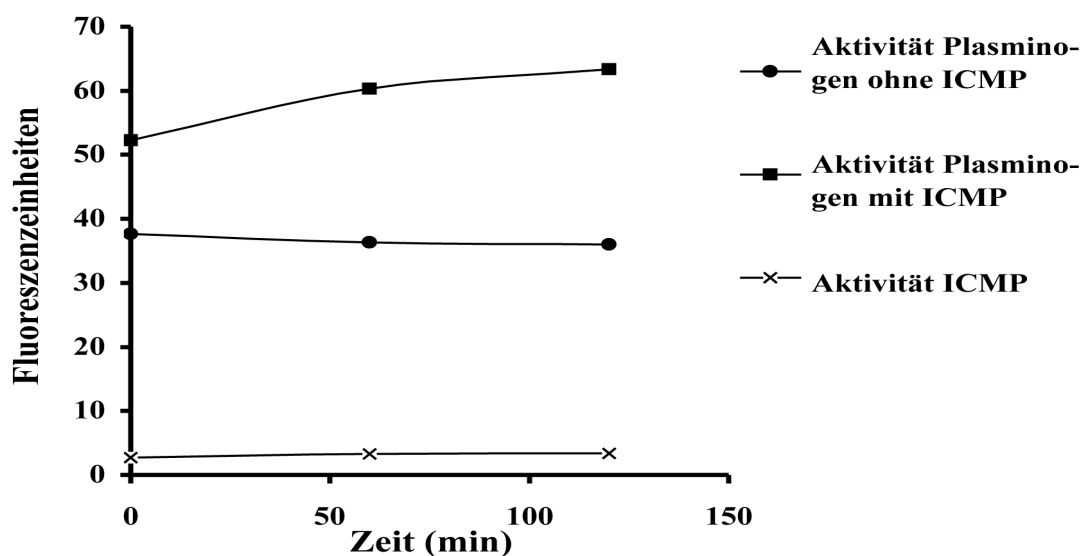


Abb. 7 Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin unter Einwirkung der ICMP. Messung der Plasminaktivität mit dem fluorogenen Substrat Boc-Glu-Lys-Lys-AMC

3.1.5 Versuche mit Inhibitoren

Die ICMP wird durch den Inhibitor EEDQ in ihrer Aktivität nicht beeinflusst. Bei Inhibitorkonzentrationen zwischen 0 und 1,5mM ist nach 30min Reaktionszeit zwischen ICMP und Inhibitor

eine gleichbleibende Enzymaktivität gegenüber radioaktiv markiertem Insulin messbar. Das spricht gegen das Vorhandensein einer Carboxylgruppe im aktiven Zentrum des Enzyms.

3.2 Charakterisierung der CCMP von *Bacillus cereus*

3.2.1 Spaltspezifität der CCMP

Als Substrate mit definierter Aminosäuresequenz wurden die Insulin A- und Insulin B-Kette verwendet. Beide wurden durch die Protease abgebaut. Die Spaltstücke wurden mittels HPLC getrennt. Nach einer Retentionszeit von ca. 40min erscheint der Peak, der der intakten Insulin A- bzw. B-Kette entspricht. Dieser nahm an Größe ab, wohingegen die Peaks, die den einzelnen Spaltstücken zugeordnet werden konnten, mit zunehmender Einwirkungszeit des Enzyms auf die jeweiligen Insulin-Ketten an Größe zunahm.

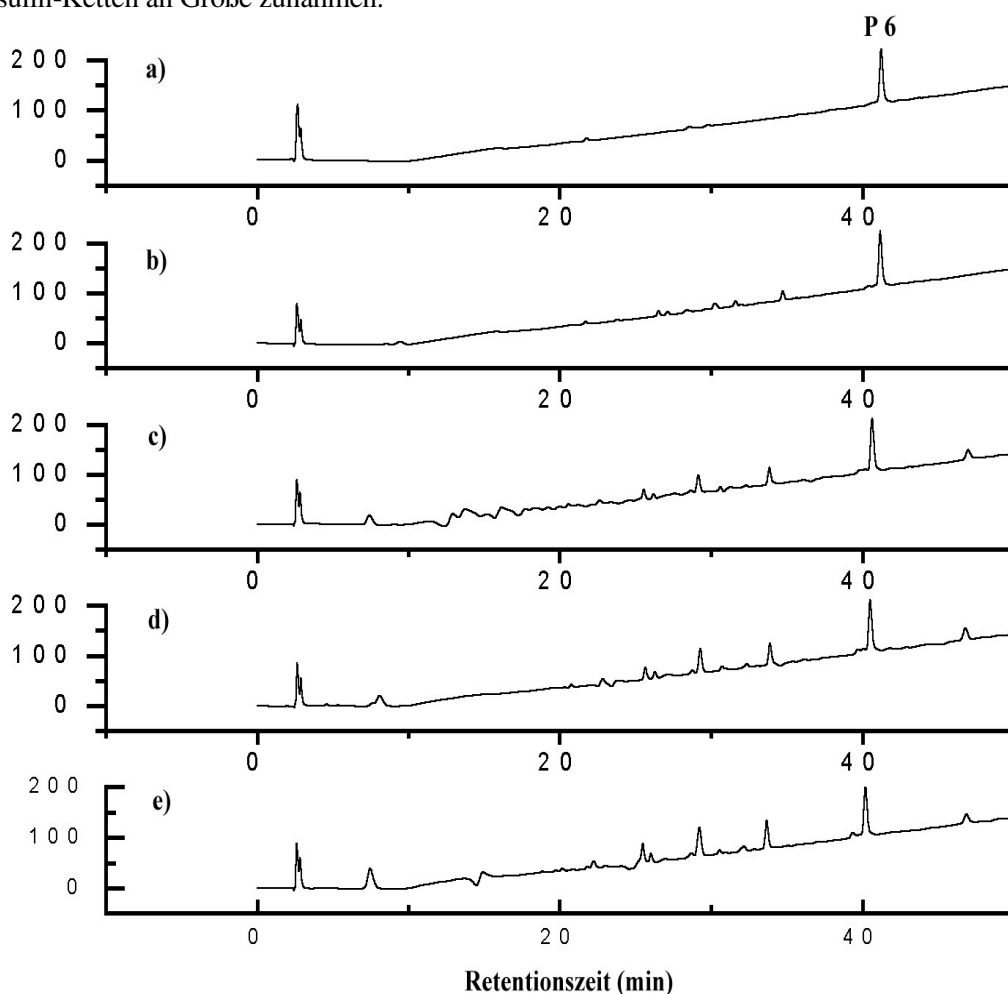


Abb. 8 Trennung der Bruchstücke durch HPLC nach Spaltung der Insulin-B-Kette durch die CCMP. a) Leerwert der Insulin-B-Kette (P6) b) nach 30min c) nach 60min d) nach 90min e) nach 120min Inkubationszeit der Insulin-B-Kette mit der CCMP

Das Molekulargewicht der Spaltstücke wurde durch Massenspektrometrie bestimmt. Die Identifizierung der Bruchstücke erfolgte entsprechend der massenspektrometrischen Ergebnisse, in Zweifelsfällen durch N-terminale Sequenzierung. Damit konnten die Bruchstücke eindeutig identifiziert

und die Spaltstellen zugeordnet werden. In der Insulin A-Kette fanden sich folgende Spaltstellen: Ala⁸ -↓- Ser⁹, Tyr¹⁴ -↓- Gln¹⁵, Gln¹⁵ -↓- Leu¹⁶, Tyr¹⁹ -↓- Cys²⁰. Die Insulin B-Kette wurde an folgenden Stellen gespalten: Leu¹¹ -↓- Val¹², Glu¹³ -↓- Ala¹⁴, Tyr¹⁶ -↓- Leu¹⁷, Leu¹⁷ -↓- Val¹⁸, Tyr²⁶ -↓- Thr²⁷. Eine Unterscheidung zwischen primären und sekundären Spaltstellen war nicht möglich.

Über die gefundenen Spaltstellen lässt sich verallgemeinernd sagen, dass die CCMP bevorzugt Peptidbindungen zwischen zwei aliphatischen Aminosäuren oder zwischen zwei Aminosäuren mit einer hydrophilen Seitenkette (-OH, -SH, -CONH₂) oder Peptidbindungen zwischen je einer Aminosäure dieser beiden Gruppen spaltet.

3.2.2 Abbau synthetischer Proteasesubstrate

(a) Abbau von chromogenen Proteasesubstraten

Für keines der drei getesteten Proteasesubstrate konnte ein messbarer Abbau gefunden werden. Auch in einer vorangegangenen Arbeit war für weitere elf synthetische Substrate mit pNA kein Abbau durch die CCMP nachgewiesen worden [109]. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen zu den Spaltstellen der Insulin-Ketten geht hervor, dass Camelysin hydrophobe Reste in der P₁'-Position meidet. Wahrscheinlich ist der Grund für den fehlenden Abbau solcher Substrate nicht ihre Aminosäuresequenz, sondern die Struktur und die Größe der chromogenen Gruppe, in diesem Fall para-Nitroanilid. Eine Interpretation der Ergebnisse dahingehend, dass Substrate mit diesen Aminosäuresequenzen nicht abgebaut werden, ist daher nicht möglich.

(b) Abbau von fluorogenen Proteasesubstraten

Proteasesubstrate mit der fluorogenen Gruppe AMC sind sensitiver als pNA-Substrate. Der Abbau der Substrate mit mehr als zwei Aminosäuren wurde aus den unter 2.6.2 erläuterten Gründen jeweils in einem Ansatz mit und ohne Aminopeptidase M getestet. Ohne Aminopeptidase M war für die AMC-Substrate nur ein sehr schwach ausgeprägter Abbau nachweisbar und dieser auch nur dann, wenn sich die Aminosäure Arg in P₁-Position befand. Unter Zusatz von Aminopeptidase M waren die Abbauraten insbesondere bei Substraten mit aliphatischen Aminosäuren in der Kette zum Teil deutlich höher. Wie auch para-Nitroanilid ist 7-Amino-4-methylcoumarin eine große aromatische Gruppe. Bei der Spaltung der Insulin-Ketten wurde gezeigt, dass Camelysin aromatische Aminosäurereste in der P₁'-Position meidet. Das könnte den fehlenden Abbau dieser Substrate in den Versuchen ohne Aminopeptidase M erklären. Eine das Ergebnis beeinflussende Reaktion der Aminopeptidase M mit den Substraten ohne Einwirkung der CCMP ist nicht anzunehmen, da keines der Substrate einen freien N-Terminus hat und für die Calpainsubstrate Boc-Leu-Met-AMC und Boc-Leu-Leu-Met-AMC keine Zunahme der Fluoreszenz unter Einwirkung der Aminopeptidase M gemessen werden konnte.

Anders verhält es sich mit den intramolekular gequenchten Substraten. Diese wurden mit hoher Spezifität mit niedrigen K_m-Werten abgebaut. Bei Substraten der Matrixmetalloproteasen sowie beim TACE-Substrat war eine starke Fluoreszenzzunahme nach Reaktion mit der CCMP zu verzeichnen. Bei den Berechnungen der relativen Abbauraten wurde die durchschnittliche Zunahme

der Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzeinheiten über 5sec über eine Gesamtzeit von 300sec zugrunde gelegt. Dabei entspricht der Wert für das Substrat mit dem höchsten Umsatz (hier das MMP-2-Substrat) 100%. Alle anderen Abbauraten sind hierzu in Relation gesetzt. Um die Umsatzraten bei Substanzen mit zwei verschiedenen fluorogenen Gruppen vergleichen zu können, wurde der Umrechnungsfaktor 1,085 verwendet. Dieser war nach der unter 2.6.2 beschriebenen Methode ermittelt worden. Es ergaben sich folgende relative Abbauraten:

Tab. 6 Abbau von fluorogenen Substraten durch die CCMP

Substrat	Typisches Substrat für	Relative Abbaurate %	
		ohne Amino-peptidase M	mit Amino-peptidase M
Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC	Furin, Kex2 Endoprotease	-	46,18
Boc-Glu-Ala-Arg-AMC	Faktor XIa, Plasmin	0,63	2,36
Boc-Glu-Lys-Lys-AMC	Plasmin	-	0,48
Boc-Gly-Lys-Arg-AMC	Kex2 Endoprotease	3,87	4,26
Boc-Leu-Leu-Met-AMC	Calpain	-	-
Boc-Leu-Met-AMC	Calpain	-	-
Boc-Met-Met-AMC	Calpain	-	0,58
Boc-Val-Gly-Arg-AMC	Faktor Xa, Plasminogenaktivator	9,03	17,41
Boc-Val-Leu-Lys-AMC	Plasmin	1,47	5,12
Bz-Phe-Val-Arg-AMC	Thrombin	-	0,52
MCA-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(Dnp)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH ₂	TNF- α -converting enzyme (TACE), Matrixmetalloprotease	95,60	n.b.
MCA-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	Matrixmetalloprotease 2	100,00	n.b.
MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	Matrixmetalloprotease 2/7	47,20	n.b.
MCA-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Lys(Dnp)-OH	Thimet-Oligopeptidase	12,20	n.b.
Suc-Ala-Ala-Phe-AMC	Subtilisin, Thermolysin	-	3,89
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Chymotrypsin, Papain, Calpain	0,08	26,26
Suc-Leu-Tyr-AMC	Calpain, E. coli Protease Ti	-	6,07
Z-Arg-Arg-AMC	Cathepsin B	1,65	14,63
Z-Phe-Arg-AMC	Kallikrein	2,97	5,28

Es sollte überprüft werden, welches Spaltstück bei der Spaltung des MMP-2/7-Substrates durch die CCMP entsteht. Die für die HPLC vorbereiteten Proben ergaben eine nahezu lineare Abhängigkeit der Menge des entstandenen Spaltproduktes von der Zeit. Die typische Spaltstelle der Matrixmetalloproteasen ist die Bindung Gly-↓-Leu im MMP-2/7-Substrat MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂, sodass das Spaltprodukt MCA-Pro-Leu-Gly entsteht. Der kleinere aliphatische Rest ist in der P₁-Position. Welches Spaltstück unter Einwirkung von Camelysin entsteht, konnte mittels HPLC eindeutig nachgewiesen werden. Zunächst wurden hierfür HPLC-Läufe mit den in reiner Form vorliegenden Spaltstücken MCA-Pro-Leu und MCA-Pro-Leu-Gly durchgeführt. Es wurde jeweils ein reproduzierbarer Peak für jedes Substrat nach definierten Retentionszeiten nachgewiesen. Nach Einwirkung von Camelysin auf das MMP-2/7-Substrat konnte MCA-Pro-Leu als Spalt-

stück eindeutig identifiziert werden. Es wurde eine proportionale Zunahme der Höhe des Peaks in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt (siehe Abb. 9). Die CCMP spaltet demnach an der Bindung Leu-↓-Gly und bevorzugt den kleineren aliphatischen Rest in der P₁'-Position. Das gleiche Bruchstück MCA-Pro-Leu konnte bei den Substraten für die MMP-2 und TACE gefunden werden (Spaltstelle Leu-↓-Ala).

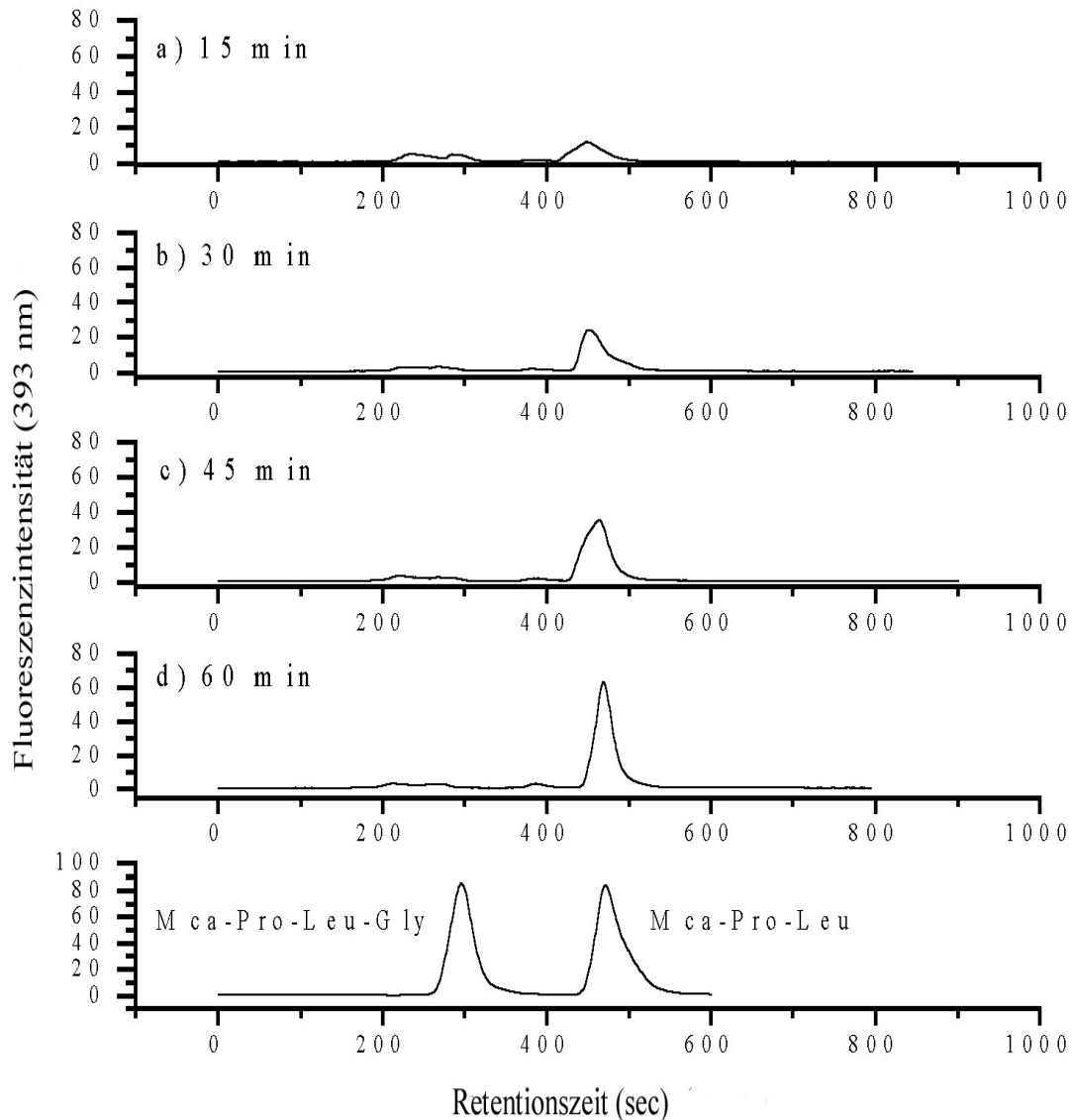


Abb. 9 Trennung der Bruchstücke mit HPLC nach Spaltung des MMP-2/7-Substrates MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ durch die CCMP

(c) Bestimmung von enzymkinetischen Parametern

Für die Reaktion der CCMP mit einzelnen Substraten wurden enzymkinetische Messungen zur Bestimmung von K_m und k_{cat} durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine Eichkurve erstellt, um den entsprechenden relativen Fluoreszenzeinheiten Substratkonzentrationen zuordnen zu können.

Bei der graphischen und rechnerischen Bestimmung der kinetischen Konstanten ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tab. 7 Enzymkinetische Parameter für die Reaktion der CCMP mit fluorogenen Substraten

Substrat	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Suc-Leu-(↓)-Leu- ↓ -Val-Tyr-AMC + Aminopeptidase M	91,80	50,70	0,55
Boc-Arg- ↓ -Val-Arg-(↓)-Arg-AMC + Aminopeptidase M	20,00	29,82	1,49
MCA-Pro-Leu- ↓ -Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	8,09	6,18	0,76
MCA-Pro-Leu- ↓ -Ala-Gln-Ala-Val-Dap(Dnp)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH ₂	9,32	18,90	2,03
MCA-Pro-Leu- ↓ -Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH ₂	7,70	23,40	3,04

Die K_m -Werte für die gequenchten MCA-Substrate sind deutlich niedriger als für die AMC-Substrate. Hier ist zusätzlich die Wirkung der Aminopeptidase M zu berücksichtigen. Das zeigt eine hohe Affinität der CCMP zu den Substraten der MMPs und TACE. Die Spezifität für das MMP-2-Substrat ist unter den hier verwendeten Substraten am höchsten. Die enzymkinetischen Messungen korrelieren gut mit den relativen Hydrolyseraten der einzelnen Substrate unter Einwirkung der CCMP.

3.2.3 Abbau von Proteinen

Tab. 8 Abbau von Proteinen durch die CCMP

Protein	Abbau durch die CCMP
Aktin (Rindermuskel)	+
α_2 -Antiplasmin (menschliches Plasma)	+
Antithrombin III (menschliches Plasma)	(+)K
α_2 -Antitrypsin (menschliches Plasma)	+
C-reaktives Protein (menschlicher Aszites)	-
Casein-Gemisch (Rindermilch)	(+)
Fibrin (menschliches Plasma)	+
Fibrinogen (menschliches Plasma)	+
Fibronectin (Mensch)	-
Globin (menschliches Hämoglobin)	+
Haptoglobin (menschliches Plasma)	-
Humanes Serumalbumin	(+)
IgA (menschliches Plasma)	-
IgG (Kaninchenplasma)	-
Kollagen Typ I (Rind)	+
Lactoferrin (menschliche Milch)	(+)
Laminin (Mensch)	-
Lysozym (Hühnerei)	-
α_2 -Makroglobulin (menschliches Plasma)	-
Plasminogen (menschliches Plasma)	(+)K
Transferrin (menschliches Plasma)	-

- kein Abbau; (+) unvollständiger Abbau; + vollständiger Abbau; (+)K Bildung eines Komplexes

Die in Tab. 8 genannten im menschlichen Körper vorkommenden Proteine (Ausnahme Casein) wurden unter der Frage getestet, ob sie von der CCMP abgebaut werden. Es zeigte sich hierbei insbesondere eine Beeinflussung der Proteaseinhibitorsysteme des Plasmas sowie von Komponenten des fibrinolytischen Systems.

In der SDS-PAGE war ein unvollständiger Abbau durch eine Abnahme der Intensität der Bande des Substratleerwertes und/oder durch neu entstandene Banden bei kleineren Molmassen gekennzeichnet. Bei vollständigem Abbau des Substrats war die Bande des Substratleerwertes nach Zugabe der CCMP nicht mehr sichtbar. Bei fehlendem Abbau blieb die Bande des Substratleerwertes unverändert. Die CCMP ist in der SDS-PAGE mit Coomassiefärbung nicht nachweisbar, aber in der gewählten Verdünnung noch eindeutig aktiv.

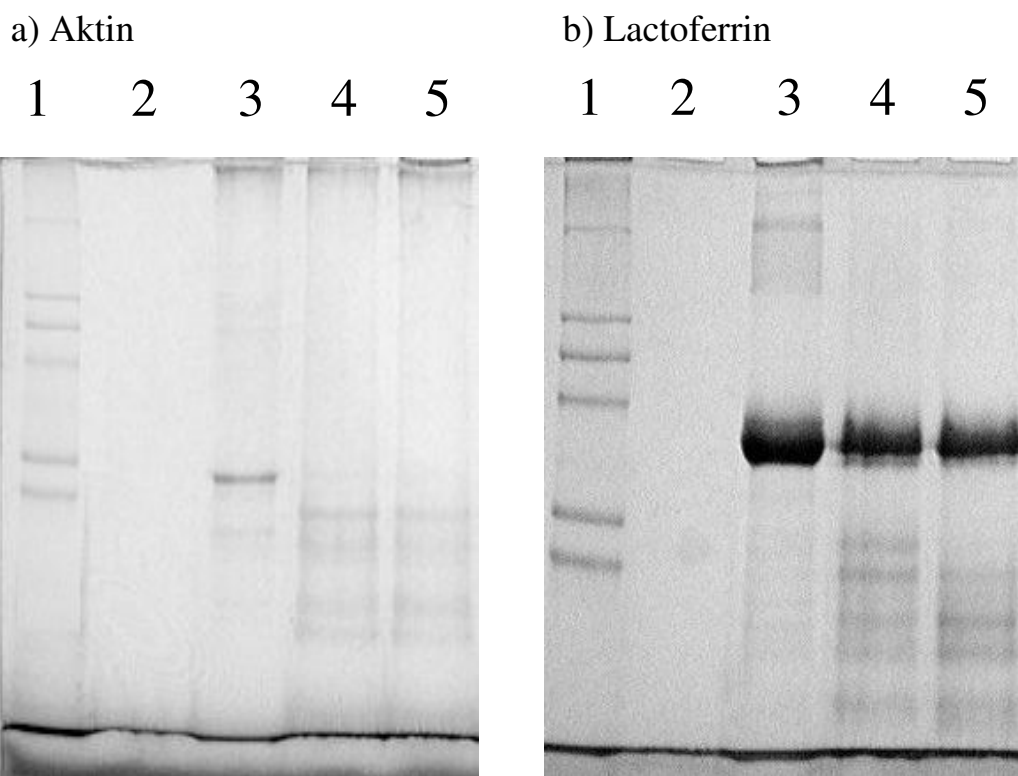


Abb. 10 (S.45-47) Abbau von Proteinen durch die CCMP in der SDS-PAGE nach Coomassiefärbung

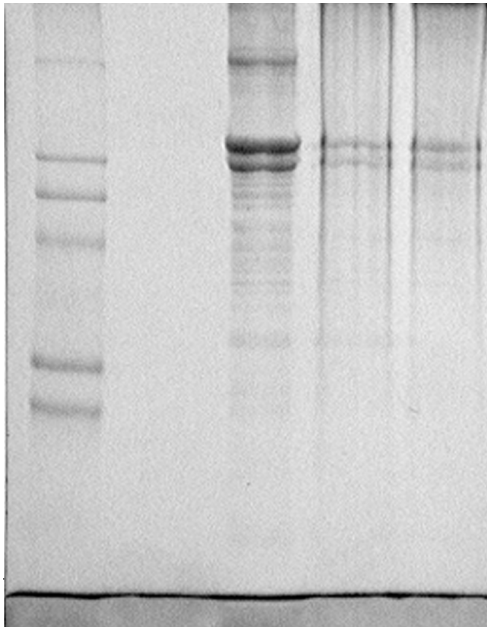
a) Aktin (10% Acrylamid), b) Lactoferrin (10% Acrylamid), c) Kollagen Typ I (10% Acrylamid), d) α_2 -Antiplasmin (10% Acrylamid), e) α_1 -Antitrypsin (15% Acrylamid), f) Globin (15% Acrylamid), g) Casein (15% Acrylamid), h) HSA (10% Acrylamid)

Spuren: a) bis c) 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Enzymleerwert CCMP, 3 Substratleerwert, 4 Hauptwert 1h Inkubation, 5 Hauptwert 2h Inkubation

d) bis h) 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Substratleerwert, 3 Enzymleerwert CCMP, 4 Hauptwert 1h Inkubation, 5 Hauptwert 2h Inkubation

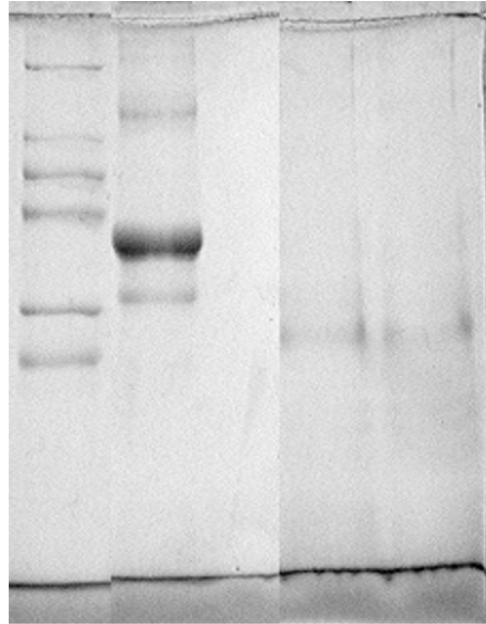
c) Kollagen Typ I

1 2 3 4 5



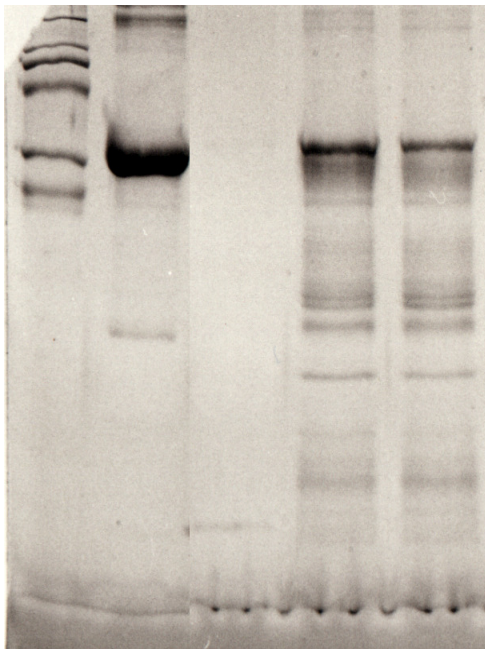
d) α_2 -Antiplasmin

1 2 3 4 5



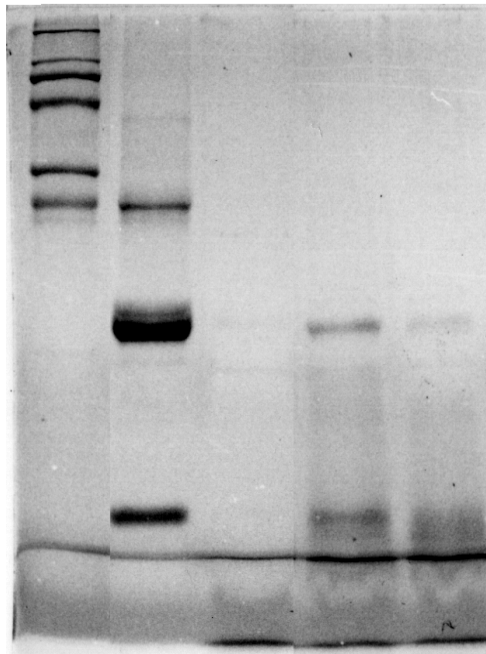
e) α_1 -Antitrypsin

1 2 3 4 5

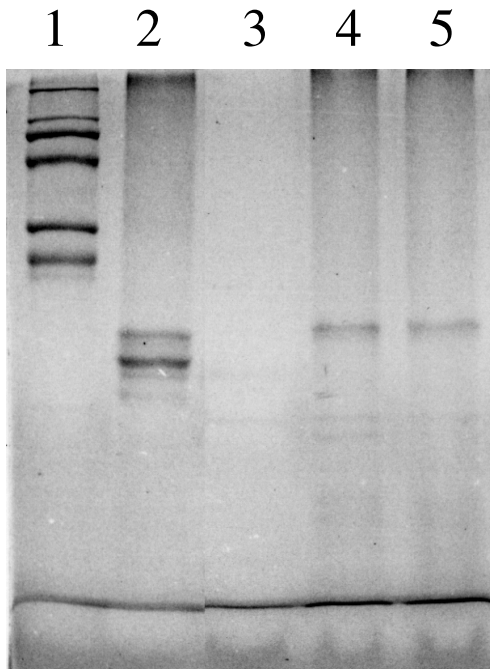


f) Globin

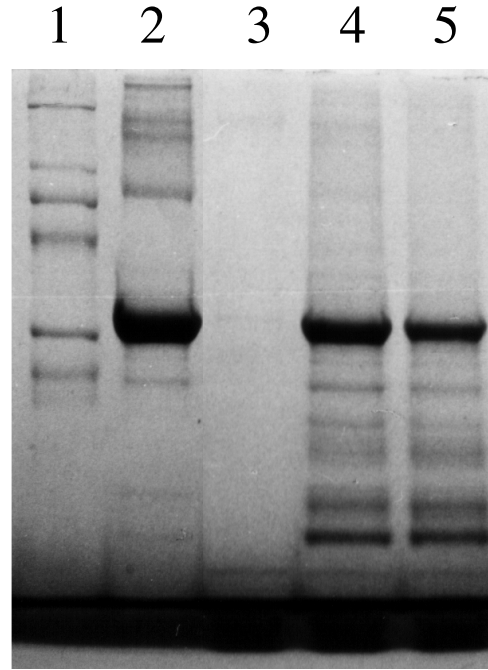
1 2 3 4 5



g) Casein

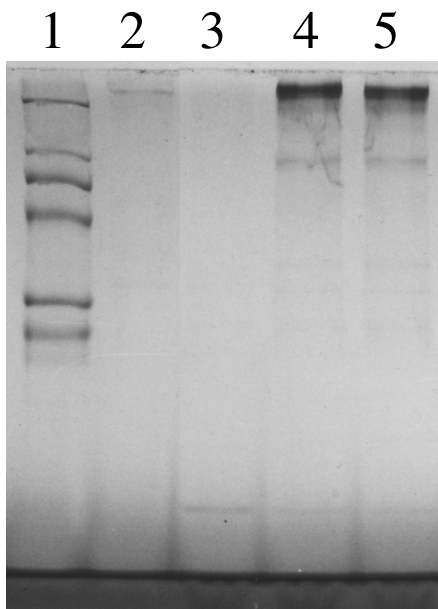


h) Humanes Serumalbumin



Der Abbau von Fibrinogen wurde sowohl unter nicht reduzierenden (Abb. 11a)) als auch unter reduzierenden (Abb. 11b)) Bedingungen untersucht.

a)



b)

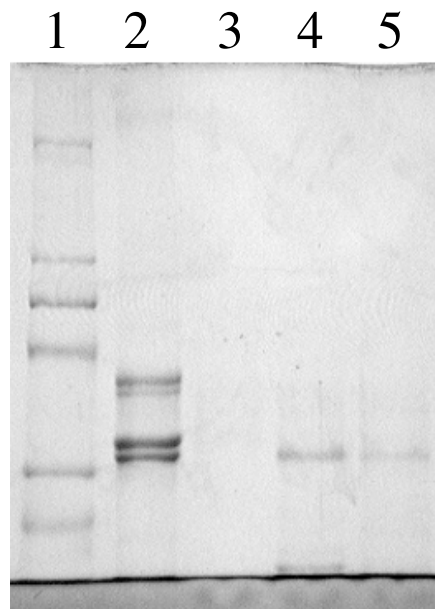


Abb. 11 Abbau von Fibrinogen durch die CCMP in der SDS-PAGE nach Coomassiefärbung.

a) unter nicht reduzierenden Bedingungen (10% Acrylamid), b) unter reduzierenden Bedingungen (7,5% Acrylamid). Spuren: 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Substratleerwert Fibrinogen, 3 Enzymleerwert CCMP, 4 Hauptwert 2h Inkubation, 5 Hauptwert 4h Inkubation

Unter nicht reduzierenden Bedingungen wanderte das Molekül im Substratleerwert auch bei 7,5%igen Gelen nicht in das Trenngel ein. In den Hauptwerten nach Inkubationszeiten von 2 und 4 Stunden fand sich eine Verschiebung der Bande des Substrats zu einer kleineren Molmasse. Das unter Einwirkung der CCMP entstandene Protein wanderte in das Trenngel ein (siehe Abb. 11a)). Hieraus lässt sich eine proteolytische Spaltung durch die CCMP vermuten. Eine eindeutige Aussage ist jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die Versuche unter reduzierenden Bedingungen wiederholt. Nach Zugabe von Mercaptoethanol zur Reduktion nach Abstoppen der Reaktion waren im Substratleerwert die einzelnen Ketten des Fibrinogenmoleküls als Banden sichtbar. Wie in Abb.11b) zu sehen, werden die α - und β -Ketten nach zwei Stunden Inkubationszeit vollständig abgebaut, wohingegen die γ -Ketten als schmale Bande sichtbar bleiben.

Die Herstellung von Fibrin erfolgte in Form von Fibringerinnseln aus Fibrinogen und Thrombin. Um ein festes Fibringerinnsel herzustellen, war vorab ein größerer methodischer Aufwand erforderlich. Bei Reaktion von Fibrinogen und Thrombin entstand lediglich eine gelartige Masse, von der sich durch Zentrifugation kein Überstand abtrennen ließ. Nach Zugabe von Calcium in einer Konzentration von 0,1mM im Ansatz entstanden in der Reaktion zwischen Fibrinogen und Thrombin feste weiße Gerinnsel nach Zentrifugation, die weiterverarbeitet werden konnten. Der Substratleerwert Fibrin ist aufgrund des großen Moleküls in der SDS-PAGE nicht sichtbar. Nach Einwirken der CCMP auf das Fibringerinnsel waren in der SDS-Gelelektrophorese eindeutig neue Banden im kleineren Molmassebereich nachweisbar, die sich weder im Enzymleerwert noch im Substratleerwert fanden (siehe Abb. 12). Diese Spaltstücke haben eine ähnliche Größe wie die einzelnen Ketten des Fibrinogenmoleküls. Damit konnte für die CCMP neben der fibrinogenolytischen auch eine fibrinolytische Aktivität nachgewiesen werden.

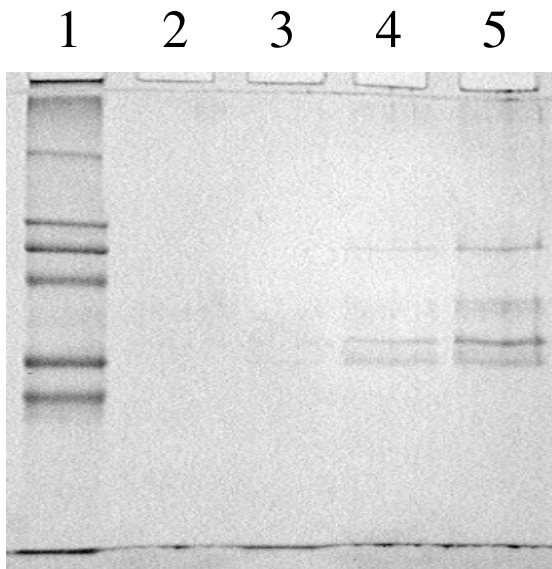


Abb. 12 Abbau von Fibrin durch die CCMP in der SDS-PAGE (7,5% Acrylamid) nach Coomassiefärbung unter nicht reduzierenden Bedingungen

Spuren: 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Enzymleerwert CCMP, 3 Substratleerwert Fibrin 4h Inkubation, 4 Hauptwert 2h Inkubation, 5 Hauptwert 4h Inkubation

3.2.4 Versuche zur Aktivierung von Progelatinasen durch die CCMP

In Versuchen, in denen die Wirkung der CCMP auf Progelatinasen im Gelatine-Zymogramm untersucht wurde, zeigte sich, dass die Progelatinase A unter Einfluss der CCMP abgebaut wurde,

reife Gelatinase A jedoch nicht verändert wurde. Unter Wirkung der *B. cereus* Protease wurden die Banden von drei Formen der Progelatinase B zu kleineren Molekulargewichten verschoben. Die Differenz gegenüber der Kontrolle beträgt ca. 5kDa. Eine solche Größenänderung könnte einem Aktivierungsprozess entsprechen. Diese Versuche wurden von Dr. Arkona (Institut für Biochemie I, Jena) durchgeführt.

Bei den hierzu von uns durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass die CCMP selbst kollagenolytische Aktivität besitzt. In der SDS-PAGE fand sich ein vollständiger Abbau des Kollagens in den Proben, die mit Kollagen und CCMP allein inkubiert wurden gegenüber dem Substratleerwert mit Kollagen. In den Proben, für die zuerst eine Reaktion zwischen Progelatinasen und CCMP herbeigeführt wurde, fanden sich Banden, die identisch mit dem Substratleerwert für Kollagen waren. Das heißt, dass das Kollagen durch die Zugabe von mit CCMP vorinkubierten Progelatinasen nicht abgebaut wurde. Eine Aktivierung der Progelatinasen liegt demzufolge nicht vor. Vielmehr muss bei gänzlich fehlender kollagenolytischer Aktivität in den Proben, in denen Progelatinasen und CCMP vorinkubiert wurden, eine Inaktivierung der CCMP durch die Progelatinasen stattgefunden haben.

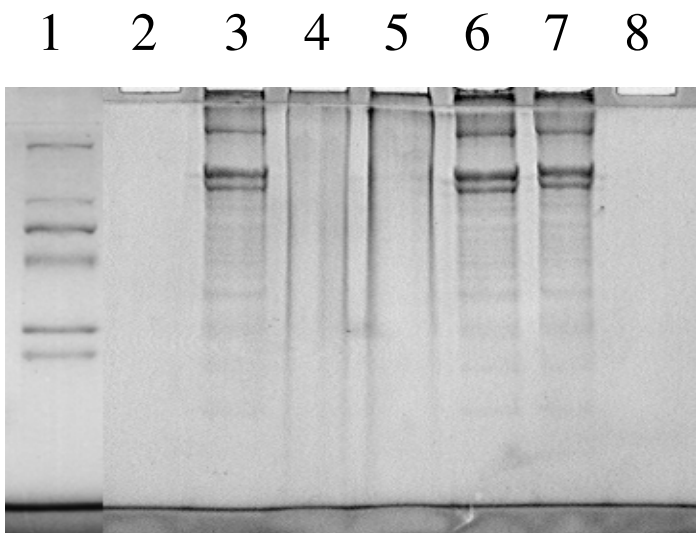


Abb. 13 Versuch der Aktivierung von Progelatinasen durch die CCMP; Nachweis einer kollagenolytischen Aktivität der CCMP in der SDS-Page (10% Acrylamid) nach Coomassiefärbung

Spuren: 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Enzymleerwert CCMP, 3 Substratleerwert Kollagen, 4 CCMP mit Kollagen 1h Inkubation, 5 CCMP mit Kollagen 2h Inkubation, 6 Progelatinasen mit CCMP und Kollagen 1h Inkubation, 7 Progelatinasen mit CCMP und Kollagen 2h Inkubation, 8 Enzymleerwert Progelatinasen mit CCMP

3.2.5 Interaktionen mit Antithrombin III

Für das Plasmaprotein Antithrombin III konnte in der SDS-Gelelektrophorese kein Abbau nachgewiesen werden. Auffällig war jedoch, dass neue Banden entstanden, die weniger weit in das Gel einwanderten als der Substratleerwert, also eine höhere Molmasse besaßen als das Ausgangssubstratprotein. Die Banden waren weder beim Substratleerwert noch beim Enzymleerwert erkennbar. Das lässt auf eine Komplexbildung unter Einwirkung der CCMP schließen.

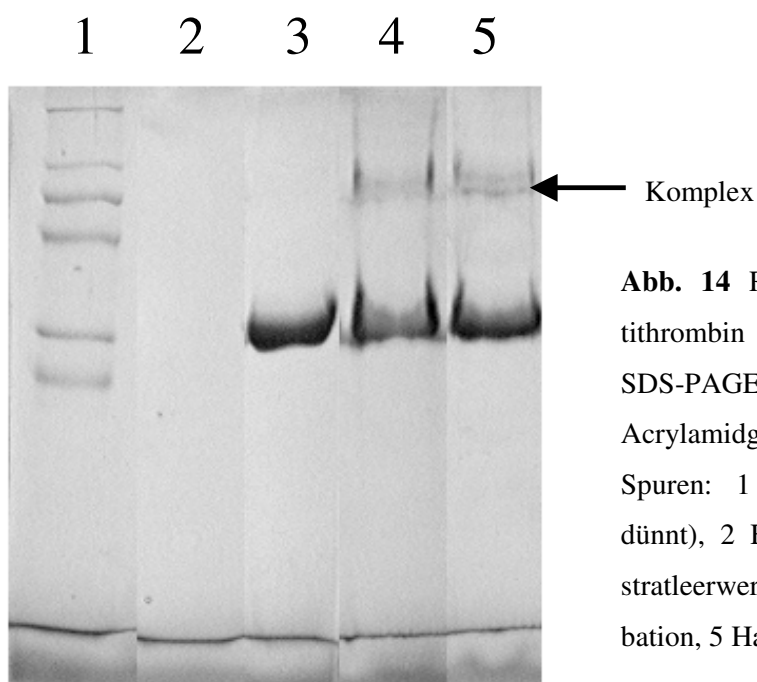


Abb. 14 Reaktion der CCMP mit Antithrombin III mit Bildung eines in der SDS-PAGE sichtbaren Komplexes (10% Acrylamidgel)

Spuren: 1 Merck Eichproteine (unverdünnt), 2 Enzymleerwert CCMP, 3 Substratleerwert AT III, 4 Hauptwert 1h Inkubation, 5 Hauptwert 2h Inkubation

Ein möglicher Einfluss auf die Aktivität von Antithrombin III durch die CCMP wurde über die AT III-Wirkung auf Thrombin getestet. Hierfür ergaben sich folgende Fluoreszenzwerte (relative Fluoreszenzeinheiten, RFU):

Thrombinaktivität mit Boc-Phe-Val-Arg-AMC	272
Thrombinaktivität unter Einfluss von AT III	76
Thrombinaktivität unter Einfluss der CCMP	
a) Thrombin : CCMP = 1:2	229
b) Thrombin : CCMP = 1:4	253
Thrombinaktivität nach Reaktion CCMP + AT III	
a) AT III : CCMP = 1:1	260
b) AT III : CCMP = 1:2	216
Aktivität der CCMP gegenüber dem MMP-2-Substrat	
a) ohne Einfluss von AT III	150
b) unter Einfluss von AT III	142

Die Thrombinaktivität wurde mit dem fluorogenen Thrombinsubstrat Bz-Phe-Val-Arg-AMC gemessen. In Anwesenheit von AT III sinkt die Thrombinaktivität auf etwa ein Viertel der Ausgangsaktivität ab. Nach Einwirkung der CCMP auf AT III über eine Zeit von 15min ergaben sich nach Hinzufügen von Thrombin ähnliche Werte für die Thrombinaktivität wie ohne Antithrombin III. Das heißt, dass eine nahezu vollständige Inaktivierung von Antithrombin III unter Einwirkung der CCMP angenommen werden muss, die vermutlich durch Komplexbildung zwischen CCMP und AT III bedingt ist. Der Effekt ist bei einem molekularen Verhältnis von 1:2 (AT III:CCMP) etwas geringer ausgeprägt als bei einem Verhältnis von 1:1. Die Aktivität der CCMP gegenüber dem MMP-2-Substrat ändert sich in Anwesenheit von Antithrombin III nicht. Die CCMP hat keinen Einfluss auf die Aktivität von Thrombin gegenüber dem Substrat Bz-Phe-

Val-Arg-AMC. Die CCMP besitzt keine Aktivität gegenüber dem Thrombinsubstrat Bz-Phe-Val-Arg-AMC.

3.2.6 Interaktionen mit Plasminogen

Nach Reaktion der CCMP mit Plasminogen zeigen sich in der SDS-PAGE neue Proteinbanden bei einem höheren Molekulargewicht als der Substratleerwert für Plasminogen. Auch hier lässt sich eine Komplexbildung zwischen Plasminogen und CCMP vermuten. Ein Abbau von Plasminogen findet nicht statt.

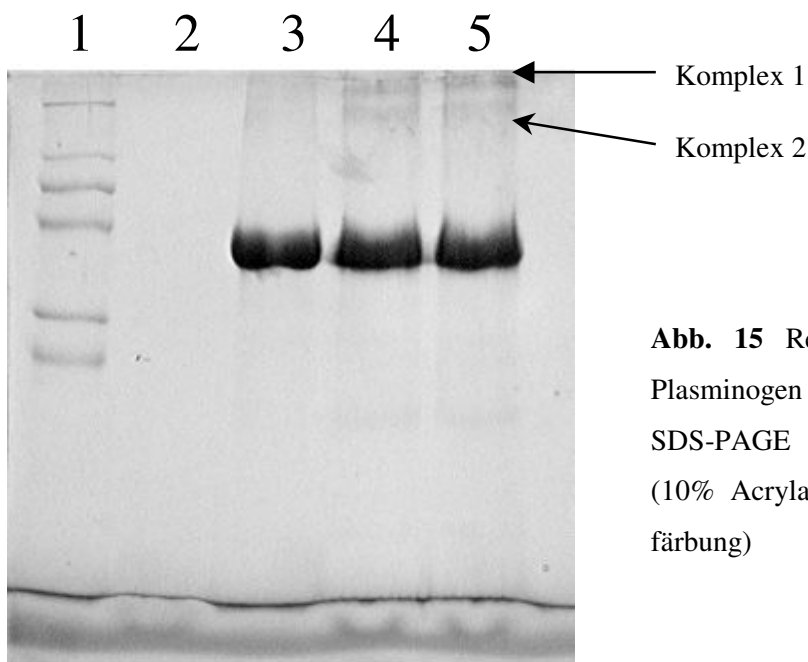


Abb. 15 Reaktion der CCMP mit Plasminogen mit Bildung von in der SDS-PAGE sichtbaren Komplexen (10% Acrylamidgel nach Coomassiefärbung)

Das chromogene Plasminsubstrat Chromozym® PL mit der Struktur Tos-Gly-Pro-Lys-pNA wird durch Plasmin hydrolytisch zu Tos-Gly-Pro-Lys und p-Nitroanilin abgebaut. Mit diesem Substrat sollte überprüft werden, ob die CCMP Plasminogen zu Plasmin aktivieren kann. Bei den Versuchen zeigte sich, dass das verwendete Plasminogen eine relativ hohe Plasminaktivität besitzt. Es war eine deutliche Zunahme des pNA-Gehaltes nach der Reaktion von Plasminogen mit dem Substrat allein zu beobachten. Die CCMP hatte nur eine minimale Aktivität gegenüber dem Substrat. In dem Ansatz, bei dem zunächst eine Inkubation der CCMP mit Plasminogen erfolgte, zeigte sich bei gleichem Verhältnis von Plasminogen und Plasminsubstrat wie im Leerwert eine geringere Menge an entstandenem pNA während der gleichen Zeit. Dies könnte eine Hemmung der Plasminaktivität durch die CCMP bzw. einen Abbau von Plasmin bedeuten. Eine eindeutige Aussage ist aus den Versuchen nicht ableitbar.

Der Versuch einer Plasminogenaktivierung wurde ebenfalls mit dem fluorogenen Plasminsubstrat Boc-Glu-Lys-Lys-AMC durchgeführt. Die CCMP besitzt gegenüber diesem Substrat keine proteolytische Aktivität (siehe Tab. 6, S. 42). Auch die Einwirkung von Plasminogen auf dieses Substrat hatte nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenz zur Folge. Nach Inkubation der CCMP mit Plas-

minogen kommt es zu einer nur wenig stärkeren Zunahme der Fluoreszenz. Eine weitere Zunahme der Fluoreszenz im Verlauf von ein und zwei Stunden im Vergleich zur sofortigen Messung nach Reaktion erfolgte nicht. Da nach diesen Ergebnissen keine oder nur eine sehr schwache Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch die CCMP vorliegt, wurde von einer grafischen Darstellung abgesehen.

3.2.7 Versuche mit Inhibitoren

(a) Hemmung durch Diethylpyrocarbonat

Diethylpyrocarbonat (DEPC) reagiert bei pH 6 mit Histidylresten eines Proteins. Die CCMP wurde bereits nach 10min bis zu einem Minimum an Restaktivität von ca. 35% durch DEPC gehemmt. Mit Hydroxylamin kann eine Decarboxylierung erreicht werden, sodass wieder die ursprünglichen Histidinreste entstehen. Die CCMP erreichte nach Zugabe von Hydroxylamin innerhalb weniger Minuten wieder ihre ursprüngliche Aktivität.

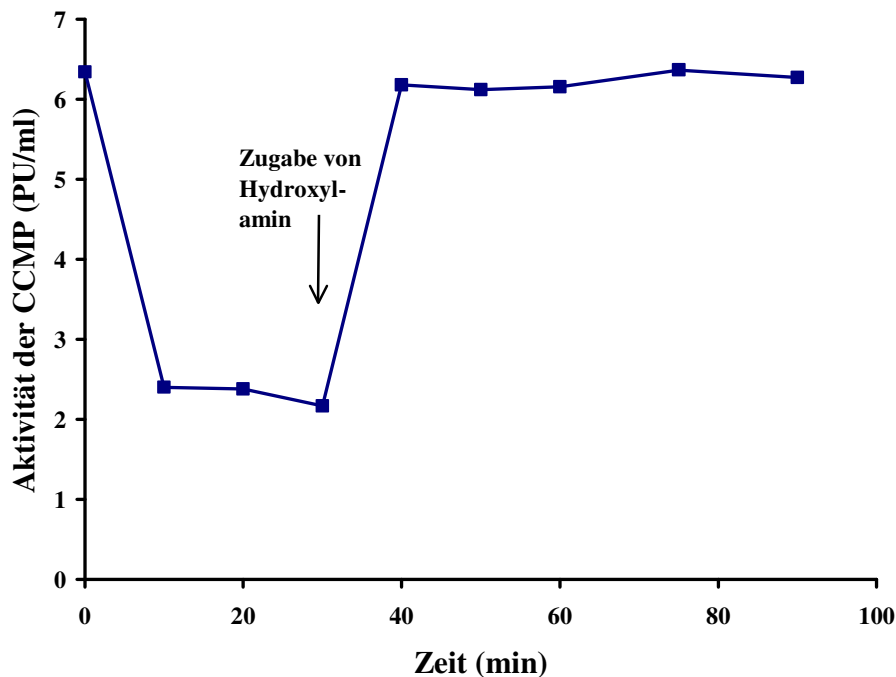


Abb. 16 Hemmung der CCMP durch DEPC und Reaktivierung durch Hydroxylamin

(b) Hemmung durch EEDQ

EEDQ reagiert mit Carboxylgruppen saurer Aminosäuren eines Proteins. Die CCMP wird durch den Inhibitor EEDQ in ihrer Aktivität nicht beeinflusst. Bei Inhibitorkonzentrationen zwischen 0 und 1,5mM ist nach 30min Reaktionszeit zwischen CCMP und Inhibitor eine gleichbleibende Enzymaktivität gegenüber Azokasein messbar. Das lässt darauf schließen, dass keine Aminosäurereste mit Carboxylgruppen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) im aktiven Zentrum des Enzyms vorhanden sind.

4 Diskussion

4.1 ICMP von *Pseudomonas aeruginosa*

4.1.1 Vergleich mit anderen insulinspaltenden Enzymen

Die einzelnen Ketten des Insulinmoleküls (Insulin A- und Insulin B-Kette) werden eingesetzt, um die Spaltspezifität von Proteasen zu untersuchen und daraus Aussagen über bevorzugte Spaltstellen der Enzyme ableiten zu können. So können Proteasen verglichen und klassifiziert werden. Insulin ist ein Substrat, das nur von wenigen Proteasen gespalten wird. Sowohl für Eukaryonten als auch für Prokaryonten sind wenige Enzyme bekannt, die einen Abbau des kompletten Insulinmoleküls, bestehend aus Insulin A-Kette und Insulin B-Kette katalysieren. Diese Enzyme sind häufig auch *in vivo* am Insulinabbau beteiligt.

Insulinspaltende Enzyme sind in vielen Geweben von eukaryontischen Lebewesen vorhanden. Jedes Gewebe, an dem Insulin eine Wirkung entfaltet, besitzt auch die Fähigkeit, das Insulinmolekül abzubauen. Das wichtigste insulinspaltende Enzym der Eukaryonten ist die IDE (Insulin degrading enzyme = Insulinase = Insulysin, EC 3.4.24.56). Die höchste insulinspaltende Aktivität befindet sich in Leber- und Nierengewebe. Der Insulinstoffwechsel ist nicht nur für den Abbau des intakten und damit biologisch aktiven Moleküls im Rahmen der Regulation des Blutzuckerspiegels von Bedeutung. Insulysin spielt eine multifunktionale Rolle bei grundlegenden zellulären Prozessen [121]. Beispielsweise besteht ein Zusammenhang zwischen dem Insulinstoffwechsel und der Entstehung der nicht vererbten Form der Demenz vom Alzheimer-Typ, wobei die IDE eine hohe Bedeutung hat [122-124].

Unter den bakteriellen Proteasen ist Pitrilysin von *Escherichia coli* (EC 3.4.24.55) als insulinspaltendes Enzym gut untersucht. Dieses auch als Protease III bezeichnete Enzym wurde zuerst 1979 von Cheng und Zisper beschrieben [44]. Es zeigt starke Homologien zu dem bei Säugetieren vorkommenden insulinspaltenden Enzym Insulysin. In drei Regionen des Enzyms fanden sich Übereinstimmungen mit Insulysin im Ausmaß von 54 und 80% [125]. Beide Enzyme sind Metalloproteasen, die zur gleichen Proteasenfamilie gehören. Pitrilysin ist im periplasmatischen Raum lokalisiert [126]. Seine Funktion ist bislang noch nicht endgültig geklärt.

In den Zellhüllen von *Pseudomonas aeruginosa* fand sich insulinolytische Aktivität. Die insulinspaltende Protease konnte als fest an die Außenmembran des gramnegativen Bakteriums gebundenes Enzym identifiziert werden und wurde deshalb als insulinspaltende Membranprotease (ICMP) bezeichnet. Für die ICMP konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Enzym ebenso wie bei Insulysin und Pitrilysin um eine Zinkmetalloprotease mit Histidinresten im aktiven Zentrum handelt [107].

Eine der Hauptaufgaben dieser Arbeit war die Ermittlung der Substrat- und Spaltspezifität der ICMP. Einen Vergleich der dabei gefundenen Spaltstellen in der Insulin B-Kette mit denjenigen anderer Proteasen zeigt Abb. 17.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
F-V-N-Q-H-L-C-G-S-H-L-V-E-A-L-Y-L-V-C-G-E-R-G-F-F-Y-T-P-K-A

ICMP (↑) ↑ ↑ (↑)
Insulysin ↑ ↑
Pitriylsin ↑ ↑

Abb. 17 Spaltstellen der ICMP von *P. aeruginosa* in der Insulin B-Kette im Vergleich zu Insulysin [127] und Pitriylsin [44]

Ein Vergleich der Spaltstellen in der Insulin B-Kette zeigt große Ähnlichkeit zwischen den drei Enzymen. Die Spaltstelle Tyr¹⁶ -↓- Leu¹⁷ ist allen drei insulinspaltenden Enzymen gemeinsam. Die zweite primäre Spaltstelle der ICMP (Glu¹³ -↓- Ala¹⁴) ist identisch mit dem zweiten Angriffspunkt von Insulysin. Eine der sekundären Spaltstellen der ICMP (Phe²⁵ -↓- Tyr²⁶) gleicht einer der Spaltstellen von Pitriylsin. Damit ist insbesondere die Ähnlichkeit der primären Spaltstellen der ICMP mit denjenigen von Insulysin auffällig. Diese Übereinstimmung in der Spaltspezifität bei der Spaltung der Insulin B-Kette der drei verglichenen Enzyme legt die Vermutung nahe, dass zwischen der ICMP und Insulysin bzw. Pitriylsin verwandtschaftliche Beziehungen bestehen. Weiteren Aufschluss hierüber könnten Untersuchungen der jeweils codierenden Gene geben, was Gegenstand einer weiterführenden Arbeit sein könnte.

In ihren enzymatischen Eigenschaften unterscheiden sich die ICMP, Pitriylsin und Insulysin voneinander (vgl. nachfolgende Tabelle).

Tab. 9 Vergleich der enzymatischen Eigenschaften verschiedener insulinspaltender Enzyme

	ICMP von <i>P. aeruginosa</i> [107, 111]	Pitriylsin von <i>E. coli</i> [44, 128]	Insulysin von Eukaryonten [129, 130]
Molmasse	44,6 kDa	110 kDa	110 kDa
Lokalisation	Membrangebunden an der Zellaußenseite	Periplasma	Cytosol
pH-Optimum	6,0-7,0	7,0-7,5	6,5-8,5
Isoelektrischer Punkt	5,3	5,7	5,2
Temperaturoptimum	37°C	45°C	37°C
Hemmung durch			
pCMB	+	-	+
Iodacetamid	-	-	+
EDTA	+	+	+

Im Unterschied zu Pitriylsin ist die ICMP in der Lage, außer Peptiden wie Insulin auch größere Proteine wie Casein, Globin, Aktin und Fibrinogen zu spalten [131]. Über einen Abbau dieser Proteine durch Insulysin ist ebenfalls nichts bekannt.

Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der ICMP eindeutig um ein von der Protease III und der IDE verschiedenes Enzym mit insulinspaltender Aktivität handelt. Verwandtschaftliche Beziehungen sind wahrscheinlich.

4.1.2 Vergleich mit anderen *Pseudomonas*-Proteasen

Die bekannten extrazellulären Proteasen von *P. aeruginosa* sind unterschiedlich gut untersucht. Detaillierte Kenntnisse liegen über die Alkalische Protease (neuerer Name Aeruginolysin) und über die Elastase (neuerer Name Pseudolysin) vor, worauf in Kap. 1.2.3 eingegangen wurde. Zwei weitere extrazelluläre Proteasen wurden ebenfalls in genanntem Kapitel erwähnt: Staphylolysin und die Protease IV. Weiterhin ist eine Lysin-spezifische Protease bekannt. Sie gehört in die Gruppe der Serinproteasen, spaltet Fibrinogen und ist eine Protease mit hoher Spezifität, die nur Peptidbindungen mit Lysylresten hydrolysiert [132]. Wahrscheinlich liegt hier eine Verwandtschaft mit der Protease IV vor, die ähnliche Eigenschaften hat [88].

Die ICMP unterscheidet sich in ihren Eigenschaften von diesen Proteasen. Versuche mit Proteaseinhibitoren ergaben eine Inaktivierung durch typische Metalloproteaseinhibitoren wie EDTA und o-Phenanthrolin. Kein Aktivitätsverlust erfolgte hingegen bei Reaktion mit dem typischen Serinproteaseinhibitor PMSF [107]. Durch HPLC in Verbindung mit einer speziellen massenspektrometrischen Nachweismethode für Metallionen (inductively coupled plasma mass spectrometry) wurde das Metallion im aktiven Zentrum der ICMP als Zinkion identifiziert, wobei pro Proteasemolekül ein Zinkion nachgewiesen wurde. Proteingebundene Calciumionen fanden sich nicht [133]. Als Metalloprotease unterscheidet sich die ICMP hinsichtlich des Aufbaus des aktiven Zentrums von den als Serinproteasen charakterisierten *Pseudomonas*-Proteasen Protease IV und der Lysin-spezifischen Protease.

Es konnte eine nahezu vollständige Inaktivierung der ICMP durch DEPC und eine Reaktivierung durch Hydroxylamin gezeigt werden [107]. Das lässt auf das Vorhandensein von Histidinresten im aktiven Zentrum der Protease schließen. In den bekannten Metalloproteasen sind Histidinreste typische Liganden von Zinkionen im aktiven Zentrum. Auch die gut untersuchten *Pseudomonas*-Proteasen Pseudolysin und Aeruginolysin besitzen Histidinreste als Liganden des zentralen Zinkions. Allerdings bestehen hinsichtlich ihrer Substrat- und Spaltspezifität wesentliche Unterschiede zur ICMP.

Bei einem Vergleich der Spaltstellen der ICMP in der Insulin B-Kette mit denen der bekannten *P. aeruginosa* Proteasen fällt auf, dass sich für die ICMP nur vier Spaltstellen fanden (Abb. 18). Diese stimmen zum großen Teil zwar mit Spaltstellen der Alkalischen Protease sowie der Elastase überein. Es besteht jedoch eine wesentlich größere Spezifität, und der größte Teil der für die anderen Enzyme beschriebenen Spaltstellen konnte für die ICMP nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich benötigt die Protease eine längere Erkennungssequenz in der Peptidkette. Hinsichtlich der Spaltspezifität ist die ICMP Insulysin und Pitrylysin ähnlicher als den bisher bekannten Proteasen von *P. aeruginosa* (s. Kap. 4.1.1). Die primären Spaltstellen der ICMP sind identisch mit den Spaltstellen von Insulysin in der Insulin B-Kette.

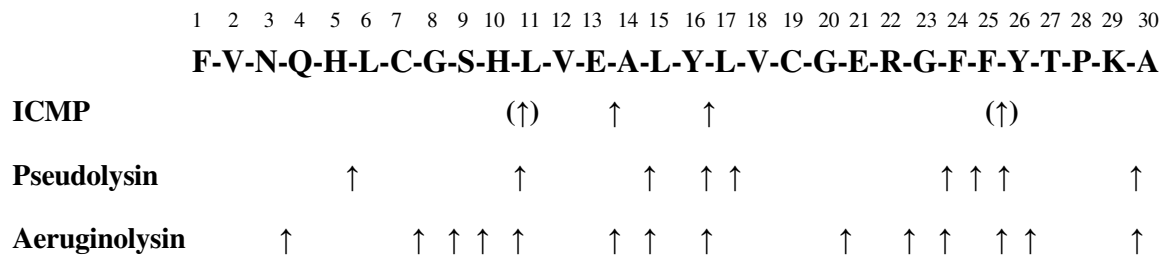


Abb. 18 Vergleich der Spaltstellen beim Abbau der Insulin B-Kette für verschiedene Proteasen von *P. aeruginosa*: ICMP, Pseudolysin [134] und Aeruginolysin [134]

Weitere Unterschiede liegen im Sekretionsvorgang und der Bindung an die Zellmembran. Die ICMP ist als aktives Enzym an die Außenmembran gebunden [111]. Andere, in Form aktiver Vorstufen oder in ihrer aktiven Form an die Zellmembran gebundene Proteasen sind für *P. aeruginosa* nicht bekannt. Pseudolysin wird zunächst als Preproenzym synthetisiert. Während des Sekretionsvorgangs wird ein 2.400 Da großes Signalpeptid in der inneren Bakterienmembran durch eine Signalpeptidase abgespalten. Dadurch entsteht das Proenzym. Die Abspaltung des 18kDa großen Propeptids erfolgt autoproteolytisch im Periplasma. Das abgespaltene Propeptid bleibt an das Enzym gebunden. Dieser Komplex ist inaktiv. Das Propeptid wirkt als Proteaseinhibitor und schützt so die Zelle vor Selbstzerstörung [135]. Außerdem spielt das Propeptid für den Sekretionsvorgang der Protease eine wichtige Rolle, indem es als Chaperon wirkt und eine Information über die endgültige Lokalisation von Pseudolysin enthält. Innerhalb der Zellhülle gibt es Proteinsekretionssysteme, die erforderlich sind, um die Proteine in den Extrazellulärraum zu transportieren [136]. Pseudolysin bleibt nicht an die Zellmembran gebunden. Für Aeruginolysin ist kein N-terminales Signalpeptid beschrieben. Die Sekretion erfolgt über das Typ I Sekretionssystem [137]. Eine Membranbindung ist nicht bekannt.

Auch gegenüber Proteaseinhibitoren verhält sich die ICMP anders als Pseudolysin. Inhibitoren wie Phosphoramidon, Zincov, Captopril und Thiorphan, die typischerweise Proteasen der Thermolysinfamilie, zu der auch Pseudolysin gehört [138], hemmen, verminderten die Aktivität der ICMP nicht oder nur in geringem Ausmaß [107]. Demzufolge ist eine Zugehörigkeit der ICMP zu dieser Proteasenfamilie nicht anzunehmen. Ein ähnlicheres Verhalten gegenüber Inhibitoren findet sich im Vergleich mit Aeruginolysin [74]. Das könnte eine Einordnung der ICMP in den Clan MB der Metalloproteasen, zu dem auch Aeruginolysin gehört, nahelegen.

Tab. 10 Vergleich enzymologischer Eigenschaften verschiedener Proteasen von *P. aeruginosa*

	ICMP [107, 111]	Elastase [78]	Alkalische Protease [74]
Molekulargewicht	44,6 kDa	33 kDa	46,4 kDa
Isoelektrischer Punkt	5,3	5,9	4,1
pH-Optimum	6,0-7,0	7,0-8,0	6,0-10,0
Temperaturstabilität	bis 40°C	bis 50°C	bis 60°C
Substratspezifität			
FAGLA	-	+	-
Z-Phe-Arg-AMC	-	n.b.	+

4.1.3 Einfluss auf das Gerinnungssystem und das fibrinolytische System

Für zahlreiche Bakterienproteasen konnte ein Eingreifen in die Gerinnungskaskade und das fibrinolytische System nachgewiesen werden. Ein kurzer Überblick hierüber wurde bereits in Kap. 1.1.4 gegeben. Ausführliche Untersuchungen hierüber gibt es für Proteasen von *Pseudomonas*, *Candida* und *Serratia*. So konnte gezeigt werden, dass es unter Einwirkung der alkalischen Protease von *P. aeruginosa* zu einer starken Aktivierung von Faktor XII, Faktor X und Prothrombin kommt. Diese Aktivierung von Gerinnungsfaktoren an Schlüsselstellen der Kaskade wurde durch endogene Plasmaproteaseinhibitoren nicht beeinflusst [26]. Eine Spaltung von Fibrinogen konnte für die Protease IV von *P. aeruginosa* gezeigt werden. Die drei Ketten des Fibrinogenmoleküls werden innerhalb einer Stunde vollständig abgebaut [88].

In der Gerinnungskaskade wird Fibrinogen unter Einwirkung von Thrombin durch Proteolyse zu Fibrinmonomeren umgewandelt, die sich dann zu großen Einheiten zusammenlagern und unter Einwirkung von Faktor XIII ein quervernetztes Fibringerinnsel bilden. Für die ICMP konnte der Abbau von Fibrinogen nachgewiesen werden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen bleibt eine scharf abgegrenzte Proteinbande in der SDS-PAGE bei etwas geringerer Molmasse im Vergleich zur Bande des Fibrinogens sichtbar. Unter reduzierenden Bedingungen zeigten sich im Substratleerwert verschiedene Banden bei geringeren Molmassen, die den einzelnen Ketten des Fibrinogenmoleküls zuzuordnen sind. Nach Einwirkung der ICMP bleibt lediglich die Bande mit der kleinsten Molmasse, die den γ -Ketten entspricht, weiterhin sichtbar. Im niedrigeren Molmassebereich treten vorher nicht sichtbare Banden auf. Es scheint demzufolge ein spezifischer Abbau der α - und β -Ketten des Fibrinogens vorzuliegen, wodurch es zu einer gestörten Blutgerinnung kommen kann. Ein Abbau von Fibrin durch die ICMP konnte nicht festgestellt werden. Der Mechanismus der Fibrinogenspaltung unterscheidet sich deutlich von dem der Protease IV. Die Reaktion mit der Serinprotease hat einen vollständigen Abbau aller drei Ketten des Fibrinogens innerhalb kurzer Zeit zur Folge. Bei Reaktion mit der ICMP hingegen werden die α - und die β -Kette abgebaut, die γ -Ketten bleiben als Bande in der SDS-Elektrophorese sichtbar.

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen ergaben sich außerdem Hinweise für das Eingreifen der ICMP in das fibrinolytische System, welches der Aufrechterhaltung des hämostatischen Gleichgewichts dient. Zur Einleitung der Fibrinolyse wird zunächst Plasminogen in Plasmin umgewandelt. Diese Umwandlung erfolgt durch verschiedene Plasminogenaktivatoren. Man unterscheidet intrinsische (Blutgerinnungsfaktoren XI und XII, Präkallikrein) und extrinsische Plasminogenaktivatoren (Urokinase aus Harnwegsepithelien, t-PA aus Gefäßendothelzellen). Plasmin ist in der Lage, Peptidbindungen in den Verbindungsregionen zwischen den Fibrinmonomeren zu spalten. Eine physiologische Hemmung des fibrinolytischen Systems erfolgt sowohl auf der Ebene der Plasminaktivatoren als auch auf der Ebene des aktiven Plasmins durch α_2 -Antiplasmin. Mit der Frage, ob die ICMP zu einer Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin führt, wurden Versuche mit dem chromogenen Plasminsubstrat Chromozym® PL durchgeführt. Hierin war sowohl unter Einwirkung der ICMP auf das Substrat ohne Plasminogen als auch unter Einwirkung von Plasminogen allein auf das Substrat eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz nachweisbar. Diese war

etwas ausgeprägter, wenn zunächst die ICMP mit Plasminogen reagierte und dann die Plasminaktivität bestimmt wurde. Eine Aussage über die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin durch die ICMP kann aufgrund der hohen Aktivität des Plasminogens gegenüber dem Substrat nicht getroffen werden. Die Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass die ICMP selbst Plasminaktivität und damit fibrinolytische Aktivität besitzen könnte. Eine andere Möglichkeit, den Einfluss der ICMP auf die Plasminogenaktivierung zu testen, waren Versuche mit dem fluorogenen Plasminsubstrat Boc-Glu-Lys-Lys AMC. Hierin zeigte sich eine leichte Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin unter der Einwirkung der ICMP. Eine Hemmung der Plasminaktivität durch die ICMP liegt nicht vor.

Eine Fibrinogenolyse, eine mögliche Plasminaktivität der ICMP und eine, wenn auch nur schwach ausgeprägte, Plasminaktivierung wirken gleichsinnig in Richtung einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems bzw. wirken einer Thrombenbildung entgegen.

Im menschlichen Organismus besteht ein genau reguliertes Gleichgewicht zwischen den Komponenten der einzelnen Systeme. Die ICMP scheint das Gleichgewicht in Richtung des fibrinolytischen Systems zu verschieben. Wie oben beschrieben, konnte für andere *Pseudomonas*-Proteasen eine Aktivierung von Gerinnungsfaktoren nachgewiesen werden, die zu einer vermehrten Bildung von Thromben führt. Zwischen verschiedenen *Pseudomonas*-Proteasen besteht ein komplexes Zusammenspiel durch das Eingreifen in beide Systeme.

Ebenfalls in diesem Zusammenhang ist zu sehen, dass andere, bereits lange bekannte *Pseudomonas*-Proteasen wie das Pseudolysin und Aeruginolysin, in der Lage sind, am Aufbau von Basalmembranen beteiligte Proteine, abzubauen [79]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass kapilläre Basalmembranen in der Augenlinse, in den Glomeruli der Niere und in der Lunge (Versuche jeweils an Rindergewebe) durch Pseudolysin angegriffen werden [139]. Dadurch ist es den die Gerinnungsvorgänge beeinflussenden Proteasen möglich, an den Ort ihrer Wirkung, nämlich in das Blutplasma zu gelangen. Eine proteolytische Aktivität der ICMP gegenüber Aktin, das am Aufbau von Gefäßwänden beteiligt ist, könnte hier von Bedeutung sein. Es ist anzunehmen, dass dieses komplexe Zusammenwirken verschiedener Proteasen dazu beiträgt, die massiven und häufig zum Tode führenden Störungen der Blutgerinnung im Rahmen einer bakteriellen Sepsis hervorzurufen.

Insgesamt gibt es weitere Ansatzpunkte, den Einfluss der ICMP auf das Gerinnungs- und das fibrinolytische System zu untersuchen. Dass die von uns untersuchte Protease Auswirkungen auf Faktoren des Gerinnungssystems hat, konnte eindeutig gezeigt werden.

4.2 CCMP von *Bacillus cereus*

4.2.1 Vergleich mit anderen Proteasen von *Bacillus* sp. und Fragilysin

Bislang sind zahlreiche intra- und extrazelluläre Proteasen bekannt, die vom Mikroorganismus *B. cereus* produziert werden. Hierzu zählen viele Enzyme, die nur sehr wenig charakterisiert sind und bisher noch keiner Protease-Familie zugeordnet werden konnten. Zu den bestuntersuchten und seit langem bekannten extrazellulären Proteasen von *Bacillus*-Arten gehören neutrale Metalloproteasen aus der Thermolysin-Familie und alkalische Serinproteasen aus der Subtilisinfamilie.

Subtilisine und Thermolysine werden als Preproenzyme synthetisiert und als Vorstufen durch die Bakterienmembran transportiert. Die reifen Enzyme werden in den Extrazellulärraum abgegeben [144, 145]. Im Gegensatz hierzu ist die CCMP als reifes Enzym fest an die Zellmembran gebunden [108]. Ein weiteres Indiz für die Lokalisation der CCMP an der Außenseite der Zellhülle ist der Transfer dieses Proteins von intakten Bakterienzellen auf Liposomen. Da nur hohe Detergenzkonzentration oder organische Lösungsmittel eine Solubilisierung der Protease bewirken, ist eine feste Bindung an die Zellhülle anzunehmen [141].

Das genetisch mit *B. cereus* eng verwandte Pflanzenschutzbakterium *Bacillus thuringiensis* produziert ein gegen Motten wirksames Toxin, das Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz mit der CCMP zeigt [146]. Für eine weitere Protease mit der Bezeichnung Camelysin von *B. thuringiensis*, ein Enzym, das erst kürzlich charakterisiert wurde, fanden sich Homologien mit der CCMP [147, 148].

Der Vergleich mit einer weiteren Bakterienprotease ist von Interesse. Zwischen dem Enterotoxin Fragilysin von *Bacteroides fragilis* und der CCMP liegen eine Reihe von Ähnlichkeiten vor. Sowohl *B. cereus* als auch *B. fragilis* sind in der Lage, beim Menschen Diarrhoen hervorzurufen. Es konnte gezeigt werden, dass die Protease Fragilysin aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität Tight junctions zwischen Zellen des Darmepithels sowie die Basalmembran zerstört [149]. Dadurch kommt es zu Flüssigkeitsverlusten in das Darmlumen und damit zu einer Diarrhoe [150]. Die CCMP zeigt proteolytische Aktivität gegenüber einem ähnlichen Spektrum an Proteinen wie Fragilysin. Beide spalten Kollagen, Fibrinogen, Aktin und α_1 -Proteaseinhibitor. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Fragilysin in die Gruppe der Metalloproteasen gehört und die zinkbindende Region eine für Matrixmetalloproteasen typische Aminosäuresequenz enthält [151]. Hier könnten weitere Ähnlichkeiten vorliegen, da auch die CCMP eine hohe Aktivität gegenüber typischen Substraten von Matrixmetalloproteasen zeigt. In weiterführenden Untersuchungen könnte geprüft werden, ob die CCMP über einen ähnlichen Wirkmechanismus an den Darmepithelien Diarrhoen auslöst wie Fragilysin.

4.2.2 Einfluss auf das Gerinnungssystem und das fibrinolytische System

Der Einfluss der CCMP auf das Gerinnungssystem und das fibrinolytische System wurde von verschiedenen Seiten untersucht. Zunächst zeigte sich ein eindeutiger Abbau des Fibrinogenmoleküls. Unter reduzierenden Bedingungen waren in der SDS-PAGE im Substratleerwert die einzelnen Ketten des Fibrinogenmoleküls sichtbar. Nach Einwirken der CCMP über 2 Stunden war im Bereich der γ -Kette noch eine scharf begrenzte, aber weniger starke Bande sichtbar, die sich bei einer Einwirkzeit von 4 Stunden in ihrer Intensität weiter verringerte. Die Banden der α - und β -Ketten waren schon nach 2 Stunden Reaktionszeit nicht mehr sichtbar. Eine erhaltene Funktion des Fibrinogenmoleküls ist nach diesen ausgedehnten proteolytischen Prozessen nicht mehr vorstellbar. Damit vermindert die CCMP das für die Blutgerinnung zur Verfügung stehende Fibrinogen und hemmt so eine effiziente Koagulation des Blutes. Die CCMP ist außerdem in der Lage, Fibrin abzubauen. Diese direkte Fibrinolyse verschiebt das Gleichgewicht der Gerinnungskaskade in die

gleiche Richtung wie die Fibrinogenolyse. Es ist außerdem bekannt, dass Fibrin- und Fibrinogenspaltprodukte eine Polymerisation des Fibrins hemmen, die Wirkung von Thrombin beeinträchtigen sowie die Plättchenadhäsion an fremden Oberflächen vermindern, was zu einer weiteren Gerinnungshemmung führt. Fibrinolytische Aktivität hat außerdem eine große Bedeutung bei der Invasivität und Ausbreitung von Bakterien, bei entzündlichen Prozessen und Reaktionen des Immunsystems [29].

Auf der Seite des fibrinolytischen Systems scheint die CCMP direkte Interaktionen mit Plasminogen einzugehen. In der Elektrophorese war eine Komplexbildung zwischen Plasminogen und der CCMP sichtbar, was einen Einfluss auf die Funktion haben könnte. Aussagen darüber konnten aus Versuchen mit einem chromogenen und einem fluorogenen Substrat nicht gewonnen werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die CCMP zu einer partiellen Aktivierung von Plasminogen führt [108]. Interaktionen mit Plasminogen sind ein weit verbreiteter Pathomechanismus von Mikroorganismen, der ihre Invasivität und Ausbreitung begünstigt. Beispielsweise konnte dies kürzlich für *Cryptococcus neoformans* gezeigt werden [152]. Die Fibrinolyse wird physiologisch auf der Ebene der Plasminaktivatoren durch verschiedene Plasminaktivatorinhibitoren und auf der Ebene des Plasmins durch α_2 -Antiplasmin reguliert. Die CCMP führt zu einem vollständigen Abbau des Proteaseinhibitors α_2 -Antiplasmin. Die Wirksamkeit des Plasmins wird dadurch indirekt erhöht, was zu einer weiteren Aktivierung der Fibrinolyse führt.

Antithrombin III ist ein Regulator des Gerinnungssystems. Es wirkt als Proteaseinhibitor und hemmt die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen durch Thrombinhemmung. Außerdem hemmt Antithrombin III die Faktoren IXa, Xa, XIa und XIIa sowie Plasmin. Die CCMP bildet mit Antithrombin III in der SDS-PAGE nachweisbare Komplexe. Unter Einwirkung der CCMP kommt es zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung von AT III. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es durch Interaktionen der CCMP mit AT III zu einer höheren Thrombinaktivität kommt. Dies hätte zur Folge, dass die Fibrinbildung begünstigt wird. Auch die Aktivität der Faktoren IXa, Xa, XIa und XIIa würde steigen. Am Ende der Kaskade steht eine vermehrte Thrombenbildung.

Die Wirkungen der CCMP auf Blutgerinnung und Fibrinolyse erscheinen komplex und beeinflussen das Gleichgewicht durch verschiedene Angriffspunkte in beide Richtungen. Auch für *Vibrio vulnificus* ist eine Protease mit einerseits fibrinolytischer Aktivität und andererseits Aktivierung von Prothrombin beschrieben worden [153]. Die Inaktivierung von AT III durch die CCMP hat eine thrombogene Wirkung zur Folge, der Abbau von Fibrinogen und Fibrin sowie der Abbau des Plasmininhibitors α_2 -Antiplasmin und eine partielle Aktivierung von Plasminogen bewirken eine Verstärkung der Blutungsneigung. Im Rahmen schwerer bakterieller Infektionen kann es zum Bild einer disseminierten intravasalen Koagulopathie kommen. Hierbei werden durch eine zunächst überschießende Blutgerinnung Gerinnungsfaktoren verbraucht, und es resultiert nachfolgend eine verstärkte Blutungsneigung. Es ist vorstellbar, dass die CCMP an diesen Vorgängen beteiligt sein könnte. Auch das Eindringen von *B. cereus* an fibrinbelegten Oberflächen, beispielsweise Wunden, wird durch die fibrinolytische Aktivität begünstigt.

Bisher sind von *B. cereus* keine Proteasen bekannt, die in die Gerinnungsvorgänge des Wirtsorganismus eingreifen. Erstmals konnte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und der bisher bekannten Mechanismen der Beteiligung von Bakterienproteasen an pathologischen Gerinnungsvorgängen, z.B. bei einer Sepsis, liegt die Vermutung nahe, dass die CCMP einen wichtigen Pathogenitätsfaktor von *B. cereus* darstellt.

4.2.3 Interaktionen mit Proteaseinhibitorsystemen

Im menschlichen Plasma liegt der Anteil der Proteaseinhibitoren bei 10% der Gesamtproteinmenge. Die größte Bedeutung bei der Regulation verschiedener proteolytischer Enzyme haben α_1 -Antitrypsin, C1-Inhibitor, α_2 -Antiplasmin, Antithrombin III und α_2 -Makroglobulin [154]. Bei normaler Funktion der wirtseigenen Proteaseinhibitorsysteme könnte den meisten der unter 1.1.4 (a)-(e) beschriebenen pathologischen Effekte, die durch Bakterienproteasen hervorgerufen werden können, entgegengesteuert werden. Proteasen von Bakterien entziehen sich nicht nur den Regulationsmechanismen der Proteaseaktivität, sondern beeinträchtigen in erheblichem Ausmaß auch die Proteaseinhibitoren in ihrer Funktion. Dieser Vorgang ist als wirkungsvoller indirekter pathogenetischer Mechanismus anzusehen (siehe 1.1.4 (e)).

Inzwischen ist für zahlreiche Bakterienproteasen bekannt, dass sie ihre Wirkung unter anderem auf der Ebene der Proteaseinhibitoren entfalten. Zuerst wurde der Abbau und damit auch die Inaktivierung von α_1 -Proteaseinhibitor von Morihara et al. 1979 für die Elastase und die alkalische Protease von *P. aeruginosa* gezeigt [47]. Auch Proteasen unterschiedlicher Stämme von *Staphylococcus aureus* führen zu einer Inaktivierung von α_1 -Proteaseinhibitor durch Proteolyse und führen so zu einer Dysregulation der neutrophilen Elastase [48]. Ebenso sind Proteasen von *Serratia marcescens* in der Lage, Plasmaproteaseinhibitoren abzubauen und damit zu inaktivieren [46]. Für die CCMP konnte eine hohe proteolytische Aktivität gegenüber α_1 -Antitrypsin und α_2 -Antiplasmin gezeigt werden. Hier ist eine Funktionseinschränkung der Aktivität der Proteaseinhibitoren anzunehmen. Mit Antithrombin III bildet die CCMP stabile Komplexe, die selbst durch die SDS-Elektrophorese nicht auflösbar sind. In weiteren Versuchen konnte eine Inaktivierung von AT III durch die CCMP nachgewiesen werden.

Neben der CCMP gibt es für bisher bekannte Proteasen von *B. cereus* keine Hinweise darauf, dass sie in Plasmaproteaseinhibitorsysteme des Wirtsorganismus eingreifen. Diese Mechanismen könnten bei der Entstehung schwerer Infektionen bis hin zur Sepsis mit *B. cereus* von Bedeutung sein.

4.2.4 Zusammenhänge mit Matrixmetalloproteasen

Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind Enzyme, die Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), z.B. Kollagen, Fibronectin, Laminin und Elastin, spalten. Sie kommen bei Tieren und Menschen vor und spielen eine Rolle bei der Embryonalentwicklung, Morphogenese, beim Gewebeabbau und vermutlich bei der Tumorgenese und Metastasierung. Die meisten von ihnen sind mit mehreren verschiedenen Namen bezeichnet worden. Matrixmetalloproteasen werden als Proenzyme syntheti-

siert. Durch Abspaltung des Propeptids entsteht das wirksame Enzym. Verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren sorgen für ein Gleichgewicht in der Aktivität der Matrixmetalloproteasen [155]. Gelatinase A und Matrilysin, deren synthetische Substrate bei Versuchen zur Substratspezifität mit der CCMP eingesetzt wurden, entsprechen den Matrixmetalloproteasen MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-7 (Matrilysin). Für die CCMP konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sie eine hohe Aktivität gegenüber Matrixmetalloproteasesubstraten besitzt, insbesondere gegenüber MCA-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (MMP-2-Substrat). Damit liegt eine Ähnlichkeit in der Substratspezifität zu Matrixmetalloproteasen für intern gequenchte fluorogene Substrate vor. Das bedeutet, dass die CCMP als extrazelluläre Protease mit ähnlicher Spaltspezifität wie die MMP-2 auch in ähnlicher Weise in proteolytische Prozesse wie diese eingreifen könnte. Im Rahmen des Geschehens beim septischen Schock werden erhöhte Matrixmetalloprotease-Spiegel beobachtet. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass eine MMP-2-Aktivität der CCMP ein zusätzlicher pathogener Faktor beispielsweise bei einem septischen Geschehen oder bei der Invasivität sein kann.

Aus Bakterien sind bislang keine Matrixmetalloproteasen isoliert worden. Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass auch Bakterien Matrixmetalloproteaseaktivität besitzen. Beispielsweise konnte für *Bacteroides fragilis* gezeigt werden, dass bakterielle Metalloproteasen an der Penetration der Darmwand und an der Entstehung einer transmuralen Entzündung beteiligt sind [156]. Kürzlich wurde ein matrixmetalloproteaseähnliches Enzym von *Tannerella forsythia*, einem wichtigen Erreger bei der Genese von Periodontitiden, mit der Bezeichnung Karilysin beschrieben [157]. Darüber hinaus liegen zahlreiche Untersuchungen über Interaktionen zwischen Matrixmetalloproteasen des menschlichen Organismus und Bakterien vor. Im Folgenden werden dafür einige Beispiele angeführt. Peptidoglycan von *Staphylococcus aureus* induziert einen raschen Anstieg des MMP-9-Spiegels in der Leber, im Blut und in der Lunge von Ratten. Es wird vermutet, dass dieser Anstieg Teil der septischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die systemische Ausbreitung von Peptidoglycan ist [158]. Im Rahmen von Weichteilinfektionen und septischer Arthritis durch Infektion mit *Staphylococcus aureus* wurden erhöhte Spiegel für verschiedene Matrixmetalloproteasen gemessen [159]. Das Exotoxin B von *Streptococcus pyogenes* scheint Matrixmetalloproteasen zu aktivieren, welche zu einer Schädigung des Gewebes führen und darüber einen proapoptotischen Effekt durch die Freisetzung von Tumornekrosefaktor α und löslichem Fas Liganden haben [160]. Bei menschlichen Monozyten ruft *Chlamydia pneumoniae* durch die Induktion von Prostaglandin E eine vermehrte Produktion von MMP-1 und -9 hervor. Dieser Mechanismus könnte bei der Ruptur atherosklerotischer Plaques eine Rolle spielen [161]. *Fusobacterium nucleatum*, ein Erreger, der vor allem bei periodontalen Erkrankungen, aber auch bei anderen Infektionen wie Endokarditis, bakterieller Arthritis sowie Tonsillen- und Leberabszessen eine Rolle spielt, bewirkt eine Erhöhung des MMP-13-Spiegels [162]. Eine Infektion mit *Helicobacter pylori* hat einen Anstieg der Spiegel von MMP-2 und MMP-9 in der Mukosa des Magenantrums zur Folge. Die Spiegel der MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 bleiben konstant. Es wird vermutet, dass die erhöhte MMP-Aktivität einen wesentlichen Faktor der Gewebeschädigung während einer *Helicobacter pylori*-

assoziierten Gastritis darstellt [163]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine *Helicobacter pylori*-Eradikation die MMP-9-Spiegel signifikant senkt [164]. Aktuelle Untersuchungen legen einen möglichen Zusammenhang zwischen systemisch erhöhten MMP-Spiegeln und extraintestinaler Manifestation, beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen, bei *Helicobacter pylori*-Infektionen nahe [165]. Bei pulmonalen Infektionen mit *Francisella tularensis* haben erhöhte MMP-9-Spiegel einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf und die Schwere der Erkrankung [166]. Die komplexen Wirkungen von MMPs bei Erkrankungen des Zahnhalteapparates sind ausführlich untersucht worden. Für *Prevotella intermedia*, ein Erreger, der hierbei eine wichtige Rolle spielt, wurde eine Induktion verschiedener MMPs gezeigt [167, 168]. Bei einer durch *Candida albicans* experimentell ausgelösten Keratitis konnten erhöhte Spiegel für MMP-8, MMP-9, MMP-13 sowie für TIMP-1 beobachtet werden [169]. Aufgrund ihrer Bedeutung bei Infektionen und septischen Krankheitsbildern könnten die MMPs Ziel neuer antimikrobieller Medikamente sein [170].

Die CCMP bewirkt einen Abbau von Aktin, das als Strukturprotein Bestandteil des Zytoskeletts aller eukaryontischen Zellen ist. Auch hochwirksame Clostridientoxine führen zu einem Aktinabbau [17].

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen fand sich für die CCMP eine intensive kollagenolytische Aktivität *in vitro* bei Reaktion mit Kollagen Typ I. Durch die Lokalisation einer Protease mit kollagenolytischer Aktivität an der Außenseite von *B. cereus* hat der Mikroorganismus die Möglichkeit, kollagenhaltige Oberflächen des Wirtsorganismus zu durchdringen und damit seine Ausbreitung zu fördern. Diese Ergebnisse können in Zusammenhang mit der gefundenen Aktivität gegenüber dem MMP-2-Substrat gesehen werden. Ein direkter Kollagenabbau führt zum Abbau der extrazellulären Matrix. Auch die Störung der Zellkontakte bei der Wundheilung und die Induktion von MMPs in menschlichen Epithelzellen durch eine Phospholipase C von *B. cereus* wirken gleichsinnig in Richtung eines verstärkten Abbaus von Proteinen der ECM [171]. Diese Vorgänge könnten eine Rolle bei der Störung von Wundheilungsprozessen und bei der Invasivität der Bakterien spielen. Invasivität ist eine Eigenschaft von Mikroorganismen, die auf verschiedenen Mechanismen beruht. Hierzu gehört der Abbau von Proteinen der ECM, wodurch eine Ausbreitung der Bakterien ermöglicht wird. Immer wieder werden schwere systemische Infektionen mit *B. cereus* beschrieben. Die hier vorliegenden Ergebnisse könnten ein Ausgangspunkt sein für weitere Untersuchungen der Mechanismen von Invasion und systemischer Ausbreitung von *B. cereus*.

5 Zusammenfassung

Proteasen sind für die Funktion eines jeden lebenden Organismus essentiell. Sie sind wichtig für den Abbau von Proteinen sowie die Einstellung der Proteinkonzentration und Proteinaktivität im Stoffwechsel, bei der Zelldifferenzierung, bei Wachstumsprozessen und beim Zelltod. Sie sind Bestandteile von Regulations- und Abwehrsystemen, z.B. Komplementsystem, Blutgerinnung, Hormonsystem. In Bakterienzellen kommen ebenso wie bei Eukaryonten intra- und extrazelluläre Proteasen sowie Membranproteasen vor. Aufgrund ihres Eingreifens in verschiedene Funktionssysteme des Wirtsorganismus spielen Bakterienproteasen eine wesentliche Rolle bei Mechanismen zur Auslösung bakteriell bedingter Erkrankungen. Sie entfalten ihre Wirkung direkt durch Gewebeabbau und indirekt durch einen Einfluss auf das Blutgerinnungssystem, das fibrinolytische System, das Bradykininsystem, das Immunsystem, das Komplementsystem und Proteaseinhibitorsysteme.

Pseudomonas aeruginosa und *Bacillus cereus* sind Bakterienarten, die als humanpathogene Mikroorganismen in der Medizin Bedeutung haben. Der gramnegative Erreger *P. aeruginosa* verursacht bei immungeschwächten und hospitalisierten Patienten schwere Infektionen mit hoher Letalität. Das grampositive Bakterium *B. cereus* ruft durch Toxinwirkung Lebensmittelinfektionen mit Erbrechen und Durchfall hervor. Auch schwere systemische Infektionen mit *B. cereus* treten auf.

Die insulinspaltende Membranprotease (ICMP) von *P. aeruginosa* ist eine an der Außenseite der Zellmembran gebundene zinkhaltige Metalloprotease. Sie wurde nach einer Standardmethode in mehreren Stufen gereinigt. Mit dem gereinigten Enzym wurden Versuche zur Substrat- und Spaltspezifität durchgeführt. Die Insulin B-Kette wird von der ICMP mit hoher Aktivität gespalten. Es fanden sich zwei primäre (Glu¹³ -↓- Ala¹⁴, Tyr¹⁶ -↓- Leu¹⁷) und zwei sekundäre Spaltstellen (His¹⁰ -↓- Leu¹¹, Phe²⁵ -↓- Tyr²⁶). Die ICMP bevorzugt hydrophobe Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten in der P1'-Position und große, zum Teil aromatische oder ionisierte Aminosäuren in der P1-Position. Es fand sich eine hohe Übereinstimmung der Spaltstellen der Insulin B-Kette mit anderen insulinspaltenden Enzymen (Insulysin von Eukaryonten und Pitrilysin von *Escherichia coli*).

Die ICMP zeigte fluorogenen Substraten gegenüber eine höhere Aktivität als bei Versuchen mit pNA-Substraten. Von den getesteten Substraten wurde das Thrombinsubstrat Bz-Phe-Val-Arg-AMC unter Zugabe von Aminopeptidase M mit der höchsten Aktivität gespalten. Ebenfalls mit hoher Aktivität wurden das Substrat des TNF- α -converting enzyme (TACE) und das Faktor Xa bzw. Plasminogenaktivatorssubstrat Boc-Val-Gly-Arg-AMC ohne Aminopeptidase M gespalten. Bei Versuchen mit Proteinen zeigte sich proteolytische Aktivität gegenüber Aktin, Casein, Globin, Lactoferrin und Fibrinogen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein Eingreifen der ICMP in Aufbau und Funktion des Wirtsorganismus anzunehmen. Von besonderem Interesse sind die Einflüsse auf das Gerinnungssystem und das fibrinolytische System. Hierdurch könnte es zu einer Verschiebung in Richtung der Fibrinolyse kommen, die im Zusammenhang mit einer Aktivierung von Gerinnungsfaktoren durch andere *Pseudomonas*-Proteasen zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie führen könnte. Ein Vergleich mit anderen *Pseudomonas*-Proteasen hinsichtlich Substrat- und

Spaltspezifität sowie weiterer enzymatischer Eigenschaften zeigt, dass die ICMP ein von diesen Proteasen deutlich verschiedenes Enzym ist.

Die caseinspaltende Membranprotease (CCMP) von *B. cereus* ist eine membrangebundene Metalloprotease, die an der Außenseite der Bakterienzelle (Surface-Protease) lokalisiert ist. Das Enzym wurde nach der Standardmethode gereinigt. Mit der gereinigten Protease wurden Versuche zur Substrat- und Spaltspezifität durchgeführt. Unter Einwirkung der CCMP auf die Insulin A- und B-Kette und massenspektrometrische Analyse der Bruchstücke fanden sich folgende Spaltstellen: Ala⁸-↓-Ser⁹, Tyr¹⁴-↓-Gln¹⁵, Gln¹⁵-↓-Leu¹⁶, Tyr¹⁹-↓-Cys²⁰ (Insulin A-Kette) und Leu¹¹-↓-Val¹², Glu¹³-↓-Ala¹⁴, Tyr¹⁶-↓-Leu¹⁷, Leu¹⁷-↓-Val¹⁸, Tyr²⁶-↓-Thr²⁷ (Insulin B-Kette). Diese Ergebnisse zeigen, dass die CCMP bevorzugt Peptidbindungen zwischen zwei aliphatischen Aminosäuren, zwischen zwei Aminosäuren mit einer hydrophilen Seitenkette oder Peptidbindungen zwischen je einer Aminosäure dieser beiden Gruppen spaltet. Im Vergleich zu anderen wichtigen *Bacillus*-Proteasen erscheint die CCMP als ein sehr viel spezifischeres Enzym. pNA-Substrate werden von der CCMP nicht abgebaut. Hohe Aktivitäten fanden sich gegenüber den intern gequenchten fluorogenen Substraten von MMP-2, MMP-2/7 und TACE sowie dem Furin- und Kex2 Endoprotease-Substrat Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC mit Aminopeptidase M. Enzymkinetische Messungen ergaben niedrige K_m -Werte für die Substrate von MMP-2, MMP-2/7 und TACE. Die CCMP spaltet eine Vielzahl physiologisch bedeutender Proteine. Dazu gehören Aktin, α_2 -Antiplasmin, α_1 -Antitrypsin, Globin, humanes Serumalbumin, Kollagen Typ I, Lactoferrin, Fibrinogen und Fibrin. Mit Plasminogen und Antithrombin III bildet die CCMP in der SDS-PAGE sichtbare Komplexe. Es konnte eine Inaktivierung von AT III durch die CCMP gezeigt werden. Aufgrund der Aktivität gegenüber zahlreichen Proteinen ist ein Eingreifen der CCMP in das Gerinnungssystem, das fibrinolytische System sowie in Proteaseinhibitorsysteme möglich. Fibrinolytische Aktivität könnte für die Invasion und Ausbreitung von *B. cereus* von Bedeutung sein. Außerdem scheint die untersuchte Protease aufgrund von intensiver kollagenolytischer Aktivität sowie aufgrund ihrer hohen Spezifität gegenüber Substraten von Matrixmetalloproteasen an Abbauvorgängen der ECM beteiligt zu sein. Eine Spaltung von Aktin könnte eine Destruktion des Zytoskeletts von Zellen zur Folge haben. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass die CCMP an der Pathogenese von Infektionen durch *B. cereus* beteiligt sein kann.

Eine genaue Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen der ICMP bzw. CCMP und einzelner Funktionssysteme des Wirtsorganismus könnte Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

Auf der Basis der Ergebnisse dieser Arbeit zur Substratspezifität konnte eine weitere Abgrenzung der ICMP bzw. CCMP gegenüber bekannten Proteasen von *P. aeruginosa* bzw. *B. cereus* vorgenommen werden und die molekularbiologische Charakterisierung mit der Identifikation der Gene für diese beiden Proteasen erfolgen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Bond SJ, Butler PE (1987) Intracellular proteases. *Ann Rev Biochem* 56:333-364.
- [2] Barrett AJ (ed), Rawlings ND (ed), Woessner JF (ed): *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2nd ed. Academic Press, London, 2004.
- [3] Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 36:D320-D325. URL: <http://merops.sanger.ac.uk/>
- [4] Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27:157-162.
- [5] Perona JJ, Craik CS (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci* 4:337-360.
- [6] van Wely KHM, Swaving J, Freudl R, Driessen AJM (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25:437-454.
- [7] Thanassi DG, Hultgren SJ (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 12:420-430.
- [8] Akiyama Y, Ito K (1990) SecY protein, a membrane-embedded secretion factor of *E. coli*, is cleaved by the ompT protease in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 167:711-715.
- [9] Murphy MP, Hickman LJ, Eckman CB, Uljon SN, Wang R, Golde TE (1999) Gamma-secretase, evidence for multiple proteolytic activities and influence of membrane positioning of substrate on generation of amyloid beta peptides of varying length. *J Biol Chem* 274:11914-11923.
- [10] Parvathy S, Oppong SY, Karran EH, Buckle DR, Turner AJ, Hooper NM (1997) Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer. *Biochem J* 327:37-43.
- [11] Steglich G, Neupert W, Langer T (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol* 19:3435-3442.
- [12] Isenman L, Liebow C, Rothman S (1995) Transport of proteins across membranes - a paradigm in transition. *Biochim Biophys Acta* 1241:341-370.
- [13] Navarre WW, Schneewind O (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:174-229.
- [14] Sara M, Sleytr UB (2000) S-layer proteins. *J Bacteriol* 182:859-868.
- [15] White SH, Wimley WC (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:319-365.
- [16] Lantz MS (1997) Are bacterial proteases important virulence factors? *J Periodont Res* 32:126-132.
- [17] Popoff MR, Bouvet P (2009) Clostridial toxins. *Future Microbiol* 4:1021-1064.
- [18] Leytus SP, Bowles LK, Konisky J, Mangel WF (1981) Activation of plasminogen to plasmin by a protease associated with the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1485-1489.

- [19] Foxman B, Zhang L, Tallman P, Palin K, Rode C, Bloch C, Gillespie B, Marrs CF (1995) Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. *J Infect Dis* 172:1536-1541.
- [20] Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD (1992) A surface protease and the invasive character of plague. *Science* 258:1004-1007.
- [21] Yu GQ, Hong JS (1986) Identification and nucleotide sequence of the activator gene of the externally induced phosphoglycerate transport system of *Salmonella typhimurium*. *Gene* 45:51-57.
- [22] Yoshihara E, Gotoh N, Nishino T, Nakae T (1996) Protein D2 porin of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane bears the protease activity. *FEBS Lett* 394:179-182.
- [23] Cheng YS, Aronson AI (1977) Characterization and function of intracellular proteases in sporulating *Bacillus cereus*. *Arch Microbiol* 115:61-66.
- [24] Travis J, Potempa J, Maeda H (1995) Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol* 3:405-407.
- [25] Lemichez E, Lecuit M, Nassif X, Bourdoulous S (2010) Breaking the wall: targeting of the endothelium by pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8:93-104.
- [26] Kaminishi H, Hamatake H, Cho T, Tamaki T, Suenaga N, Fujii T, Hagihara Y, Maeda H (1994) Activation of blood clotting factors by microbial proteinases. *FEMS Microbiol Lett* 121:327-332.
- [27] Maeda H, Yamamoto T (1996) Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 377:217-226.
- [28] Maeda H (1996) Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol Immunol* 40:685-699.
- [29] Degen JL, Bugge TH, Goguen JD (2007) Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense. *J Thromb Haemost* 5 (Suppl. 1):24-31.
- [30] Lottenberg R, Minning-Wenz D, Boyle MDP (1994) Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol* 2:20-24.
- [31] Schultz DR, Miller KD (1974) Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect Immun* 10:128-135.
- [32] Sueishi K, Nanno S, Tanaka K (1981) Permeability enhancing and chemotactic activities of lower molecular weight degradation products of human fibrinogen. *Thromb Haemost* 45:90-94.
- [33] Salonen EM, Saksela O, Vartio T, Vaheri A, Nielse LS, Zeuthen J (1985) Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem* 260:12302-12307.
- [34] Salonen EM, Zitting A, Vaheri A (1984) Laminin interacts with plasminogen and its tissue-type activator. *FEBS Lett* 172:29-32.

- [35] He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI (1989) Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2632-2636.
- [36] Beaufort N, Wojciechowski P, Sommerhoff CP, Szmyd G, Dubin G, Eick S, Kellermann J, Schmitt M, Potempa J, Magdolen V (2008) The human fibrinolytic system is a target for the staphylococcal metalloprotease aureolysin. *Biochem J* 410:157-165.
- [37] Chung MC, Jorgensen SC, Popova TG, Tonry JH, Bailey CL, Popov SG (2009) Activation of plasminogen activator inhibitor implicates protease InhA in the acute-phase response to *Bacillus anthracis* infection. *J Med Microbiol* 58:737-744.
- [38] Molla A, Yamamoto T, Akaike T, Miyoshi S, Maeda H (1989) Activation of Hageman factor and prekallikrein and generation of kinin by various microbial proteinases. *J Biol Chem* 264:10589-10594.
- [39] Frick IM, Björck L, Herwald H (2007) The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. *Thromb Haemost* 98:497-502.
- [40] Jongerius I, Ram S, Rooijackers S (2009) Bacterial complement escape. *Adv Exp Med Biol* 666:32-48.
- [41] Laarman A, Milder F, van Strijp J, Rooijackers S (2010) Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Med elektronisch publiziert* URL: <http://springerlink.com/content/k213446551318403/fulltext.pdf>
- [42] Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, Hagihara Y (1995) Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 63:984-988.
- [43] Molla A, Akaike T, Maeda H (1989) Inactivation of various proteinase inhibitors and the complement system in human plasma by the 56-kilodalton proteinase from *Serratia marcescens*. *Infect Immun* 57:1868-1871.
- [44] Cheng YS, Zisper D (1979) Purification and characterization of protease III from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 254:4698-4706.
- [45] Heck LW, Alarcon PG, Kulhavy RM, Morihara K, Russell MW, Mestecky JF (1990) Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Immunol* 144:2253-2257.
- [46] Molla A, Matsumoto K, Oyamada I, Katsuki T, Maeda H (1986) Degradation of protease inhibitors, immunoglobulins, and other serum proteins by *Serratia* protease and its toxicity to fibroblasts in culture. *Infect Immun* 53:522-529.
- [47] Morihara K, Tsuzuki H, Oda K (1979) Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor. *Infect Immun* 24:188-193.
- [48] Potempa J, Watorek W, Travis J (1986) The inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor by proteinases from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 261:14330-14334.

- [49] Miyoshi S, Narukawa H, Tomochika K, Shinoda S (1995) Actions of *Vibrio vulnificus* metalloprotease on human plasma proteinase-proteinase inhibitor systems: a comparative study of native protease with its derivate modified by polyethylene glycol. *Microbiol Immunol* 39:959-966.
- [50] Grenier D (1996) Degradation of host protease inhibitors and activation of plasminogen by proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Microbiology* 142:955-961.
- [51] Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MK (2005) Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* 174:60-607.
- [52] Usher LR, Lawson RA, Geary I, Taylor CJ, Bingle CD, Taylor GW, Whyte MK (2002) Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 168:1861-1868.
- [53] Schalk IJ, Hennard C, Dugave C, Poole K, Abdallah MA, Pattus F (2001) Iron-free pyoverdinin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol Microbiol* 39:351-360.
- [54] de Maagd RA, Lugtenberg BJ (1987) Outer membranes of gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans* 15:54-62.
- [55] Nikaido H, Nakae T (1979) The outer membrane of gram-negative bacteria. *Adv Microb Physiol* 20:163-250.
- [56] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK-S, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saller MH, Hancock REW, Lory S, Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-964.
- [57] Döring G, Obernesser HJ, Botzenhart K, Flehmig B, Hiby N, Hofmann A (1983) Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 147:744-750.
- [58] Weiner DJ (2002) Respiratory tract infections in cystic fibrosis. *Pediatr Ann* 31:116-123.
- [59] Malloy JL, Veldhuizen RA, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR (2005) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:409-418.
- [60] Garau J, Gomez L (2003) *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 16:135-143.
- [61] Hobden JA (2002) *Pseudomonas* proteases and corneal virulence. *DNA Cell Biol* 21:391-396.
- [62] Okamoto T, Akaike T, Suga M, Tanase S, Horie H, Miyajima S, Ando M, Ichinose Y, Maeda H (1997) Activation of human matrix metalloproteases by various bacterial proteinases. *J Biol Chem* 272:6059-6066.

- [63] Twining SS, Kirschner SE, Mahnke LA, Frank DW (1993) Effects of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:2699-2712.
- [64] Meynard JL, Barbut F, Guiguet M, Batisse D, Lalande V, Lasage D, Guiard-Schmid JB, Petit JC, Frottier J, Meyohas MC (1999) *Pseudomonas aeruginosa* infection in human immunodeficiency virus infected patients. *J Infect* 38:176-181.
- [65] Franzetti F, Cernuschi M, Esposito R, Moroni M (1992) *Pseudomonas* infections in patients with AIDS and AIDS-related complex. *J Intern Med* 231:437-443.
- [66] Balloy V, Verma A, Kuravi S, Si-Tahar M, Chignard M, Ramphal R (2007) The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 196:289-296.
- [67] Hassett DJ, Sutton MD, Schurr MJ, Herr AB, Caldwell CC, Matu JO (2009) *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends Microbiol* 17:130-138.
- [68] Kobayashi H, Kobayashi O, Kawai S (2009) Pathogenesis and clinical manifestations of chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* and its biofilms in the airway tract. *J Infect Chemother* 15:125-142.
- [69] Ramsey DM, Wozniak DJ (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* 56:309-322.
- [70] Lazdunski A, Guzzo J, Filloux A, Bally M, Murgier M (1990) Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 72:147-156.
- [71] Döring G, Maier M, Müller E, Bibi Z, Tümmler B, Kharazmi A (1987) Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 39:136-148.
- [72] Morihara K (1957) Studies on the protease of *Pseudomonas*. II. Crystallization of the protease and its physicochemical and general properties. *Bull Agric Chem* 21:11-17.
- [73] Okuda K, Morihara K, Atsumi Y, Takeuchi H, Kawamoto S, Kawasaki H, Suzuki K, Fukushima J (1990) Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455. *Infect Immun* 58:4083-4088.
- [74] Maeda H, Morihara K (1995) Serralysin and related bacterial proteinases. *Methods Enzymol* 248:395-413.
- [75] Morihara K, Homma JY: *Pseudomonas* proteases. In: Holder, IA (ed): *Bacterial enzymes and virulence*. CRC Press, Boca Raton, 1985, pp 41-79.
- [76] Morihara K, Tsuzuki H, Oka T, Inoue H, Ebata M (1965) *Pseudomonas aeruginosa* elastase - isolation, crystallization, and preliminary characterization. *J Biol Chem* 240:3295-3304.
- [77] Bever RA, Iglewski BH (1988) Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *J Bacteriol* 170:4309-4314.

- [78] Morihara K (1995) Pseudolysin and other pathogen endopeptidases of Thermolysin family. *Methods Enzymol* 248:242-253.
- [79] Heck LW, Morihara K, Abrahamson DR (1986) Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease. *Infect Immun* 54:149-153.
- [80] Heck LW, Morihara K, McRae WB, Miller EJ (1986) Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* 51:115-118.
- [81] Döring G, Obernesser HJ, Botzenhart K (1981) Extrazelluläre Toxine von *Pseudomonas aeruginosa*. II. Einwirkung zweier gereinigter Proteasen auf die menschlichen Immunglobuline IgG, IgA und sekretorisches IgA. *Zentralbl Bacteriol A* 249:89-98.
- [82] Matheson NR, Potempa J, Travis J (2006) Interaction of a novel form of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease (aeruginolysin) with interleukin-6 and interleukin-8. *Biol Chem* 387:911-915.
- [83] Lache M, Hearn WR, Zyskind JW, Tipper DJ, Strominger JL (1969) Specificity of a bacteriolytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 100:254-259.
- [84] Perestelo FR, Blanco MT, Gutierrez-Navarro AM, Falcón MA (1985) Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by a staphylolytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios Lett* 30:85-94.
- [85] Preston MJ, Seed PC, Toder DS, Iglewski BH, Ohman DE, Gustin JK, Goldberg JB, Pier GB (1997) Contribution of proteases and LasR to virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun* 65:3086-3090.
- [86] Kessler E, Safrin M, Abrams WR, Rosenbloom J, Ohman DE (1997) Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J Biol Chem* 272:9884-9889.
- [87] Peters JE, Galloway DR (1990) Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J Bacteriol* 172:2236-2240.
- [88] 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* 273:16792-16797.
- [89] Engel LS, Hill JM, Moreau JM (1998) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:662-665.
- [90] Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M (1994) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* 121:31-34.
- [91] Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M (1995) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* 129:17-20.
- [92] Akesson A, Hedstrom SA, Ripa T (1991) *Bacillus cereus*: a significant pathogen in postoperative and post-traumatic wounds on orthopaedic wards. *Scand J Infect Dis* 23:71-77.

- [93] David DB, Kirkby GR, Noble BA (1994) *Bacillus cereus* endophthalmitis. Br J Ophthalmol 78:577-580.
- [94] Steen MK, Bruno-Murtha LA, Chaux G, Lazar H, Bernard S, Sulis C (1992) *Bacillus cereus* endocarditis: report of a case and review. Clin Infect Dis 14:945-946.
- [95] Barrie D, Wilson JA, Hoffman PN, Kramer JM (1992) *Bacillus cereus* meningitis in two neurosurgical patients: an investigation into the source of the organism. J Infect 25:291-297.
- [96] Berner R, Heinen F, Pelz K, van Velthoven V, Sauer M, Korinthenberg R (1997) Ventricular shunt infection and meningitis due to *Bacillus cereus*. Neuropediatrics 28:333-334.
- [97] Marley EF, Saini NK, Venkatraman C, Orenstein JM (1995) Fatal *Bacillus cereus* meningoencephalitis in an adult with acute myelogenous leukemia. South Med J 88:969-972.
- [98] Drobniewski FA (1993) *Bacillus cereus* and related species. Clin Microb Rev 6:324-338.
- [99] Strauss R, Mueller A, Wehler M, Neureiter D, Fischer E, Gramatzki M, Hahn EG (2001) Pseudomembranous tracheobronchitis due to *Bacillus cereus*. Clin Infect Dis 33:E39-41.
- [100] Gaur AH, Patrick CC, McCullers JA, Flynn PM, Pearson TA, Razzouk BI, Thompson SJ, Shenep JL (2001) *Bacillus cereus* bacteremia and meningitis in immunocompromised children. Clin Infect Dis 32:1456-1462.
- [101] Matsumoto S, Suenaga H, Naito K, Sawazaki M, Hiramatsu T, Agata N (2000) Management of suspected nosocomial infection: an audit of 19 hospitalized patients with septicemia caused by *Bacillus* species. Jpn J Infect Dis 53:196-202.
- [102] Orrett FA (2000) Fatal *Bacillus cereus* bacteremia in a patient with diabetes. J Natl Med Assoc 92:206-208.
- [103] Feder J, Keay L, Garrett LR, Cirulis N, Moseley A, Wildi BS (1971) *Bacillus cereus* neutral protease. Biochim Biophys Acta 251:74-78.
- [104] Ottensen M, Svenson I (1970) The subtilisins. Methods Enzymol 19:199-215.
- [105] Sousa F, Jus S, Erbel A, Kokol V, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM (2007) A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. Enzyme Microb Technol 40:1772-1781.
- [106] Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, Bhattacharyya A, Reznik G, Mikhailova N, Lapidus A, Chu L, Mazur M, Goltsman E, Larsen N, D'Souza M, Walunas T, Grechkin Y, Pusch G, Haselkorn R, Fonstein M, Ehrlich SD, Overbeek R, Kyrpides N (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. Nature 423:87-91.
- [107] Fricke B, Parchmann O, Kruse K, Rücknagel P, Schierhorn A, Menge S (1999) Characterization and purification of an outer membrane metalloproteinase from *Pseudomonas aeruginosa* with fibrinogenolytic activity. Biochim Biophys Acta 1454:236-250.

- [108] Fricke B, Drößler K, Willhardt I, Schierhorn A, Menge S, Rücknagel P (2001) The cell envelope-bound metalloprotease (camelysin) from *Bacillus cereus* is a possible pathogenic factor. *Biochim Biophys Acta* 1537:132-146.
- [109] Buchmann T (1996) Charakterisierung einer Membranprotease von *Bacillus cereus*. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Dissertation.
- [110] Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS (1963) The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89:114-123.
- [111] Parchmann O (1996) Partielle Reinigung und Charakterisierung einer Insulin-spaltenden Membranprotease von *Pseudomonas aeruginosa*. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Dissertation.
- [112] Langner J, Wakil A, Zimmermann M, Ansorge S, Bohley P, Kirschke H, Wiederanders B (1973) Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme mit Azokasein als Substrat. *Acta Biol Med Germ* 31:1-18.
- [113] Miles EW (1977) Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. *Methods Enzymol* 47:431-442.
- [114] Knight CG, Willenbrock F, Murphy G (1992) A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assay of the matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* 296:263-266.
- [115] Bisswanger H: *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*. 3. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim, 2000, S. 68-70.
- [116] Loewy AG, Santer UV, Wiczorek M, Blodgett JK, Jones SW, Cheronis JC (1993) Purification and characterization of a novel zinc-proteinase from cultures of *Aeromonas hydrophila*. *J Biol Chem* 268:9071-9078.
- [117] Chrambach A (1985) Unified view of moving boundary electrophoresis: practical implications. *J Chromatogr A* 320:1-14.
- [118] Davis BJ (1964) Disc-Electrophoresis-2: Methods and applications to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sciences* 121:404-427.
- [119] Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28:815-820.
- [120] Weber K, Pringle JR, Osborn M (1972) Measurement of molecular weight by electrophoresis on SDS-acrylamid gel. *Methods Enzymol* 26:3-27.
- [121] Fernández-Gamba A, Leal MC, Morelli L, Castaño EM (2009) Insulin-degrading enzyme: structure-function relationship and its possible roles in health and disease. *Curr Pharm Des* 15:3644-3655.
- [122] Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsey L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4162-4167.

- [123] Hoyer S (2002) The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. *J Neural Transm* 109:341-360.
- [124] de Tullio MB, Morelli L, Castaño EM (2008) The irreversible binding of amyloid peptide substrates to insulin-degrading enzyme: a biological perspective. *Prion* 2:51-56.
- [125] Affholter JA, Fried VA, Roth RA (1988) Human insulin-degrading enzyme shares structural and functional homologies with *E. coli* Protease III. *Science* 242:1415-1418.
- [126] Swamy KH, Goldberg AL (1982) Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 149:1027-1033.
- [127] Kirschner RJ, Goldberg AL (1983) A high molecularweight metalloendoprotease from the cytosol of mammalian cells. *J Biol Chem* 258:967-976.
- [128] Ding L, Becker AB, Suzuki A, Roth RA (1992) Comparison of the enzymatic and biochemical properties of human insulin-degrading enzyme and *Escherichia coli* protease III. *J Biol Chem* 267:2414-2420.
- [129] Affholter JA, Cascieri MA, Bayne ML, Brange J, Casaretto M, Roth RA (1990) Identification of residues in the insulin molecule important for binding to insulin-degrading enzyme. *Biochemistry* 29:7727-7733.
- [130] Kirschner RJ, Goldberg AL (1981) Nonlysosomal insulin-degrading proteinases in mammalian cells. *Methods Enzymol* 80:702-711.
- [131] Anastasi A, Knight CG, Barrett AJ (1993) Characterization of the bacterial metalloendopeptidase pitrilysin by use of a continuous fluorescence assay. *Biochem J* 290:601-607.
- [132] Elliott BW, Cohen C (1986) Isolation and characterization of a lysine-specific protease from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 261:11259-11265.
- [133] Leopold I, Fricke B (1997) Inhibition, reactivation, and determination of metal ions in membrane metalloproteases of bacterial origin using high-performance liquid chromatography coupled on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Biochem* 252:277-285.
- [134] Morihara K, Tsuzuki H (1966) Proteolytic substrate specificity and some elastolytic properties of a thermostable bacterial proteinase. *Biochim Biophys Acta* 118:215-218.
- [135] Kessler E, Safrin M (1994) The propeptide of *Pseudomonas aeruginosa* elastase acts as an elastase inhibitor. *J Biol Chem* 269:22726-22731.
- [136] Kessler E, Safrin M, Gustin JK, Ohman DE (1998) Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides. *J Biol Chem* 273:30225-30231.
- [137] Guzzo J, Pages JM, Duong F, Lazdunski A, Murgier M (1991) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* 173:5290-5297.
- [138] Rawlings ND, Barrett AJ (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol* 248:183-228.

- [139] Bejarano PA, Langeveld JPM, Hudson BG, Noelken ME (1989) Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* 57:3783-3787.
- [140] Morihara K, Oka T (1970) Subtilisin BNP': inactivation by chloromethyl ketone derivatives of peptide substrates. *Arch Biochem Biophys* 138:526-531.
- [141] Grass G, Schierhorn A, Sorkau E, Müller H, Rücknagel P, Nies DH, Fricke B (2004) Camelysin is a novel surface metalloproteinase from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 72:219-228.
- [142] Gron H, Meldal M, Breddam K (1992) Extensive comparison of the substrate preferences of two subtilisins as determined with peptide substrates which are based on the principle of intramolecular quenching. *Biochemistry* 31:6011-6018.
- [143] Morihara K (1974) Comparative specificity of microbial proteinases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41:179-243.
- [144] Kubo M, Imanaka T (1988) Cloning and nucleotide sequence of the highly thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J Gen Microbiol* 134:1883-1892.
- [145] Power SD, Adams RM, Wells JA (1986) Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:3096-3100.
- [146] Bai C, Vick BA, Yi SX (2002) Characterization of a new *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Cochylis hospes*. *Curr Microbiol* 44:280-285.
- [147] Nisnevitch M, Cohen S, Ben-Dov E, Zaritsky A, Sofer Y, Cahan R (2006) Cyt2Ba of *Bacillus thuringiensis israelensis*: activation by putative endogenous protease. *Biochem Biophys Res Commun* 344:99-105.
- [148] Nisnevitch M, Sigawi S, Cahan R, Nitzan Y (2010) Isolation, characterization and biological role of Camelysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Curr Microbiol elektronisch publiziert* URL:
<http://www.springerlink.com/content/d8587336w8741539/fulltext.html>
- [149] Holton J (2008) Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Curr Infect Dis Rep* 10:99-104.
- [150] Obiso RJ, Azghani AO, Wilkins TD (1997) The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells. *Infect Immun* 65:1431-1439.
- [151] Moncrief JS, Obiso R, Barroso LA, Kling JJ, Wright RL, Van Tassell RL, Lyerly DM, Wilkins TD (1995) The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. *Infect Immun* 63:175-181.
- [152] Stie J, Bruni G, Fox D (2009) Surface-associated plasminogen binding of *Cryptococcus neoformans* promotes extracellular matrix invasion. *PLoS One* 4:e5780.
- [153] Kwon JY, Chang AK, Park JE, Shin SY, Yoon SM, Lee JS (2007) *Vibrio* extracellular protease with prothrombin activation and fibrinolytic activities. *Int J Mol Med* 19:157-163.
- [154] Travis J, Salvesen GS (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Ann Rev Biochem* 52:655-709.
- [155] Nagase H, Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494.

- [156] Medina C, Santana A, Llopis M, Paz-Cabrera MC, Antolin M, Mourelle M, Guarner F, Vilaseca J, Gonzalez C, Salas A, Quintero E, Malagelada JR (2005) Induction of colonic transmural inflammation by *Bacteroides fragilis*: implication of matrix metalloproteinases. *Inflamm Bowel Dis* 11:99-105.
- [157] Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, Thogersen IB, Enghild JJ, Nguyen KA, Potempa J (2010) A novel matrix metalloprotease-like enzyme (karilysin) of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem* 391:105-117.
- [158] Wang JE, Pettersen S, Stuestol JF, Wang YY, Foster SJ, Thiemermann C, Aasen AO, Bjornland K (2004) Peptidoglycan of *S. aureus* causes increased levels of matrix metalloproteinases in the rat. *Shock* 22:376-379.
- [159] Kanangat S, Postlethwaite A, Hasty K, Kang A, Smeltzer M, Appling W, Schaberg D (2006) Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by *Staphylococcus aureus*: implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections. *Arthritis Res Ther* 8:R176.
- [160] Tamura F, Nakagawa R, Akuta T, Okamoto S, Hamada S, Maeda H, Kawabata S, Akaike T (2004) Proapoptotic effect of proteolytic activation of matrix metalloproteinases by *Streptococcus pyogenes* thiol proteinase (*Streptococcus pyogenes* exotoxin B). *Infect Immun* 72:4836-4847.
- [161] Kim MP, Gaydos CA, Wood BJ, Hardick JP, Zhang Y, Wahl LM (2005) *Chlamydia pneumoniae* enhances cytokine-stimulated human monocyte matrix metalloproteinases through a prostaglandin E2-dependent mechanism. *Infect Immun* 73:632-634.
- [162] Uitto VJ, Baillie D, Wu Q, Gendron R, Grenier D, Putnins EE, Kanervo A, Firth JD (2005) *Fusobacterium nucleatum* increases collagenase 3 production and migration of epithelial cells. *Infect Immun* 73:1171-1179.
- [163] Bergin PJ, Anders E, Sicheng W, Erik J, Jennie A, Hans L, Pierre M, Qiang P, Marianne QJ (2004) Increased production of matrix metalloproteinases in *Helicobacter pylori*-associated human gastritis. *Helicobacter* 9:201-210.
- [164] Danese S, Papa A, Gasbarrini A, Ricci R, Maggiano N (2004) *Helicobacter pylori* eradication down-regulates matrix metalloproteinase-9 expression in chronic gastritis and gastric ulcer. *Gastroenterology* 126:369-371.
- [165] Rautelin HI, Oksanen AM, Veijola LI, Sipponen PI, Tervahartiala TI, Sorsa TA, Lauhio A (2009) Enhanced systemic matrix metalloproteinase response in *Helicobacter pylori* gastritis. *Ann Med* 41:208-215.
- [166] Malik M, Bakshi CS, McCabe K, Catlett SV, Shah A, Singh R, Jackson PL, Gaggar A, Metzger DW, Melendez JA, Blalock JE, Sellati TJ (2007) Matrix metalloproteinase 9 activity enhances host susceptibility to pulmonary infection with type A and B strains of *Francisella tularensis*. *J Immunol* 178:1013-1020.

- [167] Guan SM, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ (2009) *Prevotella intermedia* upregulates MMP-1 and MMP-8 expression in human periodontal ligament cells. FEMS Microbiol Lett 299:214-222.
- [168] Guan SM, Shu L, Fu SM, Liu B, Xu XL, Wu JZ (2008) *Prevotella intermedia* induces a matrix metalloproteinase-9 expression in human periodontal ligament cells. FEMS Microbiol Lett 83:47-53.
- [169] Yuan X, Mitchell BM, Wilhelmus KR (2009) Expression of matrix metalloproteinases during experimental *Candida albicans* keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:737-742.
- [170] Vanlaere I, Libert C (2009) Matrix metalloproteinases as drug targets in infections caused by gram-negative bacteria and in septic shock. Clin Microb Rev 22:224-239.
- [171] Firth JD, Putnins EE, Larjava H, Uitto VJ (2001) Exogenous phospholipase C stimulates epithelial cell migration and integrin expression in vitro. Wound Repair Regen 9:86-94.

7 THESEN

1. Bakterielle Proteasen spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von Mikroorganismen. Sie schädigen den Wirtsorganismus direkt durch den Abbau von Proteinen des Binde- und Stützgewebes sowie indirekt durch das Eingreifen in verschiedene Funktionssysteme, z.B. Blutgerinnungssystem, Immunsystem, Kallikreinsystem und Proteaseinhibitorsysteme.
2. *Pseudomonas aeruginosa* ist ein gramnegatives aerobes Stäbchenbakterium, welches hochwirksame Toxine und zahlreiche Virulenzfaktoren, darunter extrazelluläre Proteasen, produziert, die die Entstehung schwerer systemischer Infektionen mit hoher Letalität vor allem bei abwehrgeschwächten Personen begünstigen.
3. Die insulinspaltende Membranprotease (ICMP) von *Pseudomonas aeruginosa* ist eine zinkhaltige Metalloprotease mit einem Molekulargewicht von 44,6 kDa, die an der äußeren Zellmembran lokalisiert ist.
4. Beim Abbau der Insulin B-Kette durch die ICMP fanden sich folgende Spaltstellen: Glu¹³ -↓- Ala¹⁴, Tyr¹⁶ -↓- Leu¹⁷ als primäre Spaltstellen und His¹⁰ -↓- Leu¹¹, Phe²⁵ -↓- Tyr²⁶ als sekundäre Spaltstellen. In der P₁-Position befinden sich große Aminosäuren mit aromatischen (Tyr, His, Phe) oder sauren Seitenketten (Glu). In der P₁'-Position bevorzugt die ICMP hydrophobe Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten, mit Ausnahme des Tyrosin in der P₁'-Position in einer der sekundären Spaltstellen.
5. Bei der Spaltung synthetischer Proteasesubstrate zeigt die ICMP ein ähnliches Spektrum wie Proteasen des Gerinnungssystems. Die *Pseudomonas*-Protease spaltet p-Nitroanilidsubstrate von Thrombin, Faktor Xa, Plasmin und Plasminogenaktivator. Bei den getesteten fluorogenen Substraten wird das Thrombinsubstrat Bz-Phe-Val-Arg-AMC unter Zugabe von Aminopeptidase M mit der höchsten Aktivität gespalten. Mögliche Spaltstellen sind Phe -↓- Val oder Val -↓- Arg.
6. Gegenüber Aktin, Casein, Globin und Lactoferrin besitzt die ICMP proteolytische Aktivität, die sich in der SDS-PAGE nachweisen lässt.
7. Nach Reaktion der ICMP mit Fibrinogen war unter nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE eine neue Bande bei hoher Molmasse sichtbar. Unter reduzierenden Bedingungen fand sich nach zwei Stunden Inkubationszeit ein Abbau der α - und β -Ketten von Fibrinogen durch die ICMP.
8. Die ICMP ist aufgrund ihrer fibrinogenolytischen Eigenschaft in der Lage, in Interaktion mit dem Blutgerinnungssystem des Wirtsorganismus zu treten und könnte gerinnungshemmend wirken.
9. *Bacillus cereus* ist ein grampositives aerob oder fakultativ anaerob lebendes sporenbildendes Stäbchenbakterium. Im Rahmen von Lebensmittelvergiftungen kann *Bacillus cereus* beim Menschen Diarrhoen und Erbrechen hervorrufen. Auch schwere systemische Infektionen kommen vor.

10. Die caseinspaltende Membranprotease (CCMP) von *Bacillus cereus* ist eine neutrale Metalloprotease mit einem Molekulargewicht von 19kDa, die fest an die Zelloberfläche gebunden ist.
11. Die Insulin A-Kette wird von der CCMP zwischen Ala⁸-↓-Ser⁹, Tyr¹⁴-↓-Gln¹⁵, Gln¹⁵-↓-Leu¹⁶, Tyr¹⁹-↓-Cys²⁰ gespalten. Die Insulin B-Kette wird zwischen Leu¹¹-↓-Val¹², Glu¹³-↓-Ala¹⁴, Tyr¹⁶-↓-Leu¹⁷, Leu¹⁷-↓-Val¹⁸, Tyr²⁶-↓-Thr²⁷ gespalten. Die Protease bevorzugt Peptidbindungen zwischen zwei aliphatischen Aminosäuren oder zwischen zwei Aminosäuren mit einer hydrophilen Seitenkette (-OH, -SH, -CONH₂) oder Peptidbindungen zwischen je einer Aminosäure dieser beiden Gruppen.
12. Die CCMP spaltet verschiedene fluorogene Proteasesubstrate. Intramolekular gequenchte Substrate von Matrixmetalloproteasen und das Substrat des TNF- α -converting enzyme wurden mit der höchsten Aktivität gespalten. Hierbei entstand das Peptidspaltstück MCA-Pro-Leu.
13. Im Rahmen enzymkinetischer Untersuchungen fanden sich niedrige K_m-Werte für die Reaktion der CCMP mit dem MMP-2-Substrat MCA-Pro-Leu-Ala-Nva-Dpa-Ala-Arg-NH₂, dem MMP-2/7-Substrat MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ und dem TACE-Substrat MCA-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-Dap(Dnp)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂. Die CCMP besitzt eine hohe Affinität gegenüber diesen Substraten.
14. In der SDS-PAGE lässt sich für die CCMP proteolytische Aktivität gegen Aktin, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Antiplasmin, humanes Serumalbumin, Globin und Lactoferrin nachweisen.
15. Die CCMP besitzt kollagenolytische Aktivität und ist in der Lage, Kollagen Typ I, das hauptsächlich in Haut und Knochen vorkommt, abzubauen. Eine Aktivierung von Progelatinasen durch die CCMP wurde nicht gefunden.
16. Die CCMP ist eine Membranprotease mit fibrinogenolytischer und fibrinolytischer Aktivität.
17. Nach Reaktion der CCMP mit Antithrombin III ist in der SDS-PAGE eine Komplexbildung sichtbar. Die Aktivität von Antithrombin III sinkt unter dem Einfluss der CCMP deutlich ab.
18. Die CCMP bildet in der SDS-PAGE sichtbare Komplexe mit Plasminogen. Ein Einfluss auf die Plasminogenfunktion konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.
19. Diethylpyrocarbonat führt zu einer partiellen reversiblen Hemmung der Aktivität der CCMP. Unter Einwirkung von Hydroxylamin erreicht die CCMP wieder ihre vollständige Aktivität. Im aktiven Zentrum der CCMP befinden sich Histidin-Reste. Der mit Carboxylgruppen reagierende Inhibitor N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolon (EEDQ) hat keinen Einfluss auf die Aktivität der CCMP.
20. Aufgrund der nachgewiesenen proteolytischen Aktivität, der Substratspezifität und Interaktionen mit Antithrombin III und Plasminogen sind Wechselwirkungen der CCMP mit dem Blutgerinnungssystem, Proteaseinhibitorsystemen sowie der extrazellulären Matrix des Wirtsorganismus möglich. Die CCMP könnte einen wichtigen Pathogenitätsfaktor von *Bacillus cereus* darstellen.

LEBENS LAUF

Name: Katharina Drößler, geb. Kruse
Geburtsdatum: 29. Juni 1975
Geburtsort: Bleicherode
Wohnort: Denzenbergstraße 17, 72074 Tübingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: geschieden

Schulbildung:

1982 bis 1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule „Friedrich Schiller“, Bleicherode
1991 bis 1994 Besuch des Staatlichen Gymnasiums „Friedrich Schiller“, Bleicherode, Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium:

1994 bis 2000 Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
10/1996 Beginn der Arbeit an der Dissertation unter Betreuung von Frau Dr. Fricke im Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
10/2000 bis 11/2001 Studium der Medizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster
Praktisches Jahr im Klinikum Kreis Herford, Herford
Abschluss des Studiums mit dem 3. Staatsexamen

Berufstätigkeit:

12/2001 bis 06/2003 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses St. Josef Stift, Celle
Erlangung der Approbation als Ärztin
06/2003 bis 06/2003 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin des Krankenhauses St. Josef Stift, Celle, mit dem Schwerpunkt Diabetologie und Ernährungsmedizin
seit 07/2008 Assistenzärztin in der Tropenlinik Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen

Tübingen, im Februar 2010

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst und mich dabei keiner anderen Hilfsmittel als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Tübingen, im Februar 2010

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich weder diese noch eine andere Dissertation an einer in- oder ausländischen Fakultät zu Promotionszwecken eingereicht habe.

Tübingen, im Februar 2010

PUBLIKATIONEN

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Fricke B, Dröbber K, Willhardt I, Schierhorn A, Menge S, Rücknagel P (2001) The cell envelope-bound metalloprotease (camelysin) from *Bacillus cereus* is a possible pathogenic factor. *Biochim Biophys Acta* 1537:132-146.

Fricke B, Parchmann O, Kruse K, Rücknagel P, Schierhorn A, Menge S (1999) Characterization and purification of an outer membrane metalloproteinase from *Pseudomonas aeruginosa* with fibrinogenolytic activity. *Biochim Biophys Acta* 1454:236-250.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. habil. Gläßer und Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Hollemann möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Dissertation am Institut für Physiologische Chemie an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Fricke für die Überlassung des interessanten Themas und die Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema sowie für die über einen langen Zeitraum gewährte Unterstützung und die zahlreichen wertvollen fachlichen Hinweise und Ratschläge bei der Erstellung dieser Arbeit.

Für die großzügige fachliche und technische Unterstützung bei der Durchführung einzelner Versuche möchte ich mich ganz besonders bedanken bei Herrn Dr. Willhardt (Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), bei Frau Dr. Schierhorn und Herrn Dr. Rücknagel (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle), bei Frau Dr. Menge (Institut für Biochemie, Abteilung Pflanzenbiochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), die mein Dank leider nicht mehr erreicht, da sie 2006 verstorben ist, bei Frau Thielemann (damalige Mitarbeiterin des Instituts für Biochemie, Abteilung Pflanzenbiochemie, Halle) und bei Herrn Dr. Arkona (damaliger Mitarbeiter des Instituts für Biochemie I, Friedrich-Schiller-Universität Jena).

Frau Köhnlein und Frau Kretschmer gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Aufnahme im Labor und die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Sänger und Frau Zschau, für ihre Hilfsbereitschaft sowie die kollegiale Zusammenarbeit und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatten.

Und schließlich möchte ich mich herzlich bei meinen Freunden, insbesondere bei Dr. Elena Kruse, Barbara Ketterle und Hans Jürgen Doormann, meiner Familie und meinen Kolleginnen und Kollegen im St. Josef-Stift, Celle sowie in der Tropenlinik Paul-Lechler-Krankenhaus, Tübingen, insbesondere bei Dr. Tobias Stöckle und Dr. Hans Jakob, für alle Hilfe und Ermutigung in schwierigen Zeiten und für das Teilen von schönen und mühevollen Erfahrungen beim Schreiben dieser Arbeit bedanken.