

Isolierung und Charakterisierung eines bakteriellen Prothrombin-Aktivators

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ingenieur Thorsten Keller

aus Darmstadt

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. G. Gassen
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. P. Friedl
Tag der Einreichung:	07.05.2001
Tag der mündlichen Prüfung:	09.07.2001

Darmstadt 2001

D17

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1998 bis April 2001 in der Abteilung für Hämatologie und Transfusionsmedizin am Paul-Ehrlich-Institut in Langen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Seitz, Herrn PD Dr. J. Dodt und Herrn Prof. Dr. H. G. Gassen (Technische Universität Darmstadt) angefertigt.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. J. Dodt danke ich für die sehr gute Betreuung, seine fachliche Unterstützung und die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. König für seine hervorragende Betreuung, die immer hilfreichen und interessanten Diskussionen sowie Anregungen, die wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Forschungsarbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. H. G. Gassen (Technische Universität Darmstadt) danke ich herzlich für die Erstellung des Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. P. Friedl möchte ich für die Übernahme des Korefferats danken.

Herrn Prof. Dr. R. Seitz danke ich herzlich für die Bereitstellung des Laborplatzes, die Betreuung und für sein Interesse am Verlauf meiner Arbeit.

Für die freundliche Atmosphäre und die gute, stets konstruktive Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung 7, insbesondere jedoch bei den Frauen Stefanie Eich, Manuela Kusch, Claudia Grundmann und Christine Hanker aus „unserem“ Labor, bedanken.

Herrn Martin Selbert (Paul-Ehrlich-Institut) danke ich für die DNA-Sequenzierung, Frau Dr. S. Wolf (Technische Universität Darmstadt) für die Aminosäuresequenzierung.

Meinen Eltern Gisela und Egon Keller danke ich sehr herzlich für die stetige Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Biochemie und Physiologie der Blutgerinnung	1
1.2 Struktur und Funktion von Prothrombin und Thrombin	8
1.3 Exogene Prothrombin-Aktivatoren und andere Gerinnungsmodulatoren	16
1.4 Aufgabenstellung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Biologisches Material	21
2.1.2 Oligodesoxynukleotide	21
2.1.3 Proteine	22
2.1.4 Chemikalien	23
2.1.5 Standards und Kits	25
2.1.6 Geräte	26
2.1.7 Sonstiges Material	28
2.1.8 Medien und allgemeine Lösungen	28
2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden	32
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien	32
2.2.2 Gelelektrophorese von DNA	32
2.2.3 Enzymatische Spaltung von DNA	33
2.2.4 Ligierung von DNA-Fragmenten	34
2.2.5 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Aeromonas hydrophila</i>	34
2.2.6 Sequenzierung von DNA	34
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.8 Herstellung einer biotinylierten Gensonde	36
2.2.9 Southern-Blot-Analyse	36
2.3 Proteinchemische Methoden	38
2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.3.2 Western-Blot-Analyse	39
2.3.3 Elektrottransfer zur Proteinsequenzierung	42
2.3.4 Aminoterminal Sequenzanalysen	42
2.3.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	43
2.3.6 Produktion des Prothrombin-Aktivators im analytischen Maßstab	43
2.3.7 Produktion im präparativen Maßstab	44
2.3.8 Säulenchromatographische Reinigung des Prothrombin-Aktivators	44
2.3.9 Chromatofokussierung	47
2.3.10 Messung der Aktivierung von Prothrombin	48
2.3.11 Bestimmung kinetischer Parameter	50
2.4 Gerinnungsanalytische Methoden	50

3. Ergebnisse	52
3.1 Isolierung eines bakteriellen Prothrombin-Aktivators	52
3.1.1 Suche nach Bakterien mit Prothrombin-Aktivatoren	52
3.1.2 Untersuchung des bakteriellen Wachstumsverhaltens und der Freisetzung der enzymatischen Aktivität.....	53
3.1.3 Reinigung des Prothrombin-Aktivators	55
3.2 Analyse der Spaltung von Prothrombin und anderer Proteine.....	62
3.2.1 Untersuchung der Prothrombin-Spaltprodukte	62
3.2.2 Untersuchung der Spaltung anderer Proteine	72
3.3 Charakterisierung des Prothrombin-Aktivators.....	76
3.3.1 Sequenzanalyse der <i>Aeromonas hydrophila</i> -Protease	76
3.3.2 Direkte Spaltung chromogener und fluorogener Substrate.....	86
3.3.3 Bestimmung des pH-Optimums	87
3.3.4 Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Konzentration unterschiedlicher Salze.....	89
3.3.5 Untersuchung der thermischen Stabilität	90
3.3.6 Bestimmung des isoelektrischen Punktes	92
3.3.7 Beeinflussung der Prothrombin-aktivierenden Aktivität durch Reaktionszusätze.....	93
3.3.8 Bestimmung kinetischer Parameter der Prothrombin-Aktivierung	96
3.4 Quantitative Analyse des Prothrombin-Gehalts in Plasma.....	98
4. Diskussion	101
4.1 Die Rolle des Prothrombin-Aktivators aus <i>Aeromonas hydrophila</i> als potentieller Pathogenitätsfaktor	101
4.2 Einsatz in der biomedizinischen Analytik als Alternative zu Schlangengift-Proteasen ..	105
4.3 Ausblick	110
5. Literatur.....	118
6. Zusammenfassung	132
7. Abkürzungen und Symbole.....	133