

Die Peptidamidase aus *Stenotrophomonas maltophilia*

Molekulargenetische, biochemische, strukturelle und mechanistische
Charakterisierung sowie biotechnologischer Einsatz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sebastian Neumann
aus Berlin

Jülich 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referentin: Prof. Dr. Maria-Regina Kula

Korreferent: Prof. Dr. Georg Büldt

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1999 bis April 2002 am Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
EINLEITUNG.....	1
1. Peptidamidasen.....	1
2. Biotechnologische Anwendungen der Peptidamidasen.....	2
2.1 Selektive Entfernung von Amidschutzgruppen in der enzymatischen Peptidsynthese	3
2.2 Die Amidierung von Peptiden.....	5
3. Klassifizierung von Amidohydrolasen.....	8
3.1 Die Amidase-Signatur-Familie	9
3.2 Amidasen mit Sequenzhomologie zur Nitrilase-Familie (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Gruppe).....	12
3.3 Amidasen mit Sequenzhomologie zur Urease-Familie (<i>Mycobacterium smegmatis</i> -Gruppe).....	12
3.4 <i>N</i> -Acetylmuramoyl-L-alaninamidase-Gruppe (<i>Salmonella typhimurium</i> -Gruppe).....	12
4. Ziele der vorliegenden Arbeit.....	13
MATERIAL UND METHODEN.....	14
1. Material.....	14
1.1 Geräte.....	14
1.2 Chemikalien	15
2. Mikrobiologische Methoden.....	15
2.1 Bakterienstämme.....	15
2.2 Anzucht und Medien.....	15
2.3 Expression der Peptidamidase in <i>Escherichia coli</i>	16
2.4 Expression im 12 Liter-Maßstab.....	17
2.5 Konservierung der Bakterienstämme.....	18
3. Molekularbiologische Methoden.....	18
3.1 Photometrische Quantifizierung von DNA.....	18
3.2 DNA-Fällung	18
3.3 Präparation von DNA.....	19
3.3.1 Präparation von Plasmid-DNA (aus <i>Escherichia coli</i>)	19
3.3.2 Präparation von genomischer DNA (aus <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)....	19
3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	20
3.5 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA.....	20
3.6 Ligation von DNA	20
3.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	21
3.8 DNA-Sequenzierung.....	22
3.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	22
3.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
3.11 Kompetente <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	22
3.12 Transformation von <i>Escherichia coli</i> -Zellen	23
3.13 Konstruktion einer DNA-Sonde und Southern-Blot-Hybridisierung.....	23

3.14 Herstellung und Screening einer partiellen Genbank	24
3.15 Gerichtete Mutagenese	24
3.16 Synthetische Oligonukleotide.....	25
3.17 Plasmidvektoren	27
3.18 Datenbank-Zugangsnummer der Nukleotidsequenz	28
4. Biochemische Methoden.....	28
4.1 Bestimmung der Peptidamidaseaktivität	28
4.1.1 Umsetzung der Amidsubstrate	28
4.1.2 HPLC-Analytik	29
4.1.3 Enzymatische Ammoniumbestimmung	29
4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	30
4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	31
4.4 Isoelektrische Fokussierung	31
4.5 Elektroblothing und Proteinsequenzierung	31
4.6 Zellaufschluss und Reinigung der rekombinanten Peptidamidasen	31
4.6.1 Reinigung mittels Affinitäts-Chromatographie.....	32
4.6.2 Reinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie	32
4.7 Lagerung der Peptidamidase	33
4.8 Substratspektrum	33
4.9 Substratkinetiken	33
4.10 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur	34
4.11 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert.....	34
4.12 Inhibitionsstudien	34
4.13 Test auf proteolytische Aktivität	35
4.14 Test auf β -Lactamaseaktivität (<i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>)	35
4.14.1 <i>In-vitro</i> -Assay	35
4.14.2 <i>In-vivo</i> -Assay	36
4.15 Bestimmung des nativen Molekulargewichts.....	37
4.16 Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen.....	37
5. Kristallisation der Peptidamidase	38
5.1 Proteinkristallisation.....	38
5.2 Inkubation der Pam-Kristalle mit Inhibitoren	39
6. Strukturaufklärung der Peptidamidase	40
6.1 Röntgenstrukturanalyse	40
6.2 Datensammlung.....	42
6.3 Strukturaufklärung und Verfeinerung	42
6.4 Koordinaten.....	43
7. Enzymatische Synthese von Peptidamiden mit Hilfe der Peptidamidase.....	43
7.1 Peptidamidsynthese in organischen Lösungsmitteln.....	43
7.2 Peptidamidsynthese in ionischen Flüssigkeiten	45
ERGEBNISSE.....	47
1. Nachweis der Peptidamidase-Aktivität in <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	47
2. Isolierung von <i>pam</i>	47
3. Analyse der Sequenzdaten des 6,9 kb DNA-Fragments	48
3.1 Datenbankanalyse der DNA-Sequenz	49
3.2 Die Sondenbindungsstelle	52
3.3 Das offene Leseraster der Peptidamidase.....	52

3.4 Die regulatorischen DNA-Sequenzen 3'- und 5'-seits des Peptidamidase-Gens.....	53
3.5 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Peptidamidase	54
4. Expression und Aufreinigung der Pam-Varianten 2, 6 und 10.....	55
4.1 Pam-Variante 2: Expression und Aufreinigung	56
4.2 Pam-Variante 6: Expression und Aufreinigung	58
4.3 Pam-Variante 10: Expression und Aufreinigung	59
5. Biochemische Charakterisierung der Pam-Variante 6	60
5.1 Lagerungsstabilität.....	60
5.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichts	60
5.3 Isoelektrische Fokussierung.....	61
5.4 Quantifizierung der freien Sulphydrylgruppen.....	61
5.5 Substratspektrum.....	62
5.6 Substratkinetiken.....	66
5.7 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur	68
5.8 pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit.....	69
5.9 Inhibitionsstudien.....	70
5.10 Vergleich der Eigenschaften der Pam-Varianten 6 und 10	72
5.11 Test auf β -Lactamaseaktivität (<i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>)	73
6. Kristallisation von Pam	75
6.1 Screening nach initialen Kristallisationsbedingungen für Pam-Variante 6.....	75
6.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen für Pam-Variante 6.....	76
7. Strukturanalyse	77
7.1 Die Struktur von Pam: Nativ und im Komplex mit Chymostatin	77
7.2 Interaktionen im Pam-Chymostatin-Komplex	81
8. Gerichtete Mutagenese mit der Pam	86
8.1 Expression und Aufreinigung der Pam-Varianten S202A, S226A, K123A, C200A und T221A.....	87
8.2 Kinetische Charakterisierung der Pam-Varianten S226A, K123A, S202A, C200A und T221A.....	88
8.3 Kristallisation der Pam-Varianten S202A, S226A, K123A, C200A und T221A	91
9. Enzymatische Synthese von Peptidamiden	91
9.1 Peptidamidsynthese in organischen Lösungsmitteln.....	91
9.2 Peptidamidsynthese in ionischen Flüssigkeiten	94
DISKUSSION	97
1. Die Struktur von Amidase-Signatur-Enzymen.....	97
2. Katalysemechanismen von Amidase-Signatur-Enzymen	100
2.1 Das primäre Nucleophil in AS-Enzymen.....	100
2.2 Inhibitionsspektren von AS-Enzymen	101
2.3 Die Superfamilie der Serinhydrolasen	102
2.4 Postulierter Katalysemechanismus der FAAH.....	103
2.5 Alternativer Katalysemechanismus der Pam	104
2.6 Unterschiedliche Reaktionsmechanismen innerhalb der AS-Familie.....	107
3. Unterschiede in den Eigenschaften von Pam-Variante 6, Pam-Variante 10 und Wildtyp-Pam.....	107
4. Natürliche Funktion und Substratspektrum von Pam	109

5. Biotechnologischer Einsatz von Pam	110
ZUSAMMENFASSUNG	112
ANHANG.....	114
LITERATURVERZEICHNIS.....	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[BMIM] BTA	1-Butyl-3-methylimidazolium-bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amid
[BMIM] MeSO ₄	1-Butyl-3-methylimidazoliummethylsulfat
[EMIM] BF ₄	1-Ethyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat
[Et ₃ NH] MeSO ₄	Triethylammoniummethylsulfat
[Et ₃ NM] MeSO ₄	Triethylmethylammoniummethylsulfat
[MMIM] MeSO ₄	1,3-Dimethylimidazoliummethylsulfat
[MNIM] PF ₆	1-Methyl-3-nonylimidazoliumhexafluorophosphat
aa	Aminosäurereste
Ac-	Acetylrest
Acc. No.	accession number (Datenbank-Zugangsnummer)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
AS	Amidase-Signatur
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cst	Chymostatin
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCI	3,4-Dichloroisocoumarin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>efg</i>	Gen des Translationselongationsfaktors G
EF-G	Translationselongationsfaktors G
FAAH	Fettsäureamidohydrolase
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden

HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	isoelektrische Fokussierung
IF	ionische Flüssigkeiten
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAFP	Methylarachidonylfluorophosphonat
MDH	Malatdehydrogenase
<i>mdh</i>	Gen der Malatdehydrogenase
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
mM	millimolar (mmol/l)
NAD ⁺ /NADH + H ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxidiert/reduziert)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
Pam	Peptidamidase (Peptidamid-Amidohydrolase) von <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>pam</i>	Gen der Peptidamidase
PAP	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Peptidylprolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
<i>ppi</i>	Gen der Peptidylprolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Substrat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEA-HCl	Triethanolaminhydrochlorid
TE-Puffer	Tris-HCl-EDTA-Puffer

TFA	Trifluoressigsäure
Tris-	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	μmol Substrat/min
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
Vol%	Volumenprozent
w/v	weight/volume (Gewicht pro Volumen)
Z-	Benzyloxycarbonyl-

EINLEITUNG

1. Peptidamidasen

Die Hydrolyse von Peptidamiden (Abbildung 1) wurde zunächst nur als Nebenaktivität von Proteasen gefunden; u.a. bei der Carboxypeptidase Y (Kim und Kim, 1994).

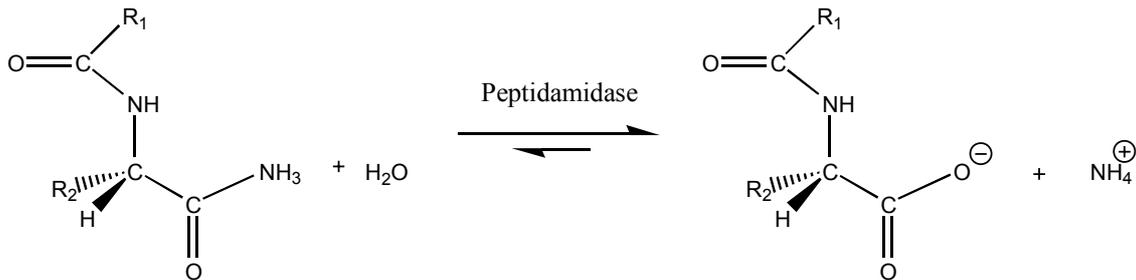


Abbildung 1. Die Hydrolyse des C-terminalen Säureamids in Peptidamiden durch die Peptidamidase (Peptidamid-Amidohydrolase). In der C-terminalen Position befindet sich ein L-Aminosäurerest. R₁: weitere Aminosäurereste der Peptidkette; R₂: Seitenkette der C-terminalen Aminosäure.

Mit der Peptidamidase (Peptidamid-Amidohydrolase) aus Orangenschalen wurde durch Steinke und Kula (1990) erstmalig ein Enzym beschrieben, das spezifisch die C-terminale Amidgruppe in Peptidamiden hydrolysiert, ohne Peptidbindungen oder Amidfunktionen in den Aminosäureseitenketten anzugreifen. Später wurde Peptidamidaseaktivität in unterschiedlichen Geweben verschiedener Zitruspflanzen nachgewiesen, z. B. in Fruchtschalen und Blättern von *Citrus sinensis* (Orange) und *Citrus limon* (Limone) sowie in den Bakterienarten *Stenotrophomonas maltophilia* und *Ochrobactrum anthropi* (Stelkes-Ritter, 1994).

Bisher wurden lediglich die Peptidamidasen aus Orangenschalen und aus *S. maltophilia* charakterisiert. Beide weisen eine hohe Regio- und Stereoselektivität auf und hydrolysieren ausschließlich Säureamidbindungen in der C-terminalen Position von Peptidamiden. In der C-terminalen Position des Peptidamids werden Aminosäurereste mit unterschiedlichen Seitenketten akzeptiert. Peptidbindungen oder Säureamidfunktionen in den Seitenketten von Aminosäuren werden nach Stelkes-Ritter et al. (1995) und Kammermeier-Steinke et al. (1993) nicht hydrolysiert.

Die natürlichen Substrate und die physiologischen Funktionen der verschiedenen Peptidamidasen sind bisher nicht bekannt. Unklar ist ebenfalls, ob die erwähnten pflanzlichen und

bakteriellen Peptidamidasen evolutiv verwandt sind, da bis auf die N-terminale Aminosäuresequenz der Peptidamidase aus *S. maltophilia* keine weiteren Sequenzinformationen vorliegen. Die Peptidamidase aus *S. maltophilia* ist die erste Peptidamidase, die bis zur Homogenität aufgereinigt worden ist und deren N-terminale Aminosäuresequenz bekannt ist (Stelkes-Ritter et al., 1995).

S. maltophilia ist ein Gram-negatives γ -Proteobakterium (Bacteria; Proteobacteria; γ -Gruppe; *Xanthomonas*-Gruppe; *Stenotrophomonas*). Es ist das einzige Mitglied der Gattung *Stenotrophomonas*. Für den Organismus liegen bisher nur wenige Gendaten vor. Der Mikroorganismus ist obligat aerob und weist eine ubiquitäre Verbreitung auf. Er ist in einer Vielzahl von natürlichen Habitaten anzutreffen und wurde z. B. aus dem Boden, aus Süßwasserseen, aus Flüssen und von Pflanzenoberflächen isoliert. Andererseits ist er auch aus verschiedenen nosokomialen Quellen isoliert worden, wie z. B. aus Dialysemaschinen, Eismaschinen, Duschwannen usw. *S. maltophilia* ist resistent gegenüber vielen Breitbandantibiotika, darunter viele β -Lactamantibiotika. Aus diesem Grund findet der Mikroorganismus selektive Bedingungen in Kliniken und Krankenhäusern, wo diese Antibiotika verstärkt zum Einsatz kommen. Er tritt als opportunistischer Nosokomialkeim in Erscheinung, d.h. er infiziert oder kolonisiert immungeschwächte Patienten. Über die pathogenen Eigenschaften dieses Mikroorganismus ist wenig bekannt. Der Pathogenesemechanismus ist bisher nicht aufgeklärt worden und die Kolonisation kann nicht klar von der Infektion unterschieden werden (Denton und Kerr (1998) und Gopalakrishnan et al. (1999)).

Neben den Peptidamid-Amidohydrolasen sind auch verschiedene Aminosäureamid-Amidohydrolasen bekannt, u.a. aus *Ochrobactrum anthropi* (Asano et al., 1989 und van den Tweel et al., 1993).

2. Biotechnologische Anwendungen der Peptidamidasen

Die hohe Regioselektivität zusammen mit der hohen Substratvariabilität innerhalb der Peptidamids substrate machen den Einsatz der Peptidamidasen in verschiedenen biotechnologischen Prozessen denkbar. Hierbei sind insbesondere zwei Anwendungsmöglichkeiten hervorzuheben:

2.1 Selektive Entfernung von Amidschutzgruppen in der enzymatischen Peptidsynthese

Die industrielle Bereitstellung von Peptiden erfolgt bisher meist durch chemische Synthese. In einem Mehrstufenprozess werden gezielt Aminosäurebausteine zu Peptiden verknüpft. Durch die Aktivierung der Carboxylfunktion eines Reaktionspartners kann die Synthese unter milden Bedingungen durchgeführt werden. Es werden nur dann eindeutig definierte Produkte erhalten, wenn alle funktionellen Gruppen, die nicht am Peptidknüpfungsschritt beteiligt sind, temporär durch geeignete Schutzgruppen blockiert werden. Für jeden Aminosäurerest, der der wachsenden Peptidkette hinzugefügt wird, muss ein Zyklus der selektiven Blockierung, Aktivierung, Kupplung und selektiven Deblockierung erneut durchlaufen werden.

Die enzymatische Peptidsynthese stellt eine Alternative zur chemischen Peptidsynthese dar. Die Ausbildung von Peptidbindungen wird hier durch Serin- oder Cysteinproteasen katalysiert. Die Methode bietet verschiedene Vorteile. So treten keine Racemisierungen auf, der Schutz von funktionellen Aminosäureseitengruppen ist nicht erforderlich, es kommen einfache Ausgangsstoffe zum Einsatz und es treten keine toxischen Nebenprodukte auf. Zentrale Nachteile sind die fehlende Möglichkeit des universellen Einsatzes von Proteasen aufgrund der Substratspezifität und die Rückspaltungsgefahr.

Grundsätzlich sind bei der enzymatischen Peptidsynthese zwei verschiedene Prinzipien zu unterscheiden: Die Synthese kann thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert durchgeführt werden (Bongers und Heimer, 1994).

Im thermodynamischen Ansatz läuft die Proteolyse durch die Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts in umgekehrter Richtung ab. Das Produkt wird hier kontinuierlich durch Fällung, Extraktion oder Komplexbildung aus dem Gleichgewicht entfernt.

Im kinetisch kontrollierten Ansatz wird die Esteraseaktivität von Proteasen ausgenutzt. Im Verlauf der Reaktion kommt es temporär zur Akkumulation des Produktes. Die Reaktion wird abgestoppt, bevor sich das thermodynamische Gleichgewicht einzustellen beginnt. Ein Beispiel für eine unter kinetischer Kontrolle durchgeführte Peptidsynthese wurde von Schwarz et al. (1992) vorgestellt (Abbildung 2).

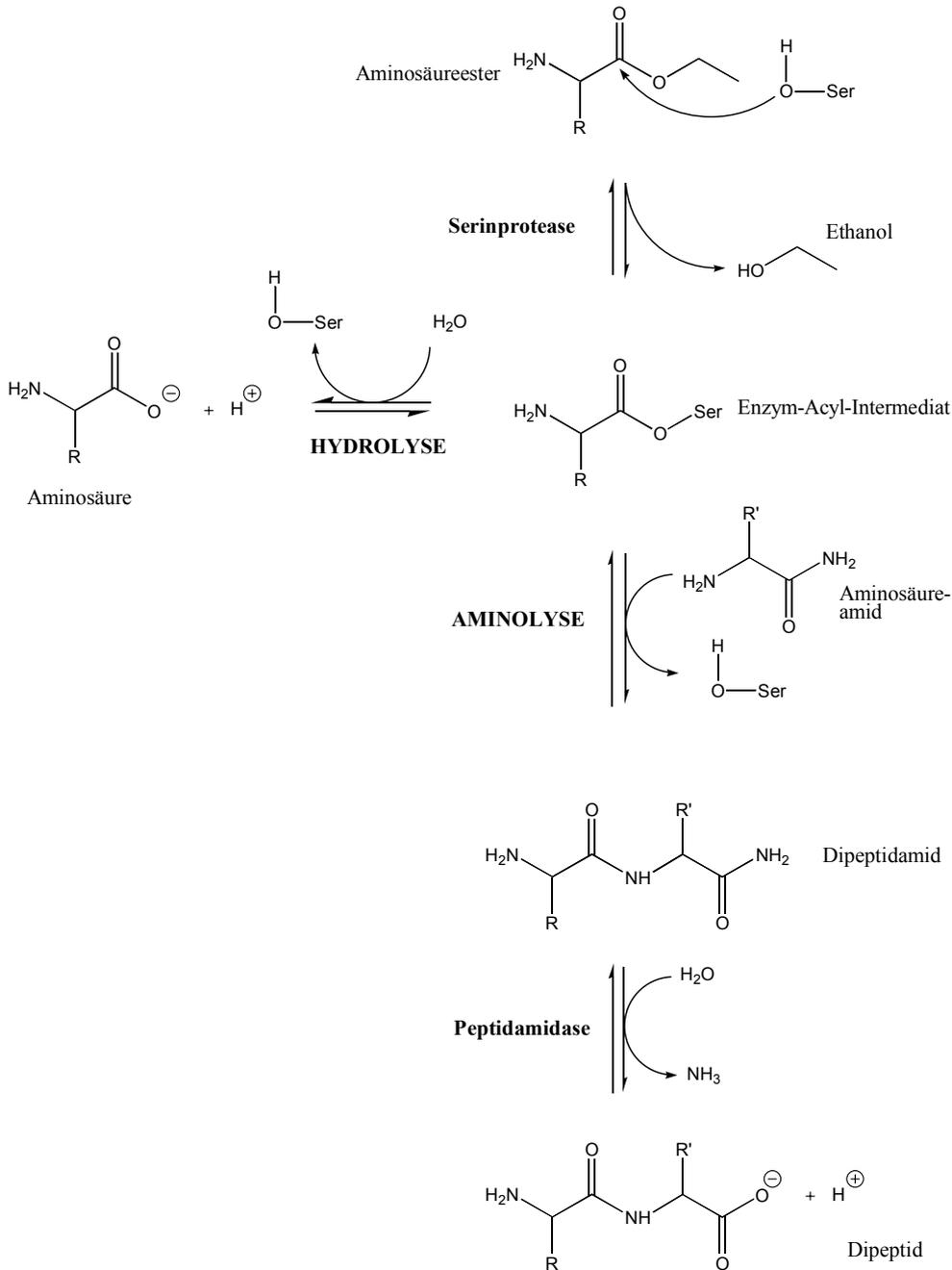


Abbildung 2. Schematische Darstellung der unter kinetischer Kontrolle verlaufenden enzymatischen Synthese von Dipeptiden unter Einsatz einer Serinprotease und einer Peptidamidase: Zunächst bildet ein Aminosäureester mit der Protease ein Enzym-Acyl-Intermediat aus. In einer kinetisch kontrollierten Reaktion wird dieses Intermediat durch ein Aminosäureamid (Aminolyse) unter Ausbildung einer Peptidbindung gespalten. Als unerwünschte Nebenreaktion tritt die Hydrolyse des Enzym-Acyl-Intermediates auf.

In einem kontinuierlichen Prozess werden Dipeptide durch die Kondensation von Aminosäureestern und Aminosäureamiden produziert. Im ersten Schritt wird die Synthese von Dipeptidamiden durch die Carboxypeptidase Y katalysiert. Im zweiten Schritt wird das Peptidamid durch die Orangen-Peptidamidase (Steinke und Kula, 1990) spezifisch desamidiert. Das Verfahren wurde für die Synthese des Dipeptids Kyotorphin (L-Tyr-L-Arg-OH) aus Tyrosin-

ethylester (L-Tyr-OEt) und Argininamid (L-Arg-NH₂) demonstriert. Kyotorphin ist ein aus dem Hypothalamus der Ratte isoliertes neuroaktives Peptid.

2.2 Die Amidierung von Peptiden

Peptide stellen eine interessante Klasse von biologisch aktiven Verbindungen dar, die als Hormone, Neurotransmitter oder Wachstumsfaktoren fungieren. Sie werden vielfach therapeutisch eingesetzt und sind für die pharmazeutische Forschung von großem Interesse. Peptide finden Verwendung als Vakkzine (Tam, 1995), als Antibiotika (Oren und Shai, 1998), als antivirale Agenzien (Jiang et al., 1993), zur Therapie von HIV-Infektionen (Kilby et al., 1998), zur Behandlung von Diabetes mellitus (Thompson et al., 1998) oder als Chemotherapeutika zur Behandlung von Krebs (Schally und Nagy, 1999). Viele dieser biologisch aktiven Peptide weisen eine für die Stabilität und biologische Aktivität essentielle carboxyterminale α -Amidgruppe auf. Das gilt z. B. für die Peptidhormone Oxytocin, Vasopressin und Calcitonin.

Bei *in vivo* synthetisierten Peptidamiden, wie sie z. B. im menschlichen Organismus vorkommen, entstammt der Amid-Stickstoff nicht, wie vermutet werden könnte, einer Transamidierungsreaktion. Die Peptidamide werden also nicht durch die Übertragung einer Aminogruppe von einem Donor auf die C-terminale Carboxylgruppe eines Peptids gebildet. In der Natur werden Peptidhormone statt dessen zunächst als Vorläuferproteine synthetisiert, die am C-Terminus einen zusätzlichen Glycinrest aufweisen. Diese C-terminale Glycinextension wird dann posttranslational oxidativ prozessiert, so dass eine C-terminale Amidfunktion verbleibt (Merkler, 1994 und Francisco et al., 1998). Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, heißt Peptidylglycin- α -amidierendes Enzym. Es ist bifunktional und fungiert als Peptidylglycin- α -hydroxylierende Monooxygenase sowie als Peptidylamidoglycolat-Lyase (Abbildung 3).

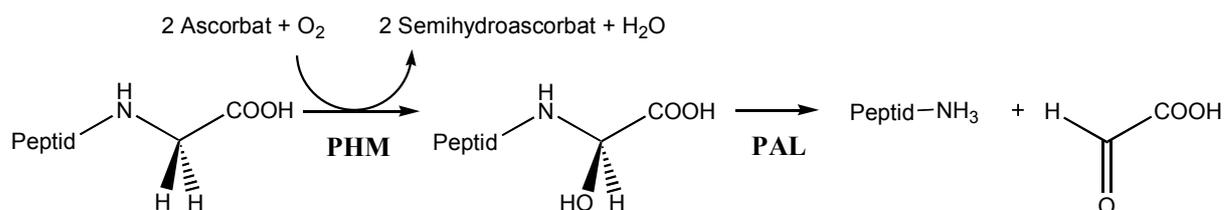


Abbildung 3. Die *In-vivo*-Synthese von Peptidamiden: Ein Vorläuferprotein mit C-terminaler Glycinextension wird im ersten Schritt durch die Peptidylglycin- α -hydroxylierende Monooxyge-

nase (PHM) zum Peptidylamidoglycolat oxidiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Umsetzung durch die Peptidylglycolat-Lyase (PAL) zum Peptidamid und Glyoxylat. Beide Aktivitäten sind in dem bifunktionalen Enzym Peptidylglycin- α -amidierende Monooxygenase vereint.

Die Bereitstellung großer Mengen an Peptidamiden für den therapeutischen Einsatz erfolgt bisher auf chemischem Weg durch Ammonolyse von C-terminalen Peptidestern, die über die konventionelle Peptidsynthese verfügbar sind (Merrifield, 1969). Die Synthese von Peptidamiden kann alternativ enzymatisch unter Einsatz der Peptidylglycin- α -amidierenden Monooxygenase durchgeführt werden (s. o.).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz zur enzymatischen Synthese von Peptidamiden wurde mit der Peptidamidase aus Orangenschalen demonstriert (Cerovsky und Kula (1998) und Cerovsky und Kula (2001)). Im Gegensatz zu der o. g. Anwendung, bei der mit Hilfe der Peptidamidase eine C-terminale Amidschutzgruppe entfernt wird, wird die Peptidamidase hier zur Katalyse der Kondensationsreaktion eingesetzt: Ein Peptidmolekül kondensiert mit Ammonium zum Peptidamid (Abbildung 4.)

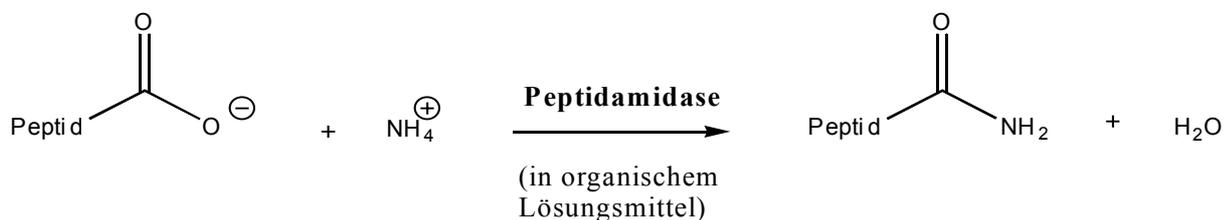


Abbildung 4. Die Peptidamidase-katalysierte Kondensation der C-terminalen Carboxylfunktion eines Peptids mit einem Ammoniumion unter Ausbildung eines Peptidamids. Die Reaktion läuft in organischem Lösungsmittel ab.

Unter Normalbedingungen liegt das Gleichgewicht der durch die Peptidamidase katalysierten Reaktion deutlich auf der Seite der Hydrolyseprodukte. Damit die Reaktion in Kondensationsrichtung abläuft, wird bei geringen Wasserkonzentrationen in organischem Lösungsmittel gearbeitet. Die Umkehrung der Reaktionsrichtung ist unter diesen Bedingungen auf die herabgesetzte Wasserkonzentration im Ansatz zurückzuführen. Da Wasser bei der Kondensationsreaktion gebildet wird, läuft diese unter den gewählten Bedingungen nach dem Massenwirkungsgesetz begünstigt ab.

Cerovsky und Kula (1998) haben die Amidierung des Dipeptidderivats Z-Gly-Phe-OH systematisch untersucht. Das System wurde in Bezug auf die Zusammensetzung des Lösungsmittels, den Wassergehalt im Reaktionsansatz, den Ammoniumdonor und die Eduktkonzentrationen optimiert: In Acetonitril in Gegenwart von 4% (v/v) Wasser, Ammoniumhydrogencarbonat als Ammoniumdonor und den Eduktkonzentrationen 25 mM Z-Gly-Phe-OH und 40 mM NH_4HCO_3 wurde nach 72 h eine Ausbeute von 35% erzielt. Dass die erneute Zugabe von Enzym nicht zu weiteren Umsätzen geführt hat, zeigt an, dass das thermodynamische Gleichgewicht erreicht worden ist. In weiteren Untersuchungen zur *In-vitro*-Amidierung von Peptiden unter Einsatz der Orangen-Peptidamidase konnten deutliche Steigerungen in den Ausbeuten erreicht werden (Cerovsky und Kula, 2001): Unter Verwendung von Ammoniumhydrogencarbonat als Ammoniumdonor wurde die C-terminale Amidierung von diversen Di-, Tri-, Tetra- und Pentapeptiden untersucht. Maximale Ausbeuten wurden in Acetonitril mit 20-25% (v/v) Dimethylformamid in Gegenwart von 3% (v/v) Wasser erzielt. Mit dem Peptidsubstrat Z-Gly-Leu-OH wurde nach 192-stündiger Inkubation immerhin eine Ausbeute von über 60% erreicht. Die limitierenden Faktoren bei dieser Methode sind die herabgesetzte Löslichkeit der Edukte sowie die Instabilität bzw. die herabgesetzte Aktivität des Enzyms in organischen Lösungsmitteln.

Denkbar wäre auch, die Peptidamidase-katalysierte Synthese von Peptidamiden aus Peptiden und Ammonium statt in organischen Lösungsmitteln in ionischen Flüssigkeiten durchzuführen. Ionische Flüssigkeiten bilden eine neuartige Klasse von Lösungsmitteln mit ionischem Charakter. Sie sind Salze, die einen niedrigen Schmelzpunkt ($< 100^\circ\text{C}$) aufweisen und die relativ niedrigviskos sind (Wasserscheid und Keim, 2000). Abbildung 5 zeigt verschiedene Kationen und Anionen, die in unterschiedlichen Kombinationen in ionischen Flüssigkeiten vorkommen.

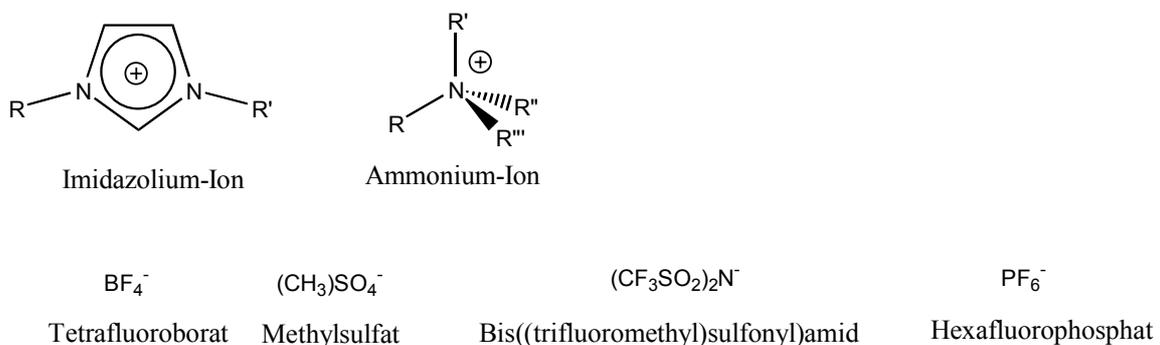


Abbildung 5. Kationen und Anionen, die in ionischen Flüssigkeiten vorkommen.

Enzymatische Umsetzungen in ionischen Flüssigkeiten wurden u.a. von Erbedinger et al. (2000) für die Thermolysin-katalysierte Synthese von Z-Aspartam und von Madeira Lau et al. (2000) für Lipase-katalysierte Reaktionen demonstriert.

3. Klassifizierung von Amidohydrolasen

Peptidamidasen sind Enzyme, die Carbonsäureamidbindungen (R-CO-NH-R') hydrolytisch spalten. Per Definition handelt es sich also um Amidohydrolasen (Peptidamid-Amidohydrolasen). Bei der Kategorisierung nach den katalytischen Eigenschaften werden die Amidohydrolasen in Peptidasen (EC 3.4) und in Amidasen, die lineare (EC 3.5.1) bzw. zyklische Amide (EC 3.5.2) umsetzen, eingeteilt. Alternativ zur Kategorisierung nach funktionellen Kriterien kann die Einteilung nach Aminosäuresequenzhomologien erfolgen. Dieses System führt zur Klassifizierung der Amidohydrolasen nach strukturellen und evolutiven Gesichtspunkten.

Die Peptidasen (Proteasen) werden nach ihren katalytischen Eigenschaften in vier Gruppen unterteilt: Serinproteasen, Cysteinproteasen, Aspartatproteasen und Metalloproteasen. Evolutiv gesehen haben sich die vier Gruppen der Peptidasen aus bis zu 60 Linien unterschiedlichen Ursprungs entwickelt (Rawlings und Barrett, 1993). Sie stehen evolutiv getrennt von den Amidasen. Die entfernte evolutive Verwandtschaft zwischen Peptidasen und anderen Amidasen wurde bisher nur für Aspartatproteasen und Amidase-Signatur-Enzyme beschrieben (Kobayashi et al., 1997).

Amidasen lassen sich evolutiv, basierend auf Aminosäuresequenzhomologien, in vier Gruppen einteilen [Novo et al. (1995), ergänzt durch die aktuelle Recherche in der NCBI-BLAST-Datenbank; Altschul et al., 1997]:

1. Die Amidase-Signatur-Familie
2. Amidasen mit Sequenzhomologie zur Nitrilase-Familie (*Pseudomonas aeruginosa*-Gruppe)
3. Amidasen mit Sequenzhomologie zur Urease-Familie (*Mycobacterium smegmatis*-Gruppe)
4. N-Acetylmuramoyl-L-alaninamidasen-Gruppe (*Salmonella typhimurium*-Gruppe)

3.1 Die Amidase-Signatur-Familie

Die Amidase-Signatur-Familie (AS-Familie) bildet eine sehr große Gruppe innerhalb der Amidohydrolasen. Bisher sind über 200 Mitglieder aus mehr als 90 unterschiedlichen Organismen bekannt (NCBI BLAST taxonomy reports; Altschul et al., 1997). Die AS-Familie definiert sich über das Auftreten der sogenannten AS-Sequenz; einem Gly/Ser-reichen Sequenzmotiv, das stark konservierte Bereiche aufweist (Chebrou et al., 1996). Bei den AS-Enzymen handelt es sich bisher mehrheitlich um hypothetische Proteine, die aus DNA-Daten abgeleitet wurden.

Die AS-Familie ist eine vergleichsweise heterogene Gruppe von Enzymen, die in allen drei Domänen der lebenden Organismen verbreitet ist: Bacteria (Koo et al., 2000), Archaea (d'Abusco et al., 2001) und Eukarya (Fraser et al., 2002). Chebrou et al. (1996) haben eine Unterteilung der AS-Familie in vier Gruppen basierend auf Aminosäuresequenzhomologien vorgenommen. Nach diesem System werden die bakteriellen aliphatischen Amidasen (AMD), die Indolacetamid-Amidohydrolasen (IAAH), die eukaryotischen Amidasen (EA) sowie die 6-Aminohexanoat-zyklische-Dimer-Hydrolasen (6AHCD) unterschieden.

Die Mitglieder der AS-Familie kommen in löslicher Form (Mayaux et al., 1990) oder als integrale Membranproteine (Cravatt et al., 1996) vor. Sie weisen unterschiedliche Organisationen auf der Ebene der Quartärstruktur auf; sie liegen z. B. als Homodimer (Kobayashi et al., 1993b) bzw. Homooctamer (Trott et al., 2001) vor oder sind Untereinheiten in Multienzymkomplexen (Curnow et al., 1997). AS-Enzyme setzen eine Vielzahl von Amidsubstraten um (Abbildung 6).

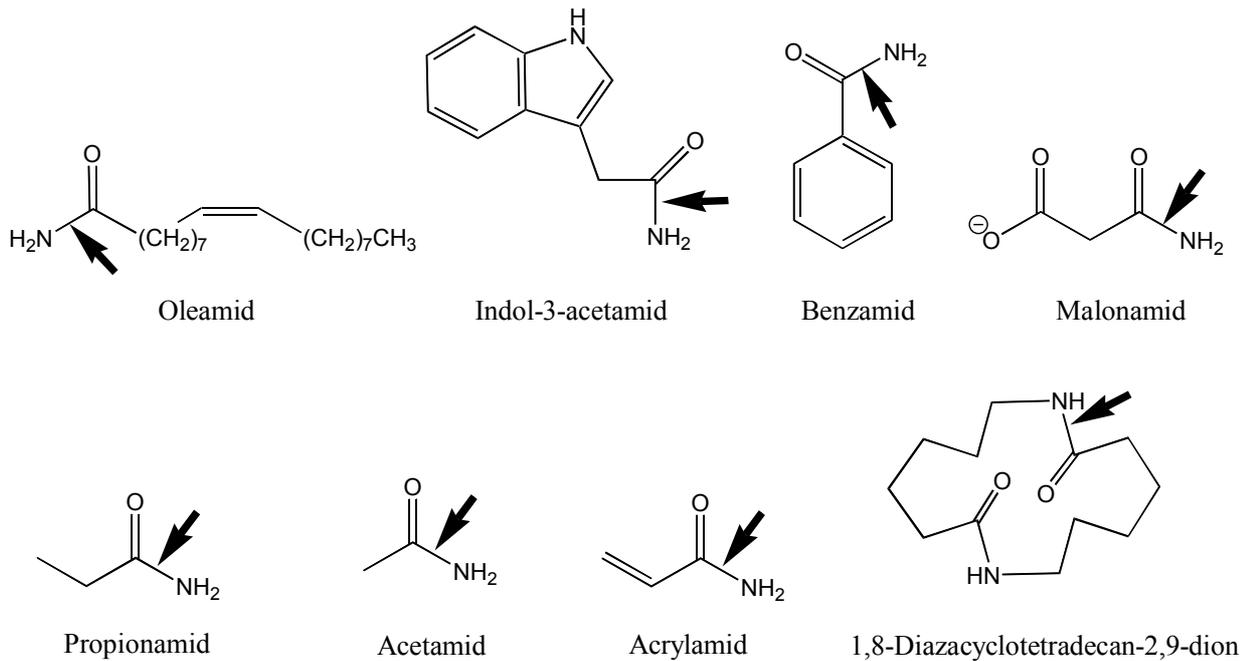


Abbildung 6. Strukturformeln von Carbonsäureamid-Funktionen enthaltenden Verbindungen, die durch Amidase-Signatur-Enzyme umgesetzt werden. Die markierte Amidbindung im jeweiligen Substrat wird hydrolytisch gespalten.

Des Weiteren sind AS-Enzyme Bestandteil verschiedener anaboler und kataboler Stoffwechselwege:

- Die Fettsäureamidohydrolase katalysiert die hydrolytische Inaktivierung von schlafinduzierenden Fettsäureamiden (z. B. Oleamid) in *Rattus norvegicus* (Cravatt et al., 1996).
- Die Indolacetamid-Amidohydrolase (IAAH) hydrolysiert Indol-3-Acetamid zu dem Auxin Indol-3-acetat. Auxine sind Phytohormone, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse in höheren Pflanzen steuern. Indolacetamid-Amidohydrolasen sind auch auf tumorinduzierenden Plasmiden verschiedener pflanzenpathogener Bakterien codiert (Sekine et al., 1989).
- Die katabole Umsetzung von Benzamid erfolgt durch die *Aspergillus nidulans*-Amidase (Fraser et al., 2002).
- Malonamidase aus *Bradyrhizobium japonicum* hydrolysiert Malonamid (Koo et al., 2000).
- Die Propionamidase aus *Rhodococcus* sp. N-477 hydrolysiert neben Propionamid auch Acetamid, Acrylamid und Indolacetamid (Hashimoto et al., 1991).
- 1,8-Diazacyclotetradecan-2,9-dion ist ein Nebenprodukt, das bei der industriellen Nylonproduktion anfällt. Es handelt sich um eine zyklische Verbindung, die formal aus zwei

6-Aminohexanoat-Molekülen besteht. Die Verbindung enthält zwei Säureamidbindungen. Eine der Säureamidbindungen wird durch die 6-Aminohexanoat-zyklische-Dimer-Hydrolase (einem AS-Enzym) gespalten. Auf diese Weise wird das zyklische Dimer in das lineare Dimer *N*-(6-Aminohexanoyl)-6-aminohexanoat überführt (Tsuchiya et al., 1989).

- (g) Ein weiterer Stoffwechselweg, in dem AS-Enzyme vorkommen, ist die Umsetzung von aliphatischen Nitrilen über Carbonsäureamide zu Carbonsäuren. Die Umsetzung erfolgt durch das Zusammenwirken zweier Enzyme: einer Nitrilhydratase, die das Nitril zum Amid hydratisiert, und einer Amidase, die das Amid zur Carbonsäure hydrolysiert (Nitrilhydratase/Amidase-System). Die enge physiologische Verknüpfung spiegelt sich oft in der genetischen Organisation in Form einer polycistronischen Transkriptionseinheit wieder (Mayaux et al., 1990). Alternativ können Nitrile durch die Nitrilase auch direkt zur Carbonsäure umgesetzt werden. In diesem Fall ist keine Amidase beteiligt (Kobayashi et al., 1993a).

Neben Hydrolasen existieren innerhalb der AS-Enzyme auch Transferasen. Die Glutaminyl-tRNA^{Gln}-Amidotransferase aus *Bacillus subtilis* ist ein heterotrimeres Enzym, dessen Unter-einheit A (GatA) ein AS-Enzym ist (Curnow et al., 1997). Die Beladung der tRNA^{Gln} mit einem Glutaminylrest erfolgt in diesem Stoffwechselweg nicht direkt durch eine Glutaminyl-tRNA-Synthetase. Statt dessen katalysiert die Glutaminyl-tRNA-Synthetase zunächst die „Fehlbeladung“ mit einem Glutamylrest unter Bildung von Glutamyl-tRNA^{Gln}. Anschließend wird in einer ATP-abhängigen Transamidierungsreaktion der an die tRNA gebundene Glutamylrest zum Glutaminylrest umgesetzt. Amid-Donor ist Glutamin (Abbildung 7).

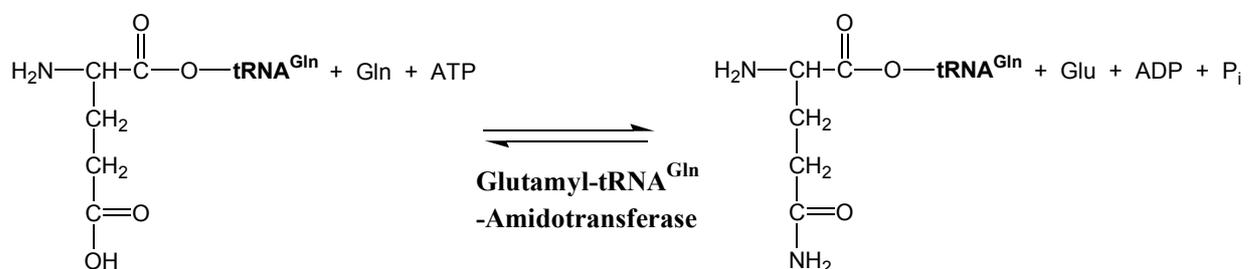


Abbildung 7. ATP-abhängige Transamidierung der Glutamyl-tRNA^{Gln} zur Glutaminyl-tRNA^{Gln}. Die Reaktion wird durch die Glutaminyl-tRNA^{Gln}-Amidotransferase katalysiert.

Die Untersuchung des Katalysemechanismus verschiedener AS-Enzyme durch Kobayashi et al. (1997), Patricelli und Cravatt (2000) und Koo et al. (2000) hat gezeigt, dass in AS-Enzymen ein Serylrest als primäres Nucleophil fungiert.

3.2 Amidasen mit Sequenzhomologie zur Nitrilase-Familie (*Pseudomonas aeruginosa*-Gruppe)

Die Amidase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Acylamidamidohydrolase; EC 3.5.1.4) katalysiert die Hydrolyse aliphatischer Amide unter Bildung der entsprechenden Carbonsäuren (Clarke, 1972).

Die *P. aeruginosa*-Gruppe setzt sich aus verschiedenen Amidasen mit ähnlichen Eigenschaften zusammen, hierzu gehören die Amidasen aus *Pseudomonas aeruginosa* (Farnaud et al., 1999), *Methylophilus methylotrophus* (Silman et al., 1991), *Arthrobacter* sp. J-1 (Asano et al., 1982), *Rhodococcus* sp. (Maestracci et al., 1984) und *Helicobacter pylori* (Skouloubris et al., 1997). Die Gruppe weist signifikante Sequenzhomologien zu der Nitrilase-Enzymfamilie auf. In Übereinstimmung mit der Nitrilase-Enzymfamilie stellt in der *P. aeruginosa*-Gruppe ein Cysteylrest das primäre Nucleophil dar (Karmali et al., 2000). Detaillierte Informationen über den Mechanismus liegen allerdings bisher nicht vor, obwohl die Struktur der Amidase aus *P. aeruginosa* bekannt ist (Farnaud et al., 1999). Die Amidasen innerhalb dieser Familie besitzen eine homotetramere, homoexamere bzw. homoctamere Struktur (Farnaud et al., 1999).

3.3 Amidasen mit Sequenzhomologie zur Urease-Familie (*Mycobacterium smegmatis*-Gruppe)

Die dritte Homologie-Gruppe innerhalb der Amidohydrolasen ist die *Mycobacterium smegmatis*-Gruppe. Aus dieser Gruppe war zunächst lediglich ein Vertreter bekannt, die Acetamidase aus *Mycobacterium smegmatis* (Mahenthiralingam et al., 1993). Mittlerweile ist die Formamidase aus *Methylophilus methylotrophus* (Wyborn et al., 1994) hinzugekommen sowie eine Reihe von hypothetischen Proteinen (NCBI-BLAST-Datenbank; Altschul et al., 1997).

3.4 N-Acetylmuramoyl-L-alaninamidasen-Gruppe (*Salmonella typhimurium*-Gruppe)

Zunächst wurde die N-Acetylmuramoyl-L-alaninamidasen-Gruppe nur durch die N-Acetylmuramoyl-L-Alaninamidase aus *Salmonella typhimurium* gebildet (Novo et al. (1995)

und Xu und Elliott (1993)). Mittlerweile ist in dieser Gruppe eine Vielzahl an hypothetischen Amidasen vereint (NCBI-BLAST-Datenbank; Altschul et al., 1997).

4. Ziele der vorliegenden Arbeit

Für die umfassende molekularbiologische und biochemische Charakterisierung der Peptidamidase aus *S. maltophilia* sollte zunächst der Versuch unternommen werden, ausgehend von der N-terminalen Sequenzinformation (Stelkes-Ritter et al., 1995) das Peptidamidase-Gen zu isolieren. Die Isolierung des Gens würde die evolutive Klassifizierung der Peptidamidase aus *S. maltophilia* innerhalb der Amidasen ermöglichen. Darüber hinaus könnte die Aminosäuresequenz der Peptidamidase, die Organisation des Peptidamidase-Gens im Genom oder das Vorhandensein einer Signalsequenz Hinweise auf die natürliche Funktion und Lokalisation des Enzyms im Bakterium liefern.

Die niedrige spezifische Aktivität im Rohextrakt sowie der pathogene Charakter des Herkunftsorganismus *S. maltophilia* machten es weiterhin erstrebenswert, ein effizientes Expressionssystem in einem nichtpathogenen Mikroorganismus zu etablieren.

Im Anschluss an die Charakterisierung sollte die Synthese von Peptidamiden mit Hilfe der Peptidamidase in organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten untersucht werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Geräte

FPLC-Anlage: Fraktionssammler FRAC-100, Liquid chromatography controller LCC-500-Plus, Peristaltik Pumpe P1. Pumpe P-500, Monitor UV-1, Motor Valve MV-7 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

HPLC-Anlage: GyncoSoft Version 3.1, High Precision Pump Model 480, Integrator Chromatopac C-R6A, Probengeber SPH-125, Spektralphotometer UVD-160 (Gynkotek, Germering, Deutschland)

Gelelektrophorese: DNA-Gelelektrophoresekammer GNA 100 (Amersham Pharmacia Biotech); DNA-Gelelektrophoresekammer Horizon 11.14 (Invitrogen, Groningen, Niederlande), SDS-Gelelektrophoresekammer (Invitrogen)

Fermentation: Bioreaktor (Infors HT, Bottmingen, Schweiz)

Heizblock: Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Lyophilisator: LYOVAC GT2 (Steris, Mentor, Ohio, USA)

PCR: Personal Cycler (Biometra, Hamburg, Deutschland)

Protein-Sequenzierung: Protein-Sequenzier 477 A (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

Spektroskopie: UV/VIS-Spektralphotometer 16 A (Shimadzu, Düsseldorf, Deutschland)

Ultrafiltration: Ultrafiltrationszelle Modell 8050 und 8010 (Millipore, Eschborn, Deutschland)

Ultraschall-Zellaufschluss: Sonopuls HD 60 (Bandelin, Berlin, Deutschland)

Zentrifugation: Sorvall RC5B (Du Pont, Bad Homburg, Deutschland); Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf); Speed-Vac-Konzentrator Univapo 150H (Uniequip, Martinsried, Deutschland)

1.2 Chemikalien

Aminosäuren, Aminosäurederivate, Aminosäureamide, Peptide, Peptidamide und Peptidamidderivate wurden von Fluka/Sigma-Aldrich (Neu-Ulm, Deutschland) und Bachem (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien besaßen p.a.-Qualität und wurden von Fluka/Sigma-Aldrich, Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2. Mikrobiologische Methoden

2.1 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet: *Stenotrophomonas maltophilia* DSM 9181 (Stelkes-Ritter et al., 1995), *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande), *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Schwalbach, Deutschland) und *E. coli* Origami (DE3) (Novagen). Da es sich bei *S. maltophilia* um einen Mikroorganismus der Risikogruppe 2 handelt, wurden die mikrobiologischen und gentechnischen Arbeiten soweit erforderlich in zugelassenen Laborräumen unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt.

2.2 Anzucht und Medien

Sämtliche Kulturmedien wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren bei 2,2 bar und 120°C für 20 min sterilisiert.

Die Anzucht von *S. maltophilia* zur Induktion der Peptidamidaseaktivität erfolgte in M2-Medium (Stelkes-Ritter et al., 1995) mit einem Zusatz von 2,5 ml/l Vitaminlösung (Schlegel, 1985) und 0,8 ml/l Spurensalzlösung. Bei der Herstellung von Festmedien wurden 1,8% Agar zugesetzt. Die Komponenten *N*-Acetyl-D,L-methioninamid, Glucose, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und die Vitaminlösung wurden dem Medium erst im Anschluss an das Autoklavieren separat und in sterilfiltrierter Form zugesetzt (Stelkes-Ritter et al., 1995). Die Anzucht wurde in einer Flüssigkultur bei 30°C und 120 Upm für 48 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen aus der Kultur abzentrifugiert (4°C, 10000 Upm, 15 min) und bei -20°C gelagert.

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde *S. maltophilia* in LB-Medium angezogen. Die Flüssigkultur wurde bei 30°C und 120 Upm für 16 h inkubiert.

Die Anzucht der verschiedenen *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium bei 120 Upm und 37°C für 12-16 h. Zur Herstellung von Festmedien wurden 1,5% Agar zugesetzt.

Lösungen und Medien:

- M2-Medium: 4,32 g *N*-Acetyl-D,L-methionamid, 18,41 g Glucose, 19,68 g Pepton aus Casein, 4,76 g Hefeextrakt, 0,50 g KH₂PO₄, 2,00 g K₂HPO₄, 1,00 g NaCl, 0,05 g CaCl₂ × 2 H₂O, 0,10 g MgSO₄ × 7 H₂O, ad 1000 ml.
- Vitaminlösung nach Schlegel (1985): 0,2 mg Biotin, 2,0 mg Nicotinsäure, 1,0 mg Thiamin, 1,0 mg 4-Aminobenzoat, 0,5 mg Pantothenat, 5,0 mg Pyridoxamin, 2,0 mg Cyanocobalamin, ad 100 ml H₂O.
- Spurensalzlösung: 75,0 mg H₃BO₃, 50,0 mg MnCl₂ × 4 H₂O, 187,5 mg ZnCl₂, 50,0 mg CuSO₄ × 5 H₂O, 625,0 mg FeCl₃ × 6 H₂O, 25,0 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4 H₂O, 37,5 mg CoCl₂ × 6 H₂O, 50,0 mg NiCl₂ × 6 H₂O, ad 200 ml H₂O.
- Luria-Bertani (LB)-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl, ad 1000 ml, pH 7,5 (Sambrook et al., 1989).

2.3 Expression der Peptidamidase in *Escherichia coli*

Zur Expression der Peptidamidase (Pam) aus *S. maltophilia* wurden zwei verschiedene *E. coli*-Expressionsstämme eingesetzt, in denen insgesamt neun Enzymvarianten der Peptidamidase erzeugt wurden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Expressionssysteme.

Tabelle 1. Überblick über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Expressionssysteme für die Peptidamidase (Pam) aus *S. maltophilia*. Für jedes Expressionssystem ist das Expressionsplasmid, das Genprodukt und der Expressionsstamm aufgeführt.

Expressionsplasmid	Genprodukt	Expressionsstamm
pEK02	Pam-Variante 2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pEK06	Pam-Variante 6	<i>E. coli</i> Origami (DE3)
pEK10	Pam-Variante 10	<i>E. coli</i> Origami (DE3)
pEK09	Pam-Variante 2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
pPAM S202A	Pam-S202A	<i>E. coli</i> Origami (DE3)
pPAM S226A	Pam-S226A	<i>E. coli</i> Origami (DE3)
pPAM K123A	Pam-K123A	<i>E. coli</i> Origami (DE3)
pPAM C200A	Pam-C200A	<i>E. coli</i> Origami (DE3)
pPAM T221A	Pam-T221A	<i>E. coli</i> Origami (DE3)

Die Volumina der Expressionskulturen in LB-Medium betragen 100 bzw. 2000 ml. Zur Selektion wurden dem Medium 50 mg/l Ampicillin zugesetzt. Zunächst wurde eine 5-200 ml LB-Amp-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 120 Upm und 37°C inkubiert. Die Hauptkultur wurde 1%ig inokuliert (v/v) und ebenfalls bei 120 Upm und 37°C inkubiert. Sobald die Hauptkultur eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,5-0,6 erreicht hatte, wurde die Expression des Peptidamidase-Gens mit 25 bis 1000 μ M IPTG induziert. Nach der Induktion wurde die Hauptkultur für 3-4 h bei 30 bzw. 37°C und 120 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert (4°C, 10000 Upm, 20 min). Die Zellen wurden bei -20°C gelagert.

2.4 Expression im 12 Liter-Maßstab

Das Expressionssystem pEK06/*E. coli* Origami (DE3) wurde im 12-Liter-Maßstab in einer Batch-Kultur angezogen (Bioreaktor von Infors HT). Die Zellen wurden zunächst über Nacht bei 37°C und 120 Upm in einer LB-Amp-Vorkultur mit 2% (v/v) Glycerin angezogen. Die LB-Amp-Hauptkultur enthielt 5% (v/v) Glycerin und wurde 1%ig mit der Vorkultur angeimpft. Der pH-Wert der Batchkultur wurde mit KOH und H₃PO₄ konstant bei 7,5 gehalten. Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) im Medium wurde während des gesamten Prozesses über den Lufteintrag und die Drehzahl des Rührers auf $\geq 30\%$ eingestellt. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wurde die Kultur mit 75 μ M IPTG induziert und die Inkubationstemperatur auf

30°C gesenkt. Nach 9 h wurde die Kultivierung beendet, und die Zellen wurden durch Zentrifugation abgeerntet (4°C, 10000 Upm, 20 min) und bei -20°C gelagert.

2.5 Konservierung der Bakterienstämme

Zur Konservierung wurden die Bakterienstämme in 10 ml LB-Kulturen angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wurden 0,9 ml der Kultur entnommen und in ein steriles 2 ml Eppendorfgefäß mit Schraubverschluss überführt. Dem Ansatz wurden 0,1 ml autoklaviertes Glycerin zugesetzt. Die wässrige Phase und das Glycerin wurden durch Vortexen gut durchmischt. Die Kryokultur wurde bei -80°C gelagert.

3. Molekularbiologische Methoden

Da es sich bei *Stenotrophomonas maltophilia* um einen Mikroorganismus der Risikogruppe 2 handelt, fallen die gentechnischen Arbeiten mit der DNA dieses Organismus teilweise in die Gentechnik-Sicherheitsstufe 2. Die entsprechenden Arbeiten wurden angemeldet und in einem zugelassenen S2-Genlabor bei Prof. Dr. Ernst am Institut für Mikrobiologie der Universität Düsseldorf unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt. Die Arbeiten mit dem Peptidamidase-Gen, das rekombinant in *E. coli* exprimiert wurde, und dem Genprodukt fallen hingegen in die Gentechnik-Sicherheitsstufe 1 und wurden am Institut für Enzymtechnologie (IET) durchgeführt.

3.1 Photometrische Quantifizierung von DNA

Die absorptionsspektroskopische Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung wurde bei 260 nm durchgeführt. Bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter entspricht der Extinktionswert 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al., 1989).

3.2 DNA-Fällung

Zur Fällung der DNA wurden der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 2 Volumen Ethanol zugesetzt. Nach Durchmischung durch mehrfaches Invertieren folgte eine 15-minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurde die gefällte DNA 20 min bei 14000

U_{pm} und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Dann wurde 15 min bei 14000 U_{pm} und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum dekantiert, das Sediment bei RT getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen (TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Die Lagerung der gelösten DNA erfolgte bei -20°C.

3.3 Präparation von DNA

3.3.1 Präparation von Plasmid-DNA (aus *Escherichia coli*)

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert. Die Methode beruht in modifizierter Form auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen nach Birnboim und Doly (1979) und einer anschließenden Anionenaustausch-Chromatographie. Die Durchführung erfolgte entsprechend dem QIAprep Miniprep Handbook (1999). Zur Plasmidisolierung wurde jeweils eine 5 ml LB-Amp-Übernachtskultur eingesetzt.

3.3.2 Präparation von genomischer DNA (aus *Stenotrophomonas maltophilia*)

Die genomische DNA aus *S. maltophilia* wurde nach Ausubel et al. (1992) isoliert. Eine 20 ml LB-Kultur mit *S. maltophilia* wurde in einem 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (10 min, 5000 U_{pm}, 4°C). Die Zellen wurden in 7,5 ml TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden dem Ansatz 400 µl einer 10%igen SDS-Lösung und 40 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) zugesetzt. Nach dem Durchmischen wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Es wurden 1,3 ml 5 molare NaCl-Lösung zugesetzt und gemischt, anschließend wurde 1 ml einer CTAB/NaCl-Lösung zugegeben und ebenfalls gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von 10 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde der Ansatz gemischt und für 5 min bei 5000 U_{pm} und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und für 5 min bei 5000 U_{pm} und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,6 ml Isopropanol versetzt. Nach Durchmischung durch mehrfaches Invertieren wurde die präzipitierte DNA abzentrifugiert (5 min, 500 U_{pm}, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert

und das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Lösungen und Puffer:

- 10% CTAB/0,7 M NaCl-Lösung: 4,1 g NaCl wurden in 80 ml H₂O gelöst, anschließend wurden portionsweise unter Erwärmung bis 65°C und Rühren 10 g CTAB zugegeben. Das Volumen wurde auf 100 ml aufgefüllt.

3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die definierte Basensequenzen in der DNA-Doppelhelix erkennen und beide DNA-Stränge spezifisch schneiden, d.h. sie hydrolysieren Phosphodiesterbindungen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (Bad Schwalmbach, Deutschland) eingesetzt. Der Restriktionsverdau wurde gemäß der Anleitung und in den entsprechenden Reaktionspuffern durchgeführt.

3.5 Dephosphorylierung von linearisierter Vektor-DNA

Vor der Dephosphorylierung wurde der Restriktionsansatz zur Inaktivierung des Restriktionsenzym für 20 min bei 65 bzw. 80°C, abhängig vom verwendeten Enzym, inkubiert. Anschließend wurden Dephosphorylierungspuffer und alkalische Phosphatase aus Garnelen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zugesetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Dephosphorylierung wurde gemäß der Anleitung (Roche Diagnostics) durchgeführt.

3.6 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation-Kits der Firma Roche Diagnostics gemäß der Anleitung durchgeführt. Das DNA-Insert und die dephosphorylierte linearisierte Vektor-DNA, die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel extrahiert worden sind (s.u.), wurden im Verhältnis 3:1 in die Ligation eingesetzt.

3.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Konstruktion der unterschiedlichen *pam*-Varianten eingesetzt. Als DNA-Polymerase wurde die Herculase (Stratagene) im entsprechenden Reaktionspuffer verwendet. Dem Reaktionsansatz wurde DMSO zugesetzt, welches die Ausbildung von Sekundärstrukturen in der DNA unterbindet, die ihrerseits die Polymerisationsreaktion behindern. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2. Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes.

Menge	Komponente
5-100 ng	Template-DNA (Plasmid-DNA)
10 μ l	Reaktionspuffer (10 \times)
je 0,2 mM	dATP, dCTP, dGTP und dTTP
50 pmol	Primer A
50 pmol	Primer B
2 Units	Herculase
5-10 Vol%	DMSO
ad 100 μ l	Aqua bidest

Der Reaktionspuffer (1 \times) hat die folgende Zusammensetzung: 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO_4 und 0,1% Triton X-100. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel der Firma Biometra durchgeführt. Das verwendete Temperatur-Zeit-Profil ist in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3. Temperatur-Zeit-Profil der Standard-PCR. T_m = Primerschmelzpunkt.

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
1. Initialdenaturierung	3 min	94°C
2. Primeranlagerung	45 sec	$(T_m - 3^\circ\text{C})$
3. Synthesephase	30 sec	72°C
4. Denaturierung	(1 min pro kb)	94°C
Schleife von 4. nach 2. (35 mal)		
5. Verlängerte Synthesephase	10 min	72°C
6. Reaktionsende	Pause	4°C

3.8 DNA-Sequenzierung

Zur einzelsträngigen Sequenzierung des 6,9 kb-Inserts von pKlon82 wurden die folgenden Primer verwendet: T7 terminator primer, T7TPwalk1, T7TPwalk2, T7TPwalk3, T7TPwalk4, T7TPwalk5, T7TPwalk6, T7TPwalk7, T7TPwalk8, SN-3B-T7-1, 3' B-T7-2, 3' BIT7-3, 3' B-T7-4, T7BGL und T7BGL/1. Zur doppelsträngigen Sequenzierung des Bereichs, der das Peptidamidase-Gen enthält, wurden die folgenden Primer verwendet: pa rev1, pa rev2, pa rev3 und pa for1. Zur Sequenzierung der Expressionsplasmide wurden die Primer T7 terminator primer, T7 promotor primer und T7TPwalk7 verwendet.

Sämtliche Primer sind in Tabelle 4 (Material und Methoden 3.16) aufgeführt. Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt.

3.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurde die DNA in Agarosegelen elektrophoretisch in Elektrophoresekammern der Firma Biorad aufgetrennt. Verwendet wurden 0,6 bis 1,8%ige Agarosegele mit $1 \times$ TAE-Puffer. Den Agarosegelen wurde ca. 0,005 Vol% Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA-Proben wurden 1/10 mit Probenpuffer ($10 \times$) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 5-7 V/cm Gellänge durchgeführt. Die Herstellung der Gele sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte gemäß Sambrook et al. (1989). Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde mit Hilfe des Videosystems EagleEye (Stratagene) im UV-Durchlicht (312 nm; Ethidiumbromidfluoreszenz) dokumentiert.

3.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction-Kits (Qiagen) gemäß der Anleitung durchgeführt. Zunächst wurde der die DNA enthaltende Gelblock bei 50°C im sog. QG-Puffer gelöst. Anschließend wurde die DNA selektiv an einen Anionentauscher gebunden, gewaschen und eluiert.

3.11 Kompetente *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* XL1Blue und *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte nach Hanahan (1983). Kompetente Zellen von *E. coli* Origami (DE3) wurden von Novagen bezogen. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

3.12 Transformation von *Escherichia coli*-Zellen

Die kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, anschließend wurden je 50 µl Zellen zu 20-100 µg Plasmid-DNA gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation des Ansatzes auf Eis wurde im Heizblock ein Hitzeschock (42°C) von 60 Sekunden durchgeführt. Der Ansatz wurde für zwei Minuten auf Eis inkubiert, bevor 300 µl LB-Medium zugesetzt wurden und eine 30-minütige Inkubation bei 37°C erfolgte. Anschließend wurden je 20 und 100 µl des Ansatzes auf einer LB-Amp-Agarplatte ausgestrichen. Es folgte eine 16-stündige Inkubation bei 37°C.

3.13 Konstruktion einer DNA-Sonde und Southern-Blot-Hybridisierung

Ausgehend von der bekannten N-terminalen Aminosäuresequenz der Peptidamidase (NVFPF-YAETDVADLQ, Stelkes-Ritter et al., 1995) wurde eine 45 Nukleotide umfassende DNA-Sonde unter Berücksichtigung des Codon-Gebrauchs von *S. maltophilia* konstruiert (Nakamura et al., 2000). Sonde A (m): 5' AAC GTG CCG TTC CCG TAC GCC GAA ACC GAC GTG GCC GAC CTG CAG - Dig 3' (siehe auch Tabelle 4).

Zur Restriktion der genomischen DNA wurde diese mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt: *Bgl*II, *Bcl*II, *Bss*HIII, *Eco*RI, *Bam*HI, *Eco*RV, *Bsp*EI, *Hpa*I, *Kpn*I, *Pvu*I, *Sac*I, *Xho*I, *Not*I, *Xba*I, *Sph*I und *Hind*III (New England Biolabs). Die restringierte genomische DNA von *S. maltophilia* wurde im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA mittels Kapillarblot (Sambrook et al., 1989) auf eine ca. 150 cm² große Nylonmembran Hybond N (Serva, Heidelberg, Deutschland) übertragen. Im Anschluss an den Transfer wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Transilluminator, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

Die Hybridisierung wurde bei 63°C in einer Glasröhre im Hybridisierungs-ofen (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde diese zunächst mit Vorhybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der Hybridisierungslösung inkubiert. Die Konzentration der Dig-dUTP-markierten 45-Nukleotide-DNA-Sonde A (m) betrug 10 pmol/ml. Jedes Sondenmolekül trug am 3'-Ende einen Digoxygenin-Rest. Das derivatisierte Oligonukleotid wurde von MWG-Biotech bezogen.

Im Anschluss an die Hybridisierung wurde die gebundene Sonde mittels Chemolumineszenz-Detektion sichtbar gemacht. Die Hybridisierung und die Detektion wurden gemäß der

Vorschrift „The DIG-System User's Guide for Filter Hybridization“ von Roche Diagnostics durchgeführt.

3.14 Herstellung und Screening einer partiellen Genbank

Die Ergebnisse aus der Southern-Hybridisierung mit genomischer DNA bildeten die Grundlage für die Herstellung der partiellen Genbank. Die genomische DNA wurde im präparativen Ansatz mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II behandelt und im Agarosegel aufgetrennt. In dem Größenbereich, in dem zuvor das *Bgl*II-Hybridisierungssignal erhalten wurde (6,9 kb), wurden die genomischen DNA-Fragmente aus dem Agarosegel extrahiert. Das Fragmentgemisch wurde in den Plasmidvektor pET-15b(+) der Firma Novagen ligiert und in *E. coli* XL1-Blue transformiert. Jeder erzeugte Klon enthielt in dem Plasmid ein genomisches DNA-Fragment aus *S. maltophilia*. Ziel war es, einen Klon zu identifizieren, der das gesuchte Fragment enthielt, welches das Hybridisierungssignal geliefert hat. Zu diesem Zweck wurden mit jeweils acht Klonen 20 × 5 ml LB-Amp-Flüssigkulturen angeimpft und jeweils die Plasmidgemische isoliert. Die Plasmidgemische wurden mit dem Restriktionsenzym behandelt und im Gel aufgetrennt. Anschließend wurde mittels Southern-Hybridisierung das Gemisch aus acht Plasmiden identifiziert, welches das gesuchte DNA-Fragment enthielt. Innerhalb der acht Plasmide wurde wiederum per Southern-Hybridisierung das betreffende Plasmid identifiziert. Insgesamt wurden 160 bakterielle Klone getestet.

3.15 Gerichtete Mutagenese

Die Einführung von Mutationen in das offene Leseraster von Pam zum Austausch einzelner Aminosäuren wurde mit Hilfe des QuickChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kits (Stratagene) gemäß der Anleitung vorgenommen. Die Mutagenese wurde mit *PfuTurbo*-DNA-Polymerase in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Als Template wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA eingesetzt (pEK06). Da das Plasmid aus *E. coli* XL1-Blue isoliert worden ist, liegt die Plasmid-DNA methyliert vor. Bei der anschließend durchgeführten PCR wurden jeweils die zwei komplementären Oligonukleotidprimer eingesetzt, welche die entsprechenden Mutationen aufwiesen. Bei der PCR wurde das gesamte Plasmid amplifiziert.

Es entstanden neue Plasmide mit einem einzelnen Nick in einem oder beiden DNA-Strängen. Die neu gebildete Plasmid-DNA mit den eingeführten Mutationen war im Gegensatz zur Template-DNA nicht methyliert. Anschließend wurden die Plasmide mit dem Restriktionsen-

zym *DpnI* behandelt. *DpnI* schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA. Auf diese Weise wurde die Template-Plasmid-DNA abgebaut. Im Ansatz verblieb die intakte, neu gebildete, die gewünschten Mutationen enthaltende Plasmid-DNA, die versetzt liegende Nicks in beiden DNA-Strängen enthält. Diese Plasmide wurden in *E. coli* XL1-Blue transformiert.

Bei der Synthese der einzelnen Plasmide wurden die folgenden Primerpaare verwendet. Die Schmelzpunkte sind jeweils in Klammern angegeben: primer S202A (for) und primer S202A (rev) [$T_m = 82,0^\circ\text{C}$]; primer S226A (for) und primer S226A (rev) [$T_m = 84,2^\circ\text{C}$]; primer K123A (for) und primer K123A (rev) [$T_m = 82,4^\circ\text{C}$]; primer C200A (for) und primer C200A (rev) [$T_m = 82,8^\circ\text{C}$]; primer T221A (rev) und primer T221A (for) [$T_m = 83,4^\circ\text{C}$]. Die Sequenzen der eingesetzten Primerpaare sind Tabelle 4 (Material und Methoden 3.16) aufgeführt.

3.16 Synthetische Oligonukleotide

In Tabelle 4 sind alle verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech und Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) bezogen. Zur Berechnung der Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurde die folgende Formel verwendet: Schmelztemperatur (T_m) in $^\circ\text{C} = 69,3 + 0,41 \times [\text{GC - Gehalt in \%}] - 650 / [\text{Anzahl an Nukleotiden}]$.

Tabelle 4. Liste sämtlicher Oligonukleotide, die als DNA-Sonde, als Sequenzierprimer bzw. zur Synthese von Pam-Expressionsplasmiden eingesetzt worden sind.

Oligonukleotid	Sequenz von 5' nach 3'
DNA-Sonde:	
Sonde A (m)	AAC GTG CCG TTC CCG TAC GCC GAA ACC GAC GTG GCC GAC CTG CAG-Digoxygenin
Sequenzierprimer:	
T7 promotor primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7 terminator primer	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
T7TPwalk1	TGC AAG CGT TTG ATG GGA CG
T7TPwalk2	AAG ATC CTT GAT GCA GAG
T7TPwalk3	CCC GCT TCG TGA CCC AG
T7TPwalk4	ATC TCG ATG ACC TTC CAG
T7Tpwalk5	GCT GTT CGC TGC TGA AG
T7Tpwalk6	GGT CGA AGC CTG GGG CC
T7Tpwalk7	TGC CGG CTC GCT GGC CC

T7Tpwalk8	ATG CCG CCA CTG ATC G
SeN-3B-T7-1	GGC GAG CCG TGA TCC GGT AGT G
3' B-T7-2	CGT AGC TGC TGC CGA TCT CC
3' BIT7-3	AAC AGC AGG CGG ACA GC
3' B-T7-4	GGG GTT CCT GTG GGA TG
T7BGL	GAT ATA GGC GCC AGC AAC CG
T7BGL/1	AGA TCG CGG AAA ACT GTC G
Pa rev1	GCA TAG GCC ATC TCG ATC AG
Pa rev2	TTC AGC AGC GGT GTC TGC AG
Pa rev3	GCG TTG ATG TTG TCC TTC AG
Pa for1	GCC GCC CAC CAG CTT GAT GC
Primer zur Synthese der Pam-Varianten:	
002 Primer 5'	CCA AGC CGC CAT ATG CGC CCG TCC TTG
002 Primer 3'	GCG TGG ATC CTC ACG GCT CGC CAG CGT CGA TCA
003 Primer 3'	TCA CGG CTC GCC AGC GTC GAT C
004 Primer 3'	TAT CCG CTC GAG ACG ACC TTC GAT CGG CTC GCC AGC GTC GAT CAG
005 Primer 5'	CCC AGC GCG CAT ATG GCC GAA CCT GCG AGC
010 Primer 5'	GCG GCC GAA CAT ATG AGC CGC AAC GTG CCG
primer S202A (for)	GCC ATT CGC CGT GTG GTG CCA GCA GCG GCA GCG CGG
primer S202A (rev)	CCG CGC TGC CGC TGC TGG CAC CAC ACG GCG AAT GGC
primer S226A (for)	CGG CAC CGA AAC CGA CGG CGC CAT CGT CTG CCC GGC GGC
primer S226A (rev)	GCC GCC GGG CAG ACG ATG GCG CCG TCG GTT TCG GTG CCG
Primer zur Synthese der Pam-Varianten mit Aminosäureaustausch:	
primer K123A (for)	CGG CAT CCC GCT GCT GCT GGC GGA CAA CAT CAA CGC CGC GC
primer K123A (rev)	GCG CGG CGT TGA TGT TGT CCG CCA GCA GCA GCG GGA TGC CG
primer C200A (for)	CGC ATC AGC CAT TCG CCG GCG GGT TCC AGC AGC GGC AGC GCG G
primer C200A (rev)	CCG CGC TGC CGC TGC TGG AAC CCG CCG GCG AAT GGC TGA TGC G
primer T221A (for)	GGC CAG CGT GGC GAT CGG CGC CGA AAC CGA CGG CAG CAT CG
primer T221A (rev)	CGA TGC TGC CGT CGG TTT CGG CGC CGA TCG CCA CGC TGG CC

3.17 Plasmidvektoren

In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidvektoren aufgeführt. Für die in der vorliegenden Arbeit erzeugten Plasmide wird die Herstellung beschrieben und, im Fall von Expressionsplasmiden, das Genprodukt.

Tabelle 5. Plasmidvektoren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. In der Beschreibung wird der Verwendungszweck und, im Fall von Expressionsplasmiden, das Genprodukt angegeben.

Plasmide	Beschreibung
Kommerziell erhältliche Plasmidvektoren:	
pET-15b(+)	Funktion: Klonierungsvektor (Novagen); Einsatz zur Erzeugung der partiellen Genbank.
pET-11a	Funktion: Expressionsvektor (Novagen)
pET-21a(+)	Funktion: Expressionsvektor (Novagen)
pET-9a	Funktion: Expressionsvektor (Novagen)
Klonierungsvektoren:	
pKlon82	Plasmidvektor pET-15b(+) mit einem inserierten 6,9 kb- <i>Bgl</i> III-Fragment genomischer DNA aus <i>S. maltophilia</i> , ligiert über die <i>Bgl</i> III-Restriktionsschnittstelle
Expressionsvektoren:	
pEK02	Genprodukt: Pam-Variante 2; mit Signalpeptid Herstellung des Expressionskonstruktes: Das PCR-Produkt (Primerpaar: 002 Primer 5'/002 Primer 3'; Template: pKlon82) wurde über die Restriktionsschnittstellen <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI in den Plasmidvektor pET-11a kloniert.
pEK06	Genprodukt: Pam-Variante 6; ohne Signalpeptid; mit His ₆ Tag Herstellung des Expressionskonstruktes: Das PCR-Produkt (Primerpaar: 005 Primer 5'/004 Primer 3'; Template: pKlon82) wurde über die Restriktionsschnittstellen <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I in den Plasmidvektor pET-21a(+) kloniert.
pEK09	Genprodukt: Pam-Variante 2; mit Signalpeptid Herstellung des Expressionskonstruktes: Das PCR-Produkt (Primerpaar: 002 Primer 5'/002 Primer 3'; Template: pKlon82) wurde über die Restriktionsschnittstellen <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI in den Plasmidvektor pET-9a kloniert. Dieser Vektor besitzt als Marker eine Kanamycin- statt, wie üblich, eine Ampicillin-Resistenz. Mit diesem Vektor wurden die Untersuchungen zur <i>In-vivo</i> -Aktivität von Pam gegenüber β -Lactam-

	antibiotika durchgeführt.
pEK10	Genprodukt: Pam-Variante 10 ohne Signalpeptid Herstellung des Expressionskonstruktes: Das PCR-Produkt (Primerpaar: 010 Primer 5'/002 Primer 3'; Template: pKlon82) wurde über die Restriktionsschnittstellen <i>NdeI/BamHI</i> in den Plasmidvektor pET-11a kloniert.
pPAM S202A	Genprodukt: Pam-Variante S202A (Pam-Variante 6 mit Aminosäureaustausch S202A)
pPAM S226A	Genprodukt: Pam-Variante S226A (Pam-Variante 6 mit Aminosäureaustausch S226A)
pPAM K123A	Genprodukt: Pam-Variante K123A (Pam-Variante 6 mit Aminosäureaustausch K123A)
pPAM C200A	Genprodukt: Pam-Variante C200A (Pam-Variante 6 mit Aminosäureaustausch C200A)
pPAM T221A	Genprodukt: Pam-Variante T221A (Pam-Variante 6 mit Aminosäureaustausch T221A)

3.18 Datenbank-Zugangsnummer der Nukleotidsequenz

Die Nukleotidsequenz des aus *S. maltophilia* DSM 9181 stammenden 6,9 kb-*BglIII*-DNA-Fragments (siehe Anhang) wurde in der EMBL/GenBank unter der Datenbank-Zugangsnummer AJ414049 hinterlegt. Das DNA-Fragment enthält die folgenden Gene: 5'-Bereich des Gens der Malatdehydrogenase (*mdh*), das Gen der Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase (*ppi*), das Gen des Translationselongationsfaktors G (*efg*), das Gen eines hypothetischen löslichen Proteins, das Gen der Peptidamidase (*pam*) und das Gen eines hypothetischen Membranproteins.

4. Biochemische Methoden

4.1 Bestimmung der Peptidamidaseaktivität

4.1.1 Umsetzung der Amidsubstrate

Die Standardreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 500 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM Ala-Phe-NH₂ (aus einer 100 mM-Stammlösung 1/10) und 100 µl Enzymlösung. Die Reaktion wurde in Gegenwart von 1 mg/ml BSA durchgeführt, um die spontane Inaktivierung des Enzyms in

Gegenwart niedriger Proteinkonzentrationen zu unterbinden. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Hitzefällung des Enzyms bei 95°C für 5 Minuten abgestoppt. Die Inkubation bei 30 bzw. 95°C wurde in Thermoblöcken der Firma Eppendorf durchgeführt. Die Enzymkonzentration wurde so eingestellt, dass etwa 10% des Eduktes umgesetzt wurden. Auf diese Weise sollte gewährleistet werden, dass die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bestimmt wurde. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (10 min, 14000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Überstand wurden dann Edukt und Produkt per HPLC-Analytik nachgewiesen (Material und Methoden 4.1.2) oder es erfolgte die Bestimmung des gebildeten Ammoniums (Material und Methoden 4.1.3).

4.1.2 HPLC-Analytik

Die Peptidamidase-Aktivität für das Substrat Ala-Phe-NH₂ wurde per HPLC-Analytik bestimmt. Es wurde eine Hypersil ODS-Säule (250 × 4,6 mm, 5 µm) mit einer Hypersil ODS-Vorsäule (10 × 4,0 mm, 5 µm) verwendet (Thermo Hypersil, Kleinostheim, Deutschland). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Substrat (Ala-Phe-NH₂) und Produkt (Ala-Phe-OH) wurden im isokratischen Gradienten bei RT getrennt, die Detektion erfolgte bei 254 nm. Das Laufmittel hatte die Zusammensetzung 90% (v/v) Bidest H₂O, 10% (v/v) Acetonitril und 0,1% (v/v) TFA. Die Retentionszeit für Ala-Phe-NH₂ beträgt unter diesen Bedingungen ca. 5,5 min, die für Ala-Phe-OH ca. 9,10 min.

4.1.3 Enzymatische Ammoniumbestimmung

Die Peptidamidase-Aktivitäten für alle anderen Substrate sowie das pH-Optimum und Temperaturoptimum mit Ala-Phe-NH₂ als Substrat und die kinetischen Daten für L-Phe-NH₂, D-Phe-NH₂ und Gly-Tyr-NH₂ wurden über die Menge des bei der jeweiligen Reaktion freigesetzten Ammoniums ermittelt (Bergmeyer und Beutler, 1985).

Das im Überstand befindliche Ammonium wurde zu diesem Zweck mit im Überschuss vorhandenen 2-Oxoglutarat und NADH durch die Glutamatdehydrogenase zu Glutamat, NAD⁺ und H₂O umgesetzt. Die sogenannte reduktive Aminierung verläuft nach der folgenden Summenformel:



Das Gleichgewicht der Reaktion liegt stark auf der rechten Seite, so dass die Reaktion praktisch vollständig abläuft. Durch die photometrische Bestimmung der Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm kann so indirekt die Peptidamidase-Aktivität bestimmt werden (Photometer: UV-160A von Shimadzu).

Die Reaktion wurde bei RT in Plastikkuvetten durchgeführt. Hierzu wurden 500 µl TEA-Puffer, 50 µl NADH-Lösung, 100 µl Probelösung und 950 µl H₂O in eine Küvette gegeben und durchmischt. Nach 5 min Inkubation wurde die Extinktion (E1) bei 340 nm gemessen. Anschließend wurden 10 µl GluDH-Lösung zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde wiederum durchmischt. Nach 30 min wurde erneut die Extinktion (E2) gemessen. Die Änderung der Extinktion ist proportional zur umgesetzten Menge NADH und damit auch zur anfänglichen Ammoniumkonzentration in der Probelösung (Lamber-Beersches-Gesetz: $\Delta E = d \times c \times \epsilon$). d ist die Schichtdicke, c die Konzentration und ϵ der Extinktionskoeffizient. Mit Hilfe von NH₄Cl-Lösungen der Konzentrationen 0 bis 4,0 mM wurde zunächst eine Eichgerade erstellt. Hierbei wurde ΔE gegen c aufgetragen.

Lösungen und Puffer:

- TEA-Puffer: 9,3 g TEA-HCl, 95 mg ADP-Natriumsalz und 670 mg 2-Oxoglutarat (Natriumsalz) wurden in 70 ml H₂O gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit NaOH (6 M) auf 8,0 eingestellt und das Volumen mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung kann bis zu zwei Monate bei 4°C gelagert werden.
- NADH-Lösung: 30 mg NADH (Natriumsalz) und 60 mg NaHCO₃ wurden in 6 ml H₂O gelöst. Die Lösung muss jeweils frisch angesetzt und auf Eis gelagert werden.
- GluDH-Lösung: 320 mg GluDH aus Rinderleber (Fluka/Sigma-Aldrich) wurde in 4 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 gelöst und sterilfiltriert. Anschließend wurden 4 ml autoklaviertes 100%iges Glycerin zugesetzt und gut gemischt. Die GluDH-Lösung kann bis zu zwei Monate bei 4°C gelagert werden.

4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wurde photometrisch nach Bradford (1976) bestimmt. Die Eichkurve wurde mit BSA erstellt.

4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde mit einer NuPAGE-Gelelektrophoreseeinheit und NuPAGE-Bis-Tris-Gelen von Invitrogen in MES-Puffer gemäß der Bedienungsanleitung durchgeführt. Als Proteinlängenstandard wurden Mark 12 bzw. Multimark verwendet (beide von Invitrogen). Für die Coomassie-Färbung wurde SimpleBlue-SafeStain von Invitrogen verwendet. Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Blum et al. (1987) durchgeführt.

4.4 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde in einer Elektrophoresekammer mit Polyacrylamidgelen (pH 3-10) von Serva gemäß der Anleitung durchgeführt. Als Standard wurde der Serva IEF Marker 3-10 verwendet: Trypsin-Inhibitor (Sojabohne), pI 4,5; β -Lactoglobulin (Kuhmilch), pI 5,15/5,3; Carboanhydrase (Rindererythrocyten), pI 6,0; Myoglobin (Pferd), pI 6,9/7,35; Lectin (*Lens culinaris*), pI 7,75/8,0/8,3.

4.5 Elektroblothing und Proteinsequenzierung

Proteinproben, die zuvor elektrophoretisch im Polyacrylamidgel aufgetrennt worden sind, wurden zur Sequenzierung mit der Elektroblothing-Methode auf eine PVDF-Membran (Immobilon P von Millipore) übertragen. Das Elektroblothing wurde mit einer Elektroblothing-Kammer von Invitrogen durchgeführt.

Die Sequenzanalyse wurde unter Verwendung des automatischen Pulsed-Liquid-Sequenziergerätes 477A der Firma Applied Biosystems nach der Methode von Edman und Begg (1967) durchgeführt. Die Identifizierung der Aminosäurephenylhydantoine wurde mit einem Online-HPLC-System (PTH analyser 120A) durchgeführt. Alle Chemikalien für die Sequenzanalyse wurden von Applied Biosystems bezogen.

4.6 Zellaufschluss und Reinigung der rekombinanten Peptidamidasen

Die Pam-Varianten, die einen C-terminalen His₆-Tag aufweisen, wurden per Affinitäts-Chromatographie über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt (Pam-Variante 6, Pam-S202A, Pam-S226A, Pam-K123A, Pam-C200A und Pam-T221A). Die Pam-Varianten ohne C-terminalen His₆-Tag (Pam-Variante 2 und Pam-Variante 10) wurden per Ionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose FF) aufgereinigt.

4.6.1 Reinigung mittels Affinitäts-Chromatographie

Eine 20%ige Zellsuspension wurde in Lysepuffer hergestellt. Anschließend wurden die Zellen für 10-30 min mit Ultraschall aufgeschlossen (Sonopuls HD60 von Bandelin; Stärke 100% und Puls 70). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 18000 Upm für 30 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand, der den zellfreien Rohextrakt enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt.

Die Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie wurde mit einer Ni-NTA-Superflow-Säule von Qiagen durchgeführt (3,0 × 10 cm, Volumen: 71 ml). Bevor der zellfreie Rohextrakt auf die Säule aufgetragen wurde, wurde diese mit Lysepuffer equilibriert. Die Flussrate betrug 3 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen und die gebundene Peptidamidase eluiert. Im nächsten Schritt wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie mit einer Sephadex G-25-Säule (5,8 × 49 cm, Volumen: 1295 ml; Amersham Pharmacia Biotech) mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 durchgeführt, um Imidazol abzutrennen und den Puffer zu wechseln. Die Aufkonzentrierung der Peptidamidaselösung wurde per Ultrafiltration durchgeführt (Membran mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa; Amicon Ultrafiltrationszelle von Millipore).

Lösungen und Puffer:

- Lysepuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
- Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
- Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0

4.6.2 Reinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie

In 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 wurde eine 20%ige (w/v) Zellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden anschließend für 10-30 min per Ultraschall aufgeschlossen (Sonopuls HD60 von Bandelin; Stärke 100% und Puls 70). Nach der Zentrifugation (18000 Upm, 30 min, 4°C) wurde der Überstand (zellfreier Rohextrakt) in ein neues Gefäß überführt.

Eine Q-Sepharose FF-Säule (2,6 × 20 cm, Volumen: 106 ml) von Amersham Pharmacia Biotech wurde zunächst mit 500 ml 50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, pH 8,0 equilibriert, die Flussrate betrug 5 ml/min. Anschließend wurde der zellfreie Rohextrakt auf die Säule aufgetragen. Ein linearer Elutionsgradient mit der Endkonzentration 50 mM Tris-HCl, 200 mM KCl, pH 8,0 wurde über ein Volumen von 450 ml angelegt. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von je 10 ml gesammelt. In den einzelnen Fraktionen wurde die Peptid-

amidase-Aktivität bestimmt. Zusätzlich wurden die Fraktionen per SDS-PAGE analysiert. Fraktionen, die eine hohe Peptidamidase-Aktivität und lediglich die Proteinbande der Peptidamidase im SDS-Gel aufwiesen, wurden vereint und per Ultrafiltration aufkonzentriert (Membran mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa; Amicon Ultrafiltrationszelle von Millipore). Während der Ultrafiltration wurde der Tris-HCl-Puffer durch 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 ersetzt.

4.7 Lagerung der Peptidamidase

Die Lagerung der verschiedenen rekombinanten Peptidamidasen erfolgte bei 4°C in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 bei einer Proteinkonzentration > 1 mg/ml.

4.8 Substratspektrum

Die relative Aktivität der Peptidamidase-Variante 6 gegenüber verschiedenen Carbonsäureamiden, D- und L-Aminosäureamiden, Aminosäureamidderivaten, Peptidamiden und Peptidamidderivaten wurde bei einer Substratkonzentration von 10 mM unter Standardbedingungen bestimmt. Substrate, die in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 nicht löslich sind (Z-Gly-Tyr-NH₂, Ac-Phe-NH₂ und Phe-Leu-NH₂), wurden zunächst in der Konzentration 100 mM in 50% (v/v) DMF und 50% (v/v) 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 gelöst. Anschließend wurde die Substratstammlösung im Verhältnis 1/10 zum Reaktionsansatz gegeben. Die Endkonzentration des jeweiligen Substrates betrug 10 mM und der Anteil an DMF 5%.

4.9 Substratkinetiken

Zur kinetischen Charakterisierung der Peptidamidase-Variante 6 wurden für die folgenden Substrate Kinetiken bestimmt: Ala-Phe-NH₂, L-Phe-NH₂, D-Phe-NH₂ und Gly-Tyr-NH₂. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden unter Standardbedingungen bei Substratkonzentrationen im Bereich 1,0 bis 50,0 mM gemessen. Um sicherzustellen, dass die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gemessen wird, wurde die Enzymkonzentration so eingestellt, dass jeweils weniger als 10% des Eduktes umgesetzt wurden.

Die Berechnung der kinetischen Parameter der einzelnen enzymkatalysierten Reaktionen erfolgte nach einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik [$v = (v_{\max} \times S)/(K_M + S)$] bzw. nach

der Michaelis-Menten-Kinetik für kompetitive Inhibition [$v = (v_{\max} \times S) / \{(1 + I/K_I) \times K_M + S\}$]. Hierbei ist v die Reaktionsgeschwindigkeit, v_{\max} ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, S ist die Substratkonzentration und K_M ist die Michaelis-Menten-Konstante, I ist die Inhibitor-Konzentration und K_I ist die Inhibitionskonstante.

Die Modellierung der kinetischen Daten wurde mit dem Programm Scientist (MicroMath Scientific Software) vorgenommen.

4.10 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Peptidamidase-Variante 6 wurde mit dem Substrat Ala-Phe-NH₂ in dem Bereich 20 bis 75°C bestimmt. Die Reaktion wurde, abgesehen von der Temperatur, unter Standardbedingungen durchgeführt.

4.11 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH-Wert

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Peptidamidase-Variante 6 vom pH-Wert wurden verschiedene Reaktionspuffer eingesetzt: 0,1 M Zitronensäure/Na₂HPO₄-Puffer (pH-Bereich 1,9 bis 7,8); 0,1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan/-HCl-Puffer (pH-Bereich 7,7 bis 8,4); 0,1 M Glycin-NaCl/HCl-Puffer (pH-Bereich 8,7 bis 10,6) und 0,1 M Na₂CO₃/NaHCO₃-Puffer (pH-Bereich 7,7 bis 12,9). Da die Effizienz der Proteinfällung durch Hitze vom Reaktionspuffer abhängig ist, wurden die Reaktionen hier statt dessen durch die Abtrennung des Enzyms per Ultrafiltration gestoppt. Es wurden Microcons der Firma Millipore mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa verwendet, die Abtrennung erfolgte durch Zentrifugation. Abgesehen vom Reaktionspuffer und der Abstoppmethode lief die Reaktion unter Standardbedingungen ab.

4.12 Inhibitionsstudien

Der Einfluss unterschiedlicher Protease-Inhibitoren auf die Aktivität der Pam-Variante 6 wurde untersucht. Als Substrat wurde 20 mM Ala-Phe-NH₂ eingesetzt. Die Reaktion wurde unter Standardbedingungen durchgeführt mit dem Unterschied, dass der jeweilige Inhibitor zusätzlich in den Reaktionsansatz gegeben wurde. Insgesamt wurden 15 verschiedene Inhibitoren getestet: Ac-Leu-Val-Phe-Aldehyd (Bachem), Antipaindihydrochlorid*, Aprotinin*, Bestatin*, Chymostatin*, 3,4-Dichloroisocoumarine (DCI), Diisopropylfluorophosphat

(DFP), E-64*, EDTA-Na₂*, Iodacetamid, Leupeptin*, Pefabloc SC*, Pepstatin*, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phosphoramidon* und Methylarachidonylfluorophosphonat (MAFP) [Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA]. Die mit einem * gekennzeichneten Inhibitoren wurden von der Firma Roche Diagnostics bezogen.

4.13 Test auf proteolytische Aktivität

Bei dem Test auf proteolytische Aktivität wurde Resorufin-markiertes Casein mit der Peptidamidase inkubiert. In Gegenwart eines Enzyms mit proteolytischer Aktivität werden Resorufin-markierte Peptide aus dem Casein freigesetzt. Anschließend wird das Casein mit Trichloroessigsäure aus dem Reaktionsansatz gefällt. Markierte Peptide präzipitieren unter diesen Bedingungen nicht. Nach der Zentrifugation können markierte Peptide photometrisch bei 574 nm im Überstand nachgewiesen werden. Der Test wurde mit dem Universellen-Protease-Substrat (Roche Diagnostics) durchgeführt.

4.14 Test auf β -Lactamaseaktivität (*in vitro* und *in vivo*)

4.14.1 *In-vitro*-Assay

Für die *In-vitro*-Überprüfung der β -Lactamaseaktivität der Peptidamidase wurde in vier Ansätzen das β -Lactamantibiotikum Ampicillin (0,625; 1,250; 1,875; 2,500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in Gegenwart von Pam-Variante 6 (0,8 mg/ml) für 5 h bei 30°C in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 inkubiert. In Negativkontrollen wurde Ampicillin in den entsprechenden Konzentrationen ohne Pam inkubiert. Im Anschluss an die potentiell erfolgte *In-vitro*-Umsetzung wurde die antibiotische Wirkung des Ampicillins *in vivo* im Plattendiffusionstest überprüft. Als Testorganismus wurde der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) eingesetzt. Dieser ist, sofern er kein Resistenzplasmid trägt, empfindlich gegenüber Ampicillin.

Die Testplättchen wurden mit jeweils 40 μl aus den acht Reaktionsansätzen getränkt. In den Plättchen befanden sich jeweils 25, 50, 75 bzw. 100 μg Ampicillin. Anschließend wurden die getränkten Plättchen auf LB-Agarplatten gesetzt, auf denen unmittelbar zuvor *E. coli* BL21 (DE3) aus einer Flüssigkultur ausgestrichen worden ist. Die Platten wurden für 18 h bei 37°C inkubiert. Nach 18 h sollte sich, abgesehen von den Hemmhofbereichen, ein Bakterienrasen gebildet haben. Die Durchmesser der Hemmhöfe um die einzelnen Testplättchen wurden vermessen. Bei einer erfolgten *In-vitro*-Inaktivierung des Ampicillins durch Pam sollten die

Hemmhofdurchmesser der Plättchen, die das mit Pam inkubierte Ampicillin enthalten, kleinere Durchmesser als die Negativkontrolle aufweisen.

In diesem Versuch wurde die *In-vitro*-Inaktivierung von Ampicillin durch Pam untersucht. Da im zweiten Schritt die antibiotische Aktivität von Ampicillin aber *in vivo* getestet wird, kann keine Aussage darüber getroffen werden, auf welchem Weg diese Inaktivierung ggf. erfolgt ist.

4.14.2 *In-vivo*-Assay

Bei der *In-vivo*-Überprüfung der β -Lactamaseaktivität der Peptidamidase wurde überprüft, ob *pam*, wenn es in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) überführt und exprimiert wird, diesem Resistenz gegenüber verschiedenen β -Lactamantibiotika verleiht. Die folgenden Antibiotika wurden getestet: Ampicillin, Amoxicillin/Clavulan, Aztreonam, Ceftazidim, Cefotaxim, Cefsulodin, Ceftriaxon, Imipenem, Meropenem, Penicillin G und Piperacillin. Sämtliche Antibiotika wurden von der Firma Oxoid (Wesel, Deutschland) bezogen.

Damit die potentielle β -Lactamase Pam an ihren Wirkungsort, das Periplasma, gelangt, wurde das Gen mit Signalpeptid exprimiert. Zunächst wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das nicht, wie üblich, eine Ampicillinresistenz als Markergen trägt, sondern eine Kanamycinresistenz. Kanamycin ist ein Aminoglycosid-Antibiotikum. Eine Ampicillinresistenz als Markergen hätte hier mit dem Assay interferiert. In einer PCR mit den Primern 5'-Primer 002 und 3'-Primer 002 wurden die Restriktionsschnittstellen *NdeI* bzw. *BamHI* an den Enden des Gens eingeführt. Die Ligation in den Expressionsvektor pET-9a (Novagen), der ein Kanamycinresistenzgen als Marker trägt, erfolgte über die besagten Restriktionsschnittstellen. Das erzeugte Expressionsplasmid heißt pEK09.

pEK09 wurde in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Das Expressionssystem pEK09/*E. coli* BL21 (DE3) wies in Abwesenheit des Induktors IPTG eine gewisse Basislevelexpression von *pam* auf (Nachweis per Aktivitätsassay, Ergebnisse nicht gezeigt). Es wurde davon ausgegangen, dass bei der Basislevelexpression von *pam* ausreichend Peptidamidase im Periplasma vorlag, um ggf. im *In-vivo*-Antibiotikaresistenztest einen sichtbaren Effekt zu erzielen. Als Negativkontrolle diente pET-9a/*E. coli* BL21 (DE3). Die jeweilige Flüssigkultur wurde auf einer LB-Platte ausgestrichen und anschließend direkt mit Antibiotika-Plättchen (Oxoid) besetzt. Die Platten wurden für 16 h bei 37°C inkubiert. Die Hemmhofdurchmesser der identischen Testplättchen bei den beiden Stämmen pET-9a/*E. coli* BL21 (DE3) und pEK09/*E. coli* BL21 (DE3) wurden verglichen.

4.15 Bestimmung des nativen Molekulargewichts

Die Bestimmung des Molekulargewichts der Pam-Variante 6 wurde per Gelfiltrations-Chromatographie mit einer Sephadex G-200-Säule ($1,6 \times 61,5$ cm, Volumen: 123,65 ml) von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt (FPLC-Anlage: Liquid chromatography controller LCC-500 Plus, Amersham Pharmacia Biotech). Als Laufpuffer wurde 50 mM HEPES-NaOH, 0,5 M NaCl bei pH 7,6 verwendet. Zunächst wurde die Säule mit 1 l Laufpuffer equilibriert. Die Flussrate betrug 1 ml/min. 1 ml einer 2 mg/ml-Lösung der Pam-Variante 6 in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 wurde mit einer Spatelspitze Dextranblau versetzt und auf die Säule aufgetragen.

Zur Beschreibung des Elutionsverhaltens einer Substanz wird der K_{av} -Wert (coefficient of available volume) bestimmt. Dieser gibt den Volumenanteil von V_i an, der für die betrachtete Substanz zugänglich ist ($V_i = V_t - V_0$). V_0 ist das Elutionsvolumen von Dextranblau (zugängliches Volumen der Säule). V_t ist das Gesamtvolumen der Säule. Der K_{av} -Wert berechnet sich wie folgt: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$. V_e ist das Elutionsvolumen der betrachteten Substanz.

Als Kalibrierungsstandards wurden Ribonuklease A (14 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa), BSA (67 kDa), Aldolase (158 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (660 kDa) eingesetzt.

Es wurde K_{av} gegen $\log M_w$ (Molekulargewicht) aufgetragen, zwischen den Größen besteht ein linearer Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient (R^2) beträgt 0,994.

4.16 Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen

Der Anteil an freien Sulfhydrylgruppen in Proteinen kann mit Ellmans-Reagenz [5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)] quantifiziert werden. Bei der Reaktion des Ellmans-Reagenz mit freien Sulfhydrylgruppen wird Thionitrobenzoat gebildet, das im Gegensatz zum Edukt ein Absorptionsmaximum bei 412 nm aufweist (Chandec und Leonard, 1995).

Zunächst wurde eine Eichkurve aufgenommen. Die Cysteinestammlösung wurde entsprechend verdünnt (0,00 mM, 0,15 mM, 0,30 mM, 0,60 mM, 0,90 mM, 1,20 mM und 1,5 mM) und in den Assay eingesetzt.

250 μ l Probelösung wurden in ein Reagenzglas gegeben, im Folgenden wurden 50 μ l Ellmans-Reagenz-Lösung sowie 2,5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0 zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 412 nm gemessen. Die ΔE ergibt sich aus der Differenz der Extinktion der jeweiligen Probe und des Nullwertes. ΔE wurde in einem Graphen gegen die Cysteinkonzentration

aufgetragen, zwischen den Größen besteht ein linearer Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient (R^2) hat den Wert 0,937.

Lösungen und Puffer:

- 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0
- Cysteinestammlösung: 1,5 mM Cystein in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0
- Ellmans-Reagenz-Lösung: 4 mg Ellmans-Reagenz in 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0

5. Kristallisation der Peptidamidase

Die Kristallisation eines Proteins ist Voraussetzung für die Röntgenstrukturanalyse, mit deren Hilfe die dreidimensionale Struktur von Molekülen aufgeklärt werden kann.

Die Kristallisation wurde in Zusammenarbeit mit Priv.-Doz. Dr. Granzin, Dr. Labahn und Prof. Dr. Büldt vom Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

5.1 Proteinkristallisation

Zu Beginn der Kristallisationsexperimente sollte das Protein in größeren Mengen in einer Konzentration im Bereich 10-25 mg/ml zur Verfügung stehen und in möglichst reiner Form (> 95%) vorliegen. Beim Kristallisationsprozess gehen Proteinmoleküle aus einer übersättigten Lösung in den festen Phasenzustand über. Die Übersättigung wird durch die Anwesenheit eines Fällungsmittels erreicht, das die Proteinmoleküle kontinuierlich aus der Lösung verdrängt. Die Konzentration in dem Ansatz, der sowohl gelöstes Protein als auch Fällungsmittel enthält, wird dabei langsam durch isotherme Dampfdiffusion von Wasser aus der Lösung in ein Reservoir mit höherer Fällungsmittelkonzentration erhöht. Als Fällungsmittel werden z. B. Salze und Polyethylenglycole verwendet. Weitere wichtige Parameter beim Kristallisationsprozess sind der pH-Wert und die Temperatur.

Zur langsamen Erhöhung der Konzentrationen von Protein und Fällungsmittel wurde in der vorliegenden Arbeit die Dampfdiffusions-Methode angewendet. Die Reaktion läuft in einer abgeschlossenen Kammer ab, die zu etwa einem Drittel mit 1 ml Reservoirlösung gefüllt ist.

Die ebenfalls in der Kammer befindliche Mikrobrücke, die die Reservoirlösung überragt, weist an ihrer Oberseite eine napfförmige Vertiefung auf. In dieser napfförmigen Vertiefung befindet sich ein aus 2-20 µl bestehender Tropfen, der aus einem Gemisch der Proteinlösung und Kristallisationspuffer (1/1) besteht.

Der Tropfen enthält eine niedrigere Salzkonzentration als die Reservoirlösung. Aus diesem Grund besteht über dem Tropfen ein höherer Dampfdruck als über dem Reservoir. Per Dampfdiffusion treten deshalb effektiv Wassermoleküle aus dem Tropfen über die Gasphase ins Reservoir über. Während dieses Prozesses, der auf den Gleichgewichtszustand zuläuft, steigt die Protein- und Reagenzkonzentration im Tropfen langsam an. Sobald die Sättigungskonzentration des gelösten Proteins im Tropfen überschritten wird, kann das Protein präzipitieren bzw. Kristalle ausbilden.

Die Kristallisationsexperimente wurden in mit Klebeband abgedichteten Cryschem-Platten bzw. in Kristallisationsplatten mit separaten Mikrobrücken, die mit Deckgläschen verschlossen und mit Siliconpaste abgedichtet wurden, durchgeführt. Es wurden die Kristallisationspuffer aus den Crystal Screen-Kits 1 und 2 (Cudney et al., 1994 und Jancarik et al., 1991) verwendet. Das gesamte Material wurde von Hampton Research (Laguna Niguel, CA, USA) bezogen.

5.2 Inkubation der Pam-Kristalle mit Inhibitoren

Kristalle der Peptidamidase wurden mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert, deren kompetitive inhibitorische Wirkung gegenüber der Peptidamidase zuvor im Aktivitätsassay nachgewiesen worden ist. U.a. wurden Chymostatin und Pefablock SC jeweils in den Konzentrationen 10 mM zugesetzt. Im Idealfall diffundiert der Inhibitor durch die Wasserkanäle im Kristall und bindet am frei zugänglichen aktiven Zentrum. Die Kristalle wurden mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht.

Ziel dieses Experimentes war es, die Struktur eines Enzym-Inhibitor-Komplexes zu bestimmen. Die Analyse der Enzym-Inhibitor-Struktur erlaubt Rückschlüsse auf die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und damit auf Aspekte des Katalysemechanismus.

6. Strukturaufklärung der Peptidamidase

Die Röntgenstrukturanalyse ermöglicht es, die räumliche Anordnung von Atomen kristalliner Festkörper zu bestimmen. Die Wellenlängen der verwendeten Röntgenstrahlung hat die gleiche Größenordnung wie atomare Abstände (10^{-10} m).

Das Röntgenexperiment beruht auf der Beugung (Diffraktion) der Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle von Atomen im Kristall und der konstruktiven Interferenz des gebeugten Strahls. Aus der Position und der Intensität der Interferenzmaxima kann, bei Lösung des Phasenproblems, die räumliche Anordnung der Atome in der Elementarzelle bestimmt werden.

Die Strukturaufklärung wurde von Priv.-Doz. Dr. Granzin, Dr. Labahn und Prof. Dr. Büldt vom Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Forschungszentrum Jülich durchgeführt. Einzelne Messungen fanden am ESRF (Beamline ID14-1) in Grenoble, Frankreich statt.

6.1 Röntgenstrukturanalyse

Kristalle bestehen aus einer Vielzahl von Elementarzellen, die durch wiederholte Translation entlang der Gitterachsen aufgebaut sind. Die Elementarzelle wird durch die sogenannte asymmetrische Einheit beschrieben.

Mit Hilfe von Symmetrieoperationen kann aus der asymmetrischen Einheit die Elementarzelle rekonstruiert werden. Die Kombination aus Gittertyp und Symmetrieoperation ergibt eine Raumgruppe. Von den theoretisch möglichen 230 Raumgruppen treten bei Proteinkristallen nur 65 auf. Die Ursache hierfür ist, dass Proteine asymmetrische C-Atome besitzen und deshalb die Symmetrieoperationen Spiegelung und Inversion nicht erlaubt sind.

Trifft ein Röntgenstrahl (Primärstrahl) auf einen Kristall, so durchquert der größte Teil von ihm den Kristall unverändert. Ein Teil allerdings wechselwirkt mit der Elektronenhülle der Atome im Kristall. Die Elektronen geraten dadurch in Resonanzschwingungen und werden so selber zum Sender von Röntgenstrahlen (Sekundärstrahlung). Da sich die Atome in einer regelmäßigen, periodisch sich wiederholenden räumlichen Anordnung im Kristallgitter befinden, kommt es zur Interferenz der von den Atomen emittierten Sekundärstrahlung. Meist führt diese Interferenz zur Auslöschung, unter bestimmten Bedingungen tritt aber eine konstruktive Interferenz auf, die im Diffraktionsmuster ein Beugungsmaximum erzeugt. Die Entstehung der Beugungsmaxima wird geometrisch als Reflexion der einfallenden Wellen an den Netzebenen des Kristalls interpretiert. Wegen der Periodizität der Anordnung gehört zu jeder Netzebene eine Schar paralleler äquidistanter Netzebenen, die Netzebenen-schar.

Trifft der Primärstrahl in einem bestimmten Einfallswinkel (Braggwinkel) auf eine Netzebenenschar, so wird ein Teil der Strahlung derart gebeugt, dass die Beziehung zwischen dem Beugungswinkel Θ , der Wellenlänge λ des Röntgenstrahls und dem Netzebenenabstand d die Braggsche Gleichung oder Reflexionsbedingung erfüllt: $n \times \lambda = 2d \times \sin \Theta$. Nur wenn die Braggsche Gleichung erfüllt ist, kommt es zu einer konstruktiven Interferenz, da die an den einzelnen Netzebenen gebeugten Primärstrahlen Sekundärstrahlen erzeugen, die sich alle in Phase befinden. Aus dieser konstruktiven Interferenz gehen die Reflexe im Diffraktionsmuster hervor (Bragg-Reflexe).

Jeder Reflex auf dem Detektor entspricht einer bestimmten Netzebenenschar. Die Lage der Netzebenenscharen und die ihnen entsprechenden Reflexe werden durch Millersche Indizes (h,k,l) beschrieben, die sich aus den Schnittpunkten der Ebene mit den Kristallachsen ergeben. Die Werte von (h,k,l) entsprechen dabei den reziproken Schnittpunktkoordinaten. Der mathematische Zusammenhang zwischen den Positionen der Atome in der Einheitszelle und dem Diffraktionsmuster ist eine Fourier-Transformation.

Die an einem Kristall gebeugten Röntgenstrahlen enthalten die komplette Information über die dreidimensionale Anordnung der Atome in dem Kristall. Diese Information ist in den drei beschreibenden Größen einer elektromagnetischen Welle enthalten: Wellenlänge, Amplitude und Phase. Die Wellenlänge des Primärstrahls wird durch die Beugung am Kristallgitter nicht verändert und ist somit bekannt. Die Amplitude bestimmt die relative Intensität des Sekundärstrahls und kann gemessen werden. Die Messung der Phase ist allerdings prinzipiell nicht möglich, wodurch ein entscheidender Teil der Informationen über die Anordnung der Atome im Kristall verloren geht.

Bevor sich aus dem Diffraktionsmuster die Elektronendichtekarte berechnen lässt, muss also das sog. Phasenproblem gelöst werden. Da für die einzelnen Reflexe die Intensitäten, nicht jedoch die Phasen bekannt sind, kann die Struktur nicht ohne weiteres aus dem Beugungsmuster abgeleitet werden. Ein Lösungsansatz ist die sog. Schweratom-Methode (Patterson-Verfahren). Diese beruht darauf, dass die Lage von Schweratomen in der Elementarzelle weitgehend die Phasen bestimmt. Enthält die zu untersuchende Verbindung selbst kein Schweratom, so kann dieses durch direkte Substitution eingeführt werden (isomorphe Substitution).

Die Proteinkristalle werden hierfür in eine Lösung transferiert, die ein Atom oder Ion mit hoher Massenzahl enthält. Die Schweratomverbindungen diffundieren in den Kristall und binden bevorzugt an der Proteinoberfläche. Je nach den chemischen Eigenschaften des Metallions oder der Metallverbindung bilden sie mit dem Protein eine kovalente Verbindung

oder eine koordinative Bindung. Durch die größere Anzahl an Elektronen streuen Schweratome Röntgenstrahlen viel stärker als die in den Aminosäuren enthaltenen Atome. Dabei ist wichtig, dass das Schweratom keine Veränderung an der Proteinstruktur oder der Packung der Proteinmoleküle im Kristall bewirkt, d.h. die schweratommodifizierten Derivatkristalle müssen isomorph zu den nativen Kristallen sein. Die Reflexe eines isomorphen Derivatkristalls liegen somit an identischen Positionen wie im nativen Kristall. Die Reflexe unterscheiden sich allerdings in ihren relativen Intensitäten. Anhand der Intensitätsunterschiede der Reflexe zwischen dem nativen Kristall und einem isomorphen Derivatkristall kann die Position der Schweratome in der Kristallzelle bestimmt werden.

6.2 Datensammlung

Die Messungen wurden bei 100 K durchgeführt. Die Datensätze des nativen Proteinkristalls und der derivatisierten Proteinkristalle wurden mit Synchrotron-Röntgenstrahlung an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Frankreich, Beamline ID14-1) und mit einem Drehanoden-Röntngenerator (Enraf-Nonius FR571, 40 kV und 50 mA) auf einem MAR CCD- bzw. einem MAR Image-Plate-Detektor aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen MOSFLM (Leslie, 1992) und SCALA/TRUNCATE des CCP4-Programm-Packets (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994).

6.3 Strukturaufklärung und Verfeinerung

Die native Struktur wurde durch multiplen isomorphen Ersatz mit anomaler Streuung (MIRAS) aufgeklärt (Schweratomderivate). Die röntgenkristallographischen Daten sind in Tabelle 11 (Ergebnisse 7.1) aufgeführt. Die Position der Schweratomlagen wurde mit Hilfe der Differenz-Patterson-Synthese, ihre Ursprungskorrelation mit Kreuz-Differenz-Fourier bestimmt. Ausgehend von den Schweratompositionen wurden die nichtkristallographischen Symmetrieoperatoren (NCS) ermittelt. Zur Verfeinerung der Schweratomlagen und der Berechnung der Phasen bis 2,3 Å wurde das Programm MLPHARE eingesetzt (Collaborative Computational Project, 1994). Die erste, auf den Schweratomstrukturphasen basierende Elektronendichte wurde unter Verwendung von Dichtemodifikationstechniken verfeinert (Collaborative Computational Project, 1994), die Hauptkette wurde unter Einsatz des Grafikprogramms O gebaut (Jones et al., 1991). Hierbei führte der Modellbau zu dem gleichen Ergebnis wie die automatische Interpretation der Elektronendichte unter Verwendung von

ARP/wARP (Lamzin und Wilson, 1993). Die weitere Verfeinerung der Struktur wurde mit dem Programm CNS unter Berücksichtigung der nichtkristallographischen Symmetrie durchgeführt.

Für den Amidase-Chymostatin-Komplex (Auflösung: 1,8 Å) wurde in der Verfeinerung die native Struktur (Auflösung: 1,4 Å) als Startmodell verwendet. Die erste Differenz-Fourier-Elektronendichtekarte zeigte deutlich die Position des Liganden (Abbildung 30, Ergebnisse 7.2). Das analysierte Protein ist die Pam-Variante 6, die kein Signalpeptid (Aminosäurereste 1-37) enthält.

Der Ramachandranplot wurde mit PROCHECK (Collaborative Computational Project, 1994) generiert und zeigt, dass 89% der Aminosäurereste in der hauptsächlich favorisierten Region liegen. Alle anderen Reste befinden sich in der zusätzlich erlaubten Region, bis auf Ser-202, das in einer Schleife liegt und *cis*-Konfiguration aufweist. Die Abbildungen wurden mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und Raster3D (Merrit und Bacon, 1997) erzeugt.

6.4 Koordinaten

Die Koordinaten werden in der Proteindatenbank hinterlegt, sobald die Strukturdaten der Peptidamidase veröffentlicht worden sind (Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

7. Enzymatische Synthese von Peptidamiden mit Hilfe der Peptidamidase

Unter Standardbedingungen in wässriger Lösung liegt das Gleichgewicht der durch die Peptidamidase katalysierten Reaktion deutlich auf Seiten der Hydrolyseprodukte. Der teilweise bzw. vollständige Ersatz des Wassers durch organische Lösungsmittel oder ionische Flüssigkeiten führt zur Verlagerung des Reaktionsgleichgewichtes in Kondensationsrichtung. Sämtliche Versuche wurden mit der Pam-Variante 6 durchgeführt.

7.1 Peptidamidsynthese in organischen Lösungsmitteln

Die *S. maltophilia*-Peptidamidase wurde zunächst gegen Wasser dialysiert [Dialyseschläuche (2000 Da) von Roth] und anschließend lyophilisiert, bevor sie in trockener Form zum Einsatz kam.

Den Kondensationsversuchen vorangehend wurde der durch diese Behandlung hervorgerufene Aktivitätsverlust bei der Peptidamidase quantifiziert: 5 ml Peptidamidaselösung in 50 mM

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 (2 mg/ml) wurde gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die lyophilisierte Peptidamidase wurde in 5 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 gelöst. In einem Assay wurde die Aktivität der dialysierten, lyophilisierten und resuspendierten Peptidamidase mit der in der Ausgangslösung verglichen.

Die Standardreaktion wurde wie folgt durchgeführt (Cerovsky und Kula, 2001). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 500 µl in einem Eppendorfgefäß mit Schraubverschluss (1,5 ml) angesetzt. 0,025 mmol Peptidsubstrat wurden in 125 µl DMF im Reaktionsgefäß gelöst. Es wurden 360 µl Acetonitril und 15 µl 2,33 M NH_4HCO_3 -Lösung zugesetzt. Um die Reaktion zu starten, wurden 2 mg lyophilisierte Peptidamidase hinzugefügt. Der Ansatz wurde bei 40°C unter Schütteln für 24-144 h inkubiert. Der Reaktionsansatz setzte sich also wie folgt zusammen: 71% (v/v) Acetonitril, 25% (v/v) DMF, 3% (v/v) H_2O , 70 mM NH_4HCO_3 und 50 mM Peptidsubstrat.

Die Kondensationsreaktion wurde mit den folgenden Peptidderivaten unter den oben beschriebenen Bedingungen getestet: Z-Gly-Leu-OH, Z-Gly-Phe-OH, Z-Gly-Tyr-OH und Z-Gly-Ala-OH.

Zur Überprüfung der Enzymaktivierung wurden variierende Mengen lyophilisierter Peptidamidase in die Reaktion eingesetzt und die Umsätze verglichen.

Mit Z-Gly-Leu-OH wurde die Umsetzung darüber hinaus in den folgenden organischen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen untersucht: Glycerin, Ethylenglycol, DMF, DMF/Glycerin (1:1), Methanol/Glycerin (1:1), Propanol/Glycerin (1:1).

Die Ausbeuten sämtlicher Umsetzungen wurden per HPLC-Analytik bestimmt. Hierzu wurde eine Vydac RP-18-Säule (250 × 4,0 mm, 5 µm) verwendet. Substrat (Z-Gly-Leu-OH) und Produkt (Z-Gly-Leu-NH₂) wurden im isokratischen Gradienten bei RT getrennt, die Detektion erfolgte bei 254 nm. Das Laufmittel hatte die Zusammensetzung 70% (v/v) Bidest H_2O , 30% (v/v) Acetonitril und 0,05% (v/v) TFA. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Die Synthese von Peptidamiden in organischen Lösungsmitteln wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Vaclav Cerovsky am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Prag (Tschechische Republik) durchgeführt.

7.2 Peptidamidsynthese in ionischen Flüssigkeiten

Insgesamt wurden sieben ionische Flüssigkeiten auf ihre Eignung als Lösungsmittel bei der Peptidamidase-katalysierten Kondensation von Peptiden mit Ammoniumionen getestet:

- (1) 1-Ethyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat: [EMIM] BF₄
- (2) Triethylmethylammoniummethylsulfat: [ET₃NM] MeSO₄
- (3) 1,3-Dimethylimidazoliummethylsulfat: [MMIM] MeSO₄
- (4) 1-Butyl-3-methylimidazolium-bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amid: [BMIM] BTA
- (5) 1-Methyl-3-nonylimidazoliumhexafluorophosphat: [MNIM] PF₆
- (6) Triethylammoniummethylsulfat: [Et₃NH] MeSO₄
- (7) 1-Butyl-3-methylimidazoliummethylsulfat: [BMIM] MeSO₄

Im ersten Schritt wurden Untersuchungen zur Löslichkeit der Edukte und des Enzyms in den einzelnen ionischen Flüssigkeiten durchgeführt. Verliefen diese Vorversuche erfolgreich, wurde die eigentliche Reaktion angesetzt.

Zunächst wurde die Reaktion in Gegenwart von 10% Wasser durchgeführt. Das Enzym wurde in gelöster Form zugesetzt. In einem weiteren Ansatz wurde die Reaktion in Abwesenheit von Wasser durchgeführt. Hierbei wurde das Enzym in lyophilisierter Form zugesetzt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 500 µl in einem Eppendorfgefäß mit Schraubverschluss (2,0 ml) angesetzt. 0,025 mmol Ala-Phe-OH wurden in 500 µl bzw. 450 µl der jeweiligen ionischen Flüssigkeit gelöst. Anschließend wurden 0,012 mmol NH₄HCO₃ und 3 mg lyophilisierte Peptidamidase bzw. 50 µl Peptidamidaselösung der Konzentration 2 mg/ml sowie 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 zugesetzt. Die Anfangskonzentration der Reaktanden im Reaktionsansatz betrug demnach 50 mM Ala-Phe-OH und 24 mM NH₄HCO₃. Der Ansatz wurde bei 37°C unter Schütteln für 12 h inkubiert.

Um zu überprüfen, ob die Aktivität der Peptidamidase generell durch die Anwesenheit der ionischen Flüssigkeiten beeinträchtigt wird, wurden Standardhydrolysereaktionen mit dem Substrat Ala-Phe-NH₂ in Gegenwart von 50 Vol% der jeweiligen ionischen Flüssigkeit durchgeführt.

Die Reaktionsausbeute wurde per HPLC-Analytik bestimmt. Es wurde eine Hypersil RP-18-Säule (250 × 4,6 mm, 5 µm) verwendet. Substrat (Ala-Phe-OH) und Produkt (Ala-Phe-NH₂) wurden im isokratischen Gradienten bei RT getrennt, die Detektion erfolgte bei 220 nm. Das Laufmittel hatte die Zusammensetzung 90% (v/v) Bidest H₂O, 10% (v/v) Acetonitril und 0,1% (v/v) TFA. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Die Synthese von Peptidamiden in ionischen Flüssigkeiten wurde in Zusammenarbeit mit Dipl.-Chem. Nicole Kaftzik und Prof. Dr. Udo Kragl aus der Abteilung für Analytische, Technische und Umweltchemie im Fachbereich Chemie der Universität Rostock durchgeführt.

ERGEBNISSE

1. Nachweis der Peptidamidase-Aktivität in *Stenotrophomonas maltophilia*

Die Anzucht von *S. maltophilia* erfolgte in M2-Medium (Stelkes-Ritter et al., 1995). Anschließend wurden die Zellen per Zentrifugation geerntet und die Peptidamidase-Aktivität im Rohextrakt bestimmt. Unter Standardbedingungen betrug die spezifische Aktivität 0,24 U/mg. Da im Kulturüberstand von *S. maltophilia* keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Peptidamidase nicht sezerniert wird.

2. Isolierung von *pam*

Auf der Grundlage der N-terminalen Aminosäuresequenz der Peptidamidase (NVPFPYAET-DVADLQ, Stelkes-Ritter et al., 1995) wurde unter Berücksichtigung des Codon-Gebrauchs (Nakamura et al., 2000) eine 45 Nukleotide umfassende DNA-Sonde entworfen: 5'-AAC GTG CCG TTC CCG TAC GCC GAA ACC GAC GTG GCC GAC CTG CAG-3' [Sonde A (m)]. Mit Hilfe der Southern-Hybridisierungs-Methode wurden verschiedene Hybridisierungssignale auf genomischer DNA von *S. maltophilia* erhalten (Abbildung 8).

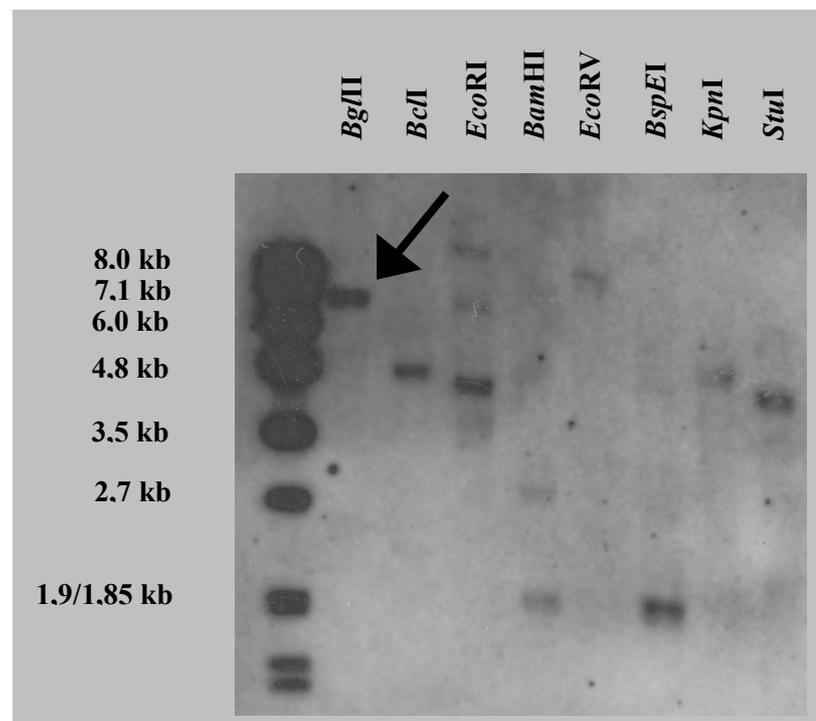


Abbildung 8. Die Abbildung zeigt den entwickelten Film mit den Ergebnissen der Southern-Hybridisierung restringierter genomischer DNA von *S. maltophilia* mit der Sonde A (m) bei 63°C. Zunächst wurde die genomische DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Übertragung und Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese mit der Sonde inkubiert. Die Bereiche, in denen die Sonde gebunden hat, sind auf dem Film geschwärzt (Chemolumineszenzdetektion). Das mit dem Pfeil markierte Signal wird von dem 6,9 kb großen *Bg*III-Fragment erzeugt, welches später aus der partiellen Genbank isoliert wurde und auf dem das vollständige Peptidamidase-Gen liegt.

Die DNA-Sonde lieferte aufgrund ihrer geringen Größe neben spezifischen auch unspezifische Signale auf der DNA. Da die Hybridisierung, ebenfalls bedingt durch die geringen Sondengröße, unter sehr niedrig-stringenten Bedingungen durchgeführt werden musste, wurden weitere Signale bedingt durch Wechselwirkungen der DNA-Sonde mit der Membran erhalten. Die schwache Markierung jedes Sondenmoleküls mit nur einem Digoxigeninrest trug ebenfalls zu einem starken Hintergrund bei.

Nach der Optimierung der Hybridisierungsbedingungen wurden bei einer Temperatur von 63°C eindeutige Signale erhalten. Im folgenden sind die Restriktionsfragmente unter Angabe der Fragmentgröße aufgeführt: *Bg*III (~6,9 kb), *Bcl*I (~4,7 kb), *Eco*RI (~4,6 kb), *Bsp*EI (~1,8 kb) und *Stu*I (~4,5 kb).

Auf der Grundlage der Hybridisierungsergebnisse wurde eine partielle Genbank mit *Bg*III-DNA-Fragmenten der Größe 6 bis 8 kb in *E. coli* XL1-Blue angelegt. Aus dieser wurde das Plasmid pKlon82 isoliert, welches das 6,9 kb-*Bg*III-Fragment enthielt, auf dem sich das Peptidamidase-Gen befindet.

3. Analyse der Sequenzdaten des 6,9 kb DNA-Fragments

Das 6,9 kb-DNA-Fragment aus *S. maltophilia* DSM 9181 wurde einzelsträngig sequenziert. In dem Bereich des Peptidamidase-Gens wurde ebenfalls der Gegenstrang sequenziert. Die Nukleotidsequenz (siehe Anhang) wurde in der EMBL/GenBank unter der folgenden Datenbank-Zugangsnummer hinterlegt: AJ414049. Bei der Sequenzierung des 3'-seits von *pam* gelegenen Bereichs traten zunächst Probleme auf, da hier vermutlich ausgeprägte DNA-Sekundärstrukturen auftreten, die die DNA-Polymerase bei der Sequenzierreaktion behindern.

3.1 Datenbankanalyse der DNA-Sequenz

Mit Hilfe des NCBI-BLASTX-Algorithmus (Altschul et al., 1997) wurde die DNA-Sequenz des 6,9 kb-DNA-Fragments aus *S. maltophilia* in alle sechs möglichen Leseraster translatiert und anschließend mit Proteinsequenzen in der NCBI-Datenbank verglichen. Auf diese Weise konnten insgesamt sechs offene Leseraster identifiziert werden (siehe Anhang): der 5'-Bereich des Gens der Malatdehydrogenase (*mdh*), das Gen der Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase (*ppi*), das Gen des Translationselongationsfaktors G (*efg*), das Gen eines hypothetischen löslichen Proteins, das Gen der Peptidamidase (*pam*) und das Gen eines hypothetischen Membranproteins (Abbildung 9). Da die Zuordnung lediglich durch Homologievergleiche vorgenommen wurde, handelt es sich bei allen Genen um hypothetische offene Leseraster.

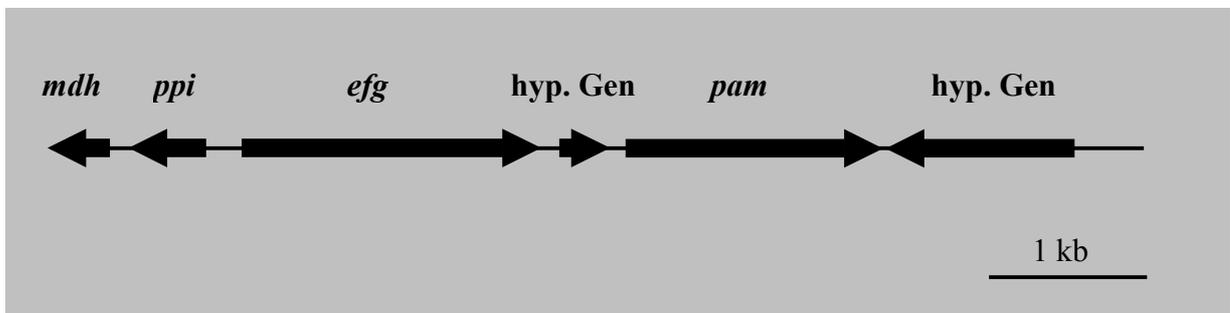


Abbildung 9. Die Organisation der sechs ORFs (offene Leseraster) auf dem 6,9 kb *BglIII*-DNA-Fragment von *S. maltophilia*: 5'-Bereich des Gens der Malatdehydrogenase (*mdh*), das Gen der Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase (*ppi*), das Gen des Translationselongationsfaktors G (*efg*), das Gen eines hypothetischen löslichen Proteins, das Gen der Peptidamidase (*pam*) und das Gen eines hypothetischen Membranproteins.

Die Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert die letzte Reaktion im Citratzyklus, die Regeneration von Oxalacetat. Es handelt sich um eine Oxidoreduktase, L-Malat wird zu Oxalacetat oxidiert, gleichzeitig wird der Cofaktor NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert. Die ausgeprägtesten Homologien bestehen zu den drei unten aufgeführten Proteinen. Eine Referenz und/oder die Zugangsnummer der Gendatenbank, die phylogenetische Zuordnung des Herkunftorganismus, die Anzahl der Aminosäurereste und der P-Wert sind jeweils angegeben. Der P-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die jeweilige Sequenzähnlichkeit zufällig auftritt:

1. hypothetische Malatdehydrogenase aus *Xylella fastidiosa* (Bacteria); 335 aa; P-Wert: 2×10^{-47} ; Simpson et al. (2000): Acc. No. NP_298501.
2. hypothetische Malatdehydrogenase aus *Ralstonia solanacearum* (Bacteria); 329 aa; P-Wert: 2×10^{-42} ; Salanoubat et al. (2002): Acc. No. NP_520119.

3. charakterisierte Malatdehydrogenase aus *Aquaspirillum arcticum* (Bacteria); 329 aa; P-Wert: 5×10^{-40} ; Kim et al. (1999): Acc. No. Q9ZF99.

Auf dem isolierten DNA-Fragment ist lediglich der 330 Basen umfassende 5'-Bereich des hypothetischen Malatdehydrogenasegens codiert, was 110 Aminosäureresten entspricht. Das gesamte Protein umfasst, den Homologievergleichen nach zu urteilen, etwa 330 Aminosäurereste.

Die Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase) katalysiert die Isomerisierung von Prolin-Peptidbindungen in Proteinen. Es wird angenommen, dass PPIasen eine Rolle bei Faltungsprozessen von Proteinen spielen (Compton et al., 1992). Die ausgeprägtesten Homologien bestehen zu den folgenden drei Proteinen:

1. hypothetische Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase aus *Xylella fastidiosa* (Bacteria); 164 aa; P-Wert: 7×10^{-65} ; Simpson et al. (2000): Acc. No. NP_298502.
2. hypothetische Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase aus *Treponema pallidum* (Bacteria); 215 aa; P-Wert: 5×10^{-39} ; Fraser et al. (1998): Acc. No. NP_219383.
3. hypothetische Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase aus *Helicobacter pylori* (Bacteria); 163 aa; P-Wert: 3×10^{-34} ; Tomb et al. (1997): Acc. No. NP_208232.

Das Gen der hypothetischen Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase ist vollständig auf dem 6,9-kb-Fragment vorhanden, es umfasst 492 Basen, was einem Protein entspricht, welches aus 163 Aminosäureresten besteht.

In allen lebenden Organismen wird die Proteinsynthese durch Ribosomen katalysiert. Die Proteinsynthese lässt sich in die aufeinanderfolgenden Phasen der Initiation, Elongation und Termination unterteilen. An dem jeweiligen Schritt sind sogenannte Translationsfaktoren beteiligt, diese werden entsprechend als Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren bezeichnet. Viele dieser Faktoren sind GTPasen, die zyklisch Konformationsänderungen erfahren (Al-Karadaghi et al., 2000).

Im letzten Schritt des Elongationszyklus, der Translokation, bewegt sich das Ribosom auf der mRNA um drei Nukleotide (ein Codon) weiter in Richtung 3'-Ende. Gleichzeitig wird die mittlerweile unbeladene tRNA von der P-Bindungsstelle zur Austrittsstelle E überführt und freigesetzt sowie die Peptidyl-tRNA von der A- zur P-Bindungsstelle befördert. Hierbei entspricht P der Bindungsstelle für die Peptidyl-tRNA, A der Bindungsstelle für die hinzukommende Aminoacyl-tRNA und E der Bindungsstelle, an der übergangsweise die abgehende tRNA bindet. Die Translokation wird vom Translationselongationsfaktor G (EF-G) kataly-

siert, der zunächst als EF-G-GTP-Komplex an das Ribosom bindet. Aus der Vielzahl an homologen Proteinen zu dem hypothetischen *S. maltophilia*-EF-G seien hier nur die ersten drei erwähnt:

1. hypothetisches GTP-bindendes Elongations-Faktor-Protein aus *Xylella fastidiosa* (Bacteria); 646 aa; P-Wert: ~ 0 ; Simpson et al. (2000): Acc. No. NP_298503.
2. hypothetisches Protein mit Homologie zum GTP-bindenden Protein BipA/TypA aus *Vibrio parahaemolyticus* (Bacteria); 609 aa; P-Wert: ~ 0 ; Datenbankeintrag von McCarter und Kim (2000): Acc. No. AAF61274.
3. hypothetisches GTP-bindendes Protein aus *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhi (Bacteria); 607 aa; P-Wert: ~ 0 ; Parkhill et al. (2001): Acc. No. NP_458041.

Das Gen des hypothetischen Translationselongationsfaktors G (EF-G) ist vollständig auf dem 6,9-kb-Fragment vorhanden, es umfasst 1896 Basen, was einem Protein bestehend aus 631 Aminosäureresten entspricht.

Zu dem hypothetischen Protein, dessen ORF zwischen dem des Translationselongationsfaktors G (EF-G) und dem der Peptidamidase lokalisiert ist, existieren lediglich zwei signifikant homologe Sequenzen:

1. hypothetisches Protein aus *Xylella fastidiosa* (Bacteria); 91 aa; P-Wert: 1×10^{-30} ; Simpson et al. (2000): Acc. No. NP_298504.
2. hypothetisches Protein aus *Vibrio cholerae* (Bacteria); 152 aa; P-Wert: 3×10^{-17} ; Heidelberg et al. (2000): Acc. No. NP_231215.

Das hypothetische Gen ist vollständig auf dem 6,9-kb-Fragment lokalisiert, es umfasst entweder 258 Basen (Homologie 1) oder 387 Basen (Homologie 2), was einem Protein bestehend aus 85 bzw. 128 Aminosäureresten entspricht.

Die einzige signifikante Homologie des hypothetischen Membranproteins besteht zu einem ebenfalls hypothetischen Genprodukt, einem Membranprotein aus *Streptomyces coelicolor* (Bacteria); 382 aa; P-Wert: 1×10^{-53} ; Datenbankeintrag von Saunders, Harris, James, Parkhill, Barrell und Rajandream (1999): Acc. No. T34940.

Das Gen des hypothetischen Membranproteins ist vollständig auf dem 6,9-kb-Fragment lokalisiert, es umfasst 1194 Basen, was einem Protein bestehend aus 397 Aminosäureresten entspricht.

3.2 Die Sondenbindungsstelle

Auf dem 6,9 kb-DNA-Fragment wurde die Bindungsstelle der DNA-Sonde A (m) identifiziert. Der 45 bp lange Sequenzabschnitt unterscheidet sich in nur zwei Nukleotiden von der Sondensequenz (Abbildung 10).

5'-AACGTGCCGTTCCCGTACGCCGAAACCGA**CGTGG**CCCGACCTGCAG-3'
 5'-..GAGCCGCAACGTGCCGTTCCCGTACGCCGAAACCGATGTTGCCGACCTGCAGGCGCGGATGA...-3'

Abbildung 10. Im Vergleich: die DNA-Sonde A (m) [oben] und der Sondenbindungsbereich in der genomischen DNA [unten]. Die abweichenden Nukleotide sind hervorgehoben. Die eigentliche Bindung der Sonde findet am komplementären Strang der genomischen DNA statt.

3.3 Das offene Leseraster der Peptidamidase

Im unmittelbaren 5'-Bereich der Sondenbindungsstelle befindet sich kein Startcodon. Das nächste Startcodon liegt 114 bp stromaufwärts. Dieser Befund war zunächst unerwartet, da die Sondensequenz vom N-Terminus der Peptidamidase abgeleitet worden ist. Mit Hilfe des SignalP-Algorithmus (Nielsen et al., 1997) wurde der N-terminale Sequenzabschnitt der Peptidamidase als Signalpeptid identifiziert. N-terminale Signalpeptide vermitteln den Sec-abhängigen Transmembrantransport von Proteinen über die Cytoplasmamembran und werden beim Transport abgespalten (Driessen et al., 1998). Da einerseits ein Signalpeptid vorhanden ist, andererseits aber keine Aktivität im Kulturüberstand von *S. maltophilia* nachweisbar ist, handelt es sich bei der Peptidamidase um ein periplasmatisches Enzym. Nach den Ergebnissen der N-terminalen Sequenzierung der prozessierten Peptidamidase durch Stelkes-Ritter et al. (1995) wird das Präprotein zwischen den Aminosäureresten 37/38 (...-A-E-P-A³⁷-S³⁸-R-N-V-...) hydrolytisch gespalten (Abbildung 11).

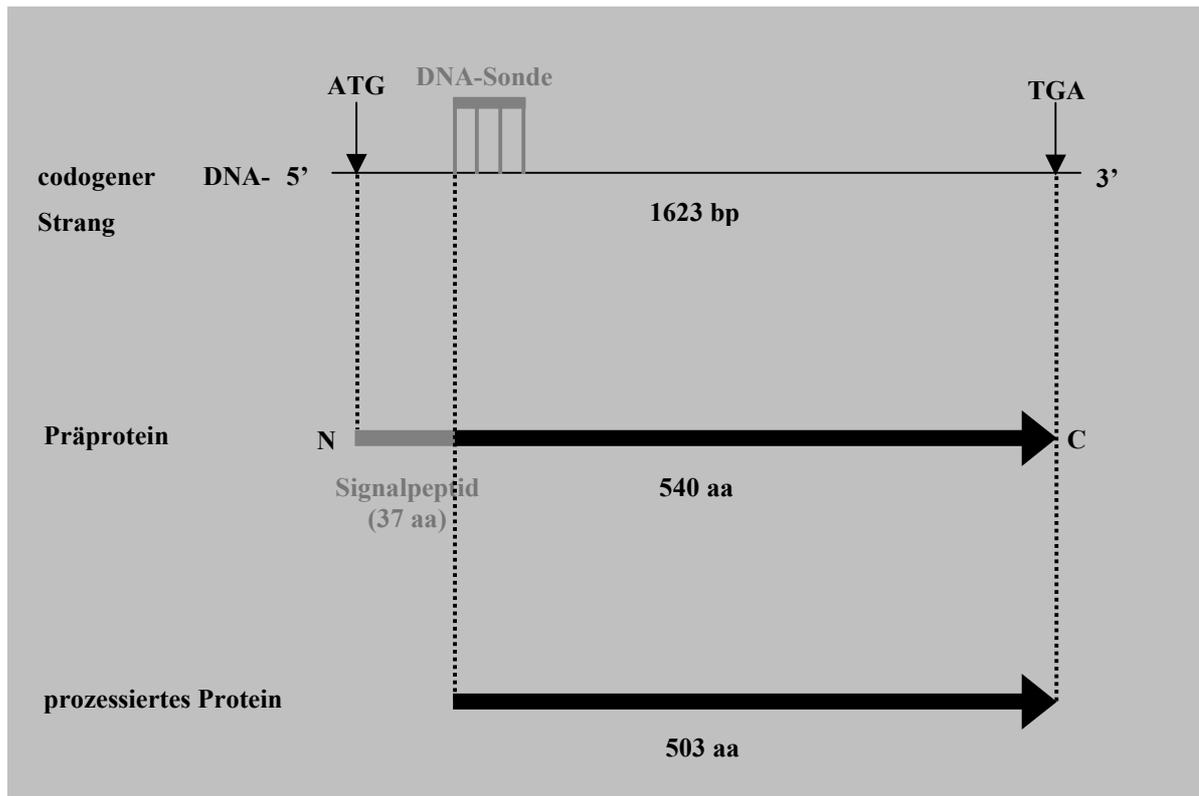


Abbildung 11. Schematische Darstellung des codogenen DNA-Strangs des Peptidamidase-Gens (1623 bp) auf der genomischen DNA von *S. maltophilia* [oben]. Start- und Stoppcodon sowie die Bindungsstelle der Sonde A(m) sind hervorgehoben. In der Mitte ist das Präprotein (540 aa) und unten das prozessierte Protein (503 aa) dargestellt.

Das Peptidamidase-Gen codiert ein Präprotein, das aus 540 Aminosäureresten besteht (57,1 kDa). Das Signalpeptid besteht aus 37 und das prozessierte Protein aus 503 Aminosäureresten (53,5 kDa).

3.4 Die regulatorischen DNA-Sequenzen 3'- und 5'-seits des Peptidamidase-Gens

Unmittelbar 5'-seits des Startcodons des Peptidamidase-Gens ist eine potentielle Ribosomenbindestelle lokalisiert (5'-ACCAAG-3'), die eine Ähnlichkeit zu dem Konsensusmotiv (5'-AGGAGG-3') aufweist. Der Abstand zum Startcodon beträgt 8 bp.

Weiterhin befindet sich im 5'-Bereich des Peptidamidase-Gens eine potentielle TATA-Box (5'-TGGACG-3') und eine -35-Region (5'-TCTACG-3'), die Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Konsensusmotiven (5'-TATAAT-3') und (5'-TTGACA-3') aufweisen (Hawley und McClure, 1983).

Im 3'-Bereich des Peptidamidase-Gens befindet sich eine sehr stark ausgeprägte Haarnadelschleife (5'-GCCGGCCGCTGGCCGGCAGATCCGGAGTTGCCGGCCAGCGGCC-

GGC-3'). Der Stamm besteht aus 18 bp und die Schleife aus zehn Nukleotiden. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine Transkriptionsterminationsstruktur.

3.5 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der Peptidamidase

Im zentralen Bereich der Aminosäuresequenz der Peptidamidase befindet sich das sogenannte Amidase-Signatur-Sequenzmotiv, über das die Amidase-Signatur-Familie definiert ist (Chebrou et al., 1996). Die Peptidamidase gehört daher zur Amidase-Signatur-Familie (AS-Familie). Das Konsensusmotiv der AS-Familie ist wie folgt definiert: G- $\{GA\}$ -S- $\{GS\}$ - $\{GS\}$ -G-x- $\{GSA\}$ - $\{GSAVY\}$ -x- $\{LIVM\}$ - $\{GSA\}$ -x(6)- $\{GSAT\}$ -x- $\{GA\}$ -x- $\{DE\}$ -x- $\{GA\}$ -x-S- $\{LIVM\}$ -R-x-P- $\{GSAC\}$.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der Peptidamidase mit Einträgen in der NCBI-Datenbank mit Hilfe des BLAST P-Algorithmus (Altschul et al., 1997) lieferte über 200 homologe Aminosäuresequenzen. In den meisten Fällen handelt es sich um hypothetische Genprodukte. Die sechs Proteine mit den ausgeprägtesten Sequenzhomologien, die im folgenden aufgeführt sind, sind allesamt hypothetisch. Eine Referenz und/oder die Zugangsnummer der Genbank, die phylogenetische Zuordnung des Herkunftsorganismus, die Anzahl der Aminosäurereste und der P-Wert ist jeweils angegeben. Dieser Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die jeweilige Sequenzähnlichkeit zufällig auftreten könnte:

1. hypothetisches Amidase-Familie-Protein aus *Caulobacter crescentus* (Bacteria); 497 aa; P-Wert: 1×10^{-102} ; Nierman et al. (2001): Acc. No. NP_421276.
2. hypothetisches Amidase-homologes Protein aus *Streptomyces coelicolor* (Bacteria); 535 aa; P-Wert: 1×10^{-90} ; Datenbankeintrag von Parkhill, Barrell und Rajandream (1998): Acc. No.: T29430.
3. hypothetische Amidase aus *Bacillus firmus* (Bacteria); 481 aa; P-Wert: 6×10^{-87} ; Datenbankeintrag von Ito und Krulwich (1996): Acc. No. AAB41685.
4. hypothetische Amidase aus *Solanum demissum* (Eukarya); 507 aa; P-Wert: 2×10^{-72} ; Datenbankeintrag von Ronning (2001): Acc. No. AAK91890.
5. hypothetische Amidase aus *Schizosaccharomyces pombe* (Eukarya); 583 aa; P-Wert: 3×10^{-72} ; Wood et al. (2002): Acc. No. NP_595018.
6. hypothetisches Amidase-ähnliches Protein aus *Arabidopsis thaliana* (Eukarya); 466 aa; P-Wert: 2×10^{-62} ; Datenbankeintrag von Town und Kaul (2002): Acc. No. NP_595018.

Die Peptidamidase weist eine starke Homologie zu der oben genannten hypothetischen Amidase aus *Arabidopsis thaliana* auf, obwohl hier ein zentraler Teil der AS-Sequenz fehlt. In Abbildung 12 ist ein Ausschnitt des Alignments der Peptidamidase, der o. g. Amidasen sowie der funktional sehr gut charakterisierten Fettsäureamidohydrolase (FAAH) aus *Rattus norvegicus* (Eukarya) dargestellt (579 aa; P-Wert: 7×10^{-5} ; Cravatt et al. (1996): Acc. No. P97612), die Amidase aus *A. thaliana* ist nicht vertreten. Es ist deutlich die vollständige Konservierung einzelner Aminosäurereste zu erkennen, z. B. Lys-123 (Lys-142*), Ser-202 (Ser-217*) und Ser-226 (Ser-241*) in der Peptidamidase aus *S. maltophilia* (*: FAAH aus *R. norvegicus*).

<i>S. maltophilia</i>	117	GIPELLLKDNIN-AAPMATSAGSLALQG-FRPDDAYLVRRRLRDAGAVVLGKTNLSEWANFRGNDS--ISGW	182
<i>C. crescentus</i>	75	GVPILLKDNIESADPLPTTAGSLALKDNITGRDAPVAKRLRDAGLVLGKANLSEWANIRSNHS--ISGW	142
<i>S. coelicolor</i>	120	GIPVLLKDNVN-TRDMPTTAGSLALAGSPDPTDAVLVGLKLRAGAVILGKANLSEWANFRAAKP--TSGW	186
<i>B. firmus</i>	77	GIPVLLKDNIDTKDKLHTSAGALVLEHSYAKKDAFLVKKLRKAGAVILGKTNMSEWAYFMSTDN-MPSGY	145
<i>S. demissum</i>	98	GIPVLVKDNIATKDKLNTTAGSLALVGSIVPQDAGVVKKLRNVGAIILGKATMTEWAASRAKNNLMPNGW	167
<i>S. pombe</i>	135	GIPFIVKDNFATKDKMDTTAGSYALLGSIVPRDAYVVVKQLREAGAVLFGHATLSEWADMRSNDY--SEGY	202
<i>R. norvegicus</i>	136	GVEVSLKECFSS-YKGDSTLGLSLNEGMPSESDCVWVQVLKLGAVPFVHTNVPQSMLSFDCSN--PL--	200
<i>S. maltophilia</i>	183	SARGGQTRNPY-RISHSPCGSSSSGSAVAANLASVAIGTETDGSIVCPAAINGVVGLKPTVGLVSRDGI	251
<i>C. crescentus</i>	145	SAVGGTVRNPY-ALDRSACGSSSSGGAAVAAGLAPLAIGTETDGSITCPAAINGLVGLKPTVGLVSRTHI	211
<i>S. coelicolor</i>	187	SAVGGQTNPY-VLDRNPCGSSSSGSAALAASLAQVAIGTETDGSIVCPAGMNGVVGLKPSLGVVVSQSGV	255
<i>B. firmus</i>	146	SSRGGQTENPYGIGKFDVGGSSSSGSGSAIAANFAAAAVGTETSGLSILSPSSQNSIVGKPTVGLISRSGI	215
<i>S. demissum</i>	168	NGRLGQALDPY-VASADPSGSSSTGSATSVAANMVAVALGTETAGSILSPPSSANSVVGIKPTVGLTSRAGV	236
<i>S. pombe</i>	203	SARGGQSRCPF-NLTVNPGSSSSGSAISVASNMIAFALGTETDGSIIDPAMRNGVVGLKPTVGLTSRYGV	271
<i>R. norvegicus</i>	201	---FGQTMNPW-KSSKSPGGSSGEGALIGSGGSPGLGLTDIGGSIKRFPSAFSGICGLKPTGNRLSKSGL	266

Abbildung 12. Partielles Alignment über den Bereich der Amidase-Signatur-Sequenz der Peptidamidase von *S. maltophilia* (Pam), den fünf Amidasen mit den ausgeprägtesten Sequenzhomologien (hypothetische Amidase CC2473 von *C. crescentus*; hypothetische Amidase SC3A7.12 von *S. coelicolor*; hypothetische Amidase von *B. firmus*; hypothetische Amidase PGEC513.10 von *S. demissum*; hypothetische Amidase SPAC869.01 von *S. pombe*) sowie der Fettsäureamidohydrolase (FAAH) aus *R. norvegicus*. Das Alignment wurde mit Hilfe des Clustal W-Algorithmus unter Verwendung der Blossum-Matrix erstellt (Thompson et al., 1994). Die Nummerierung der Aminosäurereste von Pam beziehen sich auf das Präprotein. Identische Aminosäurereste in den verschiedenen Sequenzen sind dunkelgrau unterlegt, ähnliche hellgrau.

4. Expression und Aufreinigung der Pam-Varianten 2, 6 und 10

Es wurden drei Peptidamidase-Varianten exprimiert, die sich in den N- und C-terminalen Bereichen unterscheiden. Abbildung 13 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen rekombinanten Peptidamidasen.

	N-Terminus	C-Terminus
Pam-Variante 2:	[MRPSLPPLL/TCLLAALPALLSAGCSPATPSAHA] AEPASRV	██████████ GEP
Pam-Variante 6:	[M] AEPASRV	██████████ GEPIEGRLEHHHHHH
Pam-Variante 10:	[M] SRNV	██████████ GEP

Abbildung 13. Schematische Darstellung der Pam-Varianten 2 (57,1 kDa), 6 (55,5 kDa) und 10 (53,5 kDa), hervorgehoben sind die Unterschiede in den N- und C-terminalen Sequenzabschnitten. Der zentrale Bereich stimmt in allen drei Varianten überein und ist hier durch einen schwarzen Balken symbolisiert. Die Aminosäurereste am N-Terminus, die bei der Expression in den *E. coli*-Stämmen posttranslational abgespalten werden, sind in eckige Klammern eingefasst (Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung der Genprodukte).

4.1 Pam-Variante 2: Expression und Aufreinigung

Auf dem Expressionsplasmid pEK02 ist die Pam-Variante 2 codiert. Die Pam-Variante 2 enthält das im Pam-Wildtyp vorhandene Signalpeptid.

Das Expressionssystem pEK02/*E. coli* BL21 (DE3) wurde mit 1 mM IPTG induziert und nach der Induktion bei 37°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen bildete der größte Teil des Expressionsproduktes Inclusion Bodies. In der löslichen Fraktion befanden sich zwei aktive Formen der Peptidamidase (54 und 57 kDa), wie durch Analyse per Aktivitätsassay und SDS-Gel im Anschluss an eine Trennung mittels Q-Sepharose gezeigt werden konnte. Die beiden Formen weisen dicht beieinanderliegende Elutionsmaxima auf, wobei das 54 kDa- vor dem 57 kDa-Genprodukt eluiert (Abbildung 14). Über die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde das 57 kDa-Protein als das Präenzym und das 54 kDa-Protein als prozessiertes Enzym identifiziert.

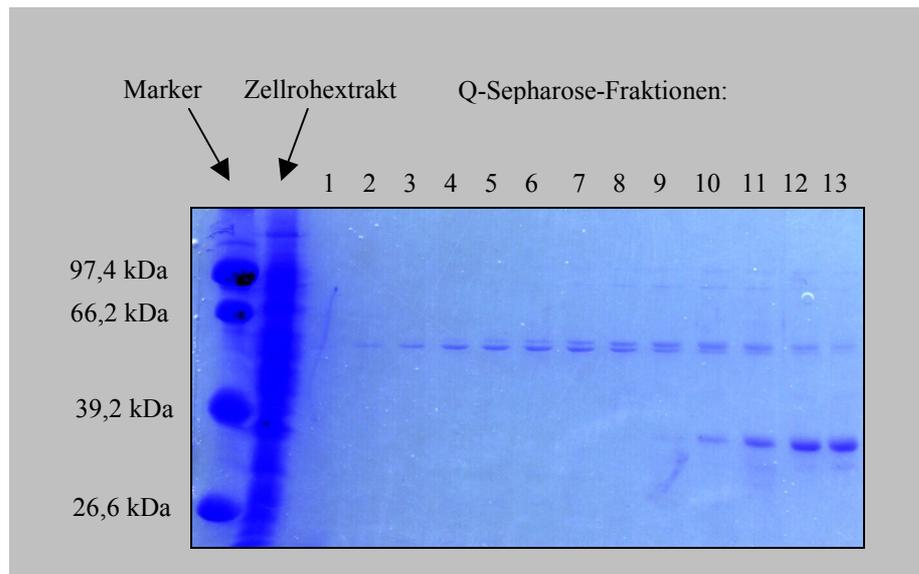


Abbildung 14. Aufreinigung der Genprodukte des Expressionssystems pEK02/*E. coli* BL21 (DE3) per Q-Sepharose-Säule. Die Fraktionen, in denen das Präprotein der Peptidamidase und die prozessierte Peptidamidase eluieren, wurden im SDS-Gel aufgetrennt.

Interessanterweise unterscheidet sich die Prozessierungsstelle für das Signalpeptid in *E. coli* von der in *S. maltophilia*. In *E. coli* BL21 (DE3) wird das Präenzym zwischen den Aminosäureresten 33/34 (...-S-A-H-A³³-A³⁴-E-P-A-...) gespalten, in *S. maltophilia* hingegen zwischen den Aminosäureresten 37/38. Die in *E. coli* nachgewiesene Schnittstelle stimmt mit der durch den SignalP-Algorithmus gefundenen überein (Nielsen et al., 1997). Offensichtlich unterscheiden sich die Signalpeptidasen aus *S. maltophilia* und *E. coli* BL21 (DE3) hinsichtlich ihrer Spaltungsaktivität.

Das initiale Expressionssystem [pEK02/*E. coli* BL21 (DE3)] besaß zwei Nachteile: Das Genprodukt war heterogen (Präprotein und prozessiertes Protein) und der überwiegende Teil des Genproduktes lag in Form von Inclusion Bodies vor. Der Großteil der Inclusion Bodies wurde durch die Peptidamidase im nichtprozessierten Zustand gebildet. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass der Transmembrantransport bei der Expression einen limitierenden Schritt darstellt. Bei der Expression des Pam-Gens ohne Signalpeptid tritt diese Limitierung nicht auf.

4.2 Pam-Variante 6: Expression und Aufreinigung

Bessere Ergebnisse wurden mit dem Expressionssystem pEK06/Origami (DE3) mit einer Induktorkonzentration von 75 μ M an IPTG und einer Inkubationstemperatur von 30°C nach Induktion erzielt. Die Pam-Variante 6 weist kein Signalpeptid auf, der N-Terminus wurde gemäß dem N-Terminus des prozessierten Proteins in dem Expressionssystem pEK02/*E. coli* BL21 (DE3) gewählt (Abbildung 13). Da das Gen ohne Signalpeptid exprimiert wird, ist das Genprodukt im Cytoplasma von *E. coli* lokalisiert (cytoplasmatische Expression). Der verwendete *E. coli*-Stamm Origami (DE3) besitzt keine Thioredoxinreduktase und keine Glutathionreduktase, aus diesem Grund ist in diesem Expressionssystem die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma möglich. Das gilt auch für die eine potentielle Disulfidbrücke in der (prozessierten) Peptidamidase, die zwei Cysteylreste aufweist. Die Pam-Variante 6 enthält einen C-terminalen His₆-Tag, der die Aufreinigung per Ni-NTA-Säule ermöglicht.

Unter den beschriebenen Bedingungen liegt der größte Teil des Genproduktes in löslicher Form vor und es werden nur wenig Inclusion Bodies gebildet. Weiterhin ist das Genprodukt homogen, d.h. es wird nur das „prozessierte“ Protein gebildet. Das Expressionssystem liefert unter Standardbedingungen eine spezifische Aktivität von 60 U/mg im Zellrohextrakt.

Aus der Fermentation von pEK06/*E. coli* Origami (DE3) in einem Kulturvolumen von 12 Litern wurden 75 g Zellnassgewicht erhalten, was in etwa einem Trockengewicht von 27,5 g entspricht. Die Peptidamidase nimmt ca. 31% der löslichen Proteinfraction ein. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule und einer Gelfiltrationssäule (Sephadex G-25) durchgeführt. Die Ausbeute der Aufreinigung betrug nahezu 100%. Die Aufreinigung ist in Tabelle 6 und Abbildung 15 dokumentiert.

Tabelle 6. Dokumentation der Aufreinigung der Peptidamidase-Variante 6 aus 5 g Zellen (Zellnassgewicht) von pEK06/*E. coli* Origami (DE3). Die Aktivitäten wurden im Rohextrakt, in der Elutionsfraktion der Ni-NTA-Säule und in der Elutionsfraktion der Gelfiltrationssäule unter Standardbedingungen bestimmt.

Reinigungsschritt	Volumen-akt. [U/ml]	Spezifische Akt. [U/mg]	Proteinkonz. [mg/ml]	Fraktionsvol. [ml]	Gesamtaktivität [$\times 10^3$ U]	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	1226	60	20,4	22,0	27,0	
Ni-NTA-Säule	1381	189	7,3	22,5	31,1	3,2
Gelfiltration (G-25)	446	194	2,3	62,0	27,7	3,2

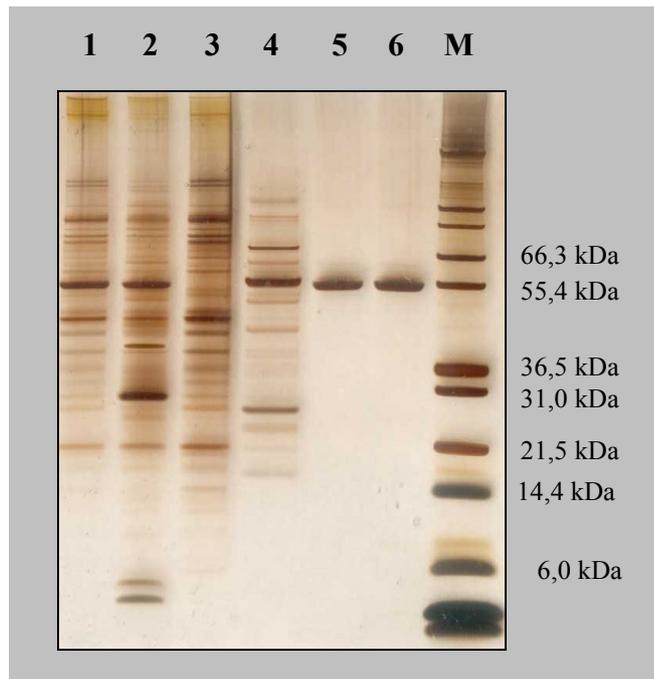


Abbildung 15. Silbergefärbtes SDS-Gel, das die Aufreinigung der Peptidamidase-Variante 6 aus *E. coli* Origami (DE3) dokumentiert. In den einzelnen Spuren sind die folgenden Fraktionen aufgetragen: 1. Zellrohextrakt (Verdünnung 1/400), 2. resuspendiertes Pellet nach Zellaufschluss (Verdünnung 1/40), 3. Durchlauf der Ni-NTA-Säule (Verdünnung 1/50), 4. Waschfraktion Ni-NTA-Säule (unverdünnt), 5. Eluat der Ni-NTA-Säule (Verdünnung 1/150), 6. Proteinfraktion der Gelfiltrationssäule (Verdünnung 1/40), 7. Protein-Längenstandard (Mark 12 von Invitrogen).

Insgesamt wurden aus den 75 g Zellen, die aus der Fermentation erhalten wurden, 2,1 g zu mehr als 95% reine Pam-Variante 6 gewonnen. Das entspricht unter Standardbedingungen einer Gesamtaktivität von 416000 Units.

4.3 Pam-Variante 10: Expression und Aufreinigung

Um den Einfluss des C-terminalen His₆-Tags und des abweichenden N-Terminus der Pam-Variante 6 auf die Aktivität zu überprüfen, wurde zum Vergleich die Pam-Variante 10 konstruiert. Pam-Variante 10 ist identisch mit der prozessierten Peptidamidase aus *S. maltophilia*. Beide Proteine weisen einen identischen N-Terminus auf und es existiert kein C-terminaler His₆-Tag. Das Gen wurde in *E. coli* Origami (DE3) exprimiert [pEK10/*E. coli* Origami (DE3)]. Die Induktion erfolgte mit 75 µM IPTG und die Inkubationstemperatur nach

Induktion betrug 30°C. Aus 2 × 2 l Flüssigkultur wurden 5 g Zellen gewonnen. Die spezifische Aktivität im Zellrohextrakt betrug 18 U/mg. Insgesamt wurde eine Gesamtaktivität von 7650 U (unter Standardbedingungen) erhalten. Das Expressionsprodukt wurde in einem Schritt unter Verwendung einer Q-Sepharose FF-Säule bis zur Homogenität aufgereinigt (> 95% rein). Insgesamt wurden 12 mg Pam-Variante 10 erhalten. Bei einer spezifischen Aktivität von 325 U/mg entspricht das einer Gesamtaktivität von 3900 U unter Standardbedingungen. Die Ausbeute bei der Aufreinigung lag bei 51%.

5. Biochemische Charakterisierung der Pam-Variante 6

5.1 Lagerungsstabilität

Die Lagerung der verschiedenen rekombinanten Peptidamidasen erfolgte bei 4°C in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 und einer Proteinkonzentration > 1 mg/ml. Unter diesen Bedingungen zeigte die Peptidamidase-Variante 6 für mehrere Monate eine konstante Aktivität. Das Einfrieren bei -20°C und nachfolgendes Auftauen hingegen verursachte einen Aktivitätsverlust von 10-15%.

5.2 Bestimmung des nativen Molekulargewichts

Das Molekulargewicht der Pam-Variante 6 im nativen Zustand wurde mittels einer Gelfiltrationssäule (Sephadex G-200) bestimmt. V_e (Pam-Variante 6) betrug 83 ml, V_0 (Dextranblau) betrug 45 ml. Da die Säule ein Gesamtvolumen von 195 ml besaß, errechnet sich nach der Formel: $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ ein K_{av} -Wert von 0,48. Der durch die Eichung bestimmte lineare Zusammenhang zwischen K_{av} und $\log M_w$ wird durch die folgende Gleichung beschrieben: $K_{av} = -0,3766 \times \log M_w + 2,2545$. Demnach beträgt das Molekulargewicht der Pam-Variante 6 ca. 50 kDa. Da das aus der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht der Pam-Variante 6 55,4 kDa beträgt, handelt es sich bei dem rekombinanten Enzym eindeutig um ein Monomer.

5.3 Isoelektrische Fokussierung

Mittels der isoelektrischen Fokussierung wurden die isoelektrischen Punkte der Pam-Varianten 6 und 10 bestimmt (Abbildung 16). Der isoelektrische Punkt der Pam-Variante 6 beträgt 6,3 und der der Pam-Variante 10 5,9.

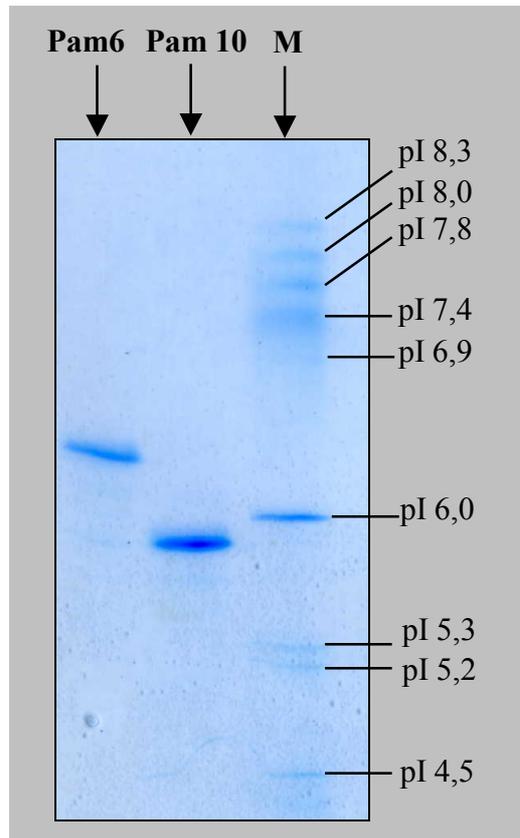


Abbildung 16. Isoelektrische Fokussierung der Pam-Variante 6 und Pam-Variante 10 im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel.

5.4 Quantifizierung der freien Sulfhydrylgruppen

Pam-Variante 6 enthält lediglich zwei Cysteylreste (Cys-200 und Cys-229). Die Quantifizierung der freien Sulfhydrylgruppen mit Hilfe von Ellmans Reagenz ergab, dass anteilig in nur 33% der Fälle in der Pam-Variante 6 eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteylresten ausgebildet wurde.

5.5 Substratspektrum

Die Pam-Variante 6 weist ein vergleichsweise breites Substratspektrum auf. Von den bisher getesteten Substraten werden Dipeptidamide am besten umgesetzt (Abbildung 17 und Abbildung 18).

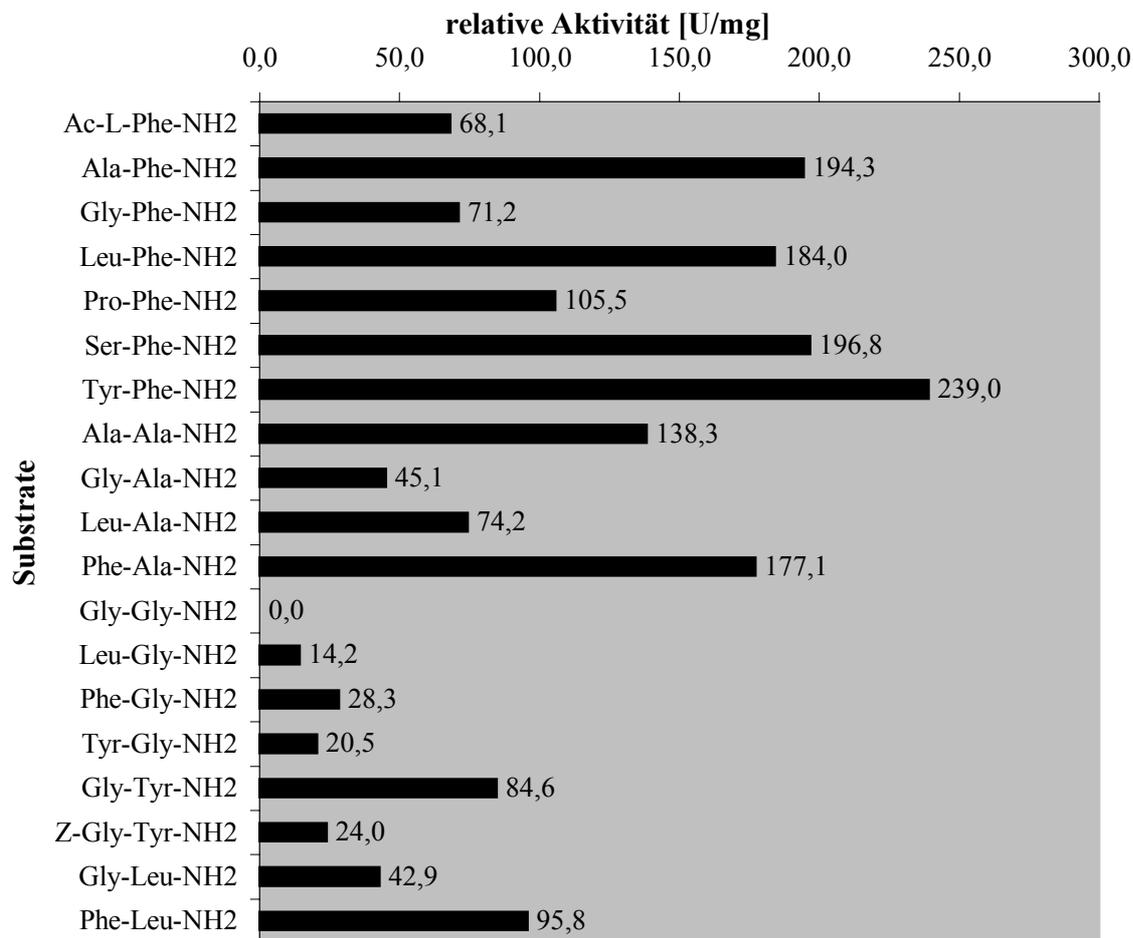


Abbildung 17. Das Substratspektrum der Pam-Variante 6: Dipeptidamide und derivatisierte Aminosäuren. Die relativen Aktivitäten wurden bei einer Substratkonzentration von 10 mM bestimmt. Bei den aufgeführten Aminosäureresten handelt es sich um das jeweilige L-Enantiomer, wenn nicht anders spezifiziert.

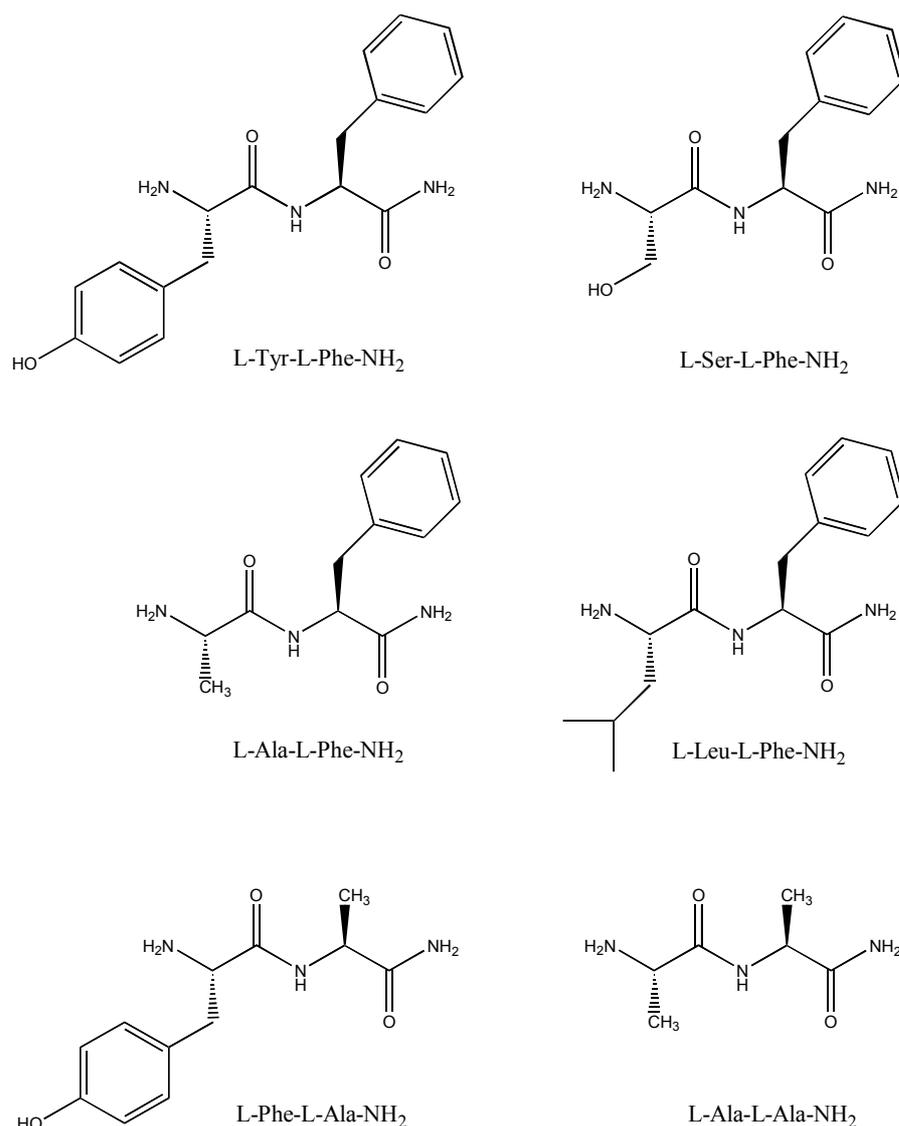


Abbildung 18. Strukturformeln einiger Dipeptidamid-Substrate, die von der Peptidamidase aus *S. maltophilia* sehr gut umgesetzt werden.

Die höchsten Aktivitäten wurden für Dipeptide mit einem L-Phenylalanylrest in der C-terminalen Position gefunden (Tyr-Phe-NH₂ (239 U/mg) und Ser-Phe-NH₂ (197 U/mg)). Gly-Phe-NH₂ wird mit einer relativen Aktivität von 71 U/mg umgesetzt. Dipeptidamide mit einem L-Alanylrest in der letzten Position werden mit bis zu 177 U/mg hydrolysiert (Phe-Ala-NH₂). Gly-Ala-NH₂ hingegen wird mit einer relativen Aktivität von nur 45 U/mg umgesetzt. Weiterhin fällt auf, dass ein Glycylrest in der letzten Position generell einen negativen Einfluss auf die Aktivität zu haben scheint, da Leu-Gly-NH₂, Phe-Gly-NH₂ und Tyr-Gly-NH₂ nur mit mäßiger Aktivität umgesetzt werden (14, 28 und 20 U/mg) und Gly-Gly-NH₂ überhaupt nicht umgesetzt wird.

Die getesteten Dipeptidamide mit L-Tyrosyl- bzw. L-Leucylresten in der letzten Position werden mit mäßigen Aktivitäten umgesetzt. Die Z-Derivatisierung des Glycylrestes in Gly-

Tyr-NH₂ hat einen negativen Einfluss auf die Aktivität: 84,6 U/mg (Gly-Tyr-NH₂) gegenüber 24,0 U/mg (Z-Gly-Tyr-NH₂).

Aminosäureamide werden mit vergleichsweise geringer Aktivität umgesetzt (Abbildung 19). Von den getesteten Aminosäureamiden wird L-Met-NH₂ am besten umgesetzt (1,6 U/mg). Auffällig ist, dass das jeweilige L-Enantiomer immer besser umgesetzt wird, als das D-Enantiomer. Im Fall von D-/L-Ala-NH₂, D-/L-Leu-NH₂ und D-/L-Lys-NH₂ wird ausschließlich das L-Enantiomer umgesetzt. Im Fall von D-/L-Gln-NH₂ wird keines der beiden Enantiomere als Substrat akzeptiert. Die höchste Aktivität, mit der ein D-Enantiomer umgesetzt wird, beträgt 0,1 U/mg für D-Phe-NH₂. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine klare Präferenz für L-Aminosäureamide vor D-Aminosäureamiden besteht.

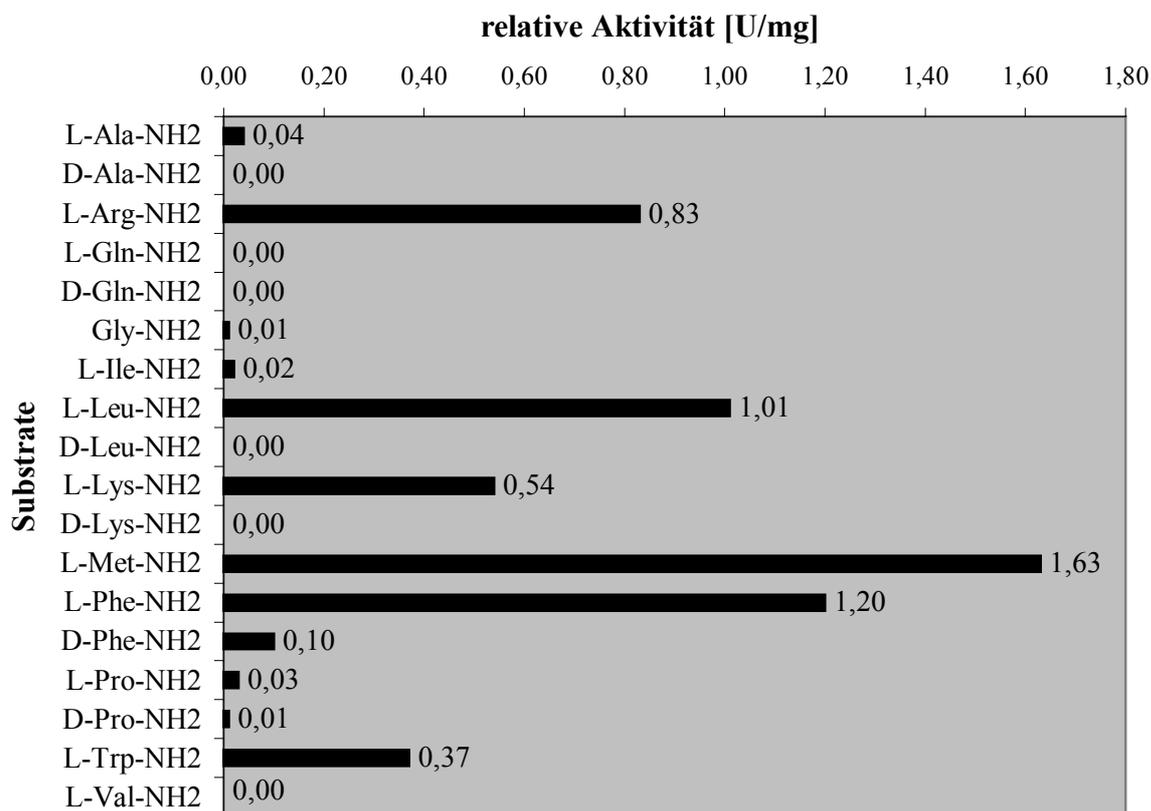


Abbildung 19. Das Substratspektrum der Pam-Variante 6: D- und L-Aminosäureamide. Die relativen Aktivitäten wurden bei einer Substratkonzentration von 10 mM bestimmt.

Auffällig ist der deutliche Unterschied in der relativen Aktivität gegenüber L-Phe-NH₂ (1,20 U/mg) verglichen mit Ac-Phe-NH₂ (68,1 U/mg). Die N-Acetylierung von L-Phe-NH₂ führt zu einem Anstieg in der Aktivität um den Faktor 57. Bei den Aktivitäten gegenüber L-Phe-NH₂ (1,20 U/mg) und Tyr-Phe-NH₂ (239,0 U/mg) liegt der Unterschied sogar bei Faktor

199. Auf der anderen Seite haben die strukturellen Unterschiede in den beiden Substraten Ac-Phe-NH₂ (68,1 U/mg) und Gly-Phe-NH₂ (71,2 mg/ml) offensichtlich keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität (Abbildung 20).

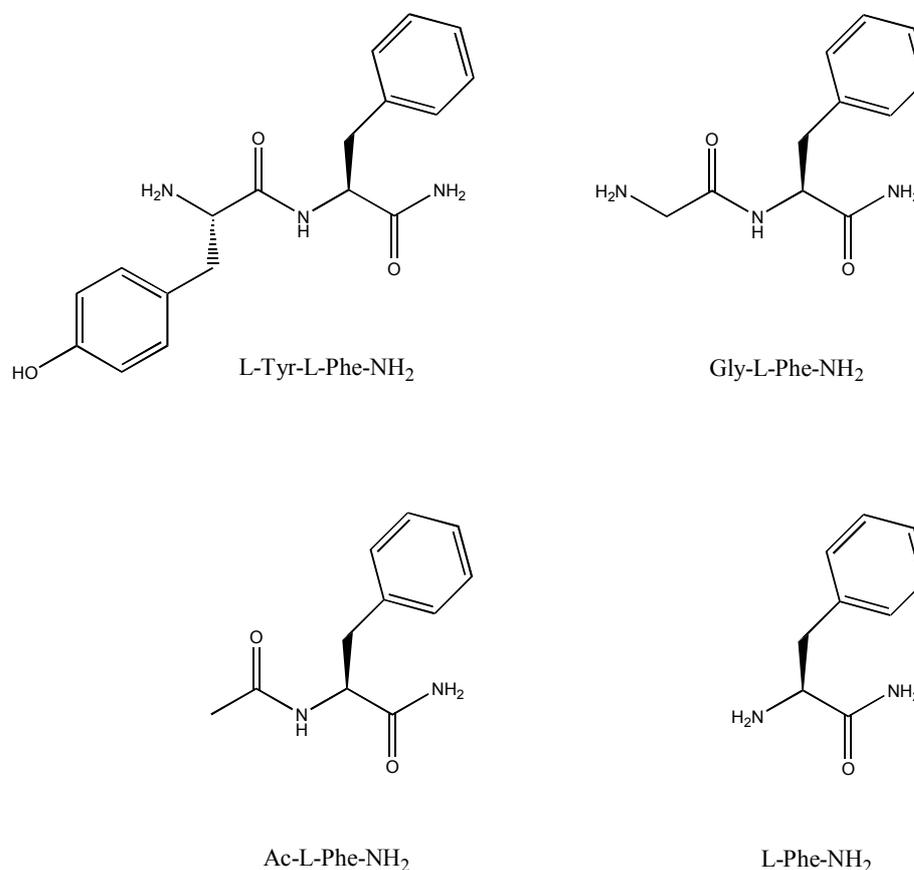


Abbildung 20. Strukturformeln verschiedener Substrate der Peptidamidase: Dipeptidamide, Aminosäureamidderivate und Aminosäureamide.

Ein noch größerer Unterschied ist in den Aktivitäten gegenüber L-Ala-NH₂ (0,04 U/mg) und Phe-Ala-NH₂ (177 U/mg) zu beobachten, hier liegt der Unterschied bei Faktor 4400. L-Ala-NH₂ wird so gut wie gar nicht umgesetzt, wohingegen Phe-Ala-NH₂ zu den am besten umgesetzten Substraten zählt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl der Aminosäurerest in der letzten als auch die vorletzten Position einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität hat, mit der das Substrat umgesetzt wird. Der Vergleich der Aktivitäten gegenüber Gly-Tyr-NH₂ (84,6 U/mg) und Z-Gly-Tyr-NH₂ (24,0 U/mg) zeigt, dass weiterhin Substrukturen und/oder Ladungen in der vorletzten Position einen Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben. Die Ergebnisse sind insbesondere im Hinblick auf das Verständnis der Enzym-Substrat-Wechselwirkung interessant. Offensichtlich finden wichtige Wechselwirkungen nicht nur zwischen dem Enzym und dem C-terminalen

Aminosäurerest im Säureamid statt, sondern ebenfalls mit Bereichen des Substratmoleküls jenseits des Aminosäureamidrestes.

Neben Dipeptidamiden und Aminosäureamiden wurden weitere Carbonsäureamide als Substrate getestet (Abbildung 21). Die Aktivitäten innerhalb dieser Substratgruppe liegen unterhalb von 0,05 U/mg. Mit der höchsten Aktivität werden L-Milchsäureamid (0,02 U/mg) und Valeramid (0,04 U/mg) umgesetzt. Säureamidfunktionen in D-/L-Glutamin oder L-Asparagin werden nicht hydrolysiert. Peptidbindungen werden ebenfalls nicht hydrolysiert, wie mit Resorufin-markiertem Casein gezeigt werden konnte (Universelles-Protease-Substrat, Roche Diagnostics).

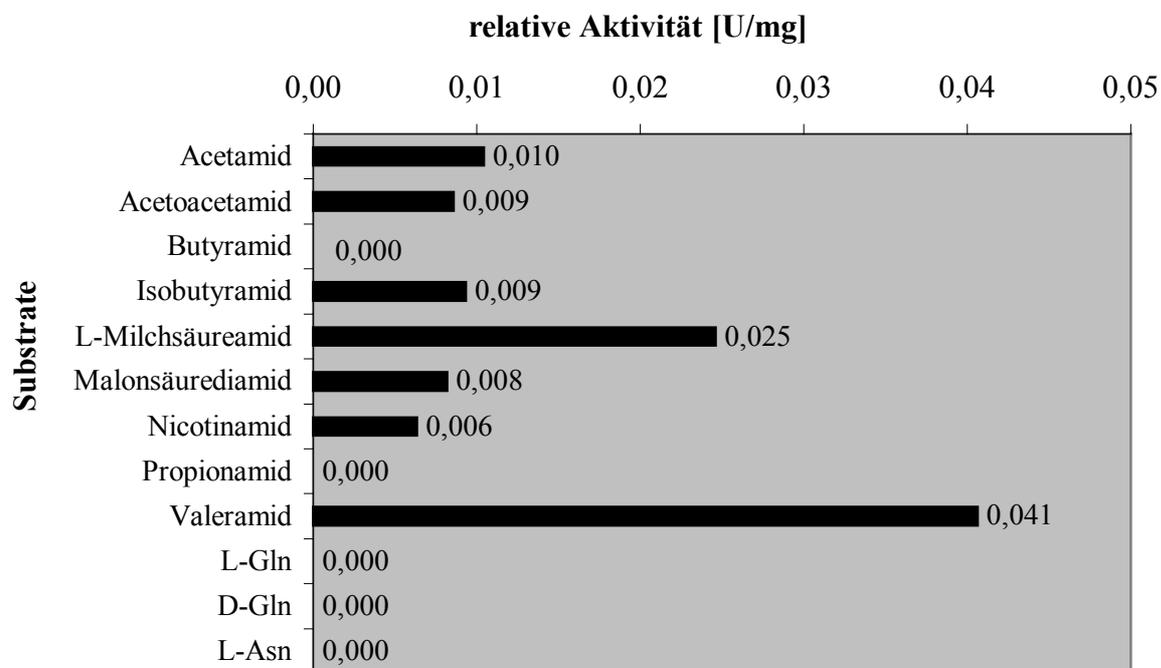


Abbildung 21. Das Substratspektrum der Pam-Variante 6: Verschiedene Carbonsäureamide sowie Aminosäuren mit Säureamidfunktionen in den Seitenketten. Die relativen Aktivitäten wurden bei einer Substratkonzentration von 10 mM bestimmt.

5.6 Substratkinetiken

Mit Pam-Variante 6 wurden für verschiedene Substrate die Kinetiken gemessen. Abbildung 22 zeigt die Messdaten, die zur Berechnung des v_{max} - und K_M -Wertes für das Substrat Ala-Phe-NH₂ herangezogen wurden.

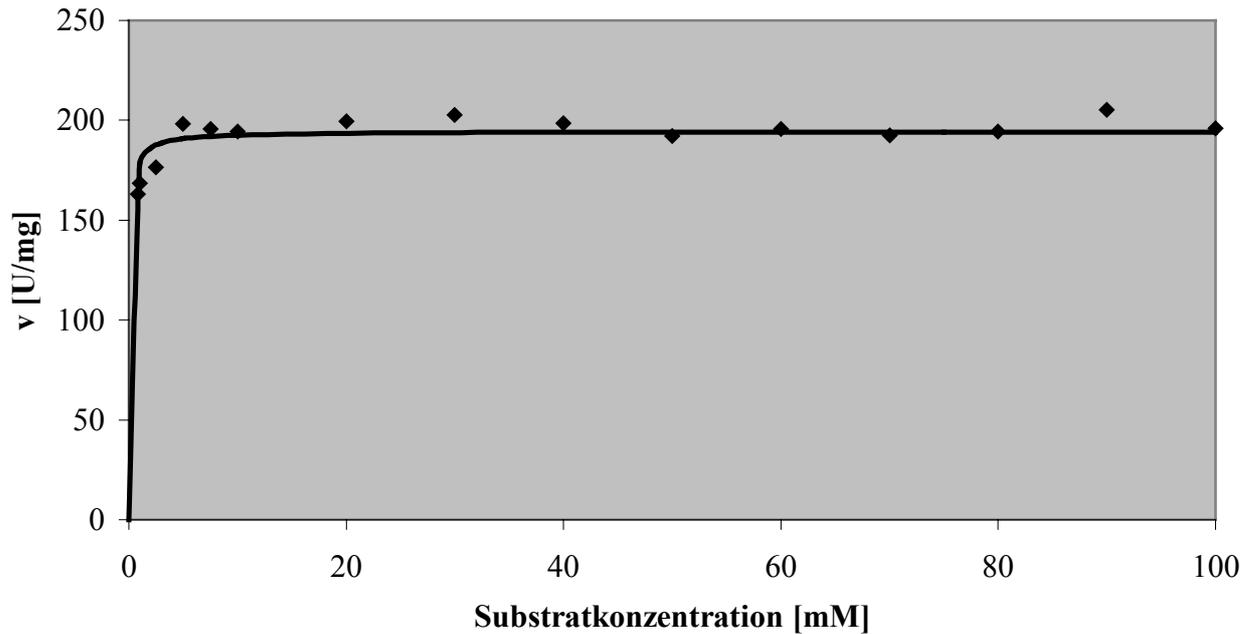


Abbildung 22. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Pam-Variante 6 wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen (Ala-Phe-NH₂). Die schwarzen Punkte entsprechen den Messwerten aus Tabelle 7, der Graph entspricht einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik mit $v = (v_{\max} \times S)/(K_M + S)$, wobei $v_{\max} = 194,3$ U/mg und $K_M = 0,09$ mM gilt. Hierbei ist v die Reaktionsgeschwindigkeit, v_{\max} ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, S ist die Substratkonzentration und K_M ist die Michaelis-Menten-Konstante.

Aus den Messwerten lässt sich ein K_M -Wert von 0,09 mM und ein v_{\max} -Wert von 194,3 U/mg errechnen. Im Konzentrationsbereich bis 100 mM tritt mit Ala-Phe-NH₂ keine Substratinhibition auf. Die Empfindlichkeit des Enzymassays ließ lediglich die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Substratkonzentration $\geq 0,8$ mM zu. Um jedoch mit hinreichender Genauigkeit K_M -Werte zu bestimmen, sind Umsatzmessungen in der Größenordnung des K_M -Wertes erforderlich. Aus diesem Grund wird der K_M -Wert mit $< 0,5$ mM angegeben.

Der k_{kat} -Wert entspricht der Anzahl der Reaktionszyklen, die an dem aktiven Zentrum des Enzyms pro Zeiteinheit ablaufen. k_{kat} errechnet sich wie folgt:

- Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} von Pam-Variante 6 beträgt 194,3 U/mg.
- M (Pam-Variante 6) = 55500 g/mol. 1 mg Pam-Variante 6 entspricht daher $1,80 \times 10^{-8}$ mol.
- $v_{\max} = 194,3$ U/mg = $(194 \times 10^{-6} \text{ mol}) / (60 \text{ s} \times \text{mg})$
- $k_{\text{kat}} = (194,3 \times 10^{-6} \text{ mol}) / (60 \text{ s} \times 1,80 \times 10^{-8} \text{ mol}) = 179,9 \text{ s}^{-1}$

In Tabelle 7 sind die kinetischen Daten der Pam-Variante 6 für die Substrate Ala-Phe-NH₂, L-Phe-NH₂, D-Phe-NH₂ und Gly-Tyr-NH₂ aufgeführt.

Tabelle 7. Kinetische Parameter der Pam-Variante 6 für die Substrate Ala-Phe-NH₂, L-Phe-NH₂, D-Phe-NH₂ und Gly-Tyr-NH₂.

Substrat	v_{\max} [U/mg]	K_M [mM]	K_I [mM]	k_{kat} [1/s]
Ala-Phe-NH ₂	194,3	< 0,5		180,0
L-Phe-NH ₂	1,4	5,8		1,3
D-Phe-NH ₂	0,1	123,8		0,1
Gly-Tyr-NH ₂	92,0	< 0,5	141,0	58,0

L-Phe-NH₂ wird mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 1,4 U/mg umgesetzt, der K_M -Wert beträgt 5,8 mM, und k_{kat} liegt bei 1,3 s⁻¹. Für D-Phe-NH₂ beträgt $v_{\max} = 0,1$ U/mg, $K_M = 123,8$ und $k_{\text{kat}} = 0,1$ s⁻¹. Im Vergleich zu Ala-Phe-NH₂ ist für beide betrachtete Substrate sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit als auch die Enzym-Substrat-Affinität stark herabgesetzt. Dennoch ist klar erkennbar, dass das L-Enantiomer von Phenylalaninamid deutlich besser umgesetzt wird als das D-Enantiomer. Weder mit L-Phe-NH₂ noch mit D-Phe-NH₂ tritt eine Substratinhibierung auf.

Für das Substrat Gly-Tyr-NH₂ beträgt $v_{\max} = 92$ U/mg, $K_M < 0,5$ mM und $k_{\text{kat}} = 58$ s⁻¹. Es wird deutlich besser umgesetzt als L-Phe-NH₂ oder D-Phe-NH₂, allerdings nicht so gut wie Ala-Phe-NH₂. Bei Gly-Tyr-NH₂ tritt eine erkennbare Substratinhibition mit einem K_I -Wert von 141 mM auf $\{v = (v_{\max} \times S) / [(1 + I/K_I) \times K_M + S]\}$.

5.7 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur

Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit ist in Abbildung 23 dokumentiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt von 20°C (115 U/mg) bis etwa 50°C (371 U/mg) stetig an, durchläuft zwischen 50 und 54°C ein Maximum und fällt dann steil ab. Bei 75°C beträgt die Restaktivität 57 U/mg.

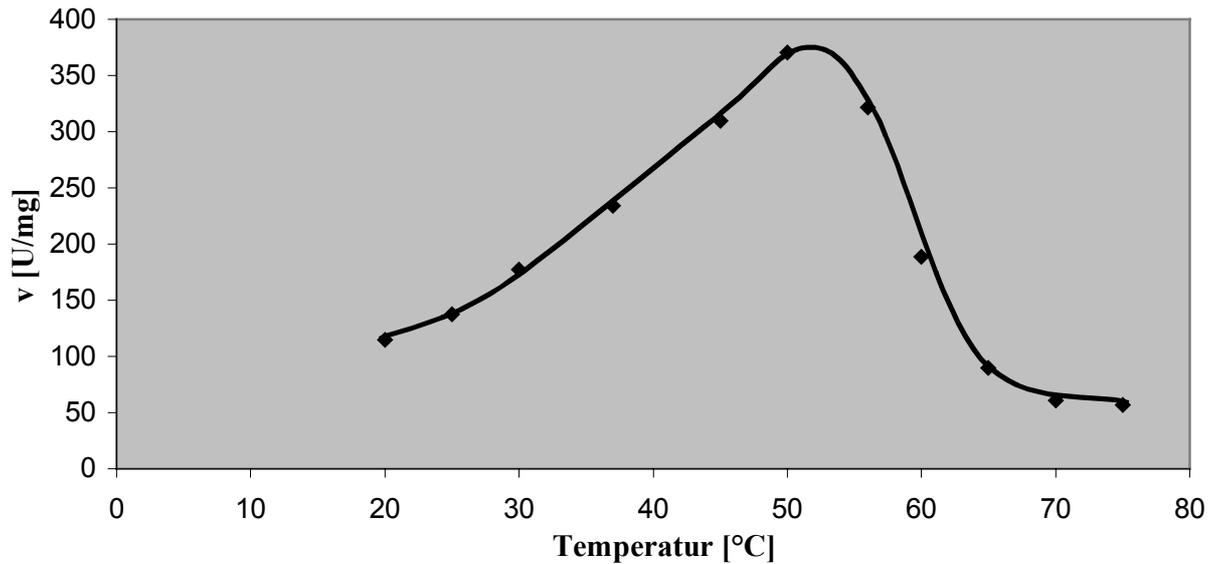


Abbildung 23. Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Pam-Variante 6 mit dem Substrat Ala-Phe-NH₂.

5.8 pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Die pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Pam-Variante 6 ist in Abbildung 24 dokumentiert. Unterhalb von pH 4,5 ist keine Aktivität messbar. Von pH 4,5 aufwärts steigt die Reaktionsgeschwindigkeit, bis sie zwischen pH 7,0 und 8,2 ein Maximum durchläuft (ca. 160 U/mg). Danach fällt die Reaktionsgeschwindigkeit zunächst mit steigendem pH-Wert. Bei ca. pH 10,2 befindet sich ein zweites Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit (ca. 120 U/mg). Im Intervall von pH 11,5 bis 12,6 sinkt die Aktivität auf Null ab.

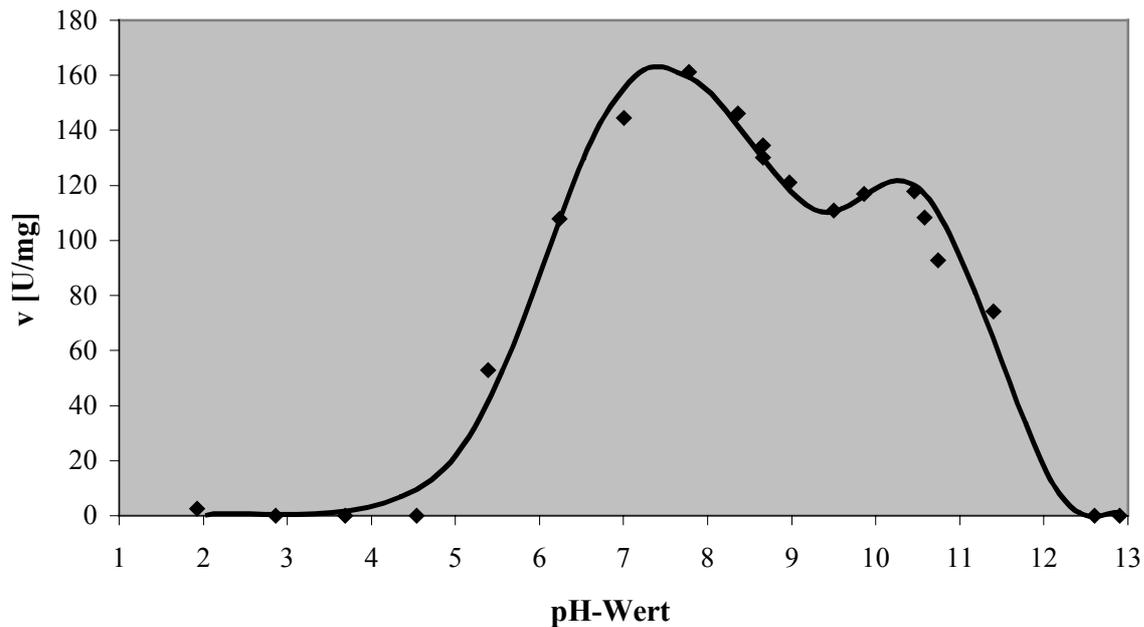


Abbildung 24. pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Pam-Variante 6 mit dem Substrat Ala-Phe-NH₂.

Das pH-Spektrum weist zwei Maxima auf. Eine Berechnung der pK_S -Werte protonierbarer, an der Katalyse beteiligter funktioneller Gruppen ist nicht möglich, da für die einzelnen pH-Werte zwar die Reaktionsgeschwindigkeit, nicht jedoch der K_M -Wert bestimmt worden ist. Damit existieren also zwei Variable, nämlich die pH-Abhängigkeit der Enzym-Substrat-Affinität (K_M -Wert) und Auswirkungen durch Veränderung des Protonierungsgrades an der Katalyse beteiligter funktioneller Gruppen.

5.9 Inhibitionsstudien

Um weitere Hinweise zum Katalysemechanismus zu erhalten, wurden insgesamt 15 verschiedene Inhibitoren daraufhin getestet, ob sie die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse von Ala-Phe-NH₂ durch die Peptidamidase-Variante 6 signifikant herabsetzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8. Inhibitoren, die gegenüber der Peptidamidase getestet worden sind, inkl. Angaben zur jeweiligen Spezifität, zur eingesetzten Konzentration und zum Ergebnis des Inhibitions-Assays.

Inhibitor	Spezifität der Hemmung	Konzentration [μM]	Ergebnis
Ac-Leu-Val-Phe-Aldehyd	HIV-Protease	100	keine Inhibition
Antipaindihydrochlorid	Papain, Trypsin	74	keine Inhibition
Aprotinin	Serinproteasen	300	keine Inhibition
Bestatin	Aminopeptidasen	130	keine Inhibition
Chymostatin	α-, β-, γ-Chymotrypsin	100	starke Inhibition
3,4-Dichloroisocoumarin (DCI)	Serinproteasen	100	keine Inhibition
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	Serinproteasen	100	keine Inhibition
E-64	Cysteinproteasen	28	keine Inhibition
EDTA- Na_2	Metalloproteasen	1300	keine Inhibition
Iodacetamid	Serinproteasen	5000	keine Inhibition
Leupeptin	Serin- und Cysteinproteasen	10	keine Inhibition
Pefabloc SC	Serinproteasen	4000	schwache Inhibition
Pepstatin	Aspartatproteasen	1	keine Inhibition
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serinproteasen	1000	keine Inhibition
Phosphoramidon	Metalloendopeptidasen	600	keine Inhibition
Methylarachidonylfluorophosphonat (MAFP)*	Phospholipase A2	0,1	keine Inhibition

*MAFP ist ein potentieller Inhibitor der FAAH aus *Rattus norvegicus*, einem Amidase-Signatur-Enzym (Deutsch et al., 1997).

Die Mehrheit der getesteten Cystein-, Serin-, Aspartat- und Metalloprotease-Inhibitoren besitzt gegenüber der Pam-Variante 6 keine inhibitorische Wirkung. Lediglich Chymostatin und in hohen Konzentrationen auch Pefabloc SC inhibieren die Pam-Variante 6. Die Inhibition durch Chymostatin erfolgt kompetitiv.

Chymostatin inhibiert bekanntermaßen Serinproteasen mit Chymotrypsin-ähnlicher Spezifität sowie die meisten Cysteinproteasen. Pefabloc SC inhibiert lediglich Serinproteasen. Die Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass es sich bei der Peptidamidase um eine Serin-Hydrolase handelt. Interessanterweise zeigen alle anderen getesteten Serinprotease-spezifischen Inhibitoren im Widerspruch zu dieser Schlussfolgerung keine inhibitorische Wirkung gegenüber der Peptidamidase: Aprotinin; 3,4-Dichloroisocoumarin (DCI); Diisopropylfluorophosphat (DFP); Iodacetamid; Leupeptin; Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).

Wenn es sich bei Pam um eine Serin-Hydrolase handelt, dann um eine mit untypischen Eigenschaften bezüglich der Inhibitor-Sensitivität.

Chymostatin wirkt als kompetitiver Inhibitor, die Inhibition erfolgt nach der Michaelis-Menten-Inhibitionskinetik (Abbildung 25): $v = (v_{\max} \times S) / [(1 + I/K_I) \times K_M + S]$.

Hierbei ist v die Reaktionsgeschwindigkeit, v_{\max} ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, S ist die Substratkonzentration, I ist die Inhibitorkonzentration, K_I ist die Inhibitionskonstante und K_M ist die Michaelis-Menten-Konstante. Es gilt $v_{\max} = 194,3 \text{ U/m}$, $K_M = 0,09 \text{ mM}$ und $K_I = 0,2 \text{ }\mu\text{M}$.

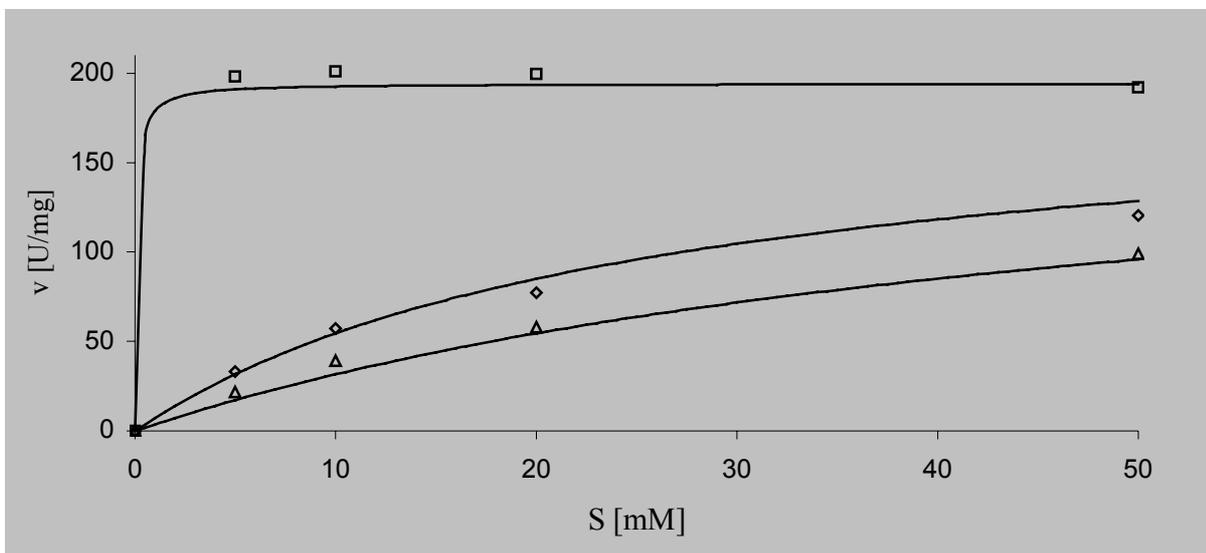


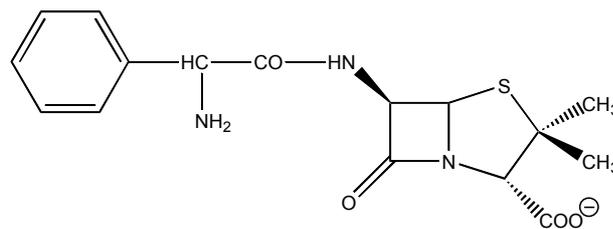
Abbildung 25. Substratkinetik der Pam-Variante 6 mit Ala-Phe-NH₂ (□) und inhibitorische Wirkung von Chymostatin in den Konzentrationen 0,05 mM (◇) und 0,10 mM (△).

5.10 Vergleich der Eigenschaften der Pam-Varianten 6 und 10

Die Pam-Variante 10 entspricht exakt der prozessierten Peptidamidase, wie sie in *S. maltophilia* vorkommt. Durch den Vergleich der Eigenschaften der Pam-Varianten 6 und 10 sollte überprüft werden, inwiefern der veränderte N- und C-Terminus in Pam-Variante 6 einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms ausübt. Die Dipeptidamide Ala-Phe-NH₂ bzw. Z-Gly-Tyr-NH₂ werden durch die Pam-Variante 6 mit 194 U/mg bzw. 24 U/mg umgesetzt, die Hydrolyse durch die Pam-Variante 10 hingegen erfolgt mit 325 U/mg bzw. 58 U/mg. Das entspricht einem Unterschied von Faktor 1,7 bzw. 2,4. Für das Substrat Ala-Phe-NH₂ wurden ebenfalls v_{\max} und K_M ermittelt; die v_{\max} -Werte entsprechen den oben angegebenen Werten. Die K_M -Werte liegen für beide Enzyme unter 0,5 mM.

5.11 Test auf β -Lactamaseaktivität (*in vitro* und *in vivo*)

S. maltophilia, der Herkunftsorganismus von Pam, ist ein Krankheitserreger, der sich vor allem durch seine Resistenzen gegenüber gängigen Breitbandantibiotika auszeichnet. Hierzu gehören auch diverse β -Lactamantibiotika: z. B. Ampicillin (Abbildung 26), Amoxicillin/Clavulan, Aztreonam, Ceftazidim, Cefotaxim, Cefsulodin, Ceftriaxon, Imipenem, Meropenem, Penicillin G und Piperacillin (Carroll et al. (1998) und Denton und Kerr (1998)).



Ampicillin

Abbildung 26. Strukturformel des β -Lactamantibiotikums Ampicillin.

β -Lactamantibiotika weisen grundsätzlich eine hohe antibakterielle Aktivität und eine niedrige Toxizität auf. Sie besitzen einen Anteil von ca. 50% am Antibiotikamarkt. Einige β -Lactamantibiotika zeigen nur ein kleines Wirkungsspektrum antibakterieller Aktivität, wohingegen andere ein breites Wirkungsspektrum aufweisen und in der Lage sind, eine Vielzahl an Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien abzutöten.

Der Angriffspunkt der β -Lactamantibiotika ist die Zellwandsynthese bei Bakterien. Die für die Quervernetzung der Mureinstränge in der Zellwand zuständige Transpeptidase wird kovalent inhibiert. Das System der Knüpfung und Lösung von Bindungen gerät dadurch aus dem Gleichgewicht, und die Bakterienzelle lysiert. Der Ort der Zellwandsynthese ist bei Gram-negativen Bakterien das Periplasma. Die β -Lactamasen, die bei Gram-negativen Bakterien die Resistenz gegenüber β -Lactamantibiotika vermitteln, sind ebenfalls im Periplasma lokalisiert. β -Lactame sind zyklische Säureamide. Die Inaktivierung erfolgt durch die Hydrolyse der Säureamidbindung im β -Lactamring. Bei β -Lactamasen handelt es sich also um Amidohydrolasen.

Für *S. maltophilia* sind die Mechanismen, die die Unempfindlichkeit gegenüber β -Lactamantibiotika vermitteln, bisher nicht vollständig verstanden, obwohl bereits eine *S. maltophilia*- β -Lactamase bekannt ist (Crowder et al., 1998). Da Pam ein periplasmatisches

Enzym ist, bestand die theoretische Möglichkeit, dass es sich bei Pam um eine β -Lactamase handelt. Wenn das der Fall wäre, besäße *S. maltophilia* zwei β -Lactamasen. Um das zu überprüfen, wurde zunächst die *In-vitro*-Inaktivierung des β -Lactamantibiotikums Ampicillin durch Pam untersucht. Es zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen eine partielle Inaktivierung des Ampicillins durch Pam erfolgt, d.h. Ampicillin büßte einen Teil seiner antibiotischen Aktivität gegenüber *E. coli* BL21(DE3) ein, wie im *In-vivo*-Assay gezeigt werden konnte (Tabelle 9).

Tabelle 9. Plattendiffusionstest zur Untersuchung der *In-vitro*-Inaktivierung von Ampicillin durch Pam.

Menge Ampicillin pro Testplättchen [μg]	Hemmhofdurchmesser [cm]	Ergebnis
25	kein Hemmhof vorhanden	deutliche Inaktivierung
25 (Negativkontrolle*)	1,1	
50	1,0	schwache Inaktivierung
50 (Negativkontrolle*)	1,3	
75	1,2	schwache Inaktivierung
75 (Negativkontrolle*)	1,3	
100	1,3	keine Inaktivierung nachweisbar
100 (Negativkontrolle*)	1,3	

* Im Fall der Negativkontrolle wurde das Ampicillin ohne Pam inkubiert.

Mit Plättchen, die unbehandeltes und mit Pam inkubiertes Ampicillin enthielten, wurde ein Agardiffusionstest durchgeführt. Am deutlichsten zeigte sich die Inaktivierung für das 25 μg -Plättchen, das vorhandene Ampicillin hat hier nach der Behandlung mit Pam seine antibiotische Aktivität vollständig eingebüßt. Bei den 50 μg - und 75 μg -Plättchen ist ebenfalls die Tendenz zu erkennen, dass der durch das behandelte Ampicillin erzeugte Hemmhof kleiner ist als der, den das nicht behandelte Ampicillin erzeugt. Bei dem 100 μg -Plättchen ist zwischen dem Testansatz und der Negativkontrolle kein Unterschied zu erkennen. Das liegt vermutlich daran, dass hier auch nach der Inkubation mit Pam noch sehr viel aktives Ampicillin im Ansatz vorlag, so dass der Unterschied nicht sichtbar wird.

Da nicht klar war, ob die Ergebnisse der *In-vitro*-Untersuchung für *In-vivo*-Verhältnisse relevant sind, wurde anschließend überprüft, ob *pam*, wenn es in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) überführt und exprimiert wird, diesem Resistenz gegenüber β -Lactamantibiotika verleihen kann. Das Ergebnis zeigte, dass für keines der getesteten Antibiotika ein Unterschied im Hemmhofdurchmesser von pEK09/*E. coli* BL21 und pET-9a/*E. coli* BL21 (DE3) existiert, d.h. *pam* war nicht in der Lage, eine Resistenz gegenüber den getesteten Antibiotika zu verleihen (Tabelle 10).

Tabelle 10. pET-9a/*E. coli* BL21 (DE3) wurde im Plattendiffusionstest auf seine Empfindlichkeit gegenüber 11 verschiedenen β -Lactamantibiotika getestet.

Antibiotikum	Menge an Antibiotikum in den Testplättchen [μ g]	Ergebnis
Ampicillin	25	keine Resistenz
Amoxicillin/Clavulan	25	keine Resistenz
Aztreonam	30	keine Resistenz
Ceftazidim	30	keine Resistenz
Cefotaxim	30	keine Resistenz
Cefsulodin	30	keine Resistenz
Ceftriaxon	30	keine Resistenz
Imipenem	10	keine Resistenz
Meropenem	10	keine Resistenz
Penicillin G	6	keine Resistenz
Piperacillin	100	keine Resistenz

In vivo konnte also die *in vitro* nachgewiesene β -Lactamaseaktivität gegenüber Ampicillin nicht bestätigt werden. Sie stellt offensichtlich eine Nebenaktivität dar, die *in vivo* keine Relevanz besitzt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Pam auch gegenüber einer Reihe weiterer β -Lactamantibiotika *in vivo* keine Aktivität besitzt.

6. Kristallisation von Pam

6.1 Screening nach initialen Kristallisationsbedingungen für Pam-Variante 6

Die Pam-Variante 6 wurde, wie oben beschrieben, über eine Ni-NTA-Säule und eine Gelfiltrationssäule aufgereinigt. Die Zellen stammten aus der 12-Liter-Fermentation. Die Pam-

Variante 6 lag in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 in einer Konzentration von 15 mg/ml vor. Die Umpufferung und Aufkonzentrierung wurde per Ultrafiltration in einer Amicon-Zelle durchgeführt. Die verwendete Membran besaß ein Ausschlussvolumen von 30 kDa.

Die Kristallisationsexperimente wurden zunächst mit insgesamt 98 unterschiedlichen Puffern (Crystal-Screen-Kits 1 und 2 von Hampton Research) bei 4°C und bei RT durchgeführt (Jancarik et al. (1991) und Cudney et al. (1994)). Das Tropfenvolumen betrug 5 + 5 µl, das Reservoirvolumen war 1 ml. Nach 48 h kam es unter den folgenden Bedingungen zur Ausbildung von Proteinkristallen:

- a) 10% PEG 8000, 0,1 M HEPES, pH 7,5, 8% Ethylenglycol, 4°C
- b) 20% PEG 10000, 0,1 M HEPES, pH 7,5, 4°C
- c) 12% PEG 20000, 0,1 M MES, pH 6,5, RT
- d) 20% PEG 10000, 0,1 M HEPES, pH 7,5, RT

6.2 Optimierung der Kristallisationsbedingungen für Pam-Variante 6

Die unter den initialen Bedingungen erhaltenen Kristalle waren in dem verwendeten Kryoprotektat Glycerin nicht stabil. Um einzeln gewachsene Kristalle geeigneter Größe zu erhalten, die unempfindlich gegenüber den später verwendeten Kryoprotektaten sind und die bei 100 K stabil sind, wurde basierend auf den initialen Kristallisationsbedingungen eine Optimierung durchgeführt. Hierbei wurden die folgenden Parameter variiert: das PEG-Molekulargewicht (200 bis 20000 Da); die PEG-Konzentration (8 bis 20% w/v); die Proteinkonzentration (9 bis 24 mg/ml); der pH-Wert (6,5 bis 8,0); die Inkubationstemperatur (4°C, 16°C und RT) und die Glycerinkonzentration (0 bis 20%). Den Kristallisationsansätzen wurde Natriumazid zugesetzt, um dem Bewuchs durch Pilze und Bakterien entgegenzuwirken.

Kristalle, die die gewünschten Eigenschaften besaßen, wurden schließlich unter den folgenden Bedingungen erhalten: 13% PEG 6000, 0,1 M HEPES pH 7,5, 20% Glycerin, 0,02% Natriumazid, bei RT. Das Tropfenvolumen wurde auf 20 µl erhöht, die Proteinkonzentration der eingesetzten Lösung betrug 24 mg/ml. Abbildung 27 zeigt einen Kristall der Pam-Variante 6, der unter optimierten Bedingungen erhalten wurde.

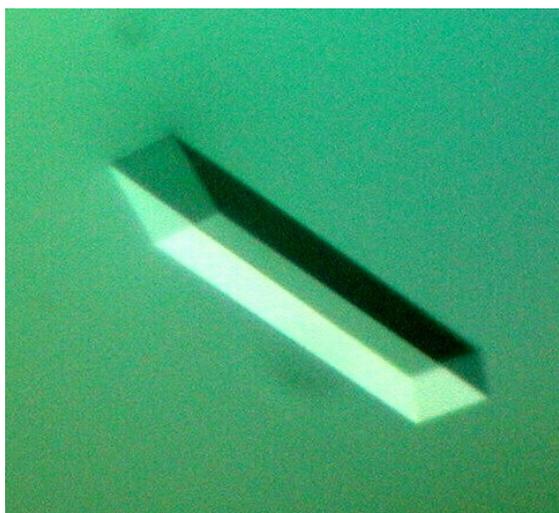


Abbildung 27. Foto eines Kristalls der Peptidamidase-Variante 6 [rekombinant aus pEK06/*E. coli* Origami (DE3)]. Die grüne Färbung tritt auf, da beim Fotografieren ein Linearpolarisationsfilter verwendet worden ist.

7. Strukturanalyse

7.1 Die Struktur von Pam: Nativ und im Komplex mit Chymostatin

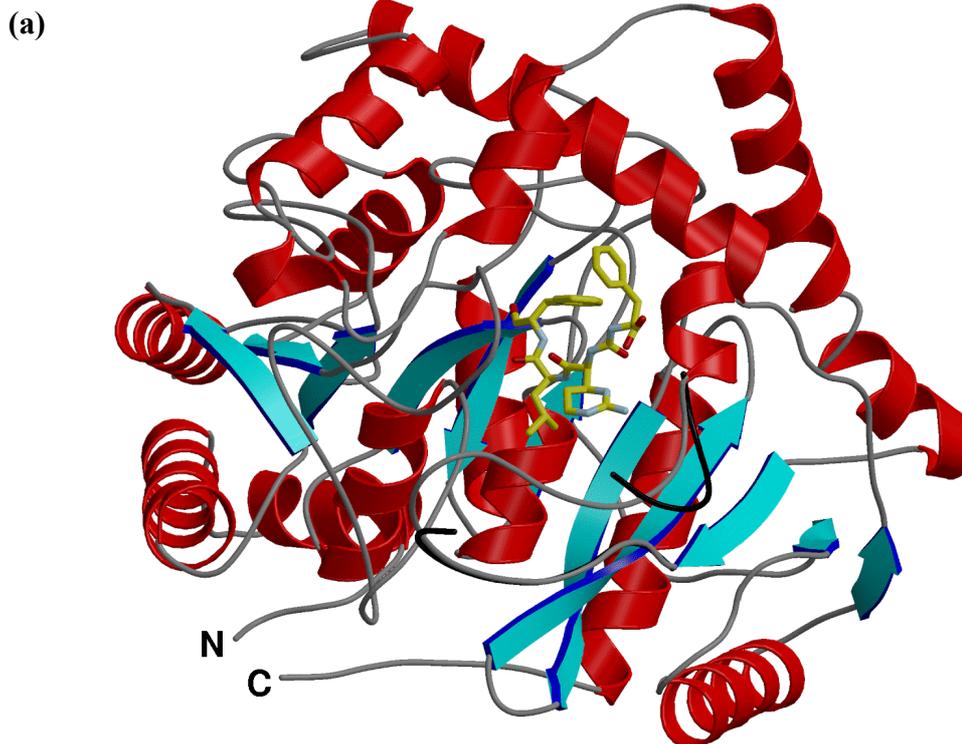
Die native Kristallstruktur von Pam-Variante 6 wurde durch multiplen isomorphen Ersatz (MIR, multiple isomorphous displacement) mit anomaler Streuung bei einer Auflösung von 2,3 Å und erweitert durch Dichtemodifizierung (density modification) bei 1,4 Å bestimmt (Tabelle 11).

Tabelle 11. Röntgenkristallographische Daten. Die Schweratomderivate und der Peptidamidase-Chymostatin-Komplex wurden durch Soaking erzeugt. $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I_i(h)}$, wobei $I_i(h)$ der i -ten Messung und $\langle I(h) \rangle$ Mittelwert aller Messpunkte von $I(h)$ entspricht. $R_{\text{iso}} = \frac{\sum |F_P - F_{\text{PH}}|}{\sum F_P}$, wobei F_P und F_{PH} jeweils die Strukturfaktoramplituden der nativen und der Derivat-Daten sind. (*) zeigt die höchste Auflösungsschale an. Für die Berechnung des freien R-Wertes sind 5% der Reflexe zufällig ausgewählt worden. ¹Der mittlere Gütefaktor nach der Dichtemodifikation. Die Daten wurden von J. Granzin und J. Labahn zur Verfügung gestellt (Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

Datensammlung					
Verbindung	Nativ +HgCl ₂ (1 mM per	Nativ +[Pt(en)I] ₂ (NO ₃) ₂ (1 mM per 20 h)	Nativ +[PtCl ₂ (C ₂ H ₄) ₂] (1 mM per 20 h)	Nativ (+HEPES)	Nativ +Chymostatin (10 mM per 1 Woche)

	20 h)				
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Gitterkonstanten					
a (Å)	73,96	73,94	73,66	74,18	74,6
b (Å)	62,5	62,55	62,54	62,6	62,56
c (Å)	101,7	101,93	101,18	101,91	102,38
β (°)	90,0	90,0	90,0	90,0	90,0
Auflösung (Å)	2,3	2,3	2,3	1,4	1,78
Röntgenstrahlungsquelle	Drehanoden-Röntgen-generator	Drehanoden-Röntgen-generator	Drehanoden-Röntgen-generator	Grenoble ID14-1	Grenoble ID14-1
Detektor	Mar300	Mar300	Mar300	MarCCD	MarCCD
Wellenlänge (Å)	1,54 (CuK _α)	1,54 (CuK _α)	1,54 (CuK _α)	0,934	0,934
Reflexe der asymmetrischen Einheit	40849	40277	40516	182206	89189
Vollständigkeit (%)	98,2 (96,8)*	96,6 (95,2)*	98,3 (97,0)*	99,3 (95,0)*	98,1 (79,9)*
R _{merge} %	5,0 (11,1)*	6,6 (14,4)*	4,8 (13,1)*	10,3 (16,9)*	9,9 (27,3)*
I/σ(I)	14,1 (8,9)*	11,8 (7,1)*	17,6 (7,9)*	7,76 (5,1)*	6,1 (3,0)*
R _{iso}	17,3	14,4	27,6	-	-
Anzahl der Schweratomlagen pro asymmetrischer Einheit	12	5	2	-	-
R _{cullis}	0,76	0,92	0,99	-	-
Figure of Merit	0,452(0,796) ¹	-	-	-	-
Verfeinerung					
Auflösung				100-1,4	100-1,8
R _{work} %				18,9	20,3
R _{free} %				19,9	21,6
Aminosäurereste				42-531	43-529
mittlerer Temperaturfaktor (Å)					
Protein				12,7	13,6
Ligand				23,4	26,7
Wasser				30,0	24,1
mittlere quadratische Abweichung					
Bindungsabstände (Å)				0,006	0,007
Bindungswinkel (Å)				1,371	1,389

Die Kristallstruktur des Pam-Chymostatin-Komplexes (Pam-Cst) wurde bei einer Auflösung von 1,8 Å unter Verwendung der nativen Struktur als Ausgangsmodell für den molekularen Ersatz bestimmt. Die asymmetrische Einheit enthält zwei Moleküle. Die ersten und letzten Aminosäurereste, die in der Elektronendichtekarte zu erkennen sind, sind Pro-42 und Phe-532 für Pam bzw. Phe-43 und Phe-529 für Pam-Cst. Innerhalb dieser Reste ist die Elektronendichte jeweils gut definiert. Eine Ausnahme bildet die Schleife 463 bis 470 (Abbildung 28 (a), Schleife in schwarz), die in der nativen Pam-Struktur ungeordnet ist. Die Strukturen der nativen Pam und von Pam-Cst sind grundsätzlich identisch (0,182 Å mittlere quadratische Abweichung).



(b)

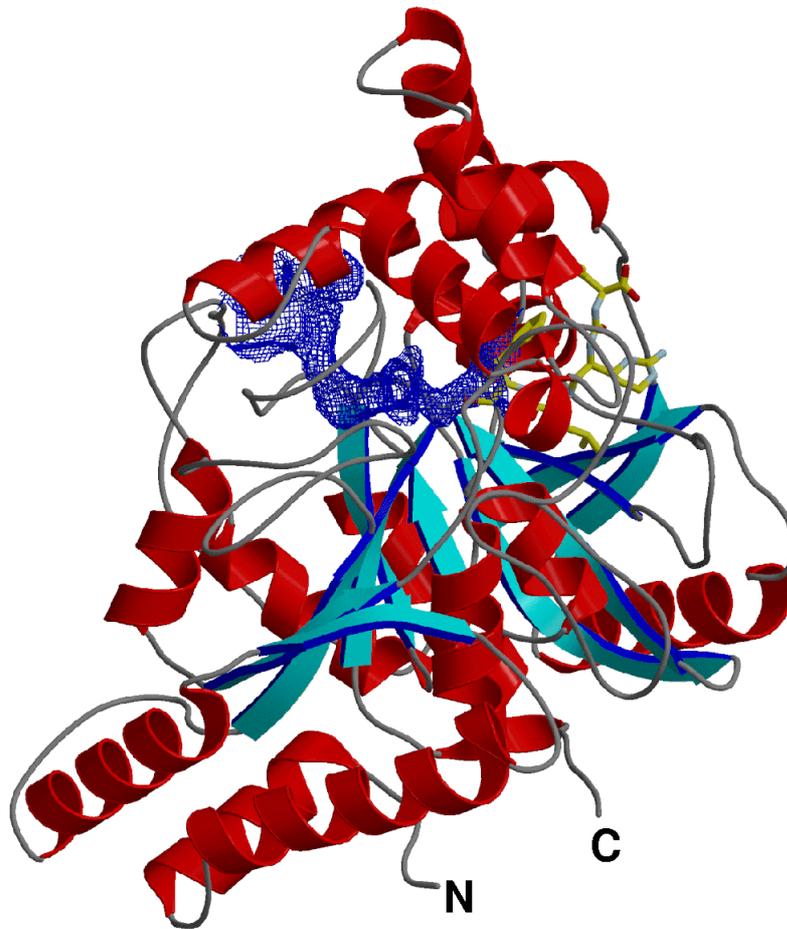


Abbildung 28. Die Faltung der Peptidamidase (Pam) aus *S. maltophilia*, dargestellt im Bändermodell. β -Stränge sind in blau, α -Helices in rot und die übrigen Bereiche sind in grau dargestellt. Die Atome des Inhibitors Chymostatin (Cst) sind je nach Atomtyp gefärbt. (a) Frontale Sicht auf das aktive Zentrum. Die teilweise ungeordnete Schleifenstruktur im nativen Peptidamidase-molekül ist in schwarz dargestellt. (b) Sicht auf das um 90° um die vertikale Achse gedrehte Peptidamidase-molekül. Das aktive Zentrum befindet sich jetzt auf der rechten Seite des Peptidamidase-moleküls. Der das Protein durchziehende Kanal ausgehend vom aktiven Zentrum zu einem anderen Punkt auf der Proteinoberfläche ist dunkelblau hervorgehoben. Die Struktur wird ausführlich im Text beschrieben. Die Abbildung wurde von J. Granzin und J. Labahn zur Verfügung gestellt (Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

Pam besitzt eine konische Form mit Maßen von ca. $56 \times 56 \times 38 \text{ \AA}^3$. Die Tertiärstruktur besteht aus einem zentralen, gemischten 11-strängigen β -Faltblatt-Kern, der oberhalb und unterhalb mit zwei Lagen α -Helices besetzt ist. Die Grundfläche des Kegels wird durch zwei senkrecht zueinander angeordnete Paare von α -Helices und zwei ausgedehnten Schleifen gebildet, zu denen auch die oben beschriebene, in der nativen Struktur ungeordnete Schleife gehört (Abbildung 28 (a)). Die Strukturelemente an der Grundfläche bilden gleichzeitig eine große Tasche aus, die die katalytischen Aminosäurereste enthält und in der der Inhibitor

Chymostatin bindet. Oberhalb des β -Faltblatts wird die Basis des Kegels durch 14 C-terminale α -Helices gebildet (Abbildung 28 (a)). Die Spitze des Kegels wird durch die drei am N-Terminus gelegenen α -Helices gebildet (Abbildung 28 (b)).

Eine zweite, kleinere Tasche mit trichterähnlicher Struktur an der Seite des Kegels ist mit der Inhibitor-Bindestelle durch einen schmalen, wassergefüllten, das Proteinmolekül durchziehenden Kanal verbunden (Abbildung 28 (b)). In dieser Tasche ist in der nativen Struktur ein Puffermolekül, das eine zu HEPES äquivalente Symmetrie aufweist, durch eine Salzbrücke zwischen der HEPES-Sulfonsäuregruppe und Arg-248 sowie der HEPES-Aminogruppe und Asp-448 gebunden. Pam-Cst enthält dieses Molekül nicht.

Sowohl in der nativen als auch in der Enzym-Inhibitor-Struktur liegt Ser-202 in der energetisch ungünstigen *cis*-Konformation vor, die über eine $O\gamma$ - $O\gamma$ -Wasserstoffbrückenbindung mit Ser-226 stabilisiert wird.

Die zwei in der prozessierten Peptidamidase vorkommenden Cysteylreste Cys-200 und Cys-229 liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Für die Enzym-Inhibitor-Struktur gibt es keinen Hinweis auf die Ausbildung einer Disulfidbrücke, in der nativen Struktur hingegen liegt zu einem geringen Anteil eine Disulfidbrücke vor. Mit dem Ellman-Assay wurde der Anteil der ausgebildeten Disulfidbrücken am gelösten Protein mit 33% bestimmt.

Der auffälligste strukturelle Unterschied zwischen der nativen Enzymstruktur und der Enzym-Inhibitor-Struktur von Pam ist die Schleife 463-470, die nur in der Enzym-Inhibitor-Struktur einen geordneten Zustand einnimmt.

7.2 Interaktionen im Pam-Chymostatin-Komplex

Da Chymostatin zuvor im Rahmen des Inhibitorscreenings als starker kompetitiver Inhibitor von Pam identifiziert wurde ($K_I = 0,2 \mu\text{M}$), wurden Pam-Kristalle mit 10 mM Chymostatin inkubiert und per Röntgenstrukturanalyse untersucht. Bei dem eingesetzten Chymostatin (Roche Diagnostics) handelt es sich um ein Gemisch aus Derivaten, die in den folgenden Anteilen vertreten sind: A: 70%, B: 24% und C: 6%. Chymostatin A entspricht *N*-[$\{(S)$ -1-Carboxy-2-phenylethyl]-carbamoyl]- α -[2-iminohexahydro-4(*S*)-pyrimidyl]-L-leucyl-L-phenylalaninal. Bei Chymostatin B und C ist der L-Leucylrest durch L-Valinyl- bzw. einen L-Isoleucylrest ersetzt (Abbildung 29).

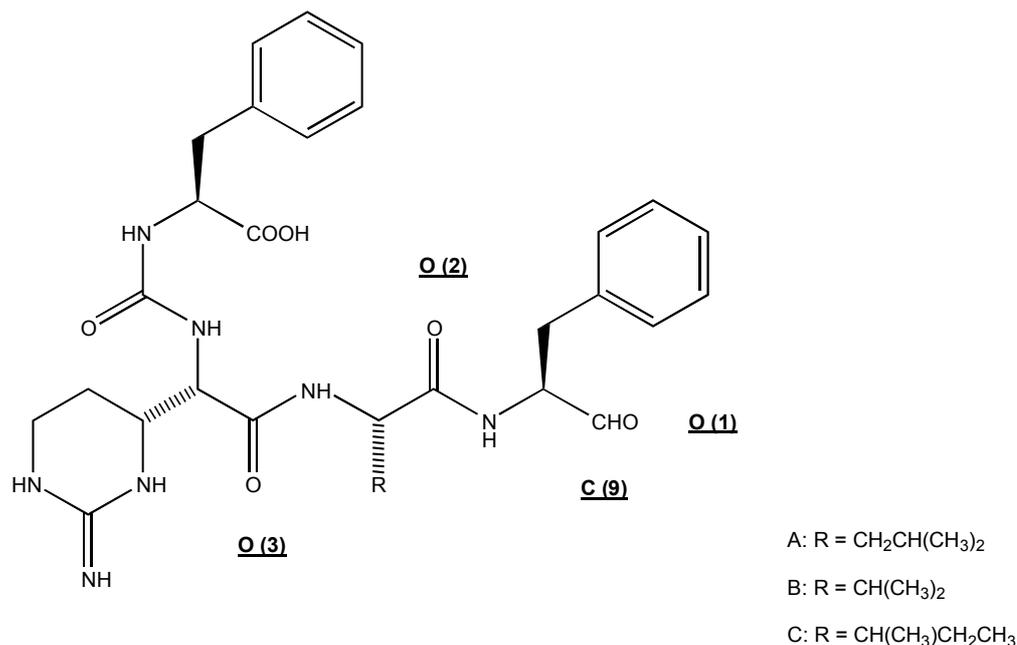


Abbildung 29. Strukturformel von Chymostatin. Chymostatin ist ein Inhibitor von Serin- und Cysteinproteasen. Es liegt ein Gemisch aus drei Chymostatin-Derivaten vor: A: R = Leu, B: R = Val, C: R = Ile. Die Sauerstoffatome O(1), O(2) und O(3) spielen bei der Enzym-Substrat-Wechselwirkung eine Rolle. C(9) ist der Aldehyd-Kohlenstoff.

In dem Pam-Chymostatin-Komplex ist nur Chymostatin A gebunden, wie durch Strukturanalyse gezeigt werden konnte (Abbildung 30).

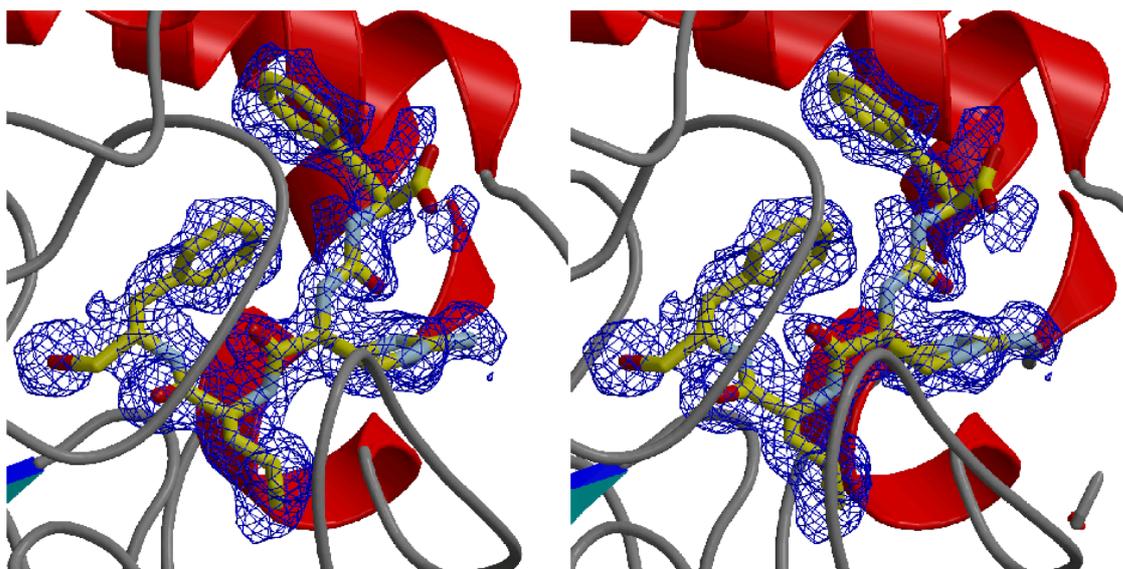


Abbildung 30. Stereo-Ansicht der bei 2,5 σ konturierten Differenzelektronendichte ($F_o - F_c$), berechnet mit den nativen Phasen des Pam-Cst-Komplexes. Cst steht für

Chymostatin. Die Abbildung wurde von J. Granzin und J. Labahn zur Verfügung gestellt (Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

Es ist bekannt, dass Peptidaldehyde Serin- und Cysteinproteasen inhibieren. Das Peptidaldehyd-Derivat Chymostatin bildet in anderen Fällen Halbacetale oder Halbthioacetale mit der nucleophilen Hydroxyl- bzw. Thiolgruppe des jeweiligen Enzyms aus (Bullock et al., 1996). Die gebildeten Halbacetale oder Halbthioacetale ähneln dem Übergangszustand, der bei der Hydrolyse von Peptidbindungen auftritt. Chymostatin inhibiert ebenfalls Aspartatproteasen, hierbei wird vermutlich die Aldehydfunktion im Inhibitor hydratisiert und bildet so ebenfalls eine dem Übergangszustand analoge Struktur aus (Sarubbi et al., 1993).

Die Strukturdaten zeigen, dass im Fall der Inhibition von Pam durch Chymostatin weder ein kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex ausgebildet wird noch eine Hydratation der Aldehydfunktion von Chymostatin auftritt.

Zur Charakterisierung der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung wurden zunächst die Abstände der einzelnen Atome aus Pam und Chymostatin analysiert. Die Abstände zwischen funktional relevanten Atomen innerhalb der Peptidamidase und zwischen Atomen der Peptidamidase und Chymostatin sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

Tabelle 12. Wasserstoffbrückenbindungen und Kontakte zwischen funktional relevanten Atomen innerhalb von Pam und zwischen Atomen von Pam und Chymostatin. Cst steht für Chymostatin. Die Daten wurden von J. Granzin und J. Labahn zur Verfügung gestellt (Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

Atome aus Pam	Atome aus Pam	Atomabstand [Å]
N ζ -Lys-123	O γ -Ser-226	4,96
N ζ -Lys-123	O γ -Ser-203	3,02
N ζ -Lys-123	O γ -Ser-202	2,81
N ζ -Lys-123	O δ -Asp-259	8,67
O γ -Ser-226	O γ -Ser-202	2,74
Atome aus Chymostatin	Atome aus Pam	Atomabstand [Å]
Cst O(1)	O-Ala-171	3,07
Cst O(1)	O γ -Ser-202	2,92
Cst O(1)	O γ -Ser-226	2,90
Cst O(1)	Wat 1	2,88
Cst O(1)	Wat 2	3,21
Cst O(2)	N δ (2)-Asn-172	3,15
Cst O(3)	N δ (2)-Asn-172	2,92
Cst C(9)	O γ -Ser-202	3,02
Cst C(9)	O γ -Ser-226	2,51

Von größtem Interesse sind hierbei die Wechselwirkungen, die zwischen den Atomen der Aldehydfunktion des Inhibitors und Atomen des Enzyms auftreten. Das O γ -Ser-226 ist näher am Carbonyl-C(9) des Chymostatins gelegen als irgendein anderes Atom von Pam, wie es für das Nucleophil zu erwarten wäre (Abbildung 31).

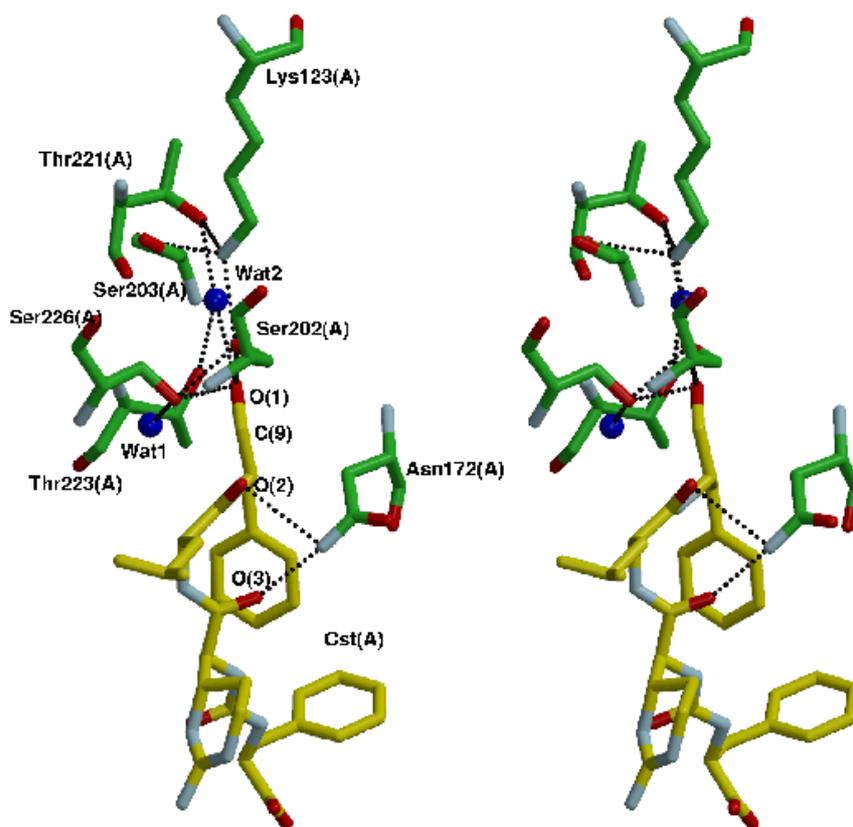


Abbildung 31. Stereoabbildung der Aminosäurereste, die im Pam-Chymostatin-Komplex direkt mit dem Inhibitor wechselwirken bzw. die eine zentrale Rolle bei der Katalyse spielen. Die Aminosäurereste von Pam sind in grün, der Inhibitor Chymostatin in gelb dargestellt. Die Abbildung wurde von J. Granzin und J. Labahn zur Verfügung gestellt (Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

Die Aminogruppe von Lys-123 hingegen steht nicht im direkten Kontakt zum Chymostatin. Die Seitenkette von Lys-123 wird durch Wasserstoffbrückenbindungen mit O γ von Thr-221, Ser-203 und Ser-202 in Position gehalten. Ser-202 bildet darüber hinaus eine Wasserstoffbrücke mit Ser-226 aus. Cst-Carbonyl-O(1) bildet sowohl mit O γ -Ser-202 als auch mit O γ -Ser-226 Wasserstoffbrücken aus.

Weitere gerichtete Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor finden durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen N δ -Asn-172 und dem Cst-Carbonyl-O(2) und -O(3) statt. Diese können nur ausgebildet werden, wenn der Inhibitor die entsprechende Konformation einnimmt. Die Bedeutung der Wechselwirkung zwischen N δ -Asn-172 und Cst-Carbonyl-O(2) wird dadurch deutlich, dass Ac-L-Phe-NH $_2$ bei einer Substratkonzentration von 10 mM mit einer um den Faktor 57 höheren Aktivität umgesetzt wird als L-Phe-

NH₂ (L-Phe-NH₂ besitzt im Gegensatz zu Ac-L-Phe-NH₂ nicht den zu Cst-Carbonyl-O(2) äquivalenten Carbonyl-Sauerstoff).

Der positiv geladene cArg-Rest (2-Iminohexahydro-4(S)-pyrimidyl) des Chymostatins ist zwischen zwei Clustern mit negativ geladenen Aminosäureresten gebunden. Der erste Cluster enthält Asp-224, Glu-231, Asp-359 und Glu-471, während der zweite Cluster die Aminosäurereste Asp-465, Asp-466 und Glu-467 umfasst. Die Aminosäurereste des zweiten Clusters sind auf der bereits erwähnten Schleife (463-470) lokalisiert, die in der nativen Struktur ungeordnet vorliegt.

Ungerichtete Wechselwirkungen vom van-der-Waals-Typ mit dem hydrophoben Chymostatin und der Bindungsstelle in Pam (beteiligte Aminosäurereste: 171-173, 180, 200-202, 223, 224, 226, 229, 254, 359, 360, 363, 364, 407, 459, 466 und 468) scheinen die treibende Kraft bei der Ausbildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes zu sein. Pam bindet sein Substrat vermutlich überwiegend durch ungerichtete Wechselwirkungen. Diese Art der Wechselwirkung ist weniger restriktiv als es z. B. bei Wasserstoffbrücken der Fall ist. Dies erklärt auch, warum Pam ein vergleichsweise breites Substratspektrum aufweist. Des Weiteren geht aus dem Substratspektrum hervor, dass die getesteten Aminosäureamide mit einer β -Verzweigung in der Seitenkette durchgehend schlecht umgesetzt werden (L-Ile-NH₂ und L-Val-NH₂). In Übereinstimmung mit diesem Befund bindet Pam selektiv das Chymostatin-Derivat A aus dem Gemisch der Derivate A, B und C. Die zusätzliche(n) Methylgruppe(n) an C β im Fall von Chymostatin-Derivat B bzw. C stellen vermutlich eine sterische Hinderung bei der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung dar.

8. Gerichtete Mutagenese mit der Pam

Um weitere Erkenntnisse zum Katalysemechanismus zu gewinnen und insbesondere Aussagen über die Rolle einzelner Aminosäurereste beim Katalysemechanismus treffen zu können, sollten die Pam-Strukturdaten durch funktionelle Daten ergänzt werden. Hierzu wurden in einer gerichteten Mutagenese einzelne relevante Aminosäurereste ausgetauscht. Anschließend wurden die erzeugten Pam-Varianten kinetisch charakterisiert. Die Aminosäurereste wurden jeweils durch Alanin ersetzt, das in der Seitenkette keine funktionelle Gruppe trägt.

Die Lage der Aminosäurereste Ser-202, Ser-226 und Lys-123 relativ zu dem am Enzym gebundenen Chymostatin, ihre Konservierung in der Enzymfamilie als Teil der AS-Sequenz

(Abbildung 12) und die Bedeutung der homologen Reste im Katalysemechanismus der FAAH machten sie zu den Hauptkandidaten bei Mutageneseuntersuchungen. Zusätzlich wurden auch die Reste Cys-200 und Thr-221 mutiert. Der Cysteylrest-200 wurde mutiert, um festzustellen, welche Rolle die teilweise ausgebildete Disulfidbrücke spielt. Der Threoninrest-221 wurde ausgetauscht um dessen mögliche katalytische Funktion bei der Aktivierung des Wassers, welches das Enzym-Acyl-Intermediat hydrolysiert, zu überprüfen.

Der Austausch des jeweiligen Codons erfolgte mittels PCR unter Berücksichtigung des Codongebrauchs von *E. coli*.

8.1 Expression und Aufreinigung der Pam-Varianten S202A, S226A, K123A, C200A und T221A

Die fünf Varianten Pam-S202A, Pam-S226A, Pam-K123A, Pam-C200A und Pam-T189A wurden in *E. coli* Origami (DE3) unter den für Pam-Variante 6 optimierten Bedingungen exprimiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule. Abbildung 32 zeigt die nach der Reinigung im SDS-Gel aufgetrennten Pam-Varianten. Pam-Variante 6 wurde ebenfalls aufgetragen.

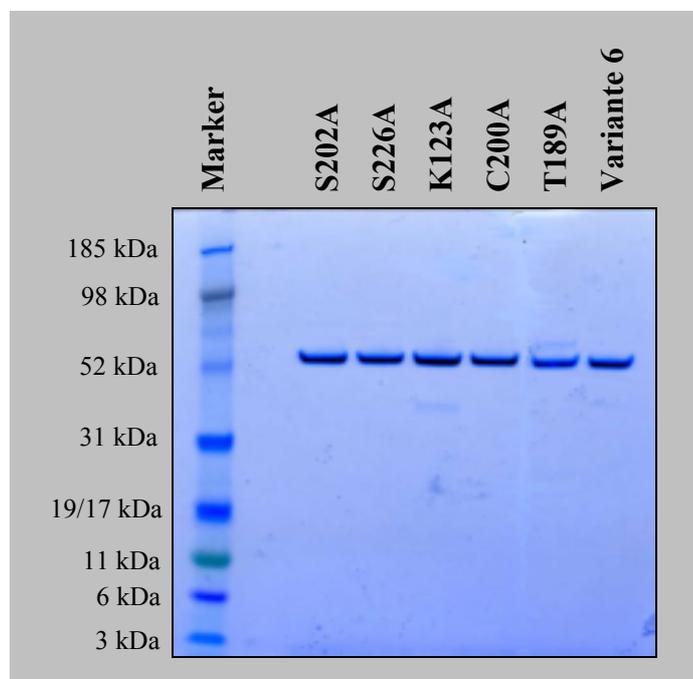


Abbildung 32. Coomassie-gefärbtes SDS-Gel, in dem die aufgereinigten Pam-Varianten aufgetragen worden sind: Pam-S202A; Pam-S226A; Pam-K123A; Pam-C200A; Pam-T189A; Pam-Variante 6; Proteingrößenstandard (Marker): Multimark von Invitrogen.

8.2 Kinetische Charakterisierung der Pam-Varianten S226A, K123A, S202A, C200A und T221A

Die Varianten Pam-S226A und Pam-K123A sind vollständig inaktiv, wohingegen Pam-S202A eine um den Faktor 140 reduzierte Aktivität aufweist (Tabelle 13). Diese Ergebnisse weisen zusammen mit den Strukturdaten klar darauf hin, dass es sich bei Ser-226 um das primäre Nucleophil von Pam handelt. Lys-123 spielt offensichtlich ebenfalls eine essentielle Rolle, ohne jedoch direkten Kontakt zum Substrat oder zum primären Nucleophil Ser-226 zu haben. Die starke Reduktion der Aktivität im Fall von Pam-S202A zeigt, dass Ser-202 ebenfalls wichtige, aber nicht essentielle Aufgaben wahrnimmt.

Die kinetischen Daten der Pam-Variante S202A sind in Abbildung 33 wiedergegeben. Nach einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik liegt der errechnete K_M -Wert bei 0,5 mM und der v_{\max} -Wert bei 1,4 U/mg. Möglicherweise wird Ser-202 in der Pam-Variante S202A funktional durch ein Wassermolekül ersetzt, so dass mit stark herabgesetzter Aktivität weiteres Substrat umgesetzt werden kann.

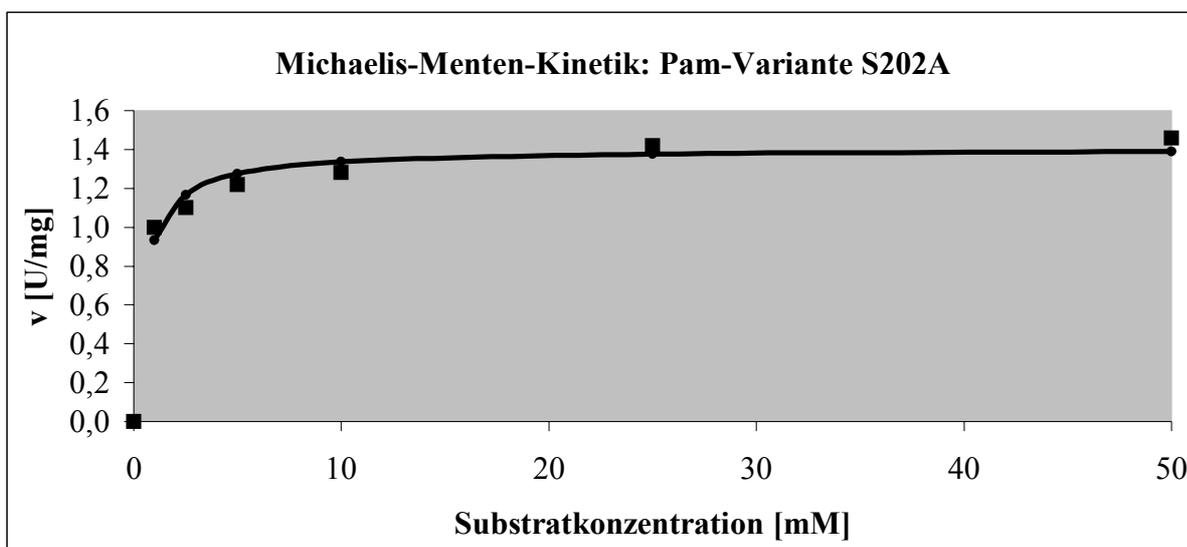


Abbildung 33. Kinetische Charakterisierung der Pam-Variante S202A mit dem Substrat Ala-Phe-NH₂. In der Grafik sind sowohl die Meßwerte (■) als auch die berechnete Michaelis-Menten-Kinetik eingetragen. Es gilt $v = (v_{\max} \times S)/(K_M + S)$, mit $v_{\max} = 1,4$ U/mg und $K_M = 0,5$ mM.

Der Austausch Cys-200-Ala in Pam-Variante 6 führt bezogen auf das Substrat Ala-Phe-NH₂ zu einer Herabsetzung der spezifischen Aktivität um den Faktor zwei ($v_{\max} = 100,2$ U/mg). Der K_M -Wert beträgt 0,05 mM. Da eine vergleichsweise hohe Restaktivität vorhanden ist, kann nicht davon ausgegangen werden, dass Cys-200 in direkter Weise an der Katalyse

beteiligt ist. In Abbildung 34 sind die kinetischen Daten der Pam-Variante C200A mit dem Substrat Ala-Phe-NH₂ wiedergegeben.

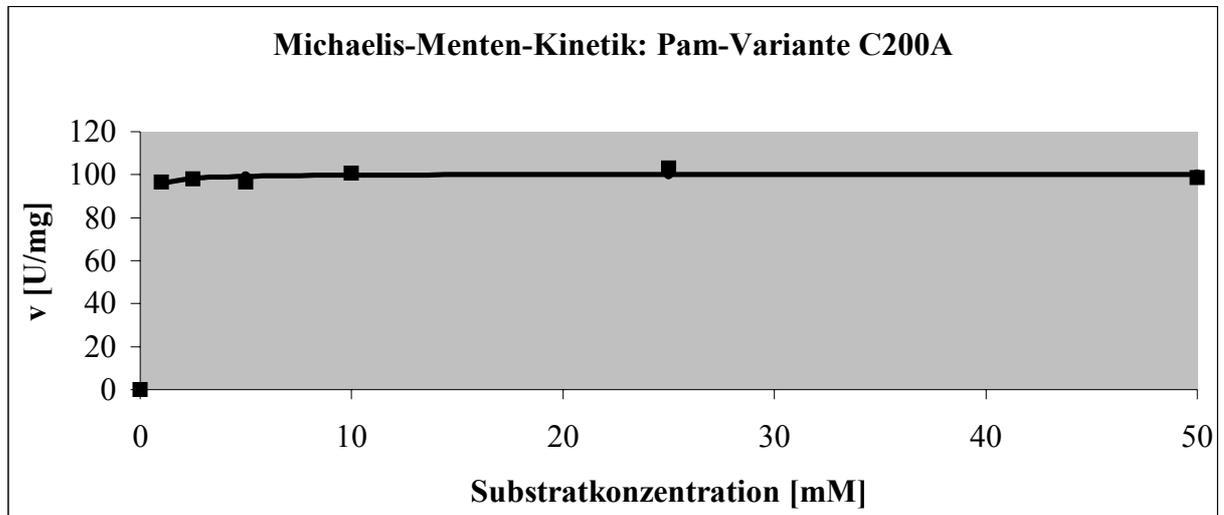


Abbildung 34. Kinetische Charakterisierung der Pam-Variante C200A mit dem Substrat Ala-Phe-NH₂. In der Grafik sind sowohl die Meßwerte (■) als auch die berechnete Michaelis-Menten-Kinetik eingetragen. Es gilt $v = (v_{max} \times S)/(K_M + S)$, mit $v_{max} = 100,2$ U/mg und $K_M = 0,05$ mM.

Die Variante Pam-T221A zeigt eine Reduktion in der spezifischen Aktivität um den Faktor drei. Wiederum kann hier wegen der vergleichsweise hohen Restaktivität eine essentielle Rolle bei der Katalyse ausgeschlossen werden. Das Thr-221-O γ (1) bildet normalerweise eine Wasserstoffbrücke zu Lys-123-N ζ aus und stabilisiert auf diese Weise die Lys-Seitenkette. Die Herabsetzung der spezifischen Aktivität könnte daher auf eine Veränderung in der Positionierung von Lys-123 zurückzuführen sein. Die kinetischen Daten der Pam-Variante T221A sind in Abbildung 35 dargestellt.

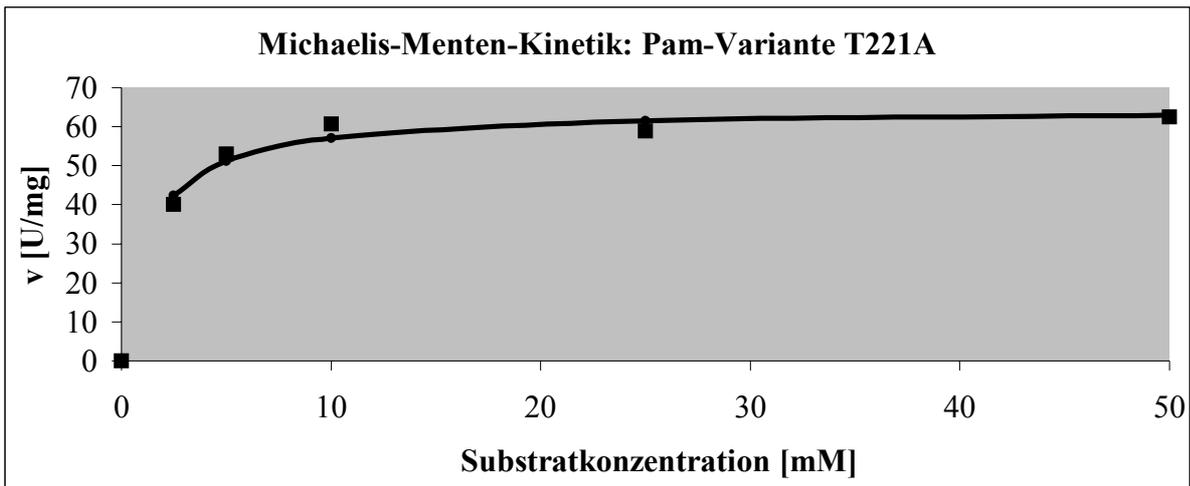


Abbildung 35. Kinetische Charakterisierung der Pam-Variante T221A mit dem Substrat Ala-Phe-NH₂. In der Grafik sind sowohl die Meßwerte (■) als auch die berechnete Michaelis-Menten-Kinetik eingetragen. Es gilt $v = (v_{\max} \times S)/(K_M + S)$, mit $v_{\max} = 64,6$ U/mg und $K_M = 1,3$ mM.

Sämtliche kinetischen Daten der erzeugten Pam-Varianten sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tabelle 13. Kinetische Eigenschaften von Pam-Variante 6 und den Pam-Varianten Pam-S202A, Pam-S226A, Pam-K123A und Pam-C200A. Die kinetischen Messungen sind für das Substrat Ala-Phe-NH₂ durchgeführt worden.

Enzyme	v_{\max} [U/mg]	K_M [mM]
Pam-Variante 6	194,3	< 0,5
Pam Ser-202-Ala	1,4	0,5
Pam Ser-226-Ala	0	nb
Pam Lys-123-Ala	0	nb
Pam Cys-200-Ala	100,2	< 0,5
Pam Thr-221-Ala	64,6	1,3

nb: nicht bestimmt

Die v_{\max} -Werte aus Tabelle 13 sind in Form eines Balkendiagramms in Abbildung 36 dargestellt.

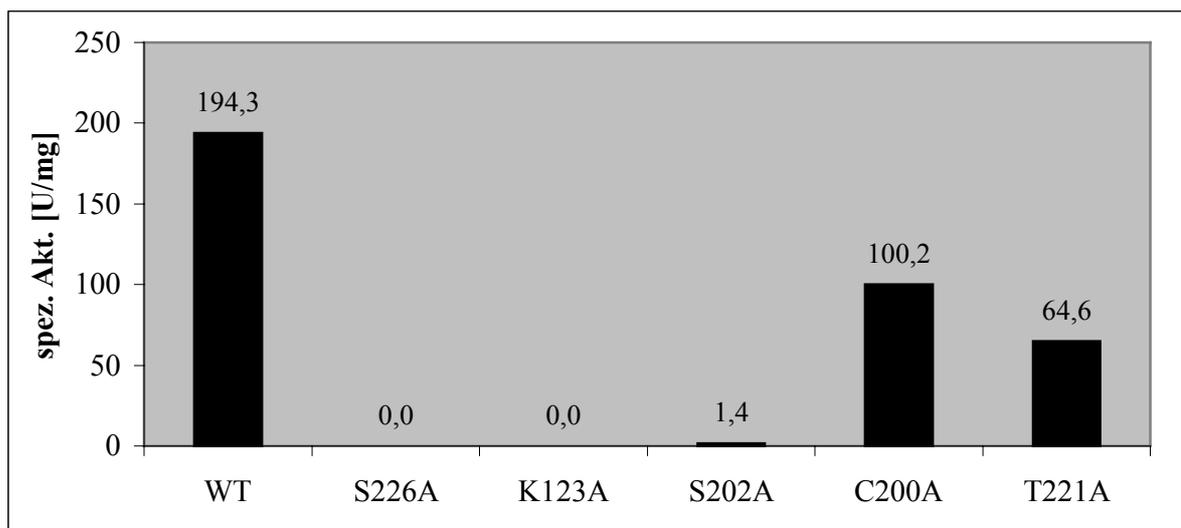


Abbildung 36. Überblick über die spezifischen Aktivitäten der Pam-Variante 6 sowie der Pam-Variante S226A, Pam-Variante K123A, Pam-Variante S202A, Pam-Variante C200A und Pam-Variante T221A gegenüber dem Substrat Ala-Phe-NH₂.

Die zusammenfassende Betrachtung und Interpretation der Ergebnisse der Strukturanalyse, des Inhibitionsspektrums und der kinetischen Daten der einzelnen Pam-Varianten wird im Diskussionsteil vorgenommen.

8.3 Kristallisation der Pam-Varianten S202A, S226A, K123A, C200A und T221A

Die Kristallisation der Varianten Pam-S202A, Pam-S226A, Pam-K123A, Pam-C200A und Pam-T189A wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie für Pam-Variante 6. Anschließend wurde eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse liegen jedoch noch nicht vor.

9. Enzymatische Synthese von Peptidamiden

9.1 Peptidamidsynthese in organischen Lösungsmitteln

Zunächst wurde der durch das Dialysieren und Lyophilisieren auftretende Aktivitätsverlust bei der Peptidamidase quantifiziert. Die in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 vorliegende Pam-Variante 6 besaß eine spezifische Aktivität von 194 U/mg (bezogen auf Ala-Phe-NH₂). Im Anschluss an Dialyse und Lyophilisieren war eine Restaktivität von 124 U/mg vorhanden. Der durch die Behandlung hervorgerufene Aktivitätsverlust betrug demnach 36%.

Unter den für die Peptidamidase aus Orangen optimierten Bedingungen (Cerovsky und Kula, 2001) wurden mit der *S. maltophilia*-Peptidamidase Amidierungsreaktionen für vier unterschiedliche Substrate angesetzt (Abbildung 37).

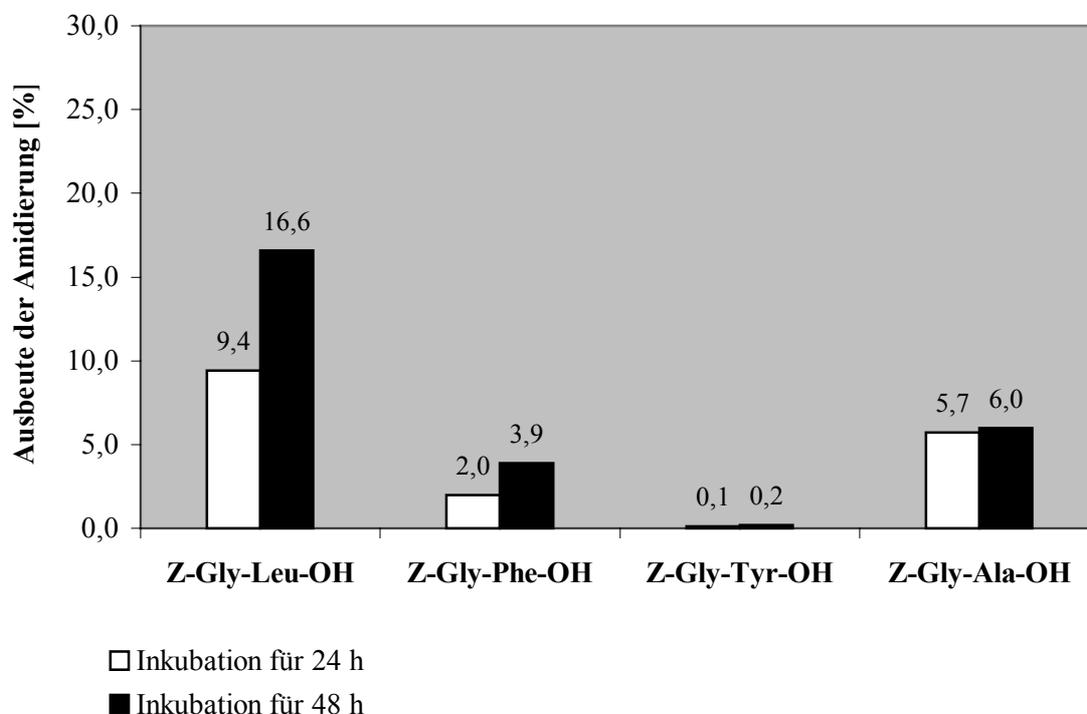


Abbildung 37. Umsetzung verschiedener Peptidderivate mit der *S. maltophilia*-Peptidamidase in Gegenwart von 71% (v/v) Acetonitril, 25% (v/v) DMF, 3% (v/v) H₂O, 70 mM NH₄HCO₃, 50 mM Peptidsubstrat und 2 mg lyophilisierte Peptidamidase bei 40°C unter Schütteln für 24 bzw. 48 h.

Im Fall von Z-Gly-Tyr-OH fand so gut wie keine Amidierung statt, bei Z-Gly-Phe-OH und Z-Gly-Ala-OH waren schlechte Ausbeuten zu verzeichnen. Bei Z-Gly-Leu-OH wurde nach 48 h immerhin eine Ausbeute von 16,6% erreicht. Wie stark verlangsamt die Kondensation im Vergleich zur Hydrolysereaktion abläuft, ist an den langen Inkubationszeiten und der großen Menge an eingesetztem Enzym zu erkennen.

Unter identischen Bedingungen wurde bei der Amidierung von Z-Gly-Leu-OH mit der Orangen-Peptidamidase nach 48 h eine Ausbeute von 32% erzielt (Cerovsky und Kula, 2001). Die Ergebnisse zeigen, dass die Amidierung prinzipiell auch mit der *S. maltophilia*-Peptidamidase möglich ist. Die Ausbeuten liegen jedoch niedriger als diejenigen, die mit dem Orangen-Enzym erreicht worden sind (Cerovsky und Kula, 2001).

Zur Überprüfung der Stabilität der *S. maltophilia*-Peptidamidase unter den gewählten Bedingungen und die Auswirkungen auf die Ausbeute wurde die eingesetzte Enzymmenge variiert (Abbildung 38). Als Testsubstrat wurde Z-Gly-Leu-OH verwendet.

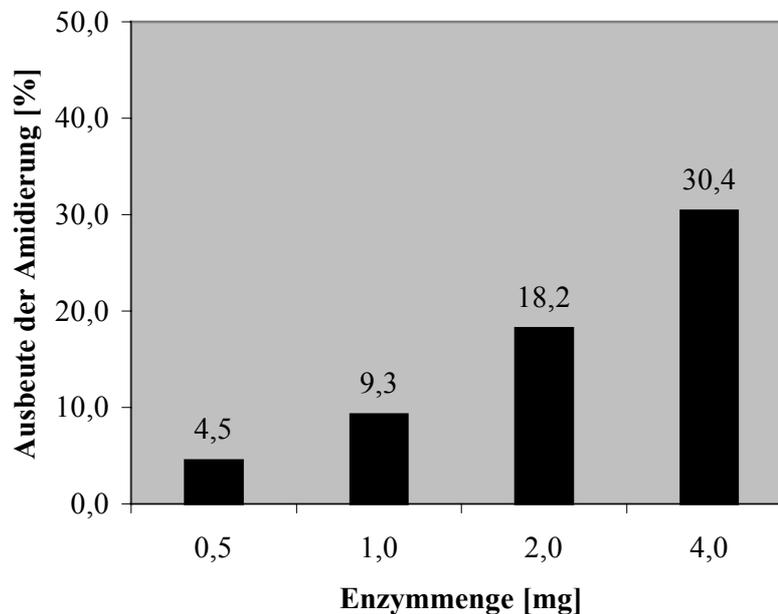


Abbildung 38. Amidierung von Z-Gly-Leu-OH mit der *S. maltophilia*-Peptidamidase in Gegenwart von 71% (v/v) Acetonitril, 25% (v/v) DMF, 3% (v/v) H₂O, 70 mM NH₄HCO₃, 50 mM Peptidsubstrat und variierender Mengen lyophilisierter Peptidamidase bei 40°C unter Schütteln für 48 h.

Die Ausbeute steigt mit der eingesetzten Enzymmenge. Das Ergebnis zeigt, dass die vergleichsweise geringen Ausbeuten auf die schnelle Inaktivierung der *S. maltophilia*-Peptidamidase zurückzuführen sind. Die Orangen-Peptidamidase ist unter den gewählten Bedingungen offensichtlich stabiler.

Auf der Suche nach geeigneteren Lösungsmittelsystemen wurde eine Reihe von Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen getestet: Glycerin, Ethylenglycol, DMF, DMF/Glycerin (1:1), Methanol/Glycerin (1:1) und Propanol/Glycerin (1:1). Die Reaktion wurde unter Standardbedingungen mit dem Substrat Z-Gly-Leu-OH im jeweiligen Lösungsmittel in Anwesenheit von 3% Wasser durchgeführt. In keinem der getesteten Systeme erfolgte die Amidierung von Z-Gly-Leu-OH.

9.2 Peptidamidsynthese in ionischen Flüssigkeiten

Alternativ zu organischen Lösungsmitteln wurden ionische Flüssigkeiten als Medium bei der Amidierung von Peptiden eingesetzt. Als Testsubstrat für die Amidierung in ionischen Flüssigkeiten wurde das Dipeptid Ala-Phe-NH₂ verwendet. Die eingesetzten ionischen Flüssigkeiten (IF) sind samt Abkürzungen in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14. Ionische Flüssigkeiten, die als Lösungsmittel bei der Pam-katalysierten Kondensation von Peptiden mit Ammonium getestet wurden. Rechts steht der abgekürzte Name der jeweiligen ionischen Flüssigkeit. Den ionischen Flüssigkeiten werden der Übersichtlichkeit halber Nummern zugeordnet.

Nr.	ionische Flüssigkeit	abgekürzter Name
1	1-Ethyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat	[EMIM] BF ₄
2	Triethylmethylammoniummethylsulfat	[ET ₃ NM] MeSO ₄
3	1,3-Dimethylimidazoliummethylsulfat	[MMIM] MeSO ₄
4	1-Butyl-3-methylimidazolium-bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amid	[BMIM] BTA
5	1-Methyl-3-nonylimidazoliumhexafluorophosphat	[MNIM] PF ₆
6	Triethylammoniummethylsulfat	[Et ₃ NH] MeSO ₄
7	1-Butyl-3-methylimidazoliummethylsulfat	[BMIM] MeSO ₄

Zunächst wurden Untersuchungen zur Löslichkeit der Edukte und des Enzyms in den einzelnen ionischen Flüssigkeiten durchgeführt (Tabelle 15). Wie sich herausstellte, waren die einzelnen Komponenten nicht in allen ausgewählten ionischen Flüssigkeiten löslich. Die Versuche wurden nur mit den ionischen Flüssigkeiten fortgesetzt, in denen alle Komponenten löslich waren, also den ionischen Flüssigkeiten 2, 3, 6 und 7.

Tabelle 15. Löslichkeitsversuche der Edukte und der Peptidamidase in den sieben eingesetzten ionischen Flüssigkeiten (IF).

ionische Flüssigkeit	Löslichkeit der Edukte und des Enzyms
IF1	Bildung eines Präzipitats
IF2	Komponenten vollständig gelöst
IF3	Komponenten vollständig gelöst
IF4	Bildung eines Präzipitats
IF5	Bildung eines Präzipitats
IF6	Komponenten vollständig gelöst
IF7	Komponenten vollständig gelöst

Die vier Reaktionsansätze in den ionischen Flüssigkeiten 2, 3, 6 und 7 hatten folgende Zusammensetzung: 50 mM Ala-Phe-OH, 24 mM NH_4HCO_3 , 50 μl Peptidamidase-Lösung, 90 Vol% ionische Flüssigkeit. Bedingt durch den Einsatz der Peptidamidase in Form einer Lösung wiesen die Ansätze einen Wassergehalt von 10% auf. Es folgte die Inkubation für 12 h bei 37°C. In keinem der Ansätze konnte nach 12 h das Amidierungsprodukt Ala-Phe- NH_2 nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch wurde die Reaktion in den ionischen Flüssigkeiten 2, 3, 6 und 7 in Abwesenheit von Wasser durchgeführt. Die Reaktionsansätze bestanden aus 50 mM Ala-Phe-OH, 24 mM NH_4HCO_3 , 3 mg lyophilisierte Peptidamidase und 100 Vol% ionische Flüssigkeit. Es folgte die Inkubation für 12 h bei 37°C unter Schütteln. Mit den ionischen Flüssigkeiten 2 und 3 war kein Umsatz zu verzeichnen, in den Ansätzen Nr. 6 und 7 hingegen wurde das Amidierungsprodukt Ala-Phe- NH_2 nachgewiesen (Abbildung 39). Durch das Dialysieren und Lyophilisieren der Peptidamidase trat ein Aktivitätsverlust von 36% auf. Die lyophilisierte Peptidamidase besitzt eine Restaktivität von 124 U/mg.

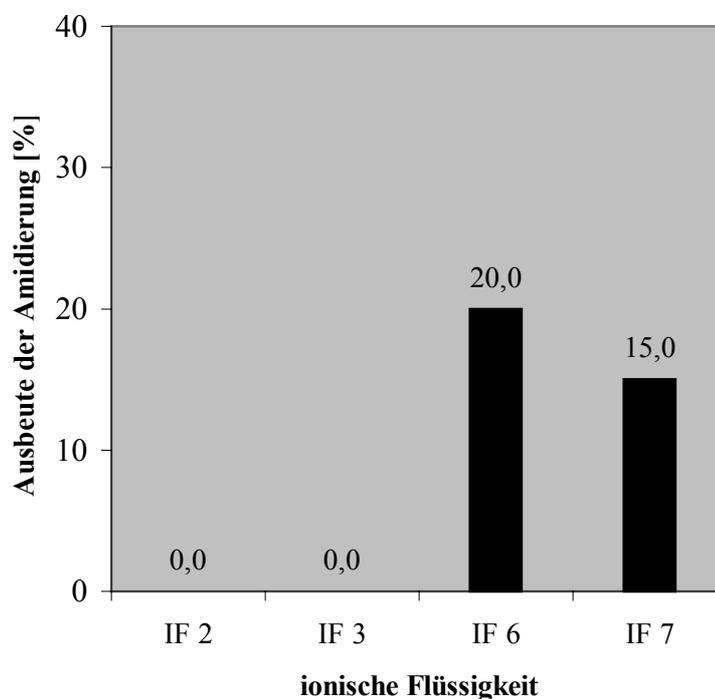


Abbildung 39. Amidierung von Ala-Phe-OH zu Ala-Phe- NH_2 mit der *S. maltophilia*-Peptidamidase in Gegenwart der ionischen Flüssigkeiten 2, 3, 6 und 7 in Abwesenheit von Wasser. Zusammensetzung des Reaktionsansatzes: 50 mM Ala-Phe-OH, 24 mM NH_4HCO_3 , 2 mg lyophilisierte

Peptidamidase, 100 Vol% ionische Flüssigkeit; Inkubation für 12 h bei 37°C. Bei den ionischen Flüssigkeiten (IF) 2, 3, 6 und 7 handelt es sich um die Substanzen [ET₃NM] MeSO₄, [MMIM] MeSO₄, [Et₃NH] MeSO₄ und [BMIM] MeSO₄.

DISKUSSION

1. Die Struktur von Amidase-Signatur-Enzymen

Die Isolierung des Gens und die Auswertung der DNA-Daten ermöglichten die Zuordnung der Peptidamidase aus *Stenotrophomonas maltophilia* zur Amidase-Signatur-Familie (Mayaux et al., 1991 und Chebrou et al., 1996). Pam ist das erste Mitglied der AS-Familie, dessen Struktur aufgeklärt und publiziert worden ist. Mit der Struktur des Pam-Inhibitor-Komplexes wurde ebenfalls erstmalig die Struktur eines Enzym-Inhibitor-Komplexes innerhalb der AS-Familie publiziert (Neumann et al., 2002 und Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

Die Topologie-Suche (DALI; Holm und Sander (1993)) für den Bereich der Amidase-Signatur in Pam (118-280) lieferte zwei Phosphoesterasen (PDB-Einträge: 1imb und 1jp4), die eine klar abgetrennte Domäne enthalten, welche sich über den Bereich der Amidase-Signatur-Sequenz erstreckt.

Bei dem ersten Enzym handelt es sich um die humane Inositolmonophosphatase (IMPase). Das Enzym ist Bestandteil der sogenannten Phosphoinositol-Kaskade, einem wichtigen System sekundärer Botenstoffe, die für die Weiterleitung zahlreicher Hormonsignale verantwortlich sind (Bone et al., 1994). Die IMPase hydrolysiert Inositol-1-phosphat (IP) zu Inositol, sie katalysiert also die Hydrolyse eines Phosphatesters (Abbildung 40(a)).

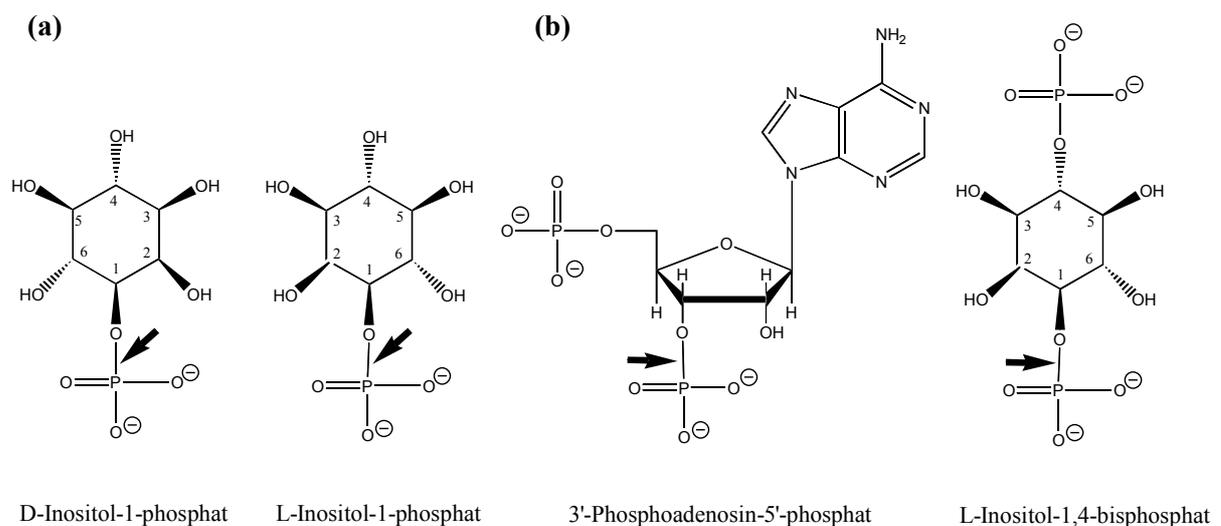


Abbildung 40. (a) Substrate der humanen Inositolmonophosphatase (IMPase): D- und L-Inositol-1-Phosphat (IP); (b) Substrate der *Rattus norvegicus*-Phosphoinositolphosphatase

(RnPIP) mit den Aktivitäten 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat-phosphatase (PAPase) und Inositol-1,4-bisphosphat-phosphatase: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat bzw. Inositol-1,4-bisphosphat (IP₂). Die Pfeile markieren die Phosphoesterbindungen, die im jeweiligen Substrat hydrolysiert werden.

Das zweite Enzym trägt den Namen *Rattus norvegicus*-Phosphoinositolphosphatase (RnPIP). Es besitzt sowohl die Aktivität einer 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat-phosphatase (PAPase) als auch die einer Inositol-1,4-bisphosphat-phosphatase (Patel et al., 2002). RnPIP entfernt spezifisch die 3'-Phosphatgruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat (PAP) bzw. die 1'-Phosphatgruppe von Inositol-1,4-bisphosphat (IP₂) unter Bildung von AMP bzw. Inositol-4'-phosphat (Abbildung 40(b)). PAP ist ein Nebenprodukt, das nach der Aktivierung von Sulfat zu 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) und der anschließenden Sulfatgruppenübertragung anfällt. Inositol-1,4-bisphosphat (IP₂) ist ein Intermediat in der Phosphoinositol-Kaskade.

Die Amidase-Signatur-Sequenz bildet ein Strukturmotiv aus, das aus einem mit vier α -Helices bedeckten fünfsträngigen β -Faltblatt besteht, welches hier als Amidase-Signatur-Domäne definiert wird (Abbildung 41 und Abbildung 42).

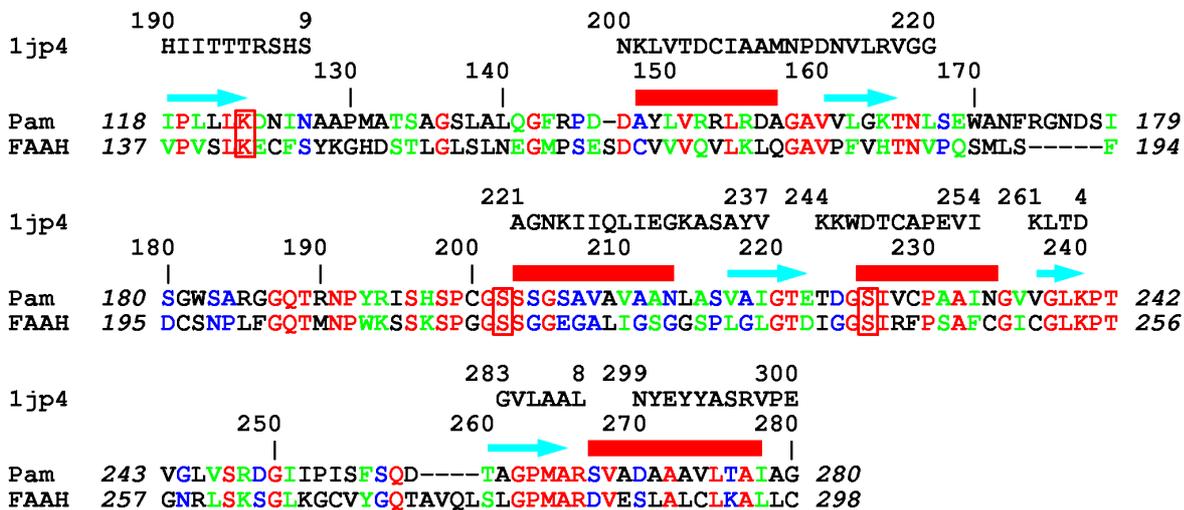


Abbildung 41. Sequenzalignment eines Ausschnitts der Amidase-Signatur-Sequenz der Peptidamidase (Pam) aus *S. maltophilia* und der Fettsäureamidohydrolase (FAAH) aus *Rattus norvegicus* über einen Bereich, der der topologisch konservierten Domäne aus den Phosphoesterasen IMPase und RnPIP entspricht. Identische Aminosäurereste sind rot, ähnliche Reste grün und teilweise konservierte Reste blau dargestellt. Die drei direkt an der Katalyse beteiligten Reste Lys-123, Ser-202 und Ser-226 sind mit Boxen hervorgehoben. Die Sekundärstrukturelemente von Pam sind oberhalb der Sequenz mit den entsprechenden Symbolen dargestellt. Zusätzlich sind die Sequenzen von RnPIP (1jp4) aus dem topologischen Alignment der Hydrolase

sedomäne angegeben (Dali overlay). Die Abbildung wurde von J. Granzin und J. Labahn zur Verfügung gestellt (Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

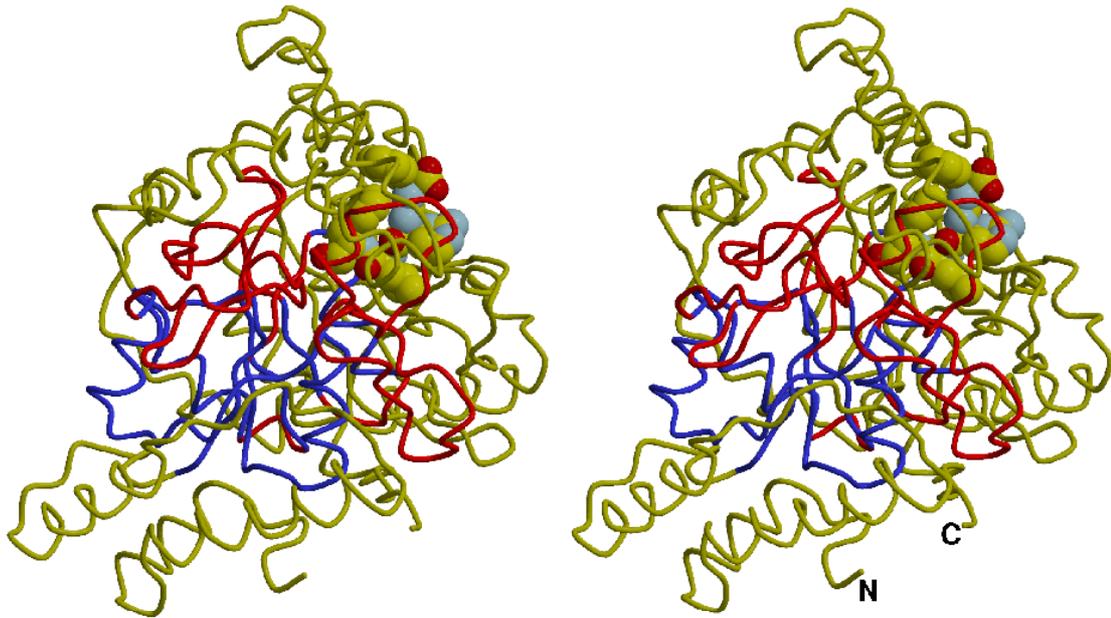


Abbildung 42. Stereoabbildung des Rückgrats der Peptidamidase (Pam) im Komplex mit Chymostatin (Cst). Der periphere Teil von Pam, der nicht zu der topologisch konservierten Hydrolasedomäne gehört, ist in gelb dargestellt. Bereiche, die bezüglich der Hydrolasedomäne aus RnPIP Insertionen darstellen, sind rot gefärbt. Die blau gefärbten Bereiche entsprechen dem topologisch konservierten Bereich (Abbildung 41). Die Abbildung wurde von J. Granzin und J. Labahn zur Verfügung gestellt (Labahn et al. (Manuskript eingereicht)).

Die AS-Domäne in Pam weist eine ausgeprägte topologische Homologie zu den Hydrolasedomänen in den Phosphoesterasen IMPase und RnPIP auf. Andererseits besteht in diesem Bereich keine signifikante Sequenzhomologie zwischen Pam und IMPase bzw. RnPIP. Das geht auch deutlich aus Abbildung 41 hervor, in der das partielle Alignment der Aminosäuresequenzen von Pam, FAAH und RnPIP (1jp4) zusammen mit den Sekundärstrukturelementen dargestellt ist.

Wesentliche strukturelle Unterschiede zwischen den Phosphoesterasen und Pam bestehen in den Veränderungen der Schleifenstrukturen, die bei den Phosphoesterasen die IP- bzw. IP₂-Bindestelle bilden. Dieser Bereich ist in Pam zu einem Trichter reduziert, der in einen das

Protein durchlaufenden, wasserenthaltenden Kanal mündet. Dieser Kanal verbindet das aktive Zentrum ausgehend von Lys-123 mit einer kleineren, an der Oberfläche gelegenen Tasche (Abbildung 28 (b)).

In Pam ist die Region 220-222 Bestandteil einer β -Struktur. In RnPIP hingegen sind hier zusätzliche Reste lokalisiert, die eine Tasche formen, in der das IP_2 -Substrat bindet. In Pam ist diese Region mit den Schleifenstrukturen 128-146, 168-202 und 241-260 bedeckt, die gemessen an der Domäne in RnPIP Insertionen darstellen (Abbildung 42). Diese Schleifenstrukturen verbinden die relativ zur AS-Domäne N- und C-terminal gelegenen Helixstrukturen (Abbildung 42). Die Aminosäurereste 235-236 und 267-269 in Pam zeigen im Vergleich zu RnPIP eine abweichende Konformation. Hier treten jeweils Wechselwirkungen mit Strukturen auf, die außerhalb der den beiden Proteinen gemeinsamen konservierten Domäne liegen.

Pam liegt als sehr kompakt gefaltetes Eindomänenprotein vor. In Proteindatenbanken existieren keine strukturhomologen Proteine. Die Ähnlichkeit der Amidase-Signatur-Domäne zu einer Domäne in den Phosphoesterasen beschränkt sich auf die Faltung. Aminosäurereste, die an der Substratbindung oder der Katalyse beteiligt sind, stimmen nicht mit denen der Phosphoesterasen überein. Bei der Domäne könnte es sich um eine evolutiv strukturkonservierte Hydrolasedomäne handeln.

Des Weiteren fällt auf, dass die bei Pam an der Substratbindung beteiligten Aminosäurereste innerhalb der AS-Familie nicht konserviert sind. Die meisten von ihnen liegen nicht innerhalb der AS-Sequenz. Die Tatsache, dass die Substratbindung durch nichtkonservierte Aminosäurereste erfolgt, könnte die Diversität des Substratspektrums von AS-Enzymen erklären.

2. Katalysemechanismen von Amidase-Signatur-Enzymen

2.1 Das primäre Nucleophil in AS-Enzymen

Zunächst wurde für AS-Enzyme ein Reaktionsmechanismus angenommen, der ein Cys-Nucleophil beinhaltet (Ciskanik et al., 1995). Später identifizierten Kobayashi et al. (1997), Koo et al. (2000) und Patricelli et al. (1999) in der *Rhodococcus rhodocrous* J1-Amidase, der Malonamidase E2 aus *Bradyrhizobium japonicum* bzw. der Fettsäureamidohydrolase aus *Rattus norvegicus* homologe Serylreste als primäre Nucleophile. Die Aussagen stützen sich

auf gerichtete Mutagenese-Experimente und, im Fall der FAAH, auf die Affinitätsmarkierung des Ser-Nucleophils. Die drei o. g. Serylreste befinden sich in homologer Position zum Ser-226 in Pam.

Die Ergebnisse der gerichteten Mutagenese in der vorliegenden Arbeit bestätigen ebenfalls die Funktion von Ser-226 als primäres Nucleophil: Die Pam-Variante mit dem Aminosäureaustausch S226A ist katalytisch inaktiv. Darüber hinaus kann diese Fragestellung erstmalig auf der strukturellen Ebene untersucht werden, da die Struktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes vorliegt. Die Strukturdaten zeigen, dass sich Ser-226 in geeigneter Orientierung zum Substrat befindet, um als primäres Nucleophil fungieren zu können. Ser-226 hat von den im aktiven Zentrum befindlichen Serylresten den geringsten Abstand zum fraglichen Carbonyl-Kohlenstoff im Inhibitor (2,51 Å). Dass es nicht zur Ausbildung eines Halbacetals kommt, zeigt an, dass das Ser-Nucleophil im Fall von Pam nicht aktiviert vorliegt.

2.2 Inhibitionsspektren von AS-Enzymen

Innerhalb der Amidase-Signatur-Familie bestehen auffällige Unterschiede bezüglich der Sensitivität gegenüber Inhibitoren: Bei der FAAH tritt eine Inhibition durch MAFP, DFP und PMSF auf (Patricelli et al., 1999). Pam hingegen wird durch keinen der drei Inhibitoren in seiner Aktivität signifikant beeinträchtigt. Die Amidase aus *Rhodococcus rhodocrous* J1 ist unempfindlich gegenüber DFP und PMSF (Kobayashi et al., 1997), und die Malonamidase E2 aus *Bradyrhizobium japonicum* wird nicht durch PMSF inhibiert (Koo et al., 2000). Untersuchungen zur Sensitivität der J1-Amidase gegenüber MAFP bzw. der Malonamidase E2 gegenüber DFP und MAFP liegen nicht vor.

Fluorophosphate und Sulfonylfluoride binden an das primäre Ser-Nucleophil in Serin-Hydrolasen. Wie aus den Strukturdaten hervorgeht, ist die Unempfindlichkeit von Pam gegenüber MAFP, DFP und PMSF nicht sterisch erklärbar, da das Serin-Nucleophil in Pam für die genannten Inhibitoren frei zugänglich sein sollte.

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien besagen allerdings nicht, dass in den Fällen, in denen Fluorophosphate und Sulfonylfluoride keine inhibitorische Wirkung ausüben, kein Ser-Nucleophil existiert. Es gibt Beispiele für Serinhydrolasen, die unempfindlich gegenüber Fluorophosphaten und Sulfonylfluoriden sind, so z. B. die bakteriellen Typ I-Signalpeptidasen (Paetzel et al., 2000).

Innerhalb der AS-Familie sind übereinstimmend Serylreste in homologer Position klar als Nucleophile identifiziert worden. Dennoch liefern die Ergebnisse der Inhibitionsstudien einen

Hinweis auf die Existenz unterschiedlicher Katalysemechanismen innerhalb der AS-Familie, da das Ser-Nucleophil im Fall von Pam, der J1-Amidase und der Malonamidase E2 deutlich schwächer aktiviert vorliegt als das bei FAAH der Fall ist.

2.3 Die Superfamilie der Serinhydrolasen

Die Serinhydrolasen sind eine der am weitest verbreiteten und best untersuchten Enzymfamilien. Die überwiegende Mehrheit der bisher identifizierten Serinhydrolasen enthält die katalytische Ser-His-Asp-Triade. Das gilt für diverse Serinproteasen, Lipasen und Esterasen, z. B. Trypsin und Subtilisin. Der Histidylrest fungiert hier als generelle Base bei der Aktivierung des Ser-Nucleophils, der Aspartylrest bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Histidylrest aus (Dodson und Wlodawer, 1998). Unter Normalbedingungen besitzt die Imidazolgruppe im Histidin einen pK_S -Wert von 6,04. Sie liegt also im physiologischen pH-Bereich hauptsächlich deprotoniert vor und kann deshalb als Protonenakzeptor fungieren.

Neben der klassischen katalytischen Triade existieren noch andere Mechanismen, über die die Aktivierung des Ser-Nucleophils erfolgen kann:

(1) Für die Klasse C β -Lactamase aus *Citrobacter freundii* wird angenommen, dass Tyr-150 als generelle Base fungiert (Oefner et al., 1990). Der pK_S -Wert der Phenolgruppe von Tyrosin liegt normalerweise bei 10,13. Es wird davon ausgegangen, dass die positive Ladungsumgebung des Tyrosylrestes im Enzym eine deutliche Absenkung des pK_S -Wertes der Phenolgruppe in der Seitenkette bewirkt, so dass der Rest deprotoniert vorliegt.

(2) Bei Klasse A β -Lactamasen ist bisher nicht geklärt, welcher Aminosäurerest die Funktion der generellen Base wahrnimmt. Es existieren vier unterschiedliche Hypothesen zum Katalysemechanismus:

Gibson et al. (1990) gehen davon aus, dass ein Glutamylrest als generelle Base fungiert, indem er das Ser-Nucleophil direkt aktiviert. Die Glu-Seitenkette weist einen pK_S -Wert von 4,07 auf und könnte somit unter physiologischen Bedingungen als Protonenakzeptor fungieren.

Lamotte-Brasseur et al. (1991) und Damblon et al. (1996) vertreten zwar ebenfalls die Ansicht, dass ein Glutamylrest als generelle Base fungiert, sie gehen dabei allerdings von einer indirekten Wirkung, vermittelt durch ein Wassermolekül, aus.

Im Gegensatz dazu sind Strynadka et al. (1992) der Meinung, dass bei Klasse A β -Lactamasen ein Lysylrest die generelle Base repräsentiert (Ser-Lys-Diade). Die ϵ -Aminogruppe von Lysin weist unter Normalbedingungen einen vergleichsweise hohen pK_S -Wert von 10,81 auf. Damit Lys als Base fungieren kann, muss der im Bereich physiologischer pH-Werte energetisch ungünstige deprotonierte Zustand stabilisiert werden. Die erforderliche Absenkung des pK_S -Wertes soll durch die den Lysylrest umgebenden positiven Ladungen hervorgerufen werden.

Herzberg und Moulton (1991) wiederum halten einen direkten Protonentransfer vom Ser-Nucleophil auf den Stickstoff der Abgangsgruppe im Substrat für möglich.

- (3) Bei bakteriellen Typ I Signalpeptidasen übernimmt vermutlich ein Lysylrest die Rolle der generellen Base. Entsprechend weisen diese Enzyme eine Ser-Lys-Diade auf (Paetzel et al., 2000). Hier wird davon ausgegangen, dass die hydrophobe Umgebung des Lysylrestes eine starke Absenkung des pK_S -Wertes zur Folge hat.

2.4 Postulierter Katalysemechanismus der FAAH

Der Katalysemechanismus der Fettsäureamidohydrolase (FAAH) aus *Rattus norvegicus* wurde unter Einsatz von kinetischen Messungen, Affinitätsmarkierung und gerichteter Mutagenese umfassend untersucht (Patricelli et al. (1999), Patricelli und Cravatt (1999) und Patricelli und Cravatt (2000)). Auf der Grundlage der Ergebnisse wurde ein Mechanismus für die FAAH postuliert, der in Form einer katalytischen Ser-Lys-Diade organisiert ist. Das primäre Nucleophil Ser-241* wird demnach durch die deprotoniert vorliegende generelle Base Lys-142* aktiviert. Ser-241* greift nucleophil den Carbonyl-Kohlenstoff der Amidbindung im Substrat an. Ser-241* und Lys-142* aus der FAAH entsprechen dabei Ser-226 und Lys-123 aus Pam. Es kommt in der Folge zur Ausbildung eines Acyl-Enzym-Intermediates, welches später hydrolysiert wird. Ser-218* (Ser-203) sowie Arg-243* (in Pam nicht vorhanden) wird eine Funktion bei der Protonierung der Abgangsgruppe und/oder bei der Stabilisierung des Übergangszustandes zugeschrieben. Ser-217* (Ser-202) soll entweder an der Aktivierung des Nucleophils Ser-241* oder an der Stabilisierung des Übergangszustandes beteiligt sein.

Die Funktion von konservierten His-Resten als generelle Basen wurde ausgeschlossen, da bei den entsprechenden Enzym-Varianten nur eine geringe Absenkung in der Aktivität zu beobachten war.

2.5 Alternativer Katalysemechanismus der Pam

Die Mutageneseuntersuchungen mit Pam haben gezeigt, dass die Aminosäurereste Ser-226 und Lys-123 essentielle Funktionen wahrnehmen, da die entsprechenden Pam-Varianten vollständig inaktiv sind. Die Pam-Variante mit dem Austausch S202A weist ebenfalls eine stark herabgesetzte Aktivität auf. Diese Ergebnisse stimmen mit den für die FAAH erhaltenen überein (Patricelli und Cravatt, 2000).

Basierend auf den für die FAAH erhobenen Daten schlagen die Autoren die Klassifizierung von Amidase-Signatur-Enzymen als eine Familie von Hydrolasen mit einer katalytischen Serin-Lysin-Diade vor. Diese Hypothese wird allerdings durch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Pam-Strukturdaten nicht gestützt.

Ser-226 in Pam (FAAH: Ser-241*) und die Aldehydfunktion von Chymostatin bilden im Enzym-Inhibitor-Komplex zwar kein Halbacetal aus, dennoch ist Ser-226 in einer Weise positioniert und orientiert, die es ihm erlaubt, als primäres Nucleophil zu fungieren, wie es auch für den homologen Serylrest in der FAAH beschrieben worden ist.

In dem von Patricelli und Cravatt (2000) vorgeschlagenen Mechanismus wird davon ausgegangen, dass die Aminogruppe in der Seitenkette von Lys-123 zunächst deprotoniert vorliegt, damit dieser Rest als generelle Base fungieren kann. Das würde allerdings eine deutliche Absenkung des pK_S -Wertes der Lys- ϵ -Aminofunktion voraussetzen. Der pK_S -Wert der ϵ -Aminogruppe vom Lysin beträgt normalerweise 10,81.

Die Umgebung von Lys-123 in Pam liefert aber keinen Hinweis auf eine deutliche Verschiebung des pK_S -Wertes. In der Umgebung treten weder positiv geladene Aminosäurereste auf noch ist die Umgebung stark hydrophob. Aus diesem Grund muss davon ausgegangen werden, dass die Lys- ϵ -Aminofunktion in Pam bei pH 7,5 fast ausschließlich protoniert vorliegt. In diesem Fall kann Lys-123 aber nicht als generelle Base fungieren.

Weiterhin zeigen die Strukturdaten von Pam, dass Lys-123 Ser-226 nicht direkt aktivieren kann, da die Reste nicht unmittelbar benachbart liegen. Der Abstand zwischen dem Lys-123 N ζ und dem Ser-226 O γ beträgt 4,96 Å. Es könnte hier lediglich eine indirekte Aktivierung über Ser-202 erfolgen, der sich zwischen den beiden Aminosäureresten befindet.

Der Befund, dass die Variante Pam-K123A katalytisch inaktiv ist, belegt, dass Lys-123 eine essentielle Funktion im Katalysemechanismus wahrnimmt. Da die Aminogruppe in der Seitenkette von Lys-123 in Pam mit großer Wahrscheinlichkeit initial protoniert vorliegt, kann der Lysylrest lediglich als katalytische Säure an der Reaktion teilnehmen.

Einschränkend muss gesagt werden, dass sich die Umgebungen von Lys-123 in Pam und Lys-142* in FAAH mit der zugrundegelegten Struktur von Pam unterscheiden. Es kann

deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass Lys-142* in FAAH tatsächlich ungeladen vorliegt und so als generelle Base fungieren könnte.

Bei Pam scheint weder ein deprotonierter Lys-123-Rest vorzuliegen, wie es für FAAH postuliert wurde, noch scheint das für den Katalysemechanismus erforderliche Nucleophil zum Zeitpunkt der Substratbindung aktiviert vorzuliegen. Die Strukturdaten, die Ergebnisse aus der gerichteten Mutagenese und den Inhibitionsstudien legen für Pam einen Mechanismus nahe, bei dem das primäre Nucleophil Ser-226 solange inaktiviert vorliegt, bis die Substratbindung erfolgt ist und ein Proton auf das Substrat übertragen worden ist. Labahn et al. (Manuskript eingereicht) schlagen für Pam den folgenden Katalysemechanismus vor, der auch in Abbildung 43 wiedergegeben ist:

1. Ein tetraedrisches, kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat wird gebildet. Die Carbonylgruppe im Substratmolekül wird durch Ser-202 protoniert; Ser-202 deprotoniert wiederum Ser-226. Gleichzeitig greift das nun aktiviert vorliegende Nucleophil Ser-226 den Carbonyl-Kohlenstoff im Säureamid des Substrates an. Der protonierte Zustand von Lys-123 führt zunächst dazu, dass die Protonierung des Carbonyl-O(1) des Substrats durch Ser-202 gefördert wird, gleichzeitig wird der nucleophile Charakter von Ser-202 und Ser-226 herabgesetzt. Der Transfer der positiven Ladung auf das Substratmolekül verstärkt die Elektrophilie am Carbonyl-Kohlenstoff des Substratmoleküls und erhöht gleichzeitig den nucleophilen Charakter von Ser-202 und Ser-226. Während des nucleophilen Angriffs von Ser-226 auf den Carbonyl-Kohlenstoff übernimmt Ser-202 dessen Proton.
2. Im tetraedrischen kovalenten Intermediat ist die Protonierung der Aminogruppe erforderlich, um eine geeignete Abgangsgruppe zu erzeugen. Auch unter Berücksichtigung der Abstandsänderungen durch die Rehybridisierung am Amid-Kohlenstoff befindet sich die Amidogruppe im Wasserstoffbrückenabstand zum O γ -Ser-202, das überschüssige positive Ladung trägt. Der Transfer eines Protons auf die Aminogruppe im Substrat durch Ser-202 wird wiederum über dessen Protonierung durch Lys-123 kompensiert.
3. Das Enzym-Acyl-Intermediat wird ausgebildet: Der Amid-Stickstoff des Substrats wird eliminiert, das Proton der Hydroxylgruppe des tetraedrischen Enzym-Substrat-Intermediats wird durch Ser-202 abstrahiert und die Carbonylfunktion im Substratmolekül wird wiederhergestellt.

4. Die Hydrolyse des Enzym-Acyl-Intermediates erfolgt mit Hilfe des Wassermoleküls Wat 1, welches seinerseits eine Wasserstoffbrücke mit Ser-226 bildet.

5. Das Produkt wird freigesetzt. Der Ausgangszustand des Enzyms ist wieder hergestellt.

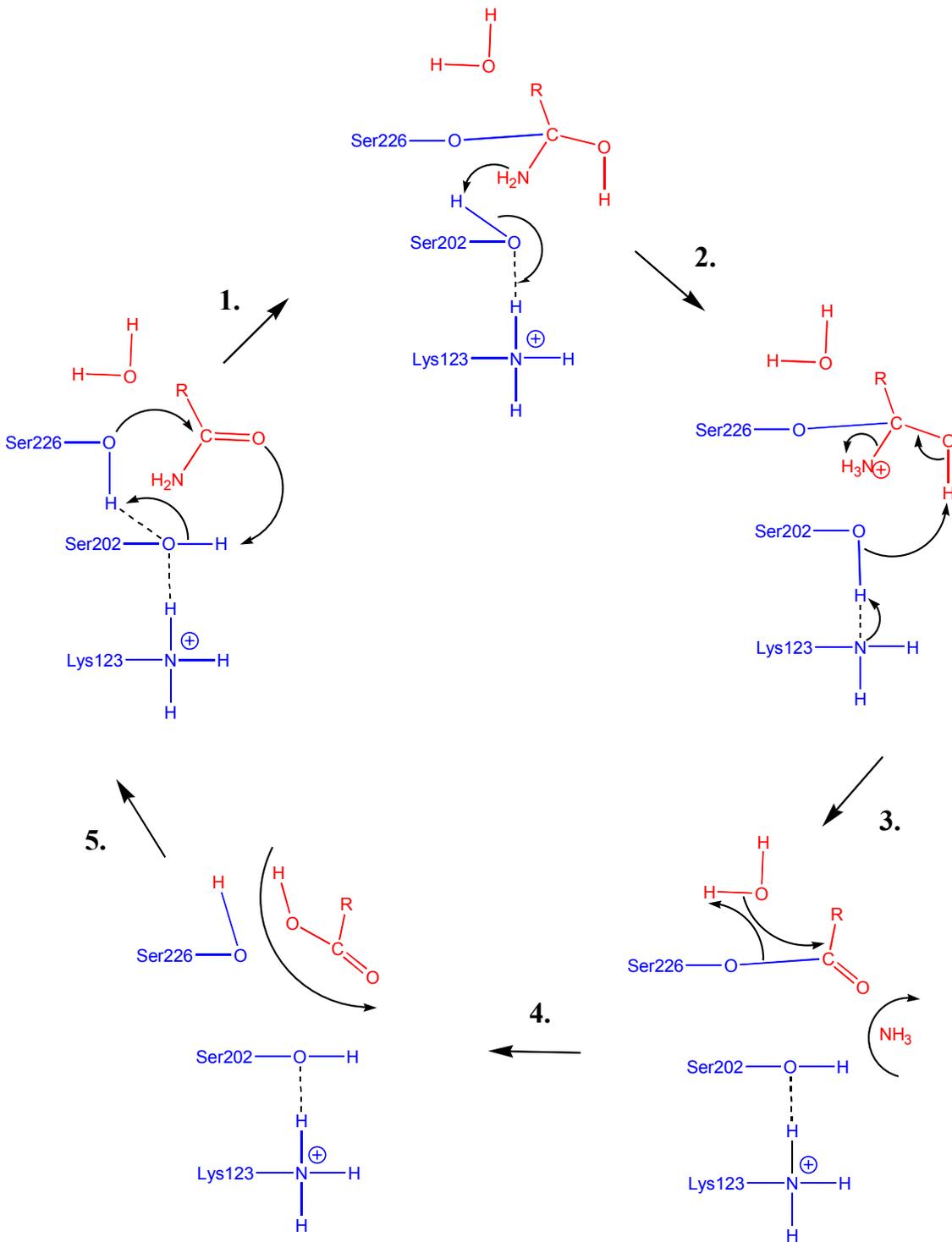


Abbildung 43. Möglicher Katalysemechanismus der Hydrolyse von Säureamiden durch die Peptidamidase aus *Stenotrophomonas maltophilia*, nach Labahn et al. (Manuskript eingereicht).

2.6 Unterschiedliche Reaktionsmechanismen innerhalb der AS-Familie

Die Unterschiede in den Inhibitionsspektren von Pam, der Malonamidase E1 und der J1-Amidase einerseits und FAAH andererseits sind ein starkes Indiz für die Existenz von zwei Untergruppen innerhalb der AS-Familie, die verschiedene Katalysemechanismen einsetzen. Für die durch die FAAH katalysierte Reaktion wurde ein Mechanismus postuliert, bei dem das Nucleophil durch eine Lys-Base aktiviert wird. Für Pam ist ein Mechanismus wahrscheinlicher, bei dem der besagte Lysylrest als katalytische Säure fungiert und das Ser-Nucleophil erst nach der Substratbindung aktiviert wird. Die vorgeschlagene enge Verknüpfung der wechselseitigen Aktivierung von Substrat und Enzym durch den Protonentransfer würde auch die Unempfindlichkeit der Peptidamidase gegenüber den Inhibitoren MAFP, DFP und PMSF im Gegensatz zu Chymostatin erklären. MAFP, DFP und PMSF können vermutlich mangels ausreichender Protonenaffinität und/oder ungeeigneter Orientierung nicht das Proton von Pam übernehmen.

Dies würde bedeuten, dass trotz der starken Konservierung der Aminosäuresequenz Gruppen von Enzymen innerhalb der Amidase-Signatur-Familie existieren, die unterschiedliche Katalysemechanismen einsetzen. Der Vergleich von Pam und FAAH ergab, dass die Abweichungen in der Ladungsumgebung von Lys-123 bzw. Lys-142* möglicherweise einen wichtigen strukturellen Faktor darstellen, der ursächlich für die mechanistischen Unterschiede der beiden Enzyme verantwortlich ist.

3. Unterschiede in den Eigenschaften von Pam-Variante 6, Pam-Variante 10 und

Wildtyp-Pam

Die Auswirkungen des abweichenden N-Terminus und des C-terminalen His₆-Tags der rekombinanten Pam-Variante 6 wurden durch Vergleich mit den Eigenschaften von Pam-Variante 10 untersucht. Pam-Variante 10 entspricht der prozessierten Peptidamidase, wie sie in *S. maltophilia* vorkommt. Wie sich gezeigt hat, liegen die v_{\max} -Werte für die zwei getesteten Substrate Ala-Phe-NH₂ und Z-Gly-Tyr-NH₂ bei Pam-Variante 10 um den Faktor 1,7 bzw. 2,4 höher als bei Pam-Variante 6. Die K_M -Werte liegen stets unter 0,5 mM. Da der C-Terminus mit dem His₆-Tag in Reichweite des aktiven Zentrums liegt, könnte er theoretisch den Substratzugang zum aktiven Zentrum behindern.

Pam-Variante 10 sollte in ihren Eigenschaften mit der Wildtyp-Peptidamidase aus *S. maltophilia* übereinstimmen, die von Stelkes-Ritter et al. (1995) charakterisiert worden ist. Das ist aber offensichtlich nicht der Fall. Die relative Aktivität der Wildtyp-Peptidamidase aus *S. maltophilia* bei einer Substratkonzentration von 10 mM wurde gegenüber Z-Gly-Tyr-NH₂ und Ala-Phe-NH₂ mit 2,1 U/mg bzw. 4,6 U/mg angegeben (Stelkes-Ritter et al., 1995). Die relativen Aktivitäten der Pam-Variante 10 gegenüber den Substraten Z-Gly-Tyr-NH₂ und Ala-Phe-NH₂ bei einer Substratkonzentration von 10 mM liegen mit 58 bzw. 325 U/mg deutlich höher. Die Abweichungen liegen bei Faktor 28 bzw. 71.

Grundsätzlich gibt es zwei mögliche Erklärungen für dieses Phänomen. Entweder sind die Abweichungen in den relativen Aktivitäten auf tatsächlich existierende Unterschiede zwischen dem rekombinanten und dem Wildtyp-Enzym zurückzuführen oder sie beruhen auf Abweichungen bei der Durchführung des Enzymassays. Eine naheliegende Erklärung wäre, dass die vergleichsweise niedrigen Aktivitäten, die durch Stelkes-Ritter et al. (1995) ermittelt wurden, auf die Inaktivierung des Enzyms aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration im Reaktionsansatz zurückzuführen sind. Das Phänomen der Inaktivierung in Gegenwart niedriger Proteinkonzentrationen wurde in der vorliegenden Arbeit bei dem rekombinanten Enzym beobachtet. Um eine derartige Inaktivierung zu verhindern, erfolgte die Lagerung der rekombinanten Peptidamidasen bei Konzentrationen > 1 mg/ml. Weiterhin wurde dem Reaktionsansatz jeweils 1 mg/ml BSA zugesetzt.

Des weiteren unterscheidet sich das Molekulargewicht der Wildtyp-Peptidamidase von ca. 38 kDa, welches durch Stelkes-Ritter et al. (1995) per Gelfiltration bestimmt worden ist, deutlich von dem in der vorliegenden Arbeit mit derselben Methode bestimmten Molekulargewicht der Pam-Variante 6 (ca. 50 kDa). Das auf der Grundlage der DNA-Daten berechnete Molekulargewicht der Wildtyp-Peptidamidase beträgt 53,5 kDa. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass die Peptidamidase aus *S. maltophilia* bei der Aufreinigung durch Stelkes-Ritter et al. (1995) im C-terminalen Bereich fragmentiert ist, was aller Wahrscheinlichkeit nach Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms hätte. Weitere Unterschiede zwischen der Wildtyp-Pam und der Pam-Variante 6 existieren in Bezug auf das Temperaturoptimum (37-45°C bzw. 50-54°C) und das pH-Optimum (pH 5,0-6,5 bzw. pH 7,0-8,2).

4. Natürliche Funktion und Substratspektrum von Pam

Die Peptidamidase stammt aus dem Gram-negativen Bakterium *Stenotrophomonas maltophilia* und ist ein periplasmatisches Enzym unbekannter Funktion. Die DNA-Daten deuten darauf hin, dass das Gen monocistronisch transkribiert wird. Auf der genetischen Ebene konnten keine weiteren Hinweise auf die natürliche Funktion von Pam erhalten werden. Im Fall eines polycistronisch organisierten Genclusters hätten die anderen Gene des Cistrons eventuell Hinweise auf die Funktion geben können, da oft die Enzyme ganzer Stoffwechselwege in einem Cistron codiert sind.

Pam weist Homologien zu Amidohydrolasen und Glu-tRNA^{Gln}-Amidotransferase Untereinheiten A aus verschiedenen Organismen auf. Die Homologieuntersuchungen geben keinen direkten Hinweis auf die natürliche Funktion von Pam. Da Pam aber im Periplasma lokalisiert ist, kommen bestimmte Funktionen nicht in Frage, z. B. kann aufgrund der periplasmatischen Lokalisation eine Funktion bei der Proteinbiosynthese ausgeschlossen werden. Pam ist demnach keine Glu-tRNA^{Gln}-Amidotransferase Untereinheit A.

Obwohl das natürliche Substrat der Peptidamidase nicht bekannt ist, spricht vieles dafür, dass Peptidamide das natürliche Substrat darstellen: die beträchtlichen Raten, mit denen die getesteten Peptidamide teilweise umgesetzt werden; die deutlich erhöhte Aktivität gegenüber Peptidamiden im Vergleich zu Aminosäureamiden; die ausgeprägte Stereoselektivität, mit der zwischen L- und D-Aminosäureamiden unterschieden wird; die hohe Regioselektivität, mit der zwischen C-terminalen Amiden in Peptiden, Amiden in den Aminosäureseitenketten und Peptidbindungen unterschieden wird; die Inhibition durch Chymostatin, einem Peptidaldehyd-Derivat sowie die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindungen zweier Peptid-Carbonyl-Sauerstoffatome mit Asn-172 für die Substraterkennung.

Unklar bleibt, in welchem periplasmatischen Stoffwechselweg bei Gram-negativen Bakterien Peptidamide umgesetzt werden. Die niedrige spezifische Aktivität, mit der die Peptidamidase im Herkunftsorganismus *S. maltophilia* vorliegt, sowie die schlechte Induzierbarkeit mit Amidsubstraten (Stelkes-Ritter et al., 1995) deuten darauf hin, dass Pam eher eine assimilatorische als eine dissimilatorische Funktion wahrnimmt.

Die Ergebnisse des Agarplatten-Diffusionstests haben gezeigt, dass Pam zumindest gegenüber den getesteten Verbindungen keine β -Lactamaseaktivität besitzt.

Wichtige Aufschlüsse über die natürliche Funktion der Peptidamidase könnten in Zukunft durch das Deletieren des Peptidamidase-Gens in *S. maltophilia* und die nachfolgende Charakterisierung dieser Mutante erhalten werden. Die hierfür erforderlichen Sequenzinformationen über die das Peptidamidase-Gen flankierenden DNA-Abschnitte sind vorhanden.

Die Untersuchungen zum Substratspektrum haben gezeigt, dass von den bisher getesteten Substraten Dipeptidamide am besten umgesetzt werden. Hierbei ist die Art des letzten und vorletzten Aminosäurerestes im Peptidsubstrat von entscheidender Bedeutung. Die großen Mengen an reiner Pam-Variante 6, die in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung standen, ermöglichten die Quantifizierung des Umsatzes schlechterer Substrate wie z. B. Aminosäureamide, von denen zuvor behauptet wurde, dass sie nicht umgesetzt werden (Stelkes-Ritter et al., 1995).

5. Biotechnologischer Einsatz von Pam

Die Erkenntnis, dass die *S. maltophilia*-Peptidamidase nicht nur Peptidamide, sondern mit niedriger Aktivität auch Aminosäureamide hydrolysiert, muss bei einem eventuellen Einsatz des Enzyms zur selektiven Entfernung von Amidschutzgruppen in der enzymatischen Peptidsynthese beachtet werden. Die *S. maltophilia*-Peptidamidase würde nämlich ggf. auch das für die Amidolyse zugesetzte Aminosäureamid in niedrigen Raten hydrolysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass die Kondensationsreaktion zur Synthese von Peptidamiden in organischen Lösungsmitteln bzw. ionischen Flüssigkeiten grundsätzlich durch die Peptidamidase aus *S. maltophilia* katalysiert wird. Das Enzym funktioniert also sowohl in Hydrolyse- als auch in Kondensationsrichtung.

Unter den von Cerovsky und Kula (2001) für die Peptidamidase aus Orangen optimierten Bedingungen wurden mit der *S. maltophilia*-Peptidamidase für das Substrat Z-Gly-Leu-OH Amidierungsausbeuten bis 30% erzielt. Mit der Orangen-Peptidamidase wurde unter den gleichen Bedingungen eine ähnliche Amidierungsausbeute erzielt, allerdings befand sich im Fall von Pam deutlich mehr Enzym im Reaktionsansatz (Cerovsky und Kula, 2001).

Indem Ansätze mit variierender Menge an eingesetztem Enzym in ihrer Ausbeute verglichen wurden, konnte gezeigt werden, dass der limitierende Faktor bei der Umsetzung die herabgesetzte Stabilität der *S. maltophilia*-Peptidamidase in Gegenwart von organischem Lösungsmittel ist.

Die Ausbeuten, die bei der Amidierung in den ionischen Flüssigkeiten Triethylammoniummethylsulfat (IF6) und 1-Butyl-3-methylimidazoliummethylsulfat (IF7) erreicht wurden, lagen bei 20 bzw. 15%. Einige der untersuchten ionischen Flüssigkeiten {1-Ethyl-3-methylimidazoliumtetrafluorborat (IF1), 1-Butyl-3-methylimidazolium-bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amid (IF4) und 1-Methyl-3-nonylimidazoliumhexafluorophosphat (IF5)} erwiesen sich als

ungeeignet, da die Edukte und das Enzym Präzipitate bildeten. In den ionischen Flüssigkeiten Triethylmethylammoniummethylsulfat (IF2) und 1,3-Dimethylimidazoliummethylsulfat (IF3) konnten zwar alle Komponenten gelöst werden, dennoch fand keine Amidierung statt.

Für die Umsetzung in organischem Lösungsmittel ist das zentrale Problem die Instabilität der *S. maltophilia*-Peptidamidase. Der nächste Schritt bei der Systemoptimierung könnte die Erhöhung der Stabilität des Biokatalysators durch gerichtete Evolution sein (Arnold, 1998 und Pantoliano, 1992). Die Erhöhung der Stabilität von Enzymen in Gegenwart von organischem Lösungsmittel durch gerichtete Evolution wurde bereits erfolgreich für Subtilisin E aus *Bacillus subtilis* demonstriert (You und Arnold, 1996).

Grundsätzlich problematisch bei der Amidierung in nichtwässrigen Systemen ist die eingeschränkte Löslichkeit vieler Edukte. Gegenüber der Synthese von Peptidamiden mit Hilfe der Peptidamidase bietet der Einsatz des Peptidylglycin- α -amidierenden Enzyms einen deutlichen Vorteil: Die Umsetzung findet im wässrigen Milieu statt, was den Löslichkeitseigenschaften der meisten Peptide entgegenkommt.

Weitere Einschränkungen für enzymatische *In-vitro*-Amidierungssysteme mit der *S. maltophilia*-Peptidamidase entstehen durch deren Substratspezifität, die in Abhängigkeit der Natur des zu amidierenden Peptids variiert. Auch dieses Problem tritt bei der Amidierung mit dem Peptidylglycin- α -amidierenden Enzym nicht auf. Da für die Umsetzung lediglich das Vorhandensein einer Glycin-Extension erforderlich ist, können Peptide beliebiger Sequenz amidiert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde aus der N-terminalen Sequenzinformation der Peptidamidase aus *Stenotrophomonas maltophilia* eine Gensonde abgeleitet. Das Gen wurde mittels einer aus 45 Nukleotiden bestehenden DNA-Sonde nachgewiesen und anschließend vollständig auf einem 6,9 kb-*Bgl*III DNA-Fragment aus einer partiellen Genbank isoliert. Neben dem Peptidamidase-Gen befanden sich noch fünf weitere hypothetische offene Leseraster auf dem DNA-Fragment: Malatdehydrogenase, Peptidylprolyl-*cis-trans*-Isomerase, Translationselongationsfaktor G, ein hypothetisches lösliches Protein und ein hypothetisches Membranprotein.

Die Sequenzanalyse zeigte, dass das Peptidamidase-Gen monocistronisch organisiert ist, eine Signalsequenz aufweist und dass es sich bei dem Genprodukt weiterhin um ein Mitglied der Amidase-Signatur-Familie handelt. Umfangreiche Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus wurden bisher vor allem an einem Mitglied dieser Enzymfamilie durchgeführt, der Fettsäureamidohydrolase (FAAH) aus *Rattus norvegicus*.

Die Peptidamidase aus *S. maltophilia* wurde in verschiedenen *E. coli*-Stämmen aktiv exprimiert. Von der Pam-Variante 6, die keine N-terminale Signalsequenz, aber einen C-terminalen His₆-Tag aufweist, konnten nach Fermentation im 12-Liter-Maßstab und einer Zwei-Schritt-Aufreinigung insgesamt 2,1 g zu über 95% reines Enzym für die weiteren Experimente bereitgestellt werden.

Es folgte die umfassende biochemische Charakterisierung des rekombinanten Enzyms bezüglich der Lagerungsstabilität, des nativen Molekulargewichtes (50 kDa), des isoelektrischen Punktes (6,3), der Quantifizierung der Sulfhydrylgruppen, des Substratspektrums, der Substratkinetiken, des Temperaturoptimums (50-54°C), des pH-Optimums (7,0-8,2) und der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Inhibitoren. Das Dipeptidamid Ala-Phe-NH₂ wird mit einer spezifischen Aktivität von 194,3 U/mg und einem K_M-Wert < 0,5 mM zu Ala-Phe-OH hydrolysiert. Chymostatin wurde als starker Inhibitor identifiziert (K_I < 0,3 µM).

Die Peptidamidase konnte kristallisiert werden. Nach der Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden Proteinkristalle erhalten, die eine Strukturaufklärung per Röntgenstrukturanalyse erlaubten. Die Röntgenstrukturanalyse wurde von J. Granzin und J. Labahn am Institut für biologische Informationsverarbeitung 2 im Forschungszentrum Jülich durchgeführt. Die Lösung des Phasenproblems gelang mittels isomorpher Substitution. Die Struktur der nativen Peptidamidase wurde bei einer Auflösung von 1,4 Å bestimmt, damit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Struktur eines Mitglieds der Amidase-Signatur-Familie beschrieben. Nach Inkubation der Pam-Kristalle in Gegenwart von Chymostatin konnte die

Struktur des Peptidamidase-Chymostatin-Komplexes bei einer Auflösung von 1,8 Å ermittelt werden.

Auf der Grundlage der Strukturdaten wurde anschließend eine gerichtete Mutagenese von Aminosäureresten im aktiven Zentrum durchgeführt. Ziel war es, die Funktion der Aminosäurereste zu klären. Die fünf erzeugten Peptidamidase-Varianten wurden kinetisch charakterisiert. Die Ergebnisse der Mutagenese von Pam stimmen mit denen für die FAAH überein: Danach sind die Varianten S226A (S241A*) und K123A (K142A*) katalytisch inaktiv. Die Variante S202A (S217A*) weist eine stark herabgesetzte Aktivität auf.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Strukturdaten widersprechen dem bisher angenommenen Katalysemechanismus für Amidase-Signatur-Enzyme (Ser-Lys-Diade). Auf der Grundlage der Strukturdaten des Enzym-Inhibitor-Komplexes, der Ergebnisse der gerichteten Mutagenese und der Inhibitionsstudien wurde ein abweichender Reaktionsmechanismus vorgeschlagen. Die Rolle des Ser-226 (Ser-241*) als primäres Nucleophil wird zwar bestätigt, Lys-123 (Lys-142*) kann allerdings im Fall von Pam nicht unmittelbar als generelle Base fungieren, die das Nucleophil aktiviert, da die räumliche Nähe zu Ser-226 nicht gegeben ist. Die Strukturdaten legen darüber hinaus nahe, dass Lys-123 im Fall von Pam nicht als generelle Base fungieren kann, da der Rest vermutlich protoniert vorliegt. Lys-123 mit direktem Kontakt zu Ser-202 (Ser-217*), aber keinem Kontakt zu Ser-226 oder zum Substrat, fungiert vermutlich als Säure-Katalysator. Ser-202 mit direktem Kontakt zu Ser-226 und zum Substrat besitzt vermutlich die Funktion eines Säure-Base-Katalysators.

Die Pam-Varianten S202A, S226A und K123A wurden ebenfalls kristallisiert und mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht. Die Auswertung der Daten steht jedoch noch aus. Insbesondere wären hier die Strukturdaten für die katalytisch inaktiven Pam-Varianten S202A und K123A im Komplex mit partiell umgesetztem Substrat für das weitere Verständnis des Reaktionsmechanismus von großem Interesse.

Bei Untersuchungen zur biotechnologischen Anwendung der Peptidamidase aus *S. maltophilia* zur Synthese von Peptidamiden aus Peptiden und Ammonium wurde der Einsatz des Enzyms in organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten in Gegenwart von wenig oder keinem Wasser untersucht. In einem Gemisch aus organischen Lösungsmitteln konnte eine Ausbeute von 30% erreicht werden. Die Umsetzung in ionischen Flüssigkeiten führte zu einer Ausbeute von 20%.

Der Inhalt der vorliegenden Arbeit wurde bereits teilweise in Form von vier Publikationen zusammengefasst [Neumann et al. (2002), Neumann und Kula (2002), Kaftzik et al. (Manuskript in Vorbereitung) und Labahn et al. (Manuskript eingereicht)].

ANHANG

DNA-Sequenzdaten: In Tabelle 16 sind die offenen Leseraster und regulatorische Sequenzen des 6,9 kb-DNA-Fragments angegeben.

Tabelle 16. Offene Leseraster und regulatorische Sequenzen auf dem 6918 bp umfassenden DNA-*Bgl*II-Fragment.

Gen/regulatorisches Sequenzmotiv	Sequenzabschnitt [bp]
5'-Bereich des Malatdehydrogenase-Gens (<i>mdh</i>)	2-331
Peptidylprolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase-Gen (<i>ppi</i>)	450-941
Gen des Translationselongationsfaktors G (<i>efg</i>)	1167-3062
Gen eines hypothetisches lösliches Proteins	3155-3541
Peptidamidase-Gen (<i>pam</i>)	3583-5202
Gen eines hypothetischen Membranproteins	5262-6455
potentielle <i>pam</i> -Ribosomenbindungsstelle 5'-ACCAAG-3'	3570-3575
potentielle <i>pam</i> -TATA-Box 5'- TGGACG -3'	3562-3567
potentielle <i>pam</i> -(-35-Region) 5'- TCTACG -3'	3501-3506
potentieller <i>pam</i> -Transkriptionsterminator 5'- GCCGGC-CGCTGGCCGGCAGATCCGGAGTTGCCGGC-CAGCGGCCGGC -3'	5216-5260

Die Sequenz des 6918 bp umfassenden DNA-*Bgl*II-Fragments aus *Stenotrophomonas maltophilia* DSM 9181 ist in doppelsträngiger Darstellung wiedergegeben. Auf dem DNA-Fragment befinden sich sechs offene Leseraster. Die Genprodukte der sechs offenen Leseraster sind in grau dargestellt. Die Nukleotidsequenz des aus *S. maltophilia* DSM 9181 stammenden 6,9 kb-*Bgl*II-DNA-Fragments wurde in der EMBL/GenBank unter der Datenbank-Zugangsnummer AJ414049 hinterlegt.

```

5' AGATCTTGGCGTTTTTCCAGCAGCAGGTCCTTGCGCTCCATGCCCGGGCCACGCGGACGCG
   10          20          30          40          50          60
3' TCTAGAACCGCAAAAGGTCGTTCGTCCAGGAACGCGAGGTACGGGCCCGGTGCGCCTGCGC
   I K A N E L L L D K R E M G P G R P R A

CGCCGACCAGCAGGGCGATGTCGGCGTCCTTGAACGCGACTTCAGCGTCATCGGTGCCGA
   70          80          90          100         110         120
GCGGCTGGTTCGTCCCGCTACAGCCGAGGAACTTGCGCTGAAGTCGCAGTAGCCACGGCT
   G V L L A I D A D K F A V E A D D T G V

```

CCATGCCGGCCAGCAGCGGGAAGGCGCAGTCTTCCAGCTCCATCATCACGCCCTTCAGGG
130 140 150 160 170 180
GGTACGGCCGGTTCGTCGCCCTTCCGCGTCAGAAGGTTCGAGGTAGTAGTCGGGGAAGTCCC
M G A L L P F A C D E L E M M V G K L A

CGGCCTGGGCCTTGTTCGACCGGCAGTTCCAGCAGCTGCAGGATGACCGGCTGGTCCTTGC
190 200 210 220 230 240
GCCGGACCCGGAACAGCTGGCCGTCAAGGTTCGTCGACGTCTACTGGCCGACCAGGAACG
A Q A K D V P L E L L Q L I V P Q D K G

CCAGCATTTTCGCCGAGGCGATGCGGAACAGCAGGGCATAACCGATCTGGCCGGCGGCGC
250 260 270 280 290 300
GGTCGTAAAGCGGCCTCCGCTACGCCTTGTTCGTCGCCGATTTGGCTAGACCGGCCGCCGCG
L M E G S A I R F L L A Y G I Q G A A G

CGGTCACGGCAACACGAACGGGTGCTTTTCATGGGGGTTTCTCTTGCTTGCAAGCGTTTG
310 320 330 340 350 360
GCCAGTGCCGTTGTGCTTGCCACGAAAAGTACCCCAAAGGAGAACGAACGTTTCGCAAAC
T V A V R V P A K M (MDH)

ATGGGACGCCGCGGGCGTGGCCACGCAGGCCTGGCGGGCGGCGGGGAACAGGGAAACGGC
370 380 390 400 410 420
TACCCTGCGGGCGCCCGCACCGGTGCGTCCGGACCGCCCGCCCTTGTCCCTTTGCCG

CACCCATGGGTGGCCGTTTTCGAAGGGGGATCAGGCGGCGAGGTGCTTGTTCCTACTCCGCG
430 440 450 460 470 480
GTGGGTACCCACCGGCAAAGCTTCCCCCTAGTCCGCGCTCCACGAACAAGGTGAGGCGC
* A A L H K N W E A V

ACGCGCTCGGCCTGGGCGGCCAGCACGGCGTTCGACGTTCGCTTCCAGGGTGATCGAATGG
490 500 510 520 530 540
TGCGCGAGCCGGACCCCGCGGTTCGTCGCCGAGCTGCAGCGGAAGGTCCACTAGCTTACC
R E A Q A A L V A D V D G E L T I S H I

ATCACGTTCGCCCTGCTTGACCGAATCGACGATGGCCTGGCCTTCCAGGACCTTGCCGAAG
550 560 570 580 590 600
TAGTGCAGCGGGACGAACTGGCTTAGCTGCTACCGGACCGGAAGGTCTTGAACGGCTTC
V D G Q K V S D V I A Q G E L V K G F V

ACGGTGTGGCGGCCGTCCAGCCAGTCCGGTCTTGATGTGGGTGATGAAGAAGTGGCTGCCG
610 620 630 640 650 660
TGCCACACCGCCGGCAGGTCCGGTCCAGCCAGAACTACACCCACTACTTCTTGACCGACGGC
T H R G D L W D T K I H T I F F Q S G N

TTGGTGTTCGGGCCGGCGTGGCCATCGACAGCGAGCCGACCTCGTGCTTCACGCCATTC
670 680 690 700 710 720
AACCACAAGCCCGGCCGCAACCGGTAGCTGTTCGCTCCGGCTGGAGCACGAAGTGCGGTAAG
T N P G A N A M S L S G V E H K V G N K

TTCTCGTCTTCGAACTTGTAGCCCGGGCCGCCGGTGCCACGACCCTGCGGGCAGCCGCC
 730 740 750 760 770 780
 AAGAGCAGAAGCTTGAACATCGGGCCCGGCCACGGTGCTGGGACGCCCGTTCGGCGGG
 E D E F K Y G P G G T G R G Q P C G G Q

TGGATCATGAAGTCGGCGATCACGCGGTGGAAGATCAGGCCGTCATAGAAACCGTGCTTG
 790 800 810 820 830 840
 ACCTAGTACTTCAGCCGCTAGTGCGCCACCTTCTAGTCCGGCAGTATCTTTGGCAGAAC
 I M F D A I V R H F I L G D Y F G H K V

ACCAGGTTACGAAGTTGGCCACGGTCAGCGGCGCCTTGTGCGGCAACAGCTCGACCTTG
 850 860 870 880 890 900
 TGGTCCAAGTGCTTCAACCGGTGCCAGTCGCCGCGAACAGCCGCTTGTGAGCTGGAAC
 L N V F N A V T L P A K D A F L E V K I

ATCGGGCCCTGGGTGGTGTGAAAAGTGGCGATGAGGGACATGAAGATCCTTGATGCAGAG
 910 920 930 940 950 960
 TAGCCCGGGACCCACCACAGCTTTCACCGCTACTCCCTGTACTTCTAGGAACTACGTCTC
 P G Q T T D F T A I L S M (PPI)

GGGAACGCGTCTAGCCACCTAGTTTACACCTGCCTCGTGGCGGCGGGCTTCGACCATG
 970 980 990 1000 1010 1020
 CCCTTGCGCAGATCGGTGGATCAAATGTGGACGGAGCACCGCCCGCCGAAGCTGGTAC

GGCGCAGATCCGGGCTTCAGCCACGGGACGGGCTGCCCGCCGTCAGGCCAGGCGGCCCT
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CCGCGTCTAGGCCCGAAGTCGGTGCCCTGCCCGACGGGGCGGCACGTCCGGTCCGCCGGA

CGACCGGCGCCGCGGACCGCCAGCTGAATGGGCCCCGTGACGGGCGTGAAATCCACCTTT
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GCTGGCCGCGGCGCCTGGCGGTGACTTACCCGGGGCACTGCCCGACTTTAGGTGAAAA

(EF-G) M L D F F F Q I R R R L

TCGCGAATCGTCAAGTTTCGACGTATAATGTTGGACTTCTTTTCCAAATCCGGCGCCGAC
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AGCGCTTAGCAGTTCAAGCTGCATATTACAACCTGAAGAAAAAGTTTAGGCCGCGGCTG

A P F R M S I E N L R N I A I V A H V D
 TGGCCCCCTTTCGTATGTCCATCGAAAATCTTCGCAACATCGCCATCGTCGCCACGTGC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 ACCGGGGGAAAGCATAACAGGTAGCTTTTAGAAGCGTTGTAGCGGTAGCAGCGGGTGCAGC

H G K T T L V D Q L L K Q S G T L S E R
 ACCATGGCAAGACCACCTGGTCGACCAGTCTGAAGCAGTCCGGCACCTGTCCGAGC
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TGGTACCGTTCTGGTGGGACCAGCTGGTCGACACTTCGTCAGGCCGTGGGACAGGCTCG

T V L A E R V M D S N D Q E K E R G I T
 GCACCGTCTTCGCCGAGCGCGTGATGGACAGCAACGACCAGGAAAAGGAACGCGGCATCA
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CGTGGCAGGAGCGGCTCGCGCACTACCTGTGCTGGTCCCTTTTCCTTGCGCCGTAGT

I L A K N T A I T W E D K K T G I K N R
CCATCCTGGCCAAGAACACCGCCATCACCTGGGAAGACAAGAAGACCCGGTATCAAGAACC
1390 1400 1410 1420 1430 1440
GGTAGGACCGGTTCTTGTGGCGGTAGTGGACCCCTTCTGTTCTTCTGGCCATAGTTCTTGG

I N I V D T P G H A D F G G E V E R V L
GGATCAACATCGTTCGACACCCCCGGCCACGCCGACTTCGGTGGTGAGGTCGAGCGCGTGC
1450 1460 1470 1480 1490 1500
CCTAGTTGTAGCAGCTGTGGGGGCGGCTGCGGCTGAAGCCACCACTCCAGCTCGCGCACG

S M V D T V L I L V D A M D G P M P Q T
TGTCGATGGTTCGACACCGTGTGATCCTGGTTCGATGCGATGGACGGCCCGATGCCGCGA
1510 1520 1530 1540 1550 1560
ACAGCTACCAGCTGTGGCAGACTAGGACCAGCTACGCTACCTGCCGGGCTACGGCGTCT

R F V T Q K A F A M G F K P I V V V N K
CCCCTTCGTGACCCAGAAGGCCTTCGCGATGGGCTTCAAGCCGATCGTTCGTGGTCAACA
1570 1580 1590 1600 1610 1620
GGGCGAAGCACTGGGTCTTCCGGAAGCGCTACCCGAAGTTCGGCTAGCAGCACCAGTTGT

V D R P G A R P E W V I D Q V F D L F D
AGGTTCGACCGTCCGGGCGCCCGTCCGGAATGGGTGATCGACCAGGCTTTCGACCTGTTTCG
1630 1640 1650 1660 1670 1680
TCCAGCTGGCAGGCCCGCGGGCAGGCCTTACCCACTAGCTGGTCCAGAAGCTGGACAAGC

K L G A T N E Q L D F P I V Y A S G L N
ACAAGCTCGGGCCACCAACGAGCAGCTGGACTTCCCGATCGTCTACGCCTCGGGCCTGA
1690 1700 1710 1720 1730 1740
TGTTTCGAGCCGCGGTGGTTGCTCGTTCGACCTGAAGGGCTAGCAGATGCGGAGCCCGACT

G Y A G L E D T V R D G D M T P L Y E A
ACGGCTACGCCGGCCTGGAAGACACCGTGC GCGATGGCGACATGACCCCCGTGTACGAAG
1750 1760 1770 1780 1790 1800
TGCCGATGCGGGCCGACCTTCTGTGGCAGCGCTACCGCTGTACTGGGGCGACATGCTTC

I M Q H A P R P E V D P E G P F Q M R I
CGATCATGCAGCACGCGCCCGTCCGGAAGTGGACCCGGAAGGCCCGTTCAGATGCGCA
1810 1820 1830 1840 1850 1860
GCTAGTACGTTCGTGCGCGGCGCAGGCCTTACCTGGGCCTTCCGGGCAAGGTCTACGCGT

S Q L D Y N N F V G V I G I G R I Q R G
TCAGCCAGCTGGACTACAACAACCTTCGTGGGCGTGATCGGCATCGGCCGATCCAGCGCG
1870 1880 1890 1900 1910 1920
AGTCGGTTCGACCTGATGTTGTTGAAGCACCCGCACTAGCCGTAGCCGGCGTAGGTCGCGC

T L K K N M Q V A V I D R E G K K R N G
GCACCCTGAAGAAGAACATGCAGGTTCGCGGTTCATCGACCGTGAAGGCAAGAAGCGCAACG
1930 1940 1950 1960 1970 1980
CGTGGGACTTCTTCTTGTACGTCCAGCGCCAGTAGCTGGCACTTCCGTTCTTCGCGTTGC

K V L Q V L G F M G L E R I E Q D T A E
 GCAAGGTGCTGCAGGTGCTGGGCTTCATGGGCCTGGAGCGCATCGAGCAGGATACCGCCG
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CGTTCCACGACGTCCACGACCCGAAGTACCCGGACCTCGCGTAGCTCGTCCTATGGCGGC

A G D I V A I S G I Q E L T I S D T I C
 AGGCCGGCGACATCGTGGCCATCTCCGGCATCCAGGAGCTGACCATCTCCGACACCATCT
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TCCGGCCGCTGTAGCACCGGTAGAGGCCGTAGGTCTCGACTGGTAGAGGCTGTGGTAGA

A P D T P E A L P A L T V D E P T I S M
 GCGCCCCGGACACCCCGAAGCCCTGCCGGCGCTGACCGTCGACGAGCCGACCATCTCGA
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 CGCGGGGCTGTGGGGCTTCGGGACGGCCGCGACTGGCAGCTGCTCGGCTGGTAGAGCT

T F Q V N N S P F A G N K D L S G G K F
 TGACCTTCCAGGTCAACAACCTCGCCGTTCCGGCAACAAGGACCTGTCCGGTGGCAAGT
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 ACTGGAAGGTCCAGTTGTTGAGCGCAAGCGGCCGTTGTTCTGGACAGGCCACCGTTCA

L T S R Q I K D R L D R E K V H N V A L
 TCCTGACCAGCCGAGATCAAGGACCGCTGGACCGTGAAAAGGTCCACAACGTGGCCC
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 AGGACTGGTCGGCGGTCTAGTTCTGGCGACCTGGCACTTTTCCAGGTGTTGCACCGGG

K V E Q L E D A D K F L V S G R G E L H
 TGAAGGTGAGCAGCTGGAAGACGCTGACAAGTTCTGGTTTTCCGGCCGTGGCGAACTGC
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 ACTTCCAGCTCGTCGACCTTCTGCGACTGTTCAAGGACCAAAGCCGGCACCGCTTGACG

L S V L I E N M R R E G Y E L A V S R P
 ACCTGTCCGGTGTGATCGAGAACATGCGTCGCGAAGGCTACGAGCTGGCCGTGTGCGGTC
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 TGGACAGCCACGACTAGCTCTTGTACGCAGCGCTTCCGATGCTCGACCGGCACAGCGCAG

E V I I K E I D G Q M M E P I E Q L V V
 CGGAAGTGATCATCAAGGAAATCGACGGCCAGATGATGGAGCCGATCGAGCAGCTGGTGG
 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 GCCTTCACTAGTAGTTCTTTAGCTGCCGGTCTACTACCTCGGCTAGCTCGTCGACCACC

D I E E I H Q G G V M E K L G T R K G Q
 TGGACATCGAAGAAATCCACCAGGGCGGCGTGATGGAAAAGCTGGGCACCCGCAAGGGCC
 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 ACCTGTAGCTTCTTTAGGTGGTCCCGCCGCACTACCTTTTCGACCCGTGGGCGTTCCCGG

L K N M E S D G K G R V R L E Y S I P A
 AGCTGAAGAACATGGAATCGGACGGCAAGGGCCGCGTGCCTGGAATACTCGATCCCGG
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 TCGACTTCTTGTACCTTAGCCTGCCGTTCCCGCGCACGCGGACCTTATGAGCTAGGGCC

R G L I G F Q N E F K T L T Q G S G L L
 CCCGTGGCCTGATCGGTTTCCAGAACGAGTTCAAGACCCCTGACCCAGGGTTCGGGCCTGC
 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 GGGCACCGGACTAGCCAAAGGTCTTGCTCAAGTTCTGGGACTGGGTCCCAAGCCCGGACG

F H V F D H Y G P K E Q G A I A K R I N
 TGTTCCACGTGTTTCGACCACTACGGCCCGAAGGAACAGGGCGCGATCGCCAAGCGCATCA
 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 ACAAGGTGCACAAGCTGGTGATGCCGGGCTTCTTGTCCC CGCTAGCGGTTTCGCGTAGT

G V M I A N A P G T T P A Y S L G P L Q
 ACGGCGTGATGATCGCCAATGCGCCGGGCACCACGCCGGCCTACTCGCTGGGCCCGCTGC
 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 TGCCGCACTACTAGCGGTTACGCGGCCCGTGGTGCGGCCGATGAGCGACCCGGGCGACG

E R G K L F A A E G D N V Y E G Q L V G
 AGGAACGCGGCAAGCTGTTTCGCTGCTGAAGGCGACAACGTGTATGAAGGTCAGCTGGTCCG
 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 TCCTTGCGCCGTTTCGACAAGCGACGACTTCCGCTGTTGCACATACTTCCAGTCGACCAGC

I H S K D N D L T V N A I K T K P L T N
 GCATCCACTCCAAGGACAACGACCTGACCGTCAACGCGATCAAGACCAAGCCGCTGACCA
 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 CGTAGGTGAGGTTCTGTTGCTGGACTGGCAGTTGCGCTAGTTCTGGTTTCGGCGACTGGT

M R A S G K D D A I Q L T P A I K Y S L
 ACATGCGCGCTTCGGGCAAGGACGATGCGATCCAGCTGACCCCGCGATCAAGTACTCGC
 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 TGTACGCGGAAGCCCGTTCTGCTACGCTAGGTGCGACTGGGGCCGCTAGTTCATGAGCG

E Q A L D F I E D D E L V E I T P K E I
 TGGAACAGGCCCTGGACTTCATCGAAGACGACGAGCTGGTTCGAGATCACCCCGAAGGAGA
 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 ACCTTGTCCGGGACCTGAAGTAGCTTCTGCTGCTCGACCAGCTCTAGTGGGGCTTCTCT

R L R K K F L T E S D R K K A S R G G *
 TCCGTCTGCGCAAGAAGTTCTGACCGAAAGCGACCGCAAGAAGGCTTCGCGCGCGCGCT
 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 AGGCAGACGCGTTCTTCAAGGACTGGCTTTTCGCTGGCGTTCTTCCGAAGCGCGCCCGCA

GAGCCAGCACCCCGTGAACCAGAGCGGCTACAACCCGGATCCACACCGGCATCCGGGTCT
 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 CTCGGTCTGGGGCACTTGGTCTCGCCGATGTTGGGCTAGGTGTGGCCGTAGGCCAGA

(hyp. Protein) M L A L L A A T G
 CCATGTCATCGCCCTGCTCGAAGCGAGCAAGGCCATGCTGGCGCTGTTGGCTGCCACCGG
 3130 3140 3150 3160 3170 3180
 GGTACAGTAGCGGGACGAGCTTTCGCTCGTTCCGCTACGACCGCGACAACCGACGGTGGCC

L E V L G P Q P L R H G I M V L I R R F
 GCTGGAAGTGCTCGGACCGCAGCCGCTGCGGCACGGC ATCATGGTCCTGATCCGGCGTTT
 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 CGACCTTACGAGCCTGGCGTCGGCGACGCCGTGCCGTAGTACCAGGACTAGGCCGCAA

S L D P D H G T L P S L L H M I S P D A
 CAGCCTGGATCCGGACCATGGCACCCCTGCCCTCGCTGCTGCACATGATCAGCCCCGACGC
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 GTCGGACCTAGGCCTGGTACCGTGGGACGGGAGCGACGACGTGTACTAGTCGGGGCTGCG

V H L A A A G M I G Y G L L H L V E A W
 GGTGCACCTGGCCGCGCGGGGATGATCGGCTACGGCCTGCTGCACCTGGTTCGAAGCCTG
 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 CCACGTGGACCGGCGCCCTACTAGCCGATGCCGGACGACGTGGACCAGCTTCGGAC

G L W R A K A W A S W L G C L T A S L Y
 GGGCCTGTGGCGCGCAAGGCCTGGGCTCCTGGCTGGGTTGCCTGACCGCCTCGCTGTA
 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 CCCGGACACCGCGCGGTTCCGGACCCGGAGGACCGACCCAACGGACTGGCGGAGCGACAT

L P F D I F A I I R H P G W P S W T I L
 CCTGCCCTTCGACATCTTCGCGATCATCCGCCACCCCGGCTGGCCGTCGTGGACGATCCT
 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 GGACGGGAAGCTGTAGAAGCGCTAGTAGGCGGTGGGGCCGACCGGCAGCACCTGCTAGGA

A I N L I V V Y V L A R D L R K R H R *
 GCGATCAACCTGATCGTGGTCTACGCTGCTCGCCCGGACCTGCGCAAGCGCCACCGCTG
 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 CCGCTAGTTGACTAGCACAGATGCACGAGCGGGCGCTGGACGCGTTTCGCGGTGGCGAC

(Pam) M R P S L P
 AGCACCGGCTACACTGGGGATTGGAGCCGACCAAGCCGCCCATGCGCCCGTTCCTTGCCG
 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 TCGTGGCCGATGTGACCCCTAACCTCGGCTGGTTTCGGCGGGGTACGCGGGCAGGAACGGC

P L L T C L L A A L P A L L S A G C S P
 CCTCTGCTGACCTGCCTGCTCGCCGCGCTGCCGGCGCTGCTTTCGGCTGGCTGCAGCCCC
 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 GGAGACGACTGGACGGACGAGCGGCGGACGGCCGCGACGAAAGCCGACCGACGTTCGGC

A T P S A H A A E P A S R N V P F P Y A
 GCCACGCCAGCGGCATGCGGCCGAACCTGCGAGCCGCAACGTGCCGTTCCCGTACGCC
 3670 3680 3690 3700 3710 3720
 CCGTGGGGTTCGCGGTACGCCGCTTGGACGCTCGGCGTTGCACGGCAAGGGCATGCGG

E T D V A D L Q A R M T A G E L D S T T
 GAAACCGATGTTGCCGACCTGCAGGCGCGGATGACCGCCGGGAACTGGACAGCACCACC
 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 CTTTGGCTACAACGGCTGGACGTCCGCGCCTACTGGCGGCCCTTGACCTGTCTGGTGG

L T Q A Y L Q R I A A L D R T G P R L R
CTGACCCAGGCCTACCTGCAGCGCATCGCCGCGCTGGACCGCACCGGGCCGCGCTGCGC
3790 3800 3810 3820 3830 3840
GACTGGGTCCGGATGGACGTTCGCGTAGCGGCGCGACCTGGCGTGGCCCGGCGCGGACCGC

A V I E L N P D A L K E A A E R D R E R
GCGGTGATCGAGCTCAACCCCGACGCCCTGAAGGAAGCCGCGAGCGGACCGCGAGCGC
3850 3860 3870 3880 3890 3900
CGCCACTAGCTCGAGTTGGGGCTGCGGGACTTCCTTCGGCGGCTCGCGCTGGCGCTCGCG

R D G R L R G P L H G I P L L L K D N I
CGCGATGGGCGCCTGCGCGGGCCGCTGCACGGCATCCCGCTGCTGCTGAAGGACAACATC
3910 3920 3930 3940 3950 3960
GCGCTACCCGCGGACGCGCCCGGCGACGTGCCGTAGGGCGACGACGACTTCCTGTTGTAG

N A A P M A T S A G S L A L Q G F R P D
AACGCCGCGCCGATGGCCACCAGTGCCGGCTCGCTGGCCCTGCAGGGCTTCGCCCCGGAT
3970 3980 3990 4000 4010 4020
TTGCGGCGCGGCTACCGGTGGTCACGGCCGAGCGACCGGGACGTCCCCAAGGCGGGCCCTA

D A Y L V R R L R D A G A V V L G K T N
GACGCCTACCTGGTGCGCCGGCTGCGCGACGCCGGTGCGGTGGTGTGGGCAAGACCAAC
4030 4040 4050 4060 4070 4080
CTGCGGATGGACCACGCGGCCGACGCGCTGCGGCCACGCCACCACGACCCGTTCTGGTTG

L S E W A N F R G N D S I S G W S A R G
CTCAGCGAATGGGCCAACTTCGCGGCAATGATTGATCTCCGGCTGGAGCGCGCGTGGC
4090 4100 4110 4120 4130 4140
GAGTCGCTTACCCGGTTGAAGGCGCCGTTACTAAGCTAGAGCCGACCTCGCGCGCACCG

G Q T R N P Y R I S H S P C G S S S G S
GGCCAGACCCGCAACCCCTATCGCATCAGCCATTTCGCCGTGTGGTTCCAGCAGCGGCAGC
4150 4160 4170 4180 4190 4200
CCGGTCTGGGCGTTGGGGATAGCGTAGTCGGTAAGCGGCACACCAAGGTCGTCGCCGTCG

A V A V A A N L A S V A I G T E T D G S
GCGGTGGCCGTGGCCGCCAACCTGGCCAGCGTGGCGATCGGCACCGAAACCGACGGCAGC
4210 4220 4230 4240 4250 4260
CGCCACCGGCACCGGCGGTTGGACCGGTTCGCACCGCTAGCCGTGGCTTTGGCTGCCGTCG

I V C P A A I N G V V G L K P T V G L V
ATCGTCTGCCCCGGCGGCATCAACGGCGTGGTTCGGCTGAAGCCGACGGTTCGGCCTGGTC
4270 4280 4290 4300 4310 4320
TAGCAGACGGGCCCGCGCTAGTTGCCGACACCGGACTTCGGCTGCCAGCCGGACCG

S R D G I I P I S F S Q D T A G P M A R
AGCCGCGATGGCATCATCCCGATCTCCTTCAGCCAGGACACCGCCGGACCGATGGCGCGC
4330 4340 4350 4360 4370 4380
TCGGCGCTACCGTAGTAGGGCTAGAGGAAGTCGGTCTGTGGCGGCTGGCTACCGCGCG

S V A D A A A V L T A I A G R D D A D P
 AGTGTGCTGACGCCGCCCGTGCTGACCGCGATCGCCGGCCGCGACGATGCCGACCCG
 4390 4400 4410 4420 4430 4440
 TCACAGCGACTGCGGCGGCGGCACGACTGGCGCTAGCGGCCGGCGCTGCTACGGCTGGGC

A T A T M P G R A V Y D Y T A R L D P Q
 GCTACGGCCACCATGCCCGGCCGCGCGTCTACGACTACACCGCGCGACTGGACCCGCGAG
 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 CGATGCCGGTGGTACGGGCGGCGCGCCAGATGCTGATGTGGCGCGCTGACCTGGGCGTC

G L R G K R I G L L Q T P L L K Y R G M
 GGCCTGCGCGCAAGCGCATCGGCCTGCTGCAGACACCGCTGCTGAAGTACCGCGGCATG
 4510 4520 4530 4540 4550 4560
 CCGGACGCGCCGTTGCGTAGCCGGACGACGTCTGTGGCGACGACTTCATGGCGCCGTAC

P P L I E Q A A T E L R R A G A V V V P
 CCGCCACTGATCGAACAGGCCGCCACCGAGCTGCGCCGCGCCGGCGCCGTGGTGGTACCG
 4570 4580 4590 4600 4610 4620
 GCGGGTGAAGTACTGTTGTCGGCGGTGGTCTGACGCGGCGCGGCCGCGGCACCACCATGGC

V E L P N Q G A W A E A E R T L L L Y E
 GTGGAGCTGCCCAACCAGGGCGCTGGGCGGAGGCCGAACGCACGCTGCTGCTGTACGAA
 4630 4640 4650 4660 4670 4680
 CACCTCGACGGGTTGGTCCCGCGGACCCGGCTCCGGCTTGCGTGCAGACGACATGCTT

F K A G L E R Y F N T H R A P L R S L A
 TTCAAGGCCGGGCTGGAGCGCTACTTCAACACCCACCGAGCGCCACTGCGCAGCCTGGCC
 4690 4700 4710 4720 4730 4740
 AAGTTCGGCCCCGACCTCGCGATGAAGTTGTGGGTGGCTCGCGGTGACGCGTCCGACCGG

D L I A F N Q A H S K Q E L G L F G Q E
 GACCTGATCGCCTTCAACCAGGCGCACAGCAAACAGGAACTGGGCCTGTTCCGGCCAGGAA
 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 CTGGACTAGCGGAAGTTGGTCCCGGTGTCGTTTGTCCCTTGACCCGGACAAGCCGGTTCCTT

L L V E A D A T A G L A D P A Y I R A R
 CTGCTGGTGGAAAGCCGATGCCACCGCCGCGCTGGCCGATCCCGCCTATATCCGCGCGCGC
 4810 4820 4830 4840 4850 4860
 GACGACCACCTTCGGCTACGGTGGCGGCCGGACCGGCTAGGGCGGATATAGGCGCGCGCG

S D A R R L A G P E G I D A A L A A H Q
 AGCGATGCGCGCCGGCTGGCCGGGCGGAGGGCATCGATGCCGCCCTTGCCGCCACCAG
 4870 4880 4890 4900 4910 4920
 TCGCTACGCGCGGCCGACCGGCCCGCTCCCGTAGCTACGCGGGAACGGCGGGTGGTC

L D A L V A P T T G V A W P I R S E G D
 CTTGATGCGCTGGTTCGCGCCACCACCGCGTGGCATGGCCGATCCGCAGCGAAGGCGAC
 4930 4940 4950 4960 4970 4980
 GAACTACGCGACCAGCGCGGGTGGTGGCCGACCGTACCGGCTAGGCGTCCGCTCCGCTG

D F P G E S Y S A A A V A G Y P S L T V
 GACTTCCCCGGTGAAAGCTACAGCGCCGCCCGCTGGCCGGCTATCCCAGCCTCACCGTG
 4990 5000 5010 5020 5030 5040
 CTGAAGGGGCCACTTTTCGATGTGCGGGCGGGCACCCGGCCGATAGGGTTCGGAGTGGCAC

P M G Q I D G L P V G L L F M G T A W S
 CCGATGGGGCAGATCGATGGCCTGCCGGTCGGCCTGCTGTTCATGGGCACCGCCTGGAGC
 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 GGCTACCCCGTCTAGCTACCGGACGGCCAGCCGGACGACAAGTACCCGTGGCGGACCTCG

E P K L I E M A Y A Y E Q R T R A R R P
 GAACCGAAGCTGATCGAGATGGCCTATGCCTATGAACAGCGCACGCGCGCGGGCGACCA
 5110 5120 5130 5140 5150 5160
 CTTGGCTTCGACTAGCTCTACCGGATACGGATACTTGTGCGGTGCGCGCGCCGCTGGT

P H F D T D A L I D A G E P *
 CCGCACTTCGATACCGACGCACTGATCGACGCTGGCGAGCCGTGATCCGGTAGTGCCGGC
 5170 5180 5190 5200 5210 5220
 GGCGTGAAGCTATGGCTGCGTGACTAGCTGCGACCCGCTCGGCACTAGGCCATCACGGCCC

CGCTGGCCGGCA GATCCGGAGTTGCCGGCCAGCGGCCGGCGCTACCGTTCGGGTTCGGC
 5230 5240 5250 5260 5270 5280
 GCGACCGGCCGTCTAGGCCTCAACGGCCGGTCGCCGGCCGGATGGCAAGCCCAAGGCCG
 * R E P E P E

TCCACCGGTACGATCGCCGCTCGCCATCTTCCGCACCCGGCGAACGCACATCTGCTGTG
 5290 5300 5310 5320 5330 5340
 AGGTGGCCATGCTAGCGGCGGAGCGGTAGAAGGCGTGGGCCGCTTGCCTGTAGACGACAC
 V P V I A A E G D E A G P S R V D A T R

CGTGACGTTGGACCGCGCGCATGTCCAGTTCGTCTGCATGCTGCAGCCGCGCACGCACC
 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 GCACGTGCACCTGGCGCGCCGTACAGGTCAAGCAGACGTACGACGTCGGCGCGTGCCTGG
 A R P G R P M D L E D A H Q L R A R V Q

TGCGGCAGCGACTGCGGATGCTCACGCGGAGGAAATCGAGCATGCGTTCGCGCACCAGG
 5410 5420 5430 5440 5450 5460
 ACGCCGTGCTGACGCCTACGAGTGCAGGCTCCTTTAGCTCGTACGCAAGCGCGTGGTCC
 P L S Q P H E R A L F D L M R E R V L C

CAACGCAGATCGAAGGCATCGCCGGAGCTGCGCGCGCTGACCAGCAGGCGCACCTGGATC
 5470 5480 5490 5500 5510 5520
 GTTGCCTTAGCTTCCGTAGCGGCCTCGACGCGCGGACTGGTCTCGCGTGGACCTAG
 R L D F A D G S S R A S V L L R V Q I A

GCACGCTCGCTGGTCTCGGTACCTGGGTACCGCAGACCCGGCCATCCCACAATGCTTCG
 5530 5540 5550 5560 5570 5580
 CGTGCAGCGACCGAGCCAGTGGACCCAGTGCCTCTGGGCCGGTAGGGTGTACGAAGC
 R E S T E T V Q T V C V R G D W L A E G

CCGCGACAGATGCGCTCCAGCTCAGCACGGATCGCCGCAATCGGCGCACGGTAGTCCAAC
5590 5600 5610 5620 5630 5640
GGCGCTGTCTACGCGAGGTCGAGTCGTGCCCTAGCGGCGTTAGCCGCGTGCCATCAGGTTG
R C I R E L E A R I A A I P A R Y D L W

CACAGGAACGCGGTGCCGAGCAGGTCGGCGCTGCGCCGCGTCCAGTTCTGGAACGGGTTT
5650 5660 5670 5680 5690 5700
GTGTCCCTTGCGCCACGGCTCGTCCAGCCGCGACGCGGCGCAGGTCAAGACCTTGCCCAAA
L F A T G L L D A S R R T W N Q F P N E

TCGATGAACCAGGTCAGCGGCACCACCATCCGCCGCTCATCCCAGATACGCACCACCAG
5710 5720 5730 5740 5750 5760
AGCTACTTGGTCCAGTCGCCGTGGTGGTAGGCGGCGAGTAGGGTCTATGCGTGGTGGTGC
I F W T L P V V M R R E D W I R V V V Y

TAGCTGCTGCCGATCTCCTCGATGCGCCCCACTCGCCCTCGACGATACCACGTCATCC
5770 5780 5790 5800 5810 5820
ATCGACGACGGCTAGAGGAGCTACGCGGGGGTGAGCGGGAGCTGCTAGTGGTGCAGTAGG
S S G I E E I R G W E G E V I V V D D L

AGCCGGATCGGCTGCGTCACCGGATCTGCAGGCCAGCGATCAGGTTGCCGAACACCGGC
5830 5840 5850 5860 5870 5880
TCGGCCTAGCCGACGACGTGGCGCTAGACGTCCGGTCGCTAGTCCAACGGCTTGTGGCCG
R I P Q T V A I Q L G A I L N G F V P K

TTGGCGGCGATACCCGCCACCAGGCCGATCAGGCCCGCCGAGGCCAGCAGCGCGGTGCCG
5890 5900 5910 5920 5930 5940
AACCGCCGCTATGGGCGGTGGTCCGGCTAGTCCGGGCGGCTCCGGTCGTCGCGCCACGGC
A A I G A V L G I L G A S A L L A T G I

ATCTTCTGCACCATCGGGAACGTCAGCAGTACCAGCGACGCGCCGAGCAGATGATGGCG
5950 5960 5970 5980 5990 6000
TAGAAGACGTGGTAGCCCTTGCAGTCGTATGGTTCGCTGCGCGGCTCGTGCTACTACCGC
K Q V M P F T L L V L S A G L V I I A G

CCCATCAGAACGCGGCTGAGCACCCGGTCTGGGTCTGGATGCGGCGTGCCCTCAGATTG
6010 6020 6030 6040 6050 6060
GGGTAGTCTTGCGCCGACTCGTGGGCCCCAGACCCAGACCTACGCCGCACGGAGGTCTAAC
M L V R S L V R T Q T Q I R R A E L N D

TCGGAGACATCGATGGGATGACTGCGCAGGATCGCGCGCTACCCGCCGCCACCGCGCGC
6070 6080 6090 6100 6110 6120
AGCCTCTGTAGCTACCCTACTGACGCGTCTTAGCGCGGAGTGGGCGGCGGTGGCGCGCG
S V D I P H S R L I A R E G A A V A R V

ACCAGCAGCCAGATGAAGCATGCGGTGACGCGGATGTGCAGCACATGCTGCAGGTTGCC
6130 6140 6150 6160 6170 6180
TGGTTCGTCGGTCTACTTTCGTACGCCAGTCGCGCTACACGTCTGTACGACGTCCAACGGG
L L W I F C A T L A I H L V H Q L N G L

AGCACCGGATCCTGCAGCGGCGTGGCCTGCAATGCGGGGATCAACAACAGCAGCGGCCAT
6190 6200 6210 6220 6230 6240
TCGTGGCCTAGGACGTGCGCCGACCCGGACGTTACGCCCTAGTTGTTGTCGTCGCCGGTA
V P D Q L P T A Q L A P I L L L L P W A

GCGGTGGCCAGCGGCAACCCGAGCACACGTCGGATGCGTGCGCGCCGGCGATCACGCCCT
6250 6260 6270 6280 6290 6300
CGCCACCGGTGCGCGTTGGGCTCGTGTGCAGGCTACGCACGCGCGGCCGCTAGTGCGGGA
T A L P L G L V R G I R A R R R D R G K

TTCAGTCGATGGTAGATCCACAGGATCAACCACGCGCCGATGCCGCCACTACAACGGCC
6310 6320 6330 6340 6350 6360
AAGTCAGCTACCATCTAGGTGTCCTAGTTGGTGC GCGGCTACGGCGGGTGATGTTGCCGG
L R H Y I W L I L W A G I G G V V V A L

AATCCCAACGGCCATGCGTAGGCCTGTGCGCTTTGCCAGTGCACCGTTGCCACCTCCACT
6370 6380 6390 6400 6410 6420
TTAGGGTTGCCGGTACGCATCCGGACACGCGAAAACGGTCACGTGGCAACGGTGAGGTGA
G L P W A Y A Q A S Q W H V T A V E V R

CGAACAGCAGGCGGACAGCCTCGCGCATGGCGCATGAGCGTCACGTGAGTTCGTAAG
6430 6440 6450 6460 6470 6480
GCTTGTGTCGTCGCGCTGTCGGAGCGCGTACCCGTACTCGCAGTGCAGTCAAGCATTC
V A P P C G R A H R M (hyp. Membranprotein)

GAGGGTGTGGTTCGGCAGGGCTTGCAGCCCTGCACCTGCTGCGAGCTGGAGCAACAGCAA
6490 6500 6510 6520 6530 6540
CTCCCACAACCAGCCGTCGCCAACGTCGGGACGTGGACGACGCTCGACCTCGTTGTCGTT

CAGCCGAAGTAGAAGCGGGTTCTGTGGGATGGCGGGGTGGGTCCGGTTGCGGGAGACG
6550 6560 6570 6580 6590 6600
GTCGGCTTCATCTTCGCCCCAAGGACACCCTACCGCCCCACCCAGCCAACGCCCTCTGC

CCGTAGACCCCGCTCCGCGGTCCGGCCCAGCCGCTGGCGGCTGTGCGTTCCGGCGCTTGC
6610 6620 6630 6640 6650 6660
GGCATCTGGGGCGAGGCGCCAGGCCGGGTCCGGACCCGACACGCAAGCCCGCAACG

GAAGCAGTGCTTCGCAAGCAAAGCGCCCTCACCCATGGGGGCTTGGCCGCGGCATCCCTG
6670 6680 6690 6700 6710 6720
CTTCGTACGAAGCGTTTCGTTTCGCGGGAGTGGGTACCCCCGAACCGGCGCCGTAGGGAC

CCGCGGACACTCCCGCAACCGGACCCACCCCGGCTTCGACAGTTTTCCGCGATCTGCTCG
6730 6740 6750 6760 6770 6780
GGCGCCTGTGAGGGCGTTGGCCTGGGTGGGGCCGAAGCTGTCAAAGGCGCTAGACGAGC

CTCTTCTATAGAGCCGAGCCATGCTCGGCTCAAATCTCACAGATATCGAAATATTCGATT
6790 6800 6810 6820 6830 6840
GAGAAGATATCTCGGCTCGGTACGAGCCGAGTTTAGAGTGTCTATAGCTTTATAAGCTAA

TCCATAGTGATTCATCCACGCATGGCGTGGATTACCGTGTGACCAAGGTCGACACCTAC
6850 6860 6870 6880 6890 6900
AGGTATCACTAAGTAGGTGCGTACCGCACCTAATGGCACAGCTGGTTCAGCTGTGGATG

CAACAGCCGCGGAGATCT 3'
6910
GTTGTCGGCGCCTCTAGA 5'

LITERATURVERZEICHNIS

- Al-Karadaghi, S., Kristensen, O., and Liljas, A. (2000). A decade of progress in understanding the structural basis of protein synthesis, *Prog Biophys Mol Biol* 73, 167-93.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25, 3389-402.
- Arnold, F. H. (1998). Design by Directed Evolution, *Acc Chem Res* 31, 125-131.
- Asano, Y., Mori, T., Hanamoto, S., Kato, Y., and Nakazawa, A. (1989). A new D-stereospecific amino acid amidase from *Ochrobactrum anthropi*, *Biochem Biophys Res Commun* 162, 470-4.
- Asano, Y., Tachibana, M., Tani, Y., and Yamada, H. (1982). Purification and characterization of amidase which participates in nitrile degradation, *Agric Biol Chem* 46, 1175-1181.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology* (New York, John Wiley & Sons).
- Bergmeyer, H. U., and Beutler, H.-O. (1985). Ammonia. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 8, 454-461, (Weinheim).
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- Blum, H., Berier, H., and Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels., *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bone, R., Frank, L., Springer, J. P., Pollack, S. J., Osborne, S. A., Atack, J. R., Knowles, M. R., McAllister, G., Ragan, C. I., Broughton, H. B., and et al. (1994). Structural analysis of inositol monophosphatase complexes with substrates, *Biochemistry* 33, 9460-7.
- Bongers, J., and Heimer, E. P. (1994). Recent applications of enzymatic peptide synthesis, *Peptides* 15, 183-193.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Bullock, T. L., Breddam, K., and Remington, S. J. (1996). Peptide aldehyde complexes with wheat serine carboxypeptidase II: implications for the catalytic mechanism and substrate specificity, *J Mol Biol* 255, 714-25.
- Carroll, K. C., Cohen, S., Nelson, R., Campbell, D. M., Clardige, J. D., Garrison, M. W., Kramp, J., Malone, C., Hoffmann, M., and Anderson, D. E. (1998). Comparison of various in vitro susceptibility methods for testing *Stenotrophomonas maltophilia*, *Diagn Microbiol Infect Dis* 32, 229-235.

- Cerovsky, V., and Kula, M.-R. (1998). C-terminale Amidierung von Peptiden - katalysiert von der aus dem Flavedo von Orangen stammenden Peptidamidase, *Angew Chem* *110*, 1986-89.
- Cerovsky, V., and Kula, M.-R. (2001). Studies on peptide amidase-catalysed C-terminal peptide amidation in organic media with respect to its substrate specificity, *Biotechnol Appl Biochem* *33*, 183-187.
- Chandec, V. B., and Leonard, S. A. (1995). *Current Protocols in Proteine Science* (New York, John Wiley & Sons, Inc.).
- Chebrou, H., Bigey, F., Arnaud, A., and Galzy, P. (1996). Study of the amidase signature group, *Biochim Biophys Acta* *1298*, 285-93.
- Ciskanik, L. M., Wilczek, J. M., and Fallon, R. D. (1995). Purification and Characterization of an Enantioselective Amidase from *Pseudomonas chlororaphis* B23, *Appl Environm Microbiol* *61*, 998-1003.
- Clarke, P. H. (1972). Biochemical and immunological comparison of aliphatic amidases produced by *Pseudomonas* species, *J Gen Microbiol* *71*, 241-57.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Cryst D* *50*, 760-763.
- Compton, L. A., Davis, J. M., Macdonald, J. R., and Bachinger, H. P. (1992). Structural and functional characterization of *Escherichia coli* peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, *Eur J Biochem* *206*, 927-934.
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., and Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides, *Nature* *384*, 83-87.
- Crowder, M. W., Walsh, T. R., Banovic, L., Pettit, M., and Spencer, J. (1998). Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*, *Antimicrob Agents Chemother* *42*, 921-926.
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., and McPherson, A. (1994). Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth, *Acta Cryst D* *50*, 414-423.
- Curnow, A. W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T. M., and Soll, D. (1997). Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation [see comments], *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11819-26.
- d'Abusco, A. S., Ammendola, S., Scandurra, R., and Politi, L. (2001). Molecular and biochemical characterization of the recombinant amidase from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*, *Extremophiles* *5*, 183-192.
- Damblon, C., Raquet, X., Lian, L. Y., Lamotte-Brasseur, J., Fozze, E., Charlier, P., Roberts, G. C., and Frere, J. M. (1996). The catalytic mechanism of beta-lactamases: NMR titration of an active-site lysine residue of the TEM-1 enzyme, *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 1747-52.

- Denton, M., and Kerr, K. G. (1998). Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clin Microbiol Rev* 11, 57-80.
- Deutsch, D. G., Omeir, R., Arreaza, G., Salehani, D., Prestwich, G. D., Huang, Z., and Howlett, A. (1997). Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase, *Biochem Pharmacol* 53, 255-60.
- Dodson, G., and Wlodawer, A. (1998). Catalytic triads and their relatives, *Trends Biochem Sci* 23, 347-52.
- Driessen, A. J., Fekkes, P., and van der Wolk, J. P. (1998). The Sec system, *Curr Opin Microbiol* 1, 216-222.
- Edman, P., and Begg, G. (1967). A protein sequenator, *Eur J Biochem* 1, 80-91.
- Erbeldinger, M., Mesiano, A. J., and Russell, A. J. (2000). Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents [In Process Citation], *Biotechnol Prog* 16, 1129-31.
- Farnaud, S., Tata, R., Sohi, M. K., Wan, T., Brown, P. R., and Sutton, B. J. (1999). Evidence that cysteine-166 is the active-site nucleophile of *Pseudomonas aeruginosa* amidase: crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the enzyme, *Biochem J* 340, 711-4.
- Francisco, W. A., Merkler, D. J., Blackburn, N. J., and Klinman, J. P. (1998). Kinetic mechanism and intrinsic isotope effects for the peptidylglycine alpha-amidating enzyme reaction, *Biochemistry* 37, 8244-52.
- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., Gwinn, M., Hickey, E. K., Clayton, R., Ketchum, K. A., *et al.* (1998). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete, *Science* 281, 375-88.
- Fraser, J. A., Davis, M. A., and Hynes, M. J. (2002). The Genes *gmdA*, Encoding an Amidase, and *bzuA*, Encoding a Cytochrome P450, Are Required for Benzamide Utilization in *Aspergillus nidulans*, *Fungal Genet Biol* 35, 135-146.
- Gibson, R. M., Christensen, H., and Waley, S. G. (1990). Site-directed mutagenesis of beta-lactamase I. Single and double mutants of Glu-166 and Lys-73, *Biochem J* 272, 613-9.
- Gopalakrishnan, R., Hawley, H. B., Czachor, J. S., Markert, R. J., and Bernstein, J. M. (1999). *Stenotrophomonas maltophilia* infection and colonization in the intense care units of two community hospitals: a study of 143 patients, *Heart & Lung* 28, 134-141.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Hashimoto, Y., Nishiyama, M., Ikehata, O., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1991). Cloning and characterization of an amidase gene from *Rhodococcus* species N-774 and its expression in *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta* 1088, 225-33.
- Hawley, D. K., and McClure, W. R. (1983). Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences, *Nucleic Acids Res* 11, 2237-2255.
- Heidelberg, J. F., Eisen, J. A., Nelson, W. C., Clayton, R. A., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., Hickey, E. K., Peterson, J. D., Umayam, L., *et al.* (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*, *Nature* 406, 477-83.

- Herzberg, O., and Moulton, J. (1991). Penicillin-binding and degrading enzymes, *Curr Opin Struct Biol* 1, 946-953.
- Holm, L., and Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices., *J Mol Biol* 233, 123-38.
- Jancarik, J., Scott, W. G., Milligan, D. L., Koshland, D. E., Jr., and Kim, S. H. (1991). Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of *Salmonella typhimurium*, *J Mol Biol* 221, 31-4.
- Jiang, S., Lim, K., Strick, N., and Neurath, A. R. (1993). HIV-1 inhibition by a peptide, *Nature* 365, 113.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Cryst A* 47, 110-9.
- Kaftzik, N., Neumann, S., Kula, M.-R., and Kragl, U. (manuscript in preparation). Use of ionic liquids to increase yield in enzymatic reactions using β -galactosidase and peptide amidase.
- Kammermeier-Steinke, D., Schwarz, A., Wandrey, C., and Kula, M. R. (1993). Studies on the substrate specificity of a peptide amidase partially purified from orange flavedo, *Enzyme Microb Technol* 15, 764-769.
- Karmali, A., Tata, R., and Brown, P. R. (2000). Substitution of Glu-59 by Val in amidase from *Pseudomonas aeruginosa* results in a catalytically inactive enzyme, *Mol Biotechnol* 16, 5-16.
- Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., *et al.* (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry., *Nat Med* 4, 1302-7.
- Kim, J., and Kim, K. (1994). Identification of the C-terminal amino acid amides by carboxypeptidase Y digestion and fast atom bombardment mass spectrometry, *Biochem Mol Biol Int* 34, 897-907.
- Kim, S. Y., Hwang, K. Y., Kim, S. H., Sung, H. C., Han, Y. S., and Cho, Y. (1999). Structural basis for cold adaptation. Sequence, biochemical properties, and crystal structure of malate dehydrogenase from a psychrophile *Aquaspirillum arcticum*, *J Biol Chem* 274, 11761-7.
- Kobayashi, M., Fujiwara, Y., Goda, M., Komeda, H., and Shimizu, S. (1997). Identification of active sites in amidase: evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11986-91.
- Kobayashi, M., Izui, H., Nagasawa, T., and Yamada, H. (1993a). Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 247-51.
- Kobayashi, M., Komeda, H., Nagasawa, T., Nishiyama, M., Horinouchi, S., Beppu, T., Yamada, H., and Shimizu, S. (1993b). Amidase coupled with low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and expression of the

- gene and purification and characterization of the gene product, *Eur J Biochem* 217, 327-36.
- Koo, H. M., Choi, S. O., Kim, H. M., and Kim, Y. S. (2000). Identification of active-site residues in *Bradyrhizobium japonicum* malonamidase E2, *Biochem J* 349, 501-507.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J Appl Cryst* 24, 946-950.
- Labahn, J., Neumann, S., Granzin, J., Büldt, G., and Kula, M.-R. (manuscript submitted). An alternative mechanism for amidase signature enzymes.
- Lamotte-Brasseur, J., Dive, G., Dideberg, O., Charlier, P., Frere, J. M., and Ghuysen, J. M. (1991). Mechanism of acyl transfer by the class A serine beta-lactamase of *Streptomyces albus* G, *Biochem J* 279, 213-21.
- Lamzin, V. S., and Wilson, K. S. (1993). Automated refinement of protein models, *Acta Cryst D* 49, 129-147.
- Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image data., *Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography* 26.
- Madeira Lau, R., Van Rantwijk, F., Seddon, K. R., and Sheldon, R. A. (2000). Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids [In Process Citation], *Org Lett* 2, 4189-91.
- Maestracci, M., Thiery, A., Bui, K., Arnaud, A., and Galzy, P. (1984). Activity and regulation of an amidase (acrylamide amidohydrolase, EC 3.5.1.4) with a wide substrate spectrum from a *Brevibacterium* sp., *Arch Microbiol* 138, 315-320.
- Mahenthalingam, E., Draper, P., Davis, E. O., and Colston, M. J. (1993). Cloning and sequencing of the gene which encodes the highly inducible acetamidase of *Mycobacterium smegmatis*, *J Gen Microbiol* 139, 575-83.
- Mayaux, J. F., Cerebelaud, E., Soubrier, F., Yeh, P., Blanche, F., and Petre, D. (1991). Purification, cloning, and primary structure of a new enantiomer-selective amidase from a *Rhodococcus* strain: structural evidence for a conserved genetic coupling with nitrile hydratase, *J Bacteriol* 173, 6694-6704.
- Mayaux, J. F., Cerebelaud, E., Soubrier, F., Faucher, D., and Petre, D. (1990). Purification, cloning, and primary structure of an enantiomer-selective amidase from *Brevibacterium* sp. strain R312: structural evidence for genetic coupling with nitrile hydratase, *J Bacteriol* 172, 6764-73.
- Merkler, D. J. (1994). C-terminal amidated peptides: production by the in vitro enzymatic amidation of glycine-extended peptides and the importance of the amide to bioactivity, *Enzyme Microb Technol* 16, 450-6.
- Merrifield, R. B. (1969). Solid-phase peptide synthesis, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32, 221-96.
- Merrit, E. A., and Bacon, D. J. (1997). *Methods Enzymol* 277, 505-524.
- Nakamura, Y., Gojobori, T., and Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000, *Nucleic Acids Res* 28, 292.

- Neumann, S., Granzin, J., Kula, M.-R., and Labahn, J. (2002). Crystallization and preliminary X-ray data of the recombinant peptide amidase from *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acta Cryst D* 58, 333-335.
- Neumann, S., and Kula, M.-R. (2002). Gene cloning, overexpression and characterization of the peptide amidase from *Stenotrophomonas maltophilia*, *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 772-780.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng* 10, 1-6.
- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J., Heidelberg, J. F., Alley, M. R., Ohta, N., Maddock, J. R., *et al.* (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4136-41.
- Novo, C., Tata, R., Clemente, A., and Brown, P. R. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase is related to the nitrilase/cyanide hydratase enzyme family and Cys166 is predicted to be the active site nucleophile of the catalytic mechanism, *FEBS Lett* 367, 275-9.
- Oefner, C., D'Arcy, A., Daly, J. J., Gubernator, K., Charnas, R. L., Heinze, I., Hubschwerlen, C., and Winkler, F. K. (1990). Refined crystal structure of beta-lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for beta-lactam hydrolysis, *Nature* 343, 284-8.
- Oren, Z., and Shai, Y. (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides., *Biopolymers* 47, 451-63.
- Paetzel, M., Dalbey, R. E., and Strynadka, N. C. (2000). The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target, *Pharmacol Ther* 87, 27-49.
- Pantoliano, M. W. (1992). Proteins Designed for Challenging Environments and Catalysis in Organic Solvents, *Opin Struct Biol* 2, 559-568.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D., Holden, M. T., *et al.* (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18, *Nature* 413, 848-52.
- Patel, S., Yenush, L., Rodriguez, P. L., Serrano, R., and Blundell, T. L. (2002). Crystal structure of an enzyme displaying both inositol-polyphosphate-1-phosphatase and 3'-phosphoadenosine-5'-phosphate phosphatase activities: a novel target of lithium therapy, *J Mol Biol* 315, 677-85.
- Patricelli, M. P., and Cravatt, B. F. (1999). Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism, *Biochemistry* 38, 14125-30.
- Patricelli, M. P., and Cravatt, B. F. (2000). Clarifying the catalytic roles of conserved residues in the amidase signature family, *J Biol Chem* 275, 19177-84.
- Patricelli, M. P., Lovato, M. A., and Cravatt, B. F. (1999). Chemical and mutagenic investigations of fatty acid amide hydrolase: evidence for a family of serine hydrolases with distinct catalytic properties, *Biochemistry* 38, 9804-12.

- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases, *Biochem J* 290, 205-18.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., *et al.* (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*, *Nature* 415, 497-502.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sarubbi, E., Seneci, P. F., Angelastro, M. R., Peet, N. P., Denaro, M., and Islam, K. (1993). Peptide aldehydes as inhibitors of HIV protease, *FEBS Lett* 319, 253-6.
- Schally, A. V., and Nagy, A. (1999). Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors., *Eur J Endocrinol* 141, 1-14.
- Schlegel, H. G. (1985). *Allgemeine Mikrobiologie* (Stuttgart, New York, Thieme Verlag).
- Schwarz, A., Wandrey, C., Steinke, D., and Kula, M. R. (1992). A Two-Step Enzymatic Synthesis of Dipeptides, *Biotechnol Bioeng* 39, 132-140.
- Sekine, M., Watanabe, K., and Syono, K. (1989). Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*, *J Bacteriol* 171, 1718-24.
- Silman, N. J., Carver, M. A., and Jones, C. W. (1991). Directed evolution of amidases in *Methylophilus methylotrophus*, purification and properties of amidases from wild-type and mutant strains, *J Gen Microbiol* 137, 169-178.
- Simpson, A. J., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves, L. M., Araya, J. E., Baia, G. S., Baptista, C. S., *et al.* (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis, *Nature* 406, 151-7.
- Skouloubris, S., Labigne, A., and De Reuse, H. (1997). Identification and characterization of an aliphatic amidase in *Helicobacter pylori*, *Mol Microbiol* 25, 989-98.
- Steinke, D., and Kula, M. R. (1990). Selektive Desamidierung von Peptidamiden, *Angew Chem* 102, 1204-1206.
- Stelkes-Ritter, U. (1994) *Reinigung, Charakterisierung und Anwendung der Peptidamidasen aus Citrus sinensis L. und Stenotrophomonas maltophilia*, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Stelkes-Ritter, U., Wyzgol, K., and Kula, M. R. (1995). Purification and characterization of a newly screened microbial peptide amidase, *Appl Microbiol Biotechnol* 44, 393-8.
- Strynadka, N. C., Adachi, H., Jensen, S. E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K., and James, M. N. (1992). Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution, *Nature* 359, 700-5.
- Tam, J. P. (1995). in *Peptides: Synthesis, Structures, and Applications* (Gute, B., ed.), Academic Press, San Diego, 455-500.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res* 22, 4673-80.

- Thompson, R. G., Pearson, L., Schoenfeld, S. L., and Kolterman, O. G. (1998). Pramlintide, a synthetic analog of human amylin, improves the metabolic profile of patients with type 2 diabetes using insulin. The Pramlintide in Type 2 Diabetes Group., *Diabetes Care* *21*, 987-93.
- Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature* *388*, 539-47.
- Trott, S., Bauer, R., Knackmuss, H. J., and Stolz, A. (2001). Genetic and biochemical characterization of an enantioselective amidase from *Agrobacterium tumefaciens* strain d3, *Microbiology* *147*, 1815-24.
- Tsuchiya, K., Fukuyama, S., Kanzaki, N., Kanagawa, K., Negoro, S., and Okada, H. (1989). High homology between 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolases of *Flavobacterium* and *Pseudomonas* strains, *J Bacteriol* *171*, 3187-91.
- van den Tweel, W. J. J., van Dooren, T. J. G. M., de Jonge, P. H., Kaptein, B., Duchateau, A. L. L., and Kamphuis, J. (1993). *Ochrobactrum anthropi* NCIMB 40321: a new biocatalyst with broad-spectrum L-specific amidase activity, *Appl Microbiol Biotechnol* *39*, 296-300.
- Wasserscheid, P., and Keim, W. (2000). Ionische Flüssigkeiten - neue "Lösungen" für die Übergangsmetallkatalyse, *Angew Chem* *112*, 3926-3945.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature* *415*, 871-80.
- Wyborn, N. R., Scherr, D. J., and Jones, C. W. (1994). Purification, properties and heterologous expression of formamidase from *Methylophilus methylotrophus*, *Microbiology* *140*, 191-195.
- Xu, K., and Elliott, T. (1993). An oxygen-dependent coproporphyrinogen oxidase encoded by the hemF gene of *Salmonella typhimurium*, *J Bacteriol* *175*, 4990-9.
- You, L., and Arnold, F. H. (1996). Directed Evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide, *Prot Eng* *9*, 77-83.

DANKSAGUNG

Bei Frau Prof. Dr. Maria-Regina Kula möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Enzymtechnologie bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Georg Büldt vom Institut für Biologische Informationsverarbeitung 2 im Forschungszentrum Jülich für die gute Zusammenarbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg vom Institut für Biochemie der Universität zu Köln danke ich für die freundliche Übernahme des externen Gutachtens.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Granzin und Herrn Dr. Jörg Labahn vom Institut für Biologische Informationsverarbeitung 2 im Forschungszentrum Jülich bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und für die Bereitstellung diverser Abbildungen.

Ich bedanke mich bei Frau Dipl.-Chem. Nicole Kaftzik und Herrn Prof. Dr. Udo Kragl vom Fachbereich Chemie der Universität Rostock für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Vaclav Cerovsky von der Universität Prag danke ich für die gute Zusammenarbeit während meines Aufenthaltes in Prag.

Bei Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, gentechnische Arbeiten im Genlabor der Sicherheitsstufe 2 am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorzunehmen.

Frau Birgit Henßen danke ich für die Durchführung der Proteinsequenzierungen.

Bei Frau Dipl.-Chem. Andrea Weckbecker und Frau Dr. Bettina Lingen bedanke ich mich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Des weiteren möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Enzymtechnologie für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere Dipl.-Biol. Kofi Abokitse, Dipl.-Biol. Koku Zikpi Adjogle, Dr. Mara Bönitz, Dipl.-Biol. Birgit Geueke, Dr. Petra Heim, Priv.-Doz. Dr. Werner Hummel, Dipl.-Biol. Elena Janzen, Dipl.-Chem. Lutz Krieg, Dr. Bettina Lingen, Dipl.-Ing. Konrad Odendahl, Priv.-Doz. Dr. Martina Pohl, Dipl.-Chem. Frank Schneider, Dr. Heike Slusarczyk, Dr. Stefan Verseck und Dipl.-Chem. Andrea Weckbecker.