

6 Zusammenfassung / Summary

Die Urease von *A. pp.* ist ein konstitutiv exprimiertes Protein. Mit einer Anionenaustauscherchromatographie, Ethanol-fällung, Gefiltration und sich anschließender Acrylamidgelelektrophorese konnte ein ureaseaktives Teilstück von etwa 80 kDa dargestellt werden.

Die Ureaseaktivität ist im Bereich zwischen pH 3 und pH 10,5 konstant. Sie fällt außerhalb dieses Bereiches stark ab. Bis zu einer Substratkonzentration von 5 M Harnstoff bleibt die Ureaseaktivität stabil. Außerdem steigt sie mit zunehmender Temperatur im Bereich von 10°C - 55°C mit einem Temperaturquotienten von $Q_{10} = 1,8$ an. Bei einer Vorinkubation der Urease von 80°C wurde die Aktivität auf die Hälfte der Aktivität bei 55°C gemindert. Sie läßt sich von Salzkonzentrationen im Bereich von 0-2 M NaCl oder KCl nicht beeinflussen. Die Urease läßt sich mit 66 % Ethanol aus wässrigen Lösungen fällen, dabei bleibt die Aktivität erhalten. Ebenso bleibt die Aktivität der Urease mindestens 30 min bei einer Endkonzentration von 0,5 % der Detergentien Tween 20, Tween 80, Triton X-100 und SDS im Puffer unbeeinflußt.

Die für die Urease ermittelte Michaelis-Menten-Konstante K_m ist 4,35 mM.

Diuron, Thiourea und Hydroxyurea lassen sich nicht als Substrate für die Urease verwenden. Hydroxyurea hemmt die Ureaseaktivität irreversibel.

Die Herstellung eines Antiserums im Kaninchen war möglich. Dieses hemmt die Ureaseaktivität nicht. Es reagiert im Kolonieblot stärker mit *A. pp.* als mit anderen Bakterien. Im Spotblot reagiert es mit allen Serotypstämmen von *A. pp.* außer Serotyp 6 gleich stark, zusätzlich war eine abgeschwächte Reaktion mit der Transposonmutante *A. pp.* U₃ festzustellen. Ebenso reagiert es schwächer mit Jack Bean Urease. *A. pp.*-DNA hybridisierte unter wenig stringenten Bedingungen nicht mit einer Gensonde aus einem Ureasegencluster von *Klebsiella pneumoniae*.

Purification and characterization of the urease from *Actinobacillus pleuropneumoniae*

(Gisela Ohrt)

The urease of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pp.*) is constitutive. A urease active 80 kDa protein was purified with anion exchange chromatography, ethanol precipitation, gel filtration, and electrophoresis. The activity of the urease was stable over a broad range from pH 3.0 to pH 10.5 and also with a substrate concentration of up to 5 M urea. The urease activity increases with the temperature in the range from 10°C to 55°C with a Q_{10} of 1.8. Preincubation of the urease at 80°C for half an hour decreases the activity to half the value determined at 55°C. Saline concentrations of up to 2 M NaCl or KCl do not interfere with the activity. The urease can be precipitated with 66 % ethanol from aqueous solutions without loss of activity. Concentrations up to 0.5 % of the detergents Tween 20, Tween 80, Triton X-100 or SDS do not lower the urease activity. The Michaelis-Menten constant K_M is 4.35 mM urea when it was assayed at pH 7.0. Diuron, thiourea or hydroxyurea can not be used as a substrate for the *A. pp.* urease. hydroxyurea irreversibly inhibits the urease

A rabbit antibody has been raised against the *A. pp.* urease. This antibody appears to be specific for *A. pp.* in a colony blot. In a spot blot it reacts with all twelve serotypes of *A. pp.* with the same intensity with the exception of serotype 6. In addition, a slightly decreased reaction was observed with the transposon mutant *A. pp.* U₃. The antibody shows weak binding with jack bean urease. The urease gene cluster from *A. pp.* does not possess DNA homology with the urease genes from *Klebsiella pneumoniae* as no hybridization occurred under low stringency hybridisation conditions.