

Zoya Orlando

Humane Hyaluronidasen als Wirkstofftargets:

Rekombinante Expression, Aktivitätsbestimmung und Testung von Substanzen

2015

Pharmazeutische und Medizinische Chemie

Humane Hyaluronidasen als Wirkstofftargets:

Rekombinante Expression, Aktivitätsbestimmung und Testung von Substanzen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Zoya Orlando (geb. Niazywahdaty)

aus Teheran

-2015-

Dekan: Prof. Dr. Andreas Heuer

Erster Gutachter: Prof. Dr. Joachim Jose

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Wunsch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2015

Tag der Promotion: 05.03.2015

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. **Joachim Jose** für die Möglichkeit der Promotion in seinem Arbeitskreis. Ich danke ihm für sein Vertrauen, seine Geduld, seine Betreuung und seine konstruktive Kritik.
- Prof. Dr. **Bernhard Wünsch** für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.
- Prof. Dr. **Andreas Hensel** für die freundliche Teilnahme an der Disputation als Drittprüfer.
- **Bertan Bopp** für viele lustige Momente im Arbeitskreis, seinen Humor, seine Freundschaft und seine Unterstützung. Danke für das Korrekturlesen meiner Arbeit
- **Isabelle Olschewski** für ihre Freundschaft, ihr offenes Ohr, ihr frohes Wesen und für die Kaffeepausen. Ich danke ihr für die schöne und tatkräftige Zusammenarbeit im Projekt Hyal-1 und das Korrekturlesen meiner Arbeit.
- **Philipp Tozakidis**, meinem Kücken, für die witzigen Tage im Arbeitskreis, seine freundliche Art und seine Großzügigkeit. Danke für die vielen Wasserflaschen! Und danke für das Korrekturlesen meiner Arbeit
- **Christian Nienberg** für die geduldige Hilfe bei der Formatierung.
- Allen anderen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe : **Eva Kranen, Andreas Gratz, Sarah Thömmes, Christian Detzel, Michael Goblirsch, Claudia Reicheneder, Stephanie Schumacher, Achim Braukmann, Irina Altendorfer, Claas Hundsdorfer, Tamara Tahan, Agne Tubeleviciute, Katja Thiemann, Andre Bollacke, Christian Nienberg, Cristina Gisbert, Shanna Sichwart, Thorsten Saenger, Paul Quehl, Jan Schüürmann, Wilhelmine Weckenbrock, Ilka Rauch, Indra Finger, Sandra Kohaus, Uta Meidt, Dagmar Aichele, Samer Haidar**. Danke für das angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima, für die schönen Pausen, für die fachlichen Gespräche. Ihr seid toll.
- **Dagmar Aichele, Andre Bollacke, Wilhelmine Weckenbrock, Agne Tubeleviciute und Atila Basoglu** für die gemeinsame Betreuung des Quanti-Praktikums. Diese Aufgabe mit euch zu erfüllen, hat mir Spaß gemacht.
- **Andreas Gratz** für das Besorgen des Stammes *E. coli* JC8031 und für die fachlichen aber auch privaten Gespräche.
- Prof. Dr. **Hensel** für die freundliche Bereitstellung von pflanzlichen Extrakten.

- Prof. Dr. **Melzig** und Dr. **Böttger** für die freundliche Bereitstellung von Saponinen.
- Prof. Dr. **Phillip Wright** from University of Sheffield for kindly provision of plasmids pACYC*pgl* and pJexpress401*ptsA*.
- Herrn **Nüsse**, Frau **Keller** und Frau **Rasch** für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen am Institut für Medizinische Physik und Biophysik-IMPB
- **Meiner Familie für ihre Unterstützung.**
- **Meinem Mann für seine Liebe.**

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
I Einleitung.....	5
1 Hyaluronsäure (HA).....	5
1.1 Aufbau und Vorkommen	5
1.2 (Patho)physiologische Bedeutung der HA	6
1.3 Medizinische Anwendung	8
2 Hyaluronidasen.....	9
2.1 Klassifikation der Hyaluronidasen	9
2.2 Humane Hyaluronidasen.....	9
2.3 Hyaluronidasen als Wirkstofftargets.....	14
2.4 Hemmstoffe der Hyaluronidasen.....	17
3 Analytik der HA und Hyaluronidase-Aktivität	21
3.1 Photometrische Methoden	21
3.2 Kapillarelektrophoretische Methoden	22
3.3 Chromatographische Methoden	23
3.4 Weitere Bestimmungsverfahren	24
4 Rekombinante Expression von Hyaluronidasen	25
4.1 Autodisplay	26
5 Ziele der Arbeit	29
II Material und Methoden	30
1 Materialien	30
1.1 Geräte	30
1.2 Chemikalien und Materialien.....	31
1.3 Bakterienstämme	33
1.4 Oligonukleotide	33
1.5 Plasmide	34
1.6 Antikörper.....	35
1.7 Enzyme	35
1.8 Nährmedien	35

1.9 Puffer und Lösungen.....	36
1.10 Reagenziensätze	38
1.11 Auswerteprogramme.....	38
2 Methoden.....	38
2.1 Arbeiten mit Bakterien.....	38
2.1.1 Kultivierung.....	38
2.1.2 Herstellen elektrokompenter Zellen.....	39
2.1.3 Transformation elektrokompenter Zellen	39
2.1.4 Herstellen chemisch kompetenter Zellen.....	39
2.1.5 Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	40
2.1.6 Stammhaltung	40
2.1.7 Proteinexpression und Zellernte.....	40
2.1.8 Anreicherung von Außenmembran-Vesikeln (AMV).....	41
2.1.9 Lysogenisierung von <i>E. coli</i>	42
2.1.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen	42
2.1.11 Nachweis von Heptasaccharid-produzierendem <i>E. coli</i>	43
2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren	44
2.2.1 Plasmidisolierung	44
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion	44
2.2.3 „In-Fusion“ Klonierung	45
2.2.4 Agarosegelelektrophorese und Färbung der DNA.....	45
2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	45
2.2.6 Enzymatische Spaltung von DNA.....	45
2.2.7 Ligation und Entsalzen der DNA-Lösungen.....	46
2.2.8 DNA-Sequenzanalyse	46
2.3 Arbeiten mit Proteinen.....	46
2.3.1 Anreicherung der Außenmembranproteine	46
2.3.2 Proteasesensitivität der oberflächenständigen Proteine.....	47
2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	48

2.3.4 Proteinanalyse mittels Western Blot und Immunfärbung	48
2.3.5 Intrazelluläre Expression und Aufreinigung der humanen PH-20	49
2.3.6 FRET-gestützter Nachweis der OmpT-Aktivität	50
2.4 Nachweis der Hyaluronidase-Aktivität	50
2.4.1 Photometrische Methoden	50
2.4.2 CE-gestützter Aktivitätstest	52
III Experimente und Ergebnisse	53
1 Autodisplay der humanen Hyaluronidase PH-20 (hPH-20) und Aktivitätsuntersuchungen mittels Ganzzell-Verfahren	53
1.1 Autodisplay und Aktivitätsuntersuchungen der hPH-20 nach konstitutiver Expression	53
1.1.1 Autodisplay der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20	60
1.2 Autodisplay und Aktivitätsuntersuchungen der hPH-20 nach einer <i>araBAD</i> - Promotor kontrollierten Expression	68
2 Intrazelluläre Expression der hPH-20	73
2.1 Aufreinigung und Untersuchung der intrazellulär exprimierten hPH-20	74
3 Autodisplay der hPH-20 in <i>E. coli</i> JC8031	76
3.1 Charakterisierung der hPH-20-tragenden Außenmembran-Vesikeln (AMV) ...	77
3.2 Aktivitätsuntersuchung der hPH-20-tragenden AMV mittels „Stains-all“- Verfahren	92
3.3 Turbidimetrische Aktivitätsuntersuchungen der hPH-20-tragenden AMV	93
3.4 Kapillarelektrophoretische Analytik der HA und der Hyaluronidase-Aktivität ...	94
3.4.1 Kapillarelektrophoretische Messung der Enzymaktivität mit AMV	97
3.5 Testung von Hemmstoffen	103
4 Autodisplay der humanen Hyaluronidase Hyal-1 (hHyal-1)	107
4.1 Oberflächenständigkeit der hHyal-1	107
4.2 Aktivität der oberflächenständigen hHyal-1	109
4.3 Identifizierung von pflanzlichen Inhaltsstoffen als Hemmstoffe der hHyal-1 ..	113
5 Untersuchungen zur N-Glykosylierung von Hyaluronidasen als Autotransporter- Fusionsproteine	117
5.1 N-Glykosylierung der hPH-20 in <i>E. coli</i>	118

5.2 N-Glykosylierung der hHyal-1 in <i>E. coli</i>	121
IV Diskussion.....	127
1 Autodisplay der humanen Hyaluronidase PH-20 (hPH-20).....	127
1.1 Testung von hPH-20-Fusionsprotein.....	127
1.2 Intrazelluläre Expression der hPH-20.....	129
1.3 Aktivitätstest mittels Außenmembran-Vesikeln (AMV)	129
2 Autodisplay der humanen Hyaluronidase Hyal-1	133
3 Untersuchungen zur Glykosylierung des Autotransporter-Fusionsproteins	137
4 Fazit.....	140
V Literaturverzeichnis	141
VI Anhang.....	158
1 Abkürzungsverzeichnis.....	158
2 Sequenzen	160
3 Plasmidkarten.....	162
4 Veröffentlichungen.....	163

Zusammenfassung

Die humanen Hyaluronidasen PH-20 und Hyal-1 bilden bei einer intrazellulären Expression in *Escherichia coli* Einschlusskörperchen und liegen in einer inaktiven Form vor. In Rahmen dieser Arbeit wurde die Hyaluronidase-Aktivität dieser Proteine als Teil eines Autodisplay-Fusionsproteins untersucht. Eine Expression der hPH-20 auf der Zelloberfläche von *E. coli* führte nur zu einer sehr geringen Aktivität, wenn ganze Zellen zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt wurden. Infolgedessen wurden Außenmembran-Vesikel (AMV) aus dem *E. coli* JC8031 zur Enzymmessung eingesetzt. Die Vesikulation ist eine allgemeine Eigenschaft von Gram-negativen Bakterien. *E. coli* JC8031 ist infolge einer Mutation im *tolRA* Gen zu einer Hypervesikulation befähigt. Die AMV aus diesem Stamm wurden als Träger des hPH-20-Fusionsproteins angereichert und in ihren Eigenschaften untersucht. Ihr Zetapotenzial betrug im neutralen Medium $-58,5$ mV und war damit um $11,4$ mV negativer als das Zetapotenzial der Kontroll-Vesikel ohne Enzym. Das lieferte einen ersten Hinweis für die Oberflächenständigkeit der hPH-20 (isoelektrischer Punkt 4,8). Diese AMV zeigten eine Größenverteilung von 15 bis 250 nm mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 100 nm, was für eine zellfreie Präparation der AMV sprach. Eine Untersuchung mit den Markerproteinen GFP für das Zytoplasma, SecA-His für die innere Membran und β -Lactamase für das Periplasma ergab, dass die AMV keine Verunreinigungen aus dem Zytoplasma und der inneren Membran enthielten. Die β -Lactamase als periplasmatisches Protein war jedoch in den Vesikeln vorhanden. Anschließend wurden die AMV zur Enzymmessung eingesetzt und es ergab sich im photometrischen Testverfahren eine katalytische Aktivität von 582 mU/mL. Damit konnte zum ersten Mal die Eignung von AMV mit Oberflächen-exprimierten Enzymen für Aktivitätsbestimmungen gezeigt werden. Im Weiteren wurde eine kapillarelektrophoretische Methode zur Analytik der Hyaluronidase-Aktivität etabliert. Hier wurde ebenfalls der Abbau des langkettigen Hyaluronans durch hPH-20 tragende AMV untersucht. Im Anschluss wurden Testsubstanzen auf Hemmung der hPH-20 hin geprüft. Ein potenter Hemmstoff konnte dabei jedoch nicht identifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Enzymaktivität der hHyal-1 als Autotransporter-Fusionsprotein untersucht. Die hHyal-1 tragenden *E. coli* F470 Zellen zeigten eine gut nachweisbare Aktivität. Durch Änderungen in den Anzuchtbedingungen wurde

die Aktivität von anfänglich 0,174 U/mL auf 76,56 U/mL ($OD_{578\text{ nm}}$ von 10) gesteigert. Die rekombinanten *E. coli* F470 Zellen wurden anschließend erstmalig zur Identifizierung von Hemmstoffen der hHyal-1 eingesetzt. Es wurden drei Saponin-Derivate, Gypsophila Saponin 2, SA1657 und SA1641, als neue Hemmstoffe der hHyal-1 identifiziert. Die ermittelten IC_{50} -Werte betragen 108 μM für Gypsophila Saponin 2, 371 μM für SA1657 und 296 μM für SA1641. Sie lagen damit in der gleichen Größenordnung wie der ermittelte IC_{50} -Wert von 177 μM für Glycyrrhizinsäure als bereits bekannter Hemmstoff der hHyal-1.

Summary

In *Escherichia coli* intracellular expressed human hyaluronidases PH-20 and Hyal-1 are inactive due to formation of inclusion body. In this work, these enzymes were displayed on the surface of *E. coli* by autodisplay and the enzymatic activity of the displayed enzymes was investigated. The expression of hPH-20 on the cell surface of *E. coli* lead to a poor activity in assays with whole cells. Hence, outer membrane vesicles of *E. coli* JC8031 were used for activity measurements. Vesiculation is a common feature of Gram-negative bacteria. As a consequence of the mutated *tolRA* gene, the ability of forming vesicles is increased in *E. coli* strain JC8031. Vesicles of this strain, carrying hPH-20 as autodisplay-fusionprotein were enriched and examined in their properties. Their zetapotential was tested to be -58.5 mV in neutral media in contrast to the zetapotential of control-vesicles without enzyme of only -47.1 mV. These results were a first indication of the surface display of hPH-20 (isoelectric point of 4.8). The size of outer membrane vesicles varied from 15 to 250 nm with an average size of approximately 100 nm pointing to a cell-free preparation of outer membrane vesicles. An investigation with markerproteins (GFP for the cytoplasm, SecA-His for inner membrane and β -Lactamase for the periplasm) showed, that contaminations from the cytoplasm and the inner membrane were excluded, whereas periplasmic proteins could be detected in those vesicles. Subsequently, vesicles served as an enzyme source and were tested in photometric assays. They showed a hyaluronidase activity of 582 mU/mL. For the first time, outer membrane vesicles were proven as generally applicable for activity assays with surface displayed enzymes. Furthermore, a capillary electrophoresis method to determine hyaluronidase activity was established. Here, the degradation of high molecular hyaluronan by outer membrane vesicles carrying hPH-20 could be detected. Hereafter, substances as potential inhibitors of hPH-20 were examined, but a potent inhibitor could not be identified.

In the second part of this work, hyaluronidase activity of surface displayed human Hyal-1 was examined. *E. coli* F470 strain displaying hHyal-1 showed an efficient hyaluronidase activity. Changing growth conditions, the activity could be increased from 0.174 U/mL to 76.56 U/mL (OD_{578nm} of 10). After this optimization, *E. coli* F470 cells served for the first time as a basis to identify inhibitors towards Hyal-1. Three saponine derivatives, gypsophila saponine 2, SA1657 and SA1641, could be

identified as new inhibitors of Hyal-1. The IC_{50} values could be determined as 108 μ M for gypsophila saponin 2, 371 μ M for SA1657 and 296 μ M for SA1641. The IC_{50} values of the new inhibitors are in the same range as that of the known inhibitor glycyrrhizinic acid, which was determined to be 177 μ M in the same assay.

I Einleitung

1 Hyaluronsäure (HA)

1.1 Aufbau und Vorkommen

Im Jahr 1934 isolierten Karl Mayer und John Palmer aus dem Kammerwasser des Rinderauges ein Polysaccharid und nannten es Hyaluronsäure (HA), abgeleitet von dem griechischem Wort für glasig – hyalos – und Glucuronsäure. HA ist ein lineares Polymer bestehend aus β -1 \rightarrow 4 glykosidisch verbundenen Disaccharideinheiten, die ihrerseits β -1 \rightarrow 3 verknüpfte Glucuronsäure und N-Acetylglykosamin enthalten (Abbildung 1). Dieses Biopolymer kann ein Molekulargewicht von bis zu 10^7 Da erreichen (Petrey und de la Motte, 2014).

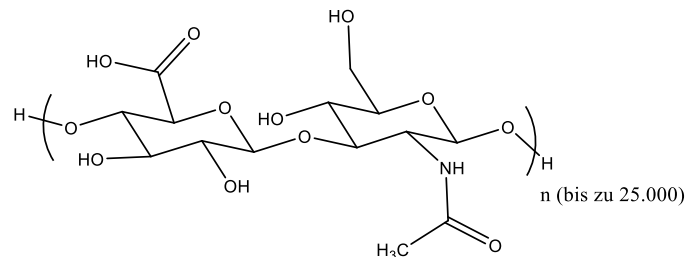


Abbildung 1: Disaccharideinheit der HA. HA besteht aus β -1 \rightarrow 4 glykosidisch verbundenen Disaccharideinheiten, die β -1 \rightarrow 3 verknüpfte Glucuronsäure und N-Acetylglykosamin enthalten

In den Jahren 1991 und 1992 konnten Scott und Mitarbeiter die Bildung von HA-Maschenwerk in wässrigen Lösungen mittels chemischen Experimenten, elektronenmikroskopischen Verfahren und NMR (Nuclear Magnetic Resonance) untersuchen. Sie lieferten Hinweise für eine „tape-like“ Struktur der HA-Ketten. Dabei zeigt jede Disaccharideinheit des Polymers, verglichen mit der Einheit davor und danach, eine Drehung von 180 Grad. Diese Konformation wird durch Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert (Abbildung 2). Dabei sind Wassermoleküle aus der Lösung an diesen Bindungen beteiligt. Bis zu 17 Wassermoleküle können eine Disaccharideinheit hydratisieren und das Polymer strecken. Die funktionellen Gruppen, die an den Wasserstoffbrücken-Bindungen beteiligt sind, liegen äquatorial, während die restlichen Wasserstoffe der Ringe axial angeordnet sind. Sie stehen mit den Acetylgruppen der darunter- bzw. darüber liegenden Ketten in hydrophoben Wechselwirkungen. So entstehen hydrophobe Felder, die sich mit hydrophilen Carboxyl-Bereichen abwechseln (Scott *et al.*, 1991).

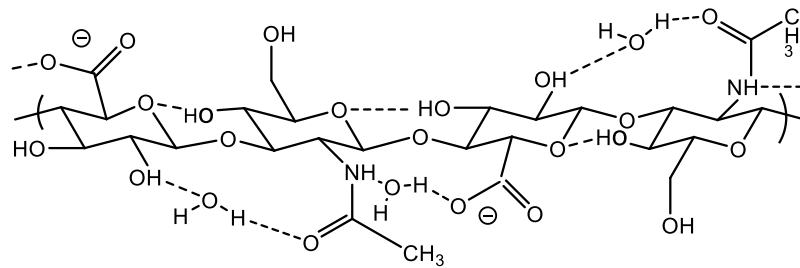


Abbildung 2: Die bevorzugte Konformation der HA im wässrigen Medium. Die gestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar. Es sind 5 potentielle H-Brückenbindungen pro Tetrasaccharideinheit vorhanden. An ihrer Bildung kann Wasser beteiligt sein. Jede Disaccharideinheit zeigt, verglichen mit der Einheit davor und danach, eine Drehung von 180 Grad Modifiziert nach Scott *et al.* (1991).

HA gehört zur Stoffgruppe der Glucosaminogluane (GAG) wie Keratinsulfat, Heparin, Dermatansulfat, Chondroitin und Chondroitinsulfat. Im Gegensatz zu anderen GAG, die durch Enzyme im Golgi-Apparat gebildet werden, wird HA durch verschiedene Glykosyltransferasen (HA-Synthasen: HAS1, HAS2 und HAS3) an der Innenseite der Zellmembran gebildet und über ein Synthase-gekoppeltes Transportprotein in die extrazelluläre Matrix (ECM) ausgeschleust. HA ist eine der Hauptkomponenten der ECM. Die Gesamtmenge an HA im menschlichen Körper beträgt annähernd 15 g und ca. 50 % davon befindet sich in der Haut. Der Rest befindet sich zum großen Teil in der Kammerflüssigkeit des Auges, in der Synovialflüssigkeit und im zentralen Nervensystem. Das Vorkommen von HA begrenzt sich nicht nur auf Säugetiere. Sie wurde in einigen Mikroorganismen, wie pathogenen Staphylokokken, aber auch in Wirbellosen nachgewiesen (Laurent und Fraser, 1992; Volpi und Maccari, 2003).

1.2 (Patho)physiologische Bedeutung der HA

HA steuert die rheologischen Eigenschaften von Gewebsflüssigkeiten. Die hygroskopische und damit verbundene raumfüllende Eigenschaft der HA sorgt für den Gewebsturgor und eine Aufrechterhaltung des Wasserhaushaltes im Gewebe. Das dynamische und poröse HA-Maschenwerk fungiert als eine Schutz- und Diffusionsbarriere für die eingebetteten Zellen und reguliert die Speicherung und den Transport von Substanzen wie Proteinen und Elektrolyten (Laurent *et al.*, 1996). Als eine der Hauptkomponente in der ECM beeinflusst HA die Prozesse wie Zellwachstum, -migration, -proliferation und -differenzierung wesentlich. Neben den aus physikochemischen Eigenschaften resultierenden Funktionen dient HA auch als ein molekularer Effektor von Signaltransduktionskaskaden, indem sie mit verschiedenen membranständigen und zytoplasmatischen Proteinen, den sog.

Hyaladherinen, interagiert. Man findet HA auch intrazellulär. Sie gelangt entweder durch Endozytose aus der ECM ins Zytoplasma oder verbleibt während der Biosynthese aufgrund eines unzureichenden Transportes nach außen direkt im Zytoplasma (Evanko und Wight, 1999). Die Hyaladherine erkennen HA und ihre Fragmente und leiten regulatorische Informationen über unterschiedliche Signalkaskaden weiter. Damit spielen HA und ihre Fragmente bei der Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Wechselwirkung eine wichtige Rolle. Zum Beispiel beruht die Fähigkeit von HA-Oligomeren, eine Proliferation der vaskulären Endothelzellen zu induzieren, auf der HA-Bindung an CD44 und RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility), welche die bekanntesten HA-Rezeptoren sind (Slevin *et al.*, 2007). CD44 ist ein polymorphes Oberflächenprotein und der Hauptrezeptor für HA. Die Interaktion zwischen HA und CD44 beeinflusst die Zellentwicklung, Tumorwachstum, T-Zell-Rekrutierung und -Aktivierung (Lesley *et al.*, 1993). Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Migration und Gewebeinvasion von Melanomzellen durch die Expression einer CD44-Isoform in Verbindung mit ihrem Liganden HA einhergeht (Yoshinari *et al.*, 1999). Slevin *et al.* (2002) zeigten, dass der PKC-Signalweg an der HA-induzierten Angiogenese beteiligt ist. Vermutlich kommt es nach einer HA-Bindung zu einer Tyrosinphosphorylierung am CD44-Rezeptor, die eine Zellteilung der Endothelzellen auslöst. Auch der Prozess der Wundheilung wird durch eine Interaktion von HA mit CD44, insbesondere bei Gewebszellen und Fibroblasten der Dermis beeinflusst (Oksala *et al.*, 1995; Kaya *et al.*, 1997). RHAMM wurde als oberflächenständiger und zytoplasmatisch lokalisierter HA-Rezeptor identifiziert. Dieser HA-Rezeptor ist an der Zell-Motilität und der malignen Transformation von Zellen beteiligt (Hardwick *et al.*, 1992). Eine Kollokalisierung von an RHAMM gebundener HA mit den Mikrotubuli weist auf eine Beteiligung der HA bei der Zellproliferation und beim Aufbau des Zytoskeletts hin (Hall und Turley, 1995). Ein kurzer Überblick von HA-Wechselwirkungen mit Hyaladherinen und ihre Bedeutung ist in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Bedeutung der HA-Wechselwirkung mit Hyaladherinen. Tabelle modifiziert und erweitert nach Jiang *et al.* (2011).

HA-Interaktion mit	Bedeutung
CD44	Zellentwicklung, Entzündung, Tumorwachstum, -adhäsion, -proliferation, und -invasion über Proteinkinasen (z. B. Ras)
RHAMM	Zellbewegung, Gewebsheilung, Onkogenese (über Ras und Src)
TLR ¹ (2 und 4)	Schutz von Epithelien, Stimulation von Entzündungsgenen
Brevican ² , Neurocan ³	Neuronale Entwicklung, Tumorinvasion, Gewebereparatur
LYVE ⁴ , HARE ⁵	Lymphatische Entwicklung, Transport von HA aus dem Gewebe ins lymphatische System, HA-Endozytose

¹Toll like receptor, ^{2,3} brain chondroitin sulfate proteoglycans, ⁴ lymphatic vessel endothelial (HA receptor) 1, ⁵ HA receptor endocytosis

Es ist bekannt, dass der Einfluss der HA auf zelluläre Abläufe von der Kettenlänge abhängig ist (Stern *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass 20 kDa HA-Fragmente die Synthese von Cytokinen stimulieren (Noble, 2002) und HA-Ketten kleiner als 500 kDa die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Makrophagen induzieren (Jiang *et al.*, 2011). HA-Fragmente gewonnen aus menschlicher Nabelschnur mit einem intermediären Gewicht von 750 kDa signalisieren dem Gewebe pathogene Veränderungen und erhöhen die Expression der Cyclooxygenase-2 (Sun *et al.*, 2001). Cyclooxygenasen setzen Arachidonsäure in Prostaglandin G2 um, das als Vorstufe für die Bildung weiterer Prostaglandine als Schmerz- und Entzündungsmediatoren dient. Weiterhin wurde demonstriert, dass die hochmolekulare HA (~ 1.000 kDa) anti-angiogen wirkt, während HA-Fragmente mit 3-25 Disaccharideinheiten die Angiogenese fördern (Deed *et al.*, 1997). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass exogen hinzugefügte HA-Tetrasaccharide in Zellkulturen eine Expression von Hitze-Schock-Proteinen induzieren und anti-apoptotisch wirken.

Zusammengefasst wirkt hochmolekulare HA immunsuppressiv, anti-inflammatorisch und antiproliferativ, während kurze HA-Fragmente anti-apoptotisch, angiogen, immunstimulierend und damit pro-inflammatorisch wirken (Sherman *et al.*, 2002; Stern *et al.*, 2006).

1.3 Medizinische Anwendung

Viele HA-haltige Produkte finden bereits medizinische Anwendung. Sie werden verwendet in Implantatmaterial zur Turgorerhöhung, in der Ophthalmologie zur

Substitution des Kammerwassers, in der Orthopädie zur Erhöhung der Gleitfähigkeit in Gelenken, als Schutz vor post-operativen Adhäsion, in Salben, Gelen und Mundwässern zur Unterstützung der Wundheilung (Wohlrab *et al.*, 2004).

2 Hyaluronidasen

Die Hyaluronidasen sind HA-spaltende Enzyme und kommen in der Natur in einer Vielzahl von Organismen vor. Sie sind Bestandteil vieler Gifte stechender Insekten z.B. Skorpionen, aber auch Schlangen und Spinnen. Die erste Kristallstruktur für eine eukaryotische Hyaluronidase wurde für die Hyaluronidase aus Bienengift bestimmt. Dieses Protein zeigt ungefähr 30 % Sequenzhomologie zu den Hyaluronidasen von Säugern. Die Hyaluronidasen der tierischen Gifte beschleunigen durch ECM-Abbau die Geweberesorption des Giftes und damit auch die Giftwirkung. Bei vielen pathogenen Mikroorganismen fördern sie das invasive Eindringen in den Wirtsorganismus. Im Gegensatz dazu sind Hyaluronidasen von Säugern aufgrund der biologischen Funktionen ihres Substrates ein wichtiger Bestandteil regulativer und zellulärer Abläufe.

2.1 Klassifikation der Hyaluronidasen

Die Einteilung der Hyaluronidasen erfolgt nach ihren Spaltmechanismen und Spaltprodukten. Die Hyaluronoglucosaminidasen (EC 3.2.1.35) sind Endohydrolasen und spalten β -1 \rightarrow 4 glykosidische Bindungen. Sie kommen in Wirbeltieren (z.B. Säugern, Schlangen) und Wirbellosen (z.B. Insekten) vor. Diese Hyaluronidasen akzeptieren andere GAG wie Chondroitin als Alternativsubstrat, zeigen dabei aber eine sehr geringe katalytische Aktivität. Die Hyaluronoglucuronidasen (EC 3.2.1.36) hydrolysieren β -1 \rightarrow 3 glykosidische Bindungen der HA. Sie kommen in Wirbellosen (z. B. Egel, Würmern) vor und setzen keine anderen GAG um. Die Hyaluronatlyasen von Bakterien (EC 4.2.2.1) bauen HA durch eine β -Eliminierung an der β -1 \rightarrow 4 glykosidischen Bindung ab. Dadurch entstehen Oligosaccharide mit ungesättigten Hexuronsäure-Resten (Stern und Jedrzejak, 2006).

2.2 Humane Hyaluronidasen

Das menschliche Genom enthält 6 identifizierte, für Hyaluronidasen codierende Gene. Jeweils drei Gene befinden sich in zwei Genclustern auf zwei Chromosomen: 3p21.3 (*HYAL1*, *HYAL2* und *HYAL3*) und 7q31.3 (*PH-20*, *HYAL4* und *HYALP1*)

(Csoka et al., 2001). Ihre Genprodukte zeigen untereinander ca. 30-42 % (Abbildung 3) und zu den entsprechenden Hyaluronidasen aus anderen Säugern, wie z.B. der Maus, bis zu 70 % Sequenzidentität (Csoka et al., 2001).

Hyal-4	MKVLSEGLQKL-CVVQPVHLTSWLLIFFILKSI SCLKPARLPIYQRKPFIAAWNAPTDQC	59
PH-20	MGVLKFKKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCCLTLNFRAPPVIVPNVPFLWAWNAPSEFC	60
Hyal-1	-----MAAHLLPICALFLTLDDMAQG--FRGPLLPNRPFPTVWNANTQWC	43
Hyal-2	-----MRAGPGPTVTLALVLAWSWAMELKPTAPPIFTGRPFVVAWDVPTQDC	47
Hyal-3	-----MTTQLGPALVVLGVALCLGCGQLPQVPE-----RPF SVLWNVPSAHC	42
HYAL-P1	-----MCNPVWAWLOVLPFLFILLTQAALKPAMPVIK SQPPNIFWAAPMTYC	46
	* * * *	
Hyal-4	LIKYNRLRLNLMFPVIGSPLAKARGQNVTFYVNRLLGYYPWYTS-QGVPINGGLPQNISL	118
PH-20	LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFYVDRLLGYYPYIDSI TGVTVNGGIPQKISL	120
Hyal-1	LERHGVDDVDSVFDVVANPGQTFRGPDMTIFYSSQLGTYPPYTP-TGEPVFGGLPQNASL	102
Hyal-2	GPRLKVPDLNNAFDVQASPNEGFVNQNTIFYRDRLLGLYPRFDS-AGRSVHGGVQNVSL	106
Hyal-3	EARFGVHLLNALGI IANRGQHFHGQNMTIFYKNQLGLYPYFGP-RGTAHNGGIPQALPL	101
HYAL-P1	MPSTMVDINLQVFNII SNPLKTSQSGSKIAAFYPNELGYYPYLSQ-DGKSFNGGIPQNVSL	105
	* * * * *	
Hyal-4	QVHLEKADQDINYI PAEDFSGGLAVI DW EYWRPQWARNWN SKDVYRQKSRKLIS-----	172
PH-20	QDHLDKAKKDI TFYMPVDNLG-MAVIDWE EWRPTWARNWKPKDVYKNRSIELVQ-----	173
Hyal-1	IAHLARTEQDILAAIPAPDFSGGLAVI DWEAWRPRWAFNWDTKDIYRQSRALVQ-----	156
Hyal-2	WAHRKMLQKRVEHY IRTQESAGLAVI DWEDWRPVVVRNWQDKDVYRRLSRQLVA-----	160
Hyal-3	DRHLAALAYQIHHSLR-PGFAGPVL DWEEWCPWAGNWGRRRAYQAASWAWAQ-----	154
HYAL-P1	SEHLRKTADDIGEGVPWWRSEELVVIDWESWKPQWDRNQSRIIYKNKSLAFTRNHSLAF	165
	* * * * * * * * * *	
Hyal-4	--DMGKNVSATDIEYLAKVTFEESAKAFMKETIKLGIKSRPKGLWGYLYPDCHN--YNV	228
PH-20	--QQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGLKLLRPNHLWGYLYFPDCYN--HHY	229
Hyal-1	--AQHPDWPAPQVEAVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGRALRPRGLWGFYGFPCYN--YDF	212
Hyal-2	--SRHPDWPDPRI VKQAQYEFEFQAQFMLETLRVYKAVRPRHLWGFYLFPCYNHDYVQ	218
Hyal-3	--QVFPDLPQEQLYKAYTGFEQAARALMEDTLRVAQALRPHGLWGFYHYACGN-GWHS	211
HYAL-P1	TRNHHPYSEMKEVTVAREKFENAGKNFMNITLTLALEMREPKLWGFYLYPDCYNVDYRI	225
	* * * * * * * * * *	
Hyal-4	YAPNYSGSCPEDEVLRRNELSWLWNSSAALYPSIGVWKS LGDSENLLRFSKFRVHESMRI	288
PH-20	KKPGYNGSCFNVEIKRNDLDSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATL-YVRNRVREAIRV	288
Hyal-1	LSPNYTGQCPSGIRAQDQLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEGTGKSMYVQHRVAEAFRV	272
Hyal-2	NWESYTGRCPDVEVARNDQLAWLWAEALFSPVYLDETLASSRHGRNFVSRVQEAALRV	278
Hyal-3	MASNYTGRCHAATLARNTQLHLWLAASSALFPSIYLPRLPPAHH-QAFVRRHLEAFRV	270
HYAL-P1	NPETYTGNCNPNXXXXXXXXXWLWEKSAALYPSIYTHLTKILKSSNLAKFVHYRREAMRV	285
	* * * * * * * * * *	
Hyal-4	STMTSHDYALPVFVYTRLYRDEPLFFLSKQDLVSTIGESAALGAAGIVIWGDMNLTASK	348
PH-20	SKI PDAKSLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSM	348
Hyal-1	A-VAAGDPNLPVLPYVQIFY-DTTNHFLPLDELEHSLGESAAQGAAGVVLVWVSWENTRTK	330
Hyal-2	ARTHANHALPVYVFTRPTY-SRRLTGLSEMDLISTIGESAALGAAGVILWGDAGYTTST	337
Hyal-3	ALVGHR-HPLPVLAYVRLTH-RRSRFLSQDDLQVQSIGVSAALGAAGVVLWGDLSLSSSE	328
HYAL-P1	AENARHDYVLPVFI FSRFPYLHSTEALSQVDLVHAI GESAALGAAGVILWGGYEYSAS-	344
	* * * * * * * * * *	
Hyal-4	ANCTKVKQFVSSDLGSYIANVTRAAEVC SLHLCRNNGRCIRKMW-NAPSYLHLNPASYHI	407
PH-20	KSCLLLDNYMETILNPYI INVTLAAKMCSQVLCQEQGVCI RKNW-NSSDYLHLNPDNFAI	407
Hyal-1	ESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCVRRTS-HPKALLLLNPASF SI	389
Hyal-2	ETCQYLKDYLTRLLVPYVNVSWATQYCSRAQCHGHGRCVRRNP-SASTFLHLSTNSFRK	396
Hyal-3	EECWHLHDYLVDTLGPYVINVTRAAMACSHQRCHGHGRCARRDPGQMEAFHLWLPD----	384
HYAL-P1	ENCLSVQQSIRGPLGHYAVNVTSAAKLCSQSLCNNHGRVFEKHLSPPSICICLKAVVRNM	404
	* * * * * * * * * *	
Hyal-4	EASEDG---EFTVKGKASDTDLAVMADTF SCHCYQGY---EGADCREIKTADGCSG----	457
PH-20	QLEKGG---KFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCYSCYSTLSCKEKADVKD TDAVDVCIADGVC	464
Hyal-1	QLTPGGG--PLSLRQALSLEDQAQMAVEFKRCRCYPGW----QAPWCERKSMW-----	435
Hyal-2	VPGHAPGEPQLRPVGELSWADIDHLQTHFRQCQYLGSW-GEQCQWDRHQAGGASE----	451
Hyal-3	-----GSLGDWKS-FSCHCYWGWA-GPTCQ----EPRPGPKE----	415
HYAL-P1	F X NKSFR--FI ISENKQKTITTDKMGNFVCHCYGWHPGSPCHDHSSDLLRVMNKAPTIN	462
	* * * *	
Hyal-4	-----VSPS--PGSLMTLCLLLLASYRSIQL	481
PH-20	IDAFKPPMETEEPQIFYNASPS LS ATMFIVSILFLIISSVASL	509
Hyal-1	-----	
Hyal-2	-----AWAGSHLTSLLAALAFTWTL----	473
Hyal-3	-----AV-----	417
HYAL-P1	FN-----LLVFLIMASSVILKILALTTMPIFS-	491

Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuresequenz humaner Hyaluronidasen. Die Sequenzen von hHyal-1 bis hHyal-4, hPH-20 und HYALP1 wurden mit Hilfe von ClustalW verglichen. Bei der Sequenz der HYALP1 handelt es sich um eine virtuelle Translation der Exons. Ihre Deletionen sind mit X dargestellt. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind grau markiert. Abbildung nach Csoka et al. (1999).

Das aktive Zentrum der Hyaluronidasen ist hoch konserviert (Stern und Jedrzejak, 2006). Ein Glutamat- und Aspartat-Rest scheinen bei allen Säuger-Hyaluronidasen für die Hydrolyse der HA verantwortlich zu sein. In der Abbildung 4 ist der postulierte Mechanismus der HA-Hydrolyse unter Beteiligung der beiden Aminosäuren dargestellt. Zusätzlich ist eine Sequenz von 30 Aminosäuren in allen Säuger-Hyaluronidasen konserviert. Sie bilden eine Furche, die für die Einleitung der HA zum aktiven Zentrum des Enzyms erforderlich scheint (Lokeshwar et al., 2002).

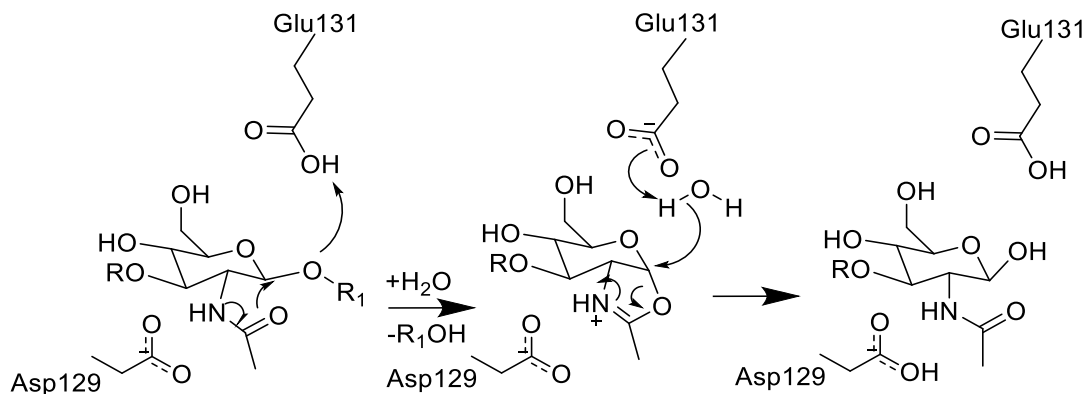


Abbildung 4: Mechanismus der HA-Hydrolyse durch die humane Hyaluronidase Hyal-1. Die Bildung des intramolekularen Oxazoliniums, das durch das negativ geladene Aspartat stabilisiert wird, begünstigt die Hydrolyse des Vollacetals. Das Produkt erhält nach der Umsetzung ein reduzierendes Ende. R und R₁ stellen die Polymerreste dar, die in beiden Richtungen mit Glucuronsäure beginnen. Abbildung modifiziert nach Zhang *et al.* (2009).

Hyal-1

Hyal-1 kommt in großen Mengen in Plasma, Urin, Leber, Nieren, Herz und Milz vor und war die erste, aus Plasma isolierte Hyaluronidase. Sie ist ein lysosomales Enzym und daher in einem schmalen pH-Bereich im Sauren aktiv (Frost *et al.*, 1997). Ihre Kristallstruktur wurde bereits aufgeklärt. (Chao *et al.*, 2007). Das native Protein enthält 435 Aminosäuren (davon zehn Cysteine), drei N-Glykosylierungsstellen und am N-Terminus ein Signalpeptid, das den Import des Proteins zum endoplasmatischen Retikulum möglich macht. Das aktive Zentrum befindet sich wie bei allen anderen Säuger-Hyaluronidasen im N-terminalen Bereich des Enzyms. Über die Funktion des C-Terminus ist wenig bekannt. Diese Region beinhaltet ein Cystein-reiches Muster, das als ein „EGF-like“-Motiv identifiziert wurde. Hyal-1 setzt HA überwiegend zu Tetrasacchariden um und erkennt Octasaccharide als Minimalsubstrat (Hofinger *et al.*, 2007b).

Unter den humanen Hyaluronidasen ist Hyal-1 die häufigste tumor-assoziierte Hyaluronidase und wird von einer Vielzahl von Tumoren gebildet. Sie wurde aus dem

Urin von Patienten mit hochgradigem Blasenkrebs isoliert. Ein höheres Expressionsniveau der hHyal-1 konnte in Epithelzellen von Blasen-, Prostata-, Kopf- und Nackentumoren nachgewiesen werden (Lokeshwar *et al.*, 2001; Franzmann *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde eine Überexpression der hHyal-1 in den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 verglichen mit normalem Brustgewebe gefunden. Es konnte eine Korrelation zwischen hHyal-1-Überexpression und der Bösartigkeit eines humanen Mammakarzinoms nachgewiesen werden (Tan *et al.*, 2011). Nach Ausschalten des *HYAL-1*-Gens zeigten die malignen Brustzelllinien neben einer reduzierten Hyaluronidase-Aktivität eine Reduktion des Zellwachstums, der Zelladhäsion und -invasion.

Paradoxerweise existieren Berichte über hHyal-1 und andere Hyaluronidasen als Tumorsuppressoren. Ihrem hochmolekularen Substrat HA werden ebenfalls paradoxe Funktionen zugeschrieben. HA wird sowohl als ein Tumorsuppressor als auch Tumorpromotor bezeichnet. (Simpson und Lokeshwar, 2008). Bislang ist nicht aufgeklärt, in welchem Stadium der onkogenen Entwicklung eine Dysregulation im HA-Hyaluronidase-System die neoplastische Transformation beeinflusst. Stern (2008) begründete dieses Paradoxon als Folge tumorabhängiger Prozesse. Vermutlich können die entarteten Tumorzellen im Anfangsstadium durch eine erhöhte Menge an hochmolekularer HA in der ECM, evtl. in Folge einer Herunterregulierung der Hyaluronidase-Expression, vor Immunzellen maskiert werden. Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaft der HA werden die benachbarten Gewebe verdrängt, was für einen späteren Ausbreitungsraum des Tumors sorgt. In späteren Stadien würden dann die HA-Oligosaccharide, gebildet durch erhöhte Hyaluronidase-Aktivität, für eine Gefäßneubildung und dadurch für die Nährstoffversorgung des Tumorgewebes sorgen. Dies würde auch eine Infiltration und Metastasierung der Tumorzellen begünstigen.

Hyal-2

Hyal-2 kommt neben Hyal-1 in hohem Level in parenchymal Geweben vor. Sie ist mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an die Plasmamembran gebunden. HHyal-2 spaltet HA in Fragmente von ca. 20 kDa, die gebunden an CD44 durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und anschließend in Lysosomen durch hHyal-1 und Exoglykosidasen in ihre Komponenten abgebaut werden (Csoka *et al.*, 2001). Sie zeigt eine deutlich geringere Hyaluronidase-Aktivität als hHyal-1 und

hPH-20 (El-Safory *et al.*, 2010). Hyal-2 ist wie Hyal-1 bei der Entstehung von Tumoren involviert. Ihre Aktivierung durch den Zellrezeptor CD44 und ihr Einfluss auf die Invasion von Brustkrebszellen wurde von Bourguignon *et al.* (2004) demonstriert. Ihre Funktion als ein Produkt eines Tumorsuppressorgens wird wie bei Hyal-1 kontrovers diskutiert (Stern, 2005; Simpson und Lokeshwar, 2008).

Hyal-3

Über dieses Protein ist bis heute nur wenig bekannt. Es wurde eine ubiquitäre Expression der Hyal-3 detektiert mit einer hohen Expression in Säugertestikeln und im Knochenmark. Aufgrund des Stammzell-ähnlichen Zustandes dieser Gewebe vermutet man eine Funktion der hHyal-3 in Embryogenese und Stammzell-Regulation. Die katalytische Aktivität dieses Proteins ist bisher ungeklärt und Gegenstand derzeitiger Forschung (Stern und Jedrzejewski, 2006; El-Safory *et al.*, 2010).

Hyal-4

Die Expression der hHyal-4 scheint auf Placenta und Skelettmuskulatur begrenzt zu sein. Es gibt Hinweise für eine Chondroitinase-Aktivität dieses Proteins (Csoka *et al.*, 2001). Chondroitin weist eine sehr ähnliche Struktur zur HA auf. Anstelle von N-Acetylglukosamin ist N-Acetylgalaktosamin β -glykosidisch mit Glucuronsäure verknüpft. Die anderen Hyaluronidasen zeigen eine sehr geringe Chondroitinase-Aktivität und spalten Chondroitin – wenn überhaupt - an nicht sulfatierten Stellen (Baker *et al.*, 1997). Auch bei hHyal-4 konnte wie bei der hHyal-3 bisher keine enzymatische Aktivität belegt werden (Stern, 2003).

PH-20

Die HA-abbauende Komponente der Extrakte aus tierischen Hoden wurde schon vor langer Zeit als „spreading factor“ beschrieben (Duran-Reynals, 1925). Später wurde dieses Enzym als PH-20 oder SPAM-1 (sperm adhesion molecule 1) bezeichnet und seine Sequenzanalyse zeigte die Homologie zu Bienengift-Hyaluronidase (Gmachl und Kreil, 1993). Zwischen der Rinder-Hyaluronidase BTH (bovine testicular hyaluronidase) und der humanen PH-20 (hPH20) existiert eine Sequenzidentität von 65 % auf Aminosäureebene. Während BTH ein HA-Hexasaccharid als Minimalsubstrat erkennt, akzeptiert hPH-20 ein HA-Octasaccharid als kürzestes

Substrat (Hofinger *et al.*, 2007a). Die hPH-20 hat 509 Aminosäuren, davon 12 Cysteine in 5 Disulfidbrücken und 6 vorhergesagte Glykosylierungsstellen (Uniprot/P38567). PH-20 ist mit einem GPI-Anker an der Zelloberfläche der Samenzelle gebunden und erleichtert die Befruchtung der Eizelle, indem sie die HA-reiche Kumulus-ECM um die Zona pellucida der Oozyte abbaut. Dabei fungiert PH-20 als ein multifunktionales Protein. Neben der Hyaluronidase-Aktivität führt die HA-Bindung an PH20 zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, welche eine Aktivierung weiterer intrazellulärer Signalwege zur Folge hat. Schließlich bindet PH-20 selbst an die Zona pellucida und leitet dadurch die akrosomale Reaktion zur Erleichterung der Befruchtung ein (Cherr *et al.*, 2001). Unter der akrosomalen Reaktion versteht man die Fusion des enzymhaltigen Zellkompartimentes im vorderen Spermienkopf mit der Spermienmembran. Dabei werden Enzyme wie Proteasen freigesetzt, die die Befruchtung der Eizelle erleichtern. Anfänglich galt PH-20 als ein Spermium-spezifisches Protein. Sie wird aber auch in der Prostata, dem weiblichen Genitaltrakt, der Placenta, fetalem Gewebe und Brustgewebe exprimiert (Beech *et al.*, 2002; Zhang und Martin-DeLeon, 2003). Es sind mehrere Berichte über die Expression der hPH-20 in metastasierenden Zellen bekannt (Liu *et al.*, 1996; Madan *et al.*, 1999; Stern, 2005). Des Weiteren wurde eine erhöhte Aktivität der hPH-20 in Astrozyten und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in Läsionen von Patienten mit Multipler Sklerose nachgewiesen (Preston *et al.*, 2013).

HYAL-P1

HYAL-P1 ist ein Pseudogen, das transkribiert, aber nicht translatiert wird. Das Gen *HYAL-P1* enthält mindestens drei Exons, in denen mehrere Mutationen vorhanden sind. Infolge einer Mutation im Exon 3 ist eine Reifung von Prä-RNA zu mRNA unterbunden, da eine Verknüpfung von Exon 2 und 3 nicht stattfinden kann. Im Falle einer Translation würden die Mutationen in Exon 1 und 2 zu einer vorzeitigen Beendigung des Prozesses führen (Csoka *et al.*, 1999).

2.3 Hyaluronidasen als Wirkstofftargets

Der HA-Metabolismus als eine Komponente in der komplexen Tumorbilogie gewinnt immer mehr Interesse in der Wirkstoffentwicklung. Die Förderung der Angiogenese und die anti-apoptotische Wirkung der HA-Oligosaccharide machen Hyaluronidasen als HA-spaltende Enzyme zu interessanten Zielen für die Entwicklung von

Zytostatika. Hochmolekulare HA und ihre Fragmente interagieren mit Zellrezeptoren wie CD44 und RHAMM. Folglich kommt es zu einer Aktivierung der Signaltransduktion über Tyrosinkinase und damit zur Modulation der Zelladhäsion, -mobilität und -proliferation (Marhaba und Zoller, 2004). Proteine mit GPI-Anker sind ebenfalls an der Signaltransduktion über Tyrosinkinase beteiligt (Cherr *et al.*, 2001). Humane Hyaluronidasen mit Ausnahme der Hyal-1 enthalten GPI-Anker. Dies könnte zur Erklärung ihres Einflusses auf zelluläre Abläufe unabhängig von ihrer Hyaluronidase-Aktivität beitragen.

Wie bereits erwähnt, begünstigt die nachweislich erhöhte Hyaluronidase-Aktivität in vielen Tumorarten nicht nur die Neovaskulation, sondern auch die Metastasierung der Tumorzellen (Simpson und Lokeshwar, 2008) und ihre Expression korreliert mit der Aggressivität und Metastasierungstendenz des Tumors (Novak *et al.*, 1999; Simpson und Lokeshwar, 2008). Daher kann eine Hemmung der Hyaluronidasen eine neue Option in der Therapie von Krebserkrankungen darstellen.

HA-Fragmente signalisieren durch die Bindung an TLR (Toll-like receptor) 4, TLR 2 und CD44 eine Stimulation der Gene in Immunzellen, welche die Bildung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren zur Folge hat (Jiang *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass nur die kurzen HA-Fragmente den transkriptional regulatorischen Komplex NF- κ B/I- κ B α in Makrophagen der Maus aktivieren und damit eine Entzündungsantwort des Gewebes auslösen können (Noble *et al.*, 1996). Auch eine Beeinflussung der Entzündungsprozesse bei Arthritis durch HA-Fragmente ist untersucht. Die Gelenkflüssigkeit bei Patienten mit Arthritis enthält eine polydisperse HA-Mischung mit signifikanter Fraktion an niedermolekularen HA-Fragmenten (Poole und Dieppe, 1994). Dies beeinträchtigt die Lubrikation der Gelenke. Die Reduktion der Kettenlänge ist vermutlich eine Folge der Depolymerisation durch reaktive Sauerstoff-Radikale (ROS) in entzündlichem Gewebe oder der enzymatischen Spaltung durch Hyaluronidasen (Noble *et al.*, 1996). Eine Heilung der rheumatoiden Arthritis ist bis heute nicht möglich. Lediglich eine Linderung der Symptomatik kann mit antirheumatischen Basistherapeutika, nichtsteroidalen Antirheumatika und Biologicals erfolgen. Eine Hemmung der HA-Degradation durch Hyaluronidasen in Gelenkflüssigkeiten könnte einen neuen Angriffspunkt bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis bieten.

Ein weiterer biologischer Vorgang, an dem die humane Hyaluronidase PH-20 beteiligt ist, ist die Fertilisation. Die weibliche Keimzelle ist von Kumuluszellen mit HA-reicher ECM umgeben. Zur Befruchtung dieser Zelle muss die Samenzelle erst diese HA-reiche Barriere mit Hilfe der hPH-20 überwinden. Eine Unterbindung dieser Penetration durch Einsatz von hPH-20 Hemmstoffen stellt ein neuartiges kontrazeptives Prinzip dar (Garg *et al.*, 2005).

HA ist ebenfalls das Hauptglykosaminoglykan im zentralen Nervensystem. Die Arbeitsgruppe um Sherman zeigte eine substantielle Beteiligung der HA an der neurodegenerativen Erkrankung Multiple Sklerose. Sie demonstrierten eine Akkumulation der hochmolekularen HA in Läsionen, die eine Verzögerung der Remyelinisierung der Axone zur Folge hatte (Back *et al.*, 2005). Nachweislich störten HA-Oligosaccharide die langsame Wanderung der Lymphozyten (lymphocyte slow rolling) an Gefäßendothelzellen im Gehirn. Es wurde vermutet, dass HA-Abbauprodukte, erzeugt durch Hyaluronidasen oder andere Mechanismen, als eine molekulare Bremse auf die Lymphozyten-Extravasation wirken und einen Beginn der entzündlichen Erkrankungen im zentralen Nervensystem verzögern (Winkler *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Expression der hPH-20 in demyelinisierten Läsionen vorliegt und HA-Abbauprodukte der hPH-20, aber nicht der anderen Hyaluronidasen, die Remyelinisierung der Axone hemmen (Preston *et al.*, 2013). Hemmstoffe für die hPH-20 und andere Hyaluronidasen könnten bei der Aufklärung der paradoxen Wirkung von HA und Hyaluronidasen hilfreich sein und als Therapieansatz für neurodegenerative Erkrankungen dienen.

Ein Einsatz von Hyaluronidase-Hemmstoffen in Präparaten zur Wundheilung wäre auch denkbar, da HA eine wichtige Funktion bei der Wundheilung ausübt. Eine Behandlung von Periodontal-Erkrankungen mit exogener hochmolekularer HA wie in Mundwässern und -gelen ist bereits mehrmals beschrieben (Dahiya und Kamal, 2013). Man könnte annehmen, dass eine Erhöhung der endogenen HA-Konzentration durch Hemmung von Hyaluronidasen sich ebenfalls günstig auf Wundheilung bei Periodontal-Erkrankungen auswirken könnte.

Davon abgesehen besteht ein großes Interesse der Kosmetikindustrie an Hyaluronidase-Hemmstoffen. Es wird angenommen, dass eine Beimischung solcher Hemmstoffe in Hautpflegeprodukten einen HA-Abbau in der Haut entgegen wirken

könnte (Stern und Maibach, 2008). Dadurch dürfte die Halbwertszeit der HA in der Haut verlängert und ihre Versorgung mit Feuchtigkeit verbessert werden.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Hyaluronidase-Hemmstoffen wäre die Blockierung des „spreading effect“ der durch bakterielle Hyaluronidasen und Hyaluronidasen in tierischen Giften ausgelöst wird. So könnte man durch lokale Verabreichung der Hemmstoffe ein weiteres Eindringen des Bakteriums oder des Giftes in den Organismus verhindern.

Neben dem Einsatz von Inhibitoren können auch Hyaluronidasen selbst in der Tumorthherapie eingesetzt werden. Ein exogener Zusatz von Hyaluronidasen durchbrach die Therapieresistenz beim malignen Melanom. Sie durchbrachen die HA-Abschirmung der Tumorzellen und verbesserten die Zugänglichkeit für die Immunzellen und Zytostatika (Spruss *et al.*, 1995; Frost, 2007). Ein erneutes Auftreten von Blasenkrebs wurde durch eine adjuvante Therapie mit Hyaluronidasen reduziert (Maier und Baumgartner, 1989).

Die vielfältigen Implikationen der Hyaluronidasen in zellulären Prozessen, resultierend aus der Komplexität ihres Substrates, macht diese Enzymklasse zu einem attraktiven Target für die Entwicklung von Wirkstoffen für klinische Interventionen pathologischer Veränderungen.

2.4 Hemmstoffe der Hyaluronidasen

Die bisher bekannten Hyaluronidase-Hemmstoffe gehören zu unterschiedlichen Substanzklassen. Ein direkter Vergleich der Hemmstoffe ist aufgrund dieser Diversität, aber auch aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der untersuchten Enzyme, Herkunft der HA (gewonnen aus Mikroorganismen, Nabelschnur oder Hahnenkamm) und aufgrund unterschiedlicher Bestimmungsmethoden schwierig.

Es waren Haas (1946) und Dorfman *et al.* (1948), die zum ersten Mal die Existenz eines zirkulierenden Hemmstoffes von Hyaluronidasen im Menschen beschrieben. Eine Aufrechterhaltung des HA-Spiegels scheint durch die Hemmung der Aktivität sekretierter Hyaluronidasen im Gewebe und Plasma für den Organismus günstiger zu sein als eine Erhöhung der HA-Biosynthese (Mio und Stern, 2002). Der Hyaluronidase-Hemmstoff im Plasma ist ein komplexes Proteoglykan und zeigt die Eigenschaften eines I α I-like (Inter- α -Inhibitor-like) Moleküls. Das bedeutet, dass es

den Proteaseinhibitoren Ial ähneln. Es besteht aus drei Polypeptidketten. An einer dieser Ketten hängt Chondroitinsulfat, welches im Gewebe durch HA ersetzt werden kann. Man vermutet, dass HA dadurch von einer Fragmentierung geschützt werden kann.

Viele Pflanzensekundärstoffe, wie Saponine, Flavonoide, Polysaccharide (Pektine, Alginsäure) und Polyphenole (Tannine) aus ethno-pharmazeutisch genutzten Naturheilmitteln, wurden auf ihre Hyaluronidase-Hemmung getestet. Über Glycyrrhizinsäure, ein Saponin aus der Süßholzwurzel, wurde mehrmals als Hemmstoff von Hyaluronidasen berichtet. Saponine sind pflanzliche Glycoside von Steroiden oder Triterpenen. Glycyrrhizinsäure wurde auf ihre Hemmwirkung für rekombinante aufgereinigte humane Hyal-1 untersucht und zeigte dabei einen IC_{50} -Wert von 26 μ M (Hofinger *et al.*, 2007b) bzw. 39,4 μ M (Isoyama *et al.*, 2006). Für bovine testikuläre Hyaluronidase (BTH) zeigte dieser Hemmstoff einen IC_{50} -Wert von 3 μ M (Furuya *et al.*, 1997) bzw. 1,3 mM (Hertel *et al.*, 2006). Diese große Diskrepanz zwischen den ermittelten IC_{50} -Werten könnte aus den unterschiedlichen pH-Werten bei den Inhibitionsbestimmungen resultieren. BTH ist sowohl im Sauren als auch im Neutralen katalytisch aktiv. Furuya *et al.* arbeiteten bei einem pH-Wert von 3,6 und Hertel *et al.* bei einem pH-Wert von 6. Dies führte zu unterschiedlichem Protonierungsgrad der Säuregruppen der Glycyrrhizinsäure (Abbildung 5) und könnte die Hemmwirkung der Substanz beeinflussen. Aescin (Abbildung 5), ein Saponin aus Rosskastanie, hemmte BTH mit einem IC_{50} -Wert von 149,9 μ M (Facino *et al.*, 1995). Myose *et al.* (2012) präsentierten 22 weitere Saponine aus Samen von *Camellia sinensis* als BTH-Hemmstoffe mit IC_{50} -Werten von 19,3 μ M bis 55,6 μ M. Sie setzten Rosmarinsäure, eine Phenylacrylsäure (Abbildung 5), als Referenzhemmstoff ein und bestimmten einen IC_{50} -Wert von 240,1 μ M. Für diesen pflanzlichen Sekundärstoff als Hemmstoff der BTH ermittelte die Arbeitsgruppe um Yoshizaki einen IC_{50} -Wert von 1,363 mM (Selenge *et al.*, 2013). Hier arbeiteten die Arbeitsgruppen ebenfalls in unterschiedlichen pH-Bereichen, was zu stark unterschiedlichen IC_{50} -Werten führen könnte.

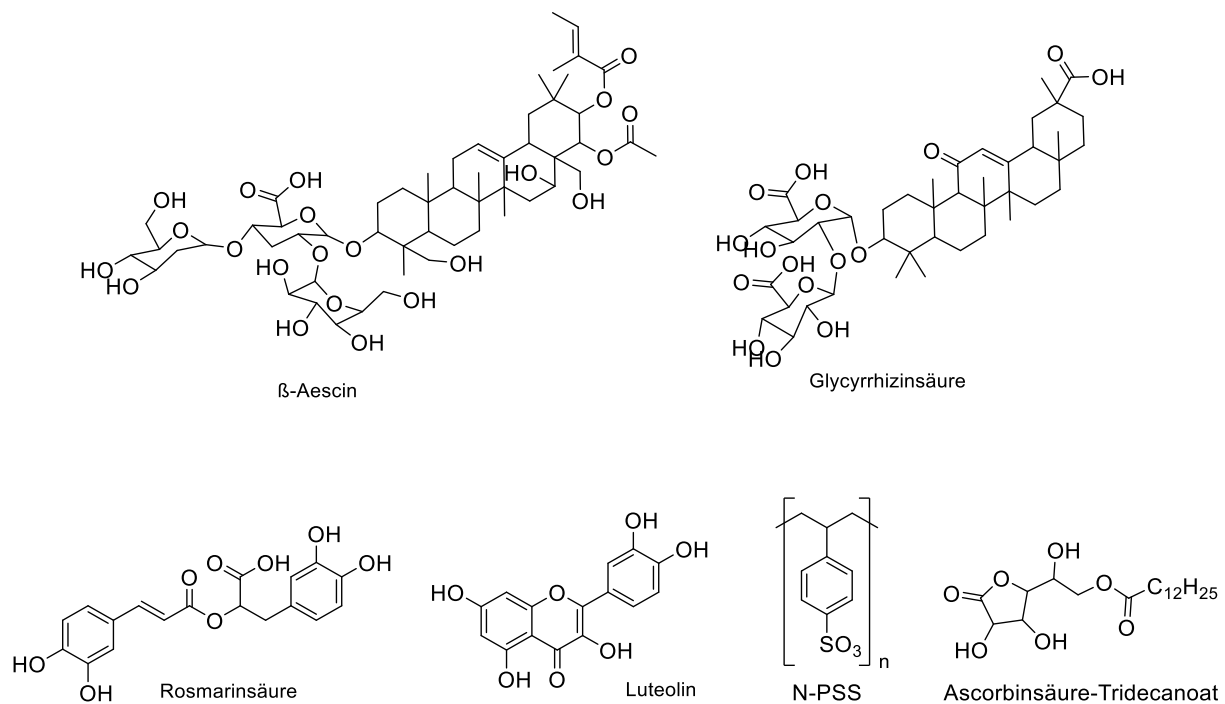


Abbildung 5: Strukturformel einiger bekannter Hemmstoffe der Hyaluronidasen. Bei β-Aescin, Glycyrrhizinsäure, Rosmarinsäure und Lutein handelt es sich um pflanzliche Sekundärstoffe. N-PSS (Natrium-Polystyren-4-Sulfonat) und Ascorbinsäure-Tridecanoat sind synthetische Hemmstoffe.

Kuppusamy *et al.* (1990) berichteten über Tannine (Polyhydroxyphenole) als potente BTH-Hemmstoffe. Allerdings können Tannine als Gerbstoffe Enzyme fällen und diese damit inaktivieren. Es wurden einige im Pflanzenreich weitverbreitete Flavonoide wie Luteolin, Kämpferol, Silybin und Quercetin auf ihre Hemmwirkung der BTH untersucht. Dabei zeigte Luteolin (Abbildung 5) mit 76 % Hemmung bei 250 μM die stärkste Hemmwirkung. Selenge *et al.* (2013) bestimmten für verschiedene Flavonoide und Tannine aus *Chamaerhodos erecta* IC₅₀-Werte von 509 bis 890 μM. Bis heute waren diverse Flavonoide Gegenstand der Untersuchungen zur Hemmung von BTH, bakteriellen Hyaluronidasen und Hyaluronidasen aus tierischen Giften. Es wurden jedoch keine potenten Komponenten identifiziert (Kuppusamy und Das, 1991; Girish und Kemparaju, 2005; Kim *et al.*, 2005; Hertel *et al.*, 2006; Gonzalez-Pena *et al.*, 2013). Man untersuchte auch Alginsäure und Pektine als natürliche Polysaccharide in ihrer Hemmwirkung für BTH (Sawabe *et al.*, 1992; Asada *et al.*, 1997). Alginsäure unterschiedlichen Molekulargewichts zeigte bei 22,3 μg/mL ca. 40-80 % Hemmung. Mit steigendem Molekulargewicht der Alginsäure konnte eine stärkere Hemmung des Enzyms erzielt werden.

Sulfatierte HA ist ein bekannter Hyaluronidase-Hemmstoff (Balazs *et al.*, 1951; Benitez *et al.*, 2011). Basierend darauf wurden weitere vollständig O-sulfatierte GAG in ihrer Hemmwirkung für Hyaluronidase BTH getestet. Die ermittelten IC₅₀-Werte waren für sulfatiertes Chondroitin 1,35 µg/mL, für vollständig sulfatiertes Dermatansulfat 1,33 µg/mL, für sulfatiertes Heparin 1,14 µg/mL und für vollständig sulfatierte HA 0,78 µg/mL (Zimmermann *et al.*, 1983; Toida *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2001). Neben sulfatierten Polysacchariden wurden einige sulfatierte β-1,4-Galacto-Oligosaccharide untersucht und ihre IC₅₀-Werte mit 20 bis 600 µM für BTH bestimmt (Salmen *et al.*, 2005). Ihre Wirkung auf die humanen Hyaluronidasen ist allerdings nicht bekannt.

Das synthetische Polymer N-PSS (Natrium-Polystyren-4-Sulfonat, Abbildung 5) ist ein weiteres Beispiel für einen hochmolekularen Hyaluronidase-Hemmstoff. N-PSS mit einem Molekulargewicht von 1.400 bis 990.000 Da inhibierte hHyal-1 mit IC₅₀-Werten von 8,2 µM bis 0,0096 µM (Isoyama *et al.*, 2006). Jedoch sollte bei der Bewertung der niedrigen IC₅₀-Werte das extrem hohe Molekulargewicht hervorgehoben werden. Dabei können von Einheiten eines langkettigen Polymers mehrere Enzymmoleküle gleichzeitig gehemmt werden, welches sich in einem niedrigen IC₅₀-Wert widerspiegelt. Weiterhin macht die fehlende Bioverfügbarkeit dieser Polymere sie für eine systemische Anwendung ungeeignet.

Neben natürlichen Substanzen wurden unterschiedliche niedermolekulare Substanzen synthetisiert und als Hemmstoffe von Hyaluronidasen getestet. Benzoxazol-2-thione, Benzimidazole und Ascorbinsäure-Derivate wurden als Hemmstoffe der bakteriellen Hyaluronatlyasen mit IC₅₀-Werten von 0,9 bis 355 µM identifiziert (Botzki *et al.*, 2004; Rigden *et al.*, 2006; Spickenreither *et al.*, 2006). Sieben Ascorbinsäure-Derivate wurden ebenfalls auf ihre hemmende Eigenschaft gegenüber hHyal-1 untersucht. Das 6-O-Tridecanoat-Derivat (Abbildung 5) mit einem IC₅₀-Wert von 50 µM stellte das potenteste Derivat aus der Reihe dar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit wachsendem Alkylrest der Estergruppierung bis 13 Kohlenstoffe die Hemmwirkung zunahm. Für Ascorbinsäurepalmitat wurde ein IC₅₀-Wert von größer als 50 µM angegeben. Die ungenaue Angabe war dadurch bedingt, dass eine vollständige Löslichkeit der Substanz nur bis zu dieser Konzentration möglich war und bei dieser Konzentration keine 100 %ige Hemmung erreicht wurde (Hofinger *et al.*, 2007b).

Einige bekannte anti-entzündliche Mittel, wie Indometacin, Phenylbutazon und Salicylate, sowie Antiallergika, Cromoglicinsäure und Transilat, wiesen eine hemmende Wirkung bei BTH und bakterieller Hyaluronidase auf (Guerra, 1946; Szary *et al.*, 1975; Kakegawa *et al.*, 1985; Mio und Stern, 2002). Jedoch lag ihre Hemmwirkung in hohem mikromolaren bis millimolaren Bereich.

Bei den meisten dieser Substanzen wurde die Hemmung für BTH, Hyaluronatlyasen und Hyaluronidasen aus tierischen Giften untersucht. Zusammengefasst lässt sich anmerken, dass für humane Hyaluronidasen bis heute keine niedermolekularen, potenten Hemmstoffe mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich bekannt sind.

3 Analytik der HA und Hyaluronidase-Aktivität

3.1 Photometrische Methoden

Photometrische Methoden sind in der Regel einfach in der Handhabung und damit erste Wahl bei enzymatischen Messungen. Dabei wird sich im Falle von Hyaluronidasen die Wechselwirkung zwischen Farbstoffen und HA zur Nutze gemacht. Mit dem Farbstoff „Stains-all“ (Abbildung 6) entwickelten Benchetrit *et al.* (1977) eine Methode zur Aktivitätsbestimmungen der Hyaluronidasen, und Homer *et al.* (1993) modifizierten diese Methode für die Bestimmung der BTH-Aktivität im Mikrotiterplatten-Maßstab. „Stains-all“ bildet mit hochmolekularer HA nach Zugabe von Wasser einen farbigen Komplex, der bei 650 nm quantifiziert werden kann. Nach HA-Abbau durch Hyaluronidasen ist eine Abnahme der Absorption zu detektieren.

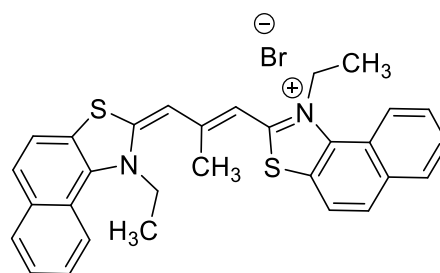


Abbildung 6: Strukturformel des kationischen Farbstoffs „Stains-all“.

In der Arbeitsgruppe Jose wurde zum ersten Mal ein Testverfahren mit „Stains-all“ zur Identifizierung von Hyaluronidase-Hemmstoffen angewandt (Kaessler *et al.*, 2008; Kaessler *et al.*, 2011). HA-Fragmentierung konnte auch durch eine Agarosegelelektrophorese und eine anschließende Färbung mit „Stains-all“ analysiert werden (Lee und Cowman, 1994). Ein Nachteil dieser HA-Anfärbung ist die

Lichtempfindlichkeit der „Stains-all“-Lösung, die eine unverzügliche Absorptions-Bestimmung nach der Zugabe des Reagenz voraussetzt. Neben der Quantifizierung langkettiger HA durch „Stains-all“ kann die Bildung von niedermolekularer HA durch farbbgebende Systeme ebenfalls verfolgt werden. Beim HA-Abbau durch Hyaluronidasen werden reduzierende Enden des Zuckers N-Acetylglykosamin frei. Diese reduzierende Eigenschaft wurde von Meyer *et al.* (1941) und Linker (1966) zur Umwandlung von Ferricyanid zu Ferrocyanid genutzt. Daneben wurde Ehrlich's Reagenz (*p*-Dimethylaminobenzaldehyd) als Reaktionspartner für den Zucker N-Acetylglykosamin verwandt und zu seiner Quantifizierung eingesetzt (Reissig *et al.*, 1955). Diese Methode wurde mehrmals modifiziert und für Anwendungen verbessert (Muckenschnabel *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2003). Bei dieser Methode können andere im Reaktionsansatz anwesenden Reduktionsmittel die HA-Bestimmung stören.

3.2 Kapillarelektrophoretische Methoden

Bei der Kapillarelektrophorese (CE) wandern Moleküle in einer Lösung unter Einwirkung eines elektrischen Feldes innerhalb einer Kapillare. Bei konstant bleibender Pufferzusammensetzung und Feldstärke ist die Migrationsgeschwindigkeit von der Größe/Gestalt des Moleküls und seiner Ladung abhängig. Üblicherweise werden bei der CE Silica-Kapillaren eingesetzt. Die Silanolgruppen der Kapillarenoberfläche besitzen einen isoelektrischen Punkt von 1,5 und sind ionisierbar. Der Grad der Ionisation ist vom pH-Wert der eingesetzten Lösungen abhängig. Bei pH-Werten oberhalb von 1,5 sind die Silanolgruppen negativ geladen und ziehen die Kationen aus Lösungen und Puffer an. Dadurch wird eine elektrische Doppelschicht an der Kapillarenwand gebildet. Durch Anlegen einer Spannung migrieren die Kationen an diffusen Bereichen dieser elektrischen Doppelschicht in Richtung Kathode und reißen die Flüssigkeitssäule in der Kapillare mit. Mit dieser Strömung migriert der Analyt mit. Dieses Phänomen ist pH-abhängig und wird als elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet. Je höher der pH-Wert, desto stärker ist der EOF. Damit können sogar ungeladene Moleküle mittels CE analysiert werden.

Grimshaw *et al.* (1994) benutzten CE für die Quantifizierung der HA im Glaskörper des Auges. Die Amidbindungen der HA können in einem UV-Detektor bei 200 nm erfasst werden. Durch Zusatz von SDS (sodium dodecyl sulfate) migrierten die Proteine der Proben in Form von Mizellen langsamer als HA und ihre Fragmente.

Nicht nur HA sondern auch andere Glykosaminoglykane wurden mittels CE untersucht (Carney und Osborne, 1991; Grimshaw, 1997). Um die Auflösung zu erhöhen und eine Störung durch andere Bestandteile der Proben zu minimieren, wurden HA-Fragmente mit Fluoreszenzmarkern konjugiert und analysiert (Honda *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1997; Toida *et al.*, 1999). Eine direkte Kopplung der CE an ein Massenspektrometer erlaubte eine direkte Identifizierung der HA-Kettenlänge nach enzymatischem Abbau (Kuhn *et al.*, 2003; Grundmann *et al.*, 2012). CE wurde zur Charakterisierung der humanen Hyaluronidasen, ihrer Aktivität und ihres Minimalsubstrats eingesetzt (Hofinger *et al.*, 2007a). Auch eine Testung von Hemmstoffen erfolgte mittels CE (Toida *et al.*, 1999). Eine CE-Untersuchung ist wegen der geringen erforderlichen Menge an Probe vorteilhaft. Diesem Vorteil steht jedoch eine relativ lange Analysenzeit von 20 bis 30 Minuten pro Probe entgegen, ein Nachteil im Vergleich zu photometrischen Methoden.

3.3 Chromatographische Methoden

HA und ihre Fragmente besitzen abhängig von ihrer Kettenlänge unterschiedliche physiologische Funktionen. Aus diesem Grund wurden chromatographische Methoden zur Trennung und Fraktionierung der Oligomere entwickelt. Eine Trennung von gesättigten Oligosacchariden mit 1-8 Monomereinheiten gelang Nebinger *et al.* (1983). Sie verwendeten eine Amino-modifizierte Kieselgel-Säule. Eine Trennung und Quantifizierung von ungesättigten Tetra- und Hexasacchariden als Produkt von bakteriellen Lyasen mittels Ionenpaar-RP-HPLC (Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography) wurde ebenfalls durchgeführt (Chun *et al.*, 1988; Payan *et al.*, 1991). Diese Methoden wurden weiter entwickelt und zur Bestimmung der Reaktionskinetik von Hyaluronidasen eingesetzt. Die Derivatisierung der HA-Fragmente mit 2-Cyanoacetamid direkt nach dem Austritt aus der Säule erlaubte eine empfindlichere Detektion (Cramer und Bailey, 1991). Suzuki *et al.* (2001) trennten aus 4 bis 20 Monomeren bestehende HA-Oligosaccharide bis zur Basislinie auf. Eine Präparation von HA-Fragmenten bestehend aus 4 bis 50 Monomeren in größerem Maßstab konnte innerhalb von 30 Minuten durch Anionenaustausch-Chromatographie erreicht werden (Tawada *et al.*, 2002). Eine Testung von Hemmstoffen mittels HPLC ist nicht attraktiv. Die hochmolekulare HA und die von Hyaluronidasen erzeugten nächst kleineren Spaltprodukte erscheinen nicht im Detektionsfenster. Damit kann ein Teil der katalytischen Aktivität nicht erfasst werden

und ein Ermitteln der Hemmung nur über die detektierbaren kleineren Oligomere fehlerhaft macht. Außerdem können die Signale der Hemmstoffe die von HA-Fragmenten überlagern. Neben HPLC wurde auch Gelpermeationschromatographie zu Untersuchung der Kinetik der HA-Spaltung durch BTH angewendet (Vercruysse *et al.*, 1994). Dabei zeigen Fragmente mit einem größeren hydrodynamischen Volumen eine kürzere Retentionszeit, da sie nicht in den Poren des Trägermaterials eindringen und dort verweilen können. Diese Methode dürfte zur Hemmstofftestung geeignet sein, da hochmolekulare HA früher als die HA-Oligosaccharide die Säule verlässt und eine Reduktion ihres Signales zur Quantifizierung der Hyaluronidase-Aktivität herangezogen werden kann. Rothenhofer *et al.* (2012) entwickelten eine HPTLC (High Performance Thin-Layer Chromatography) Methode mit Aminomodifizierung der Kieselgelplatte für die qualitative und quantitative Analyse der Oligosaccharide mit 2-4 Disaccharideinheiten. Diese Saccharide wurden durch Hitzeeinwirkung auf der Platte zu farbigen Produkten derivatisiert und die entstandenen Flecken densitometrisch ausgewertet. Bei dieser Methode können die HA-Fragmente größer als 4 Disaccharideinheiten ebenfalls nicht erfasst werden, wodurch eine genaue Quantifizierung der Hyaluronidase-Aktivität nicht möglich ist.

3.4 Weitere Bestimmungsverfahren

Es wurden ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zur Aktivitätsbestimmung von Hyaluronidasen entwickelt. Delpech *et al.* (1987) inkubierten HA-beschichtete Mikrotiterplatten mit Hyaluronidase, entfernten die Abbauprodukte und behandelten die Kavernen der Platte mit HA-bindendem Proteoglykan (Hyaluronectin), das von einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper erkannt wurde. Nach Umsetzung des Phosphatase-Substrates wurde die Absorption gemessen. Frost *et al.* (1997) setzten Mikrotiterplatten ein, die mit biotinylierter HA beschichtet waren. Nach einer HA-Umsetzung mit Hyaluronidasen wurde die restliche HA mittels einer Biotin-Avidin-Reaktion indirekt quantifiziert. Dabei war Avidin mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, das eine Umsetzung des Phosphatase-Substrates erlaubte.

HA und ihre Spaltprodukte wurden auch mittels Elektrophorese aufgetrennt und anschließend gefärbt (Abramson und Friedman, 1967; Herd *et al.*, 1974). Guntenhöner *et al.* (1992) versetzten das Gelmaterial mit HA und trennten Hyaluronidasen mittels Elektrophorese auf. Das SDS-Gel wurde zur Renaturierung des Enzyms in einem Triton X-100-haltigen Puffer und anschließend im

Hyaluronidase-Reaktionspuffer inkubiert. Nach dem Anfärben der hochmolekularen HA mit Alcianblau und „Stains-all“ erschienen helle Banden im Gel, die auf Hyaluronidase-Aktivität hin deuteten. Mit dieser Methode kann nur eine qualitative Testung von Hemmstoffen erfolgen. Eine Basis für die Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität liefern die rheologischen Eigenschaften der HA-Lösungen. Die Lösungen hochmolekularer HA sind viskos. Diese Viskosität ist direkt proportional zur mittleren Molekülmasse. Nach Behandlung von HA mit Hyaluronidasen wurde durch viskosimetrische Messungen die Enzymaktivität bestimmt, die jedoch sehr stark variierte (Alburn und Whitley, 1951). Eine weitere physikochemische Methode zur Aktivitätsbestimmung von Hyaluronidasen wurde auf Basis der Niederschlagbildung der HA mit quartären Ammoniumverbindungen entwickelt. Di Ferrante (1956) setzten Cetyltrimethylammonium-Bromid ein, das zum einem fein dispersen Niederschlag der hochmolekularen HA führte. Nach Behandlung mit Hyaluronidasen nahm die Trübung der Dispersion ab, was bei 580 nm quantifiziert werden konnte.

4 Rekombinante Expression von Hyaluronidasen

Für die rekombinante Proteinproduktion ist das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* ein bevorzugter Wirt. *E. coli* ist gut charakterisiert, vermehrt sich sehr schnell, weist eine hohe Proteinbildungsrate auf und beansprucht keine aufwendigen Wachstumsmedien. Allerdings zeigt dieser Expressionswirt einige Nachteile. Fehlende posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung, mangelnde oder falsch ausgebildete Disulfidbrückenbindungen bei einer Überexpression eines Fremdproteins gehören dazu. Diese Proteine, die in einem nicht nativen Zustand vorliegen, können dichte unlösliche Aggregate (Einschlusskörperchen) bilden (Lottspeich und Engels, 2006).

Auch Hyaluronidasen konnten zu Untersuchungszwecken in *E. coli* produziert werden. Soldatova *et al.* (1998) exprimierten die Bienengift-Hyaluronidase in *E. coli*. Das Enzym erreichte nach der Aufreinigung nur 20-30 % der Aktivität des aus dem Bienengift isolierten Enzyms. Infolgedessen wurde das Protein in Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* rekombinant produziert und zeigte eine enzymatische Aktivität wie das isolierte Enzym aus dem Bienengift. Die humane Hyaluronidase Hyal-1 wurde in *E. coli* und *Drosophila* Schneider-2 Zellen exprimiert (Hofinger *et al.* 2007b). Die Produktion in *E. coli* lieferte ein inaktives Protein in Form von

Einschlusskörperchen. Diese wurden gelöst und die richtige Faltung des Proteins durch Zugabe von Reagenzien initiiert. Das eukaryotisch produzierte Protein wurde von den Zellen ins Medium sezerniert und lag in einer funktionellen Form vor. Auch weitere Versuche, rekombinante hHyal-1 aus *E. coli* in aktiver Form aufzureinigen, blieben erfolglos (Jung *et al.* (2010)). Infolgedessen wurde hHyal-1 im pflanzlichen Gewebe von *Nicotiana benthamiana* (Tabak) produziert und daraus isoliert. Die Blätter dieser Pflanze wurden mit Plasmid-haltigen Agrobakterien infiziert und für 4-6 Wochen kultiviert. Sie wurden geerntet, für 3-4 Tage luftdicht aufbewahrt, anschließend aufgeschlossen und das mit einem His-Tag modifizierte Protein mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Ni-NTA-Säule isoliert.

Zusammengefasst lässt sich bemerken, dass *E. coli* ein bevorzugter Wirt zur Proteinexpression ist. *E. coli* wächst schnell in einfachen Medien und zeigt in der Regel eine hohe Expressionsrate. Im Gegensatz dazu sind eukaryotische Zellen zwar zu posttranslationalen Modifikationen des rekombinanten Proteins befähigt, benötigen jedoch anspruchsvolle Wachstumsmedien und wachsen langsam. Sie sind zeit- und kostenaufwendig und liefern nur geringe Mengen an Zielprotein.

4.1 Autodisplay

Humane Hyaluronidasen lassen sich mittels Autodisplay Technologie rekombinant exprimieren. Diese Technologie beruht auf dem natürlichen Autotransporter-Sekretionsmechanismus Gram-negativer Bakterien (Jose und Meyer, 2007). Ein typisches Autotransporter-Protein besteht aus 4 Domänen, die alle Informationen für den Transport aus dem Zytoplasma und die Translokation auf die bakterielle Zelloberfläche beinhalten (Abbildung 7 A). Am N-Terminus besitzt es ein Signalpeptid (SP), das C-terminal von einer Passagierdomäne, Verbindungsdomäne (Linker) und einem β -Fass gefolgt wird. Gelegentlich werden in der Literatur Linker und β -Fass zusammen als Autotransporter bezeichnet. Das SP markiert den Weg über die innere Membran ins Periplasma. Dieser ATP-abhängige Transport erfolgt über den Sec-Apparat der bakteriellen Sekretionsmaschinerie. Nach dem Export ins Periplasma wird das SP abgespalten und verbleibt in der inneren Membran. Der C-Terminus des Proteins bildet in der äußeren Membran eine fassartige Struktur aus amphipatischen β -Faltblättern aus. Der Linker wird in das β -Fass inkorporiert und bildet eine haarnadelartige Struktur, welche den ungefalteten Passagier an die Zelloberfläche transloziert (Maurer *et al.*, 1997). Neben diesem Modell diskutierten Gawarzewski *et*

al. andere Translokationsmodelle (Gawarzewski *et al.*, 2013). Sie beschrieben ein weiteres Modell unter Beteiligung des Bam-Komplexes (barrel assembly machinery) für den Transport von Autotransporter-Proteinen an die Zelloberfläche. Demnach faltet sich das Autotransporter-Protein nach der Translokation durch die innere Membran durch Bindung von periplasmatischen Chaperone unvollständig. Dieses Intermediat wird dann durch Omp85 (outer membrane protein) in die äußere Membran integriert und das β -Fass in einer offenen Form gehalten bis der teilweise gefaltete Passagier sich auf der Zelloberfläche befindet (Ieva und Bernstein, 2009). Dabei konnte auch eine haarnadelartige Inkorporation des Linkers im unvollständig gefalteten β -Fass experimentell nachgewiesen werden (Ieva *et al.*, 2008; Pavlova *et al.*, 2013). Das führte zur Formulierung eines „Alternativ-Modells“, welches die beiden genannten Modelle kombiniert und die Sekretion von teilweise gefalteten Proteinen erlauben würde (Benz und Schmidt, 2011; Pavlova *et al.*, 2013).

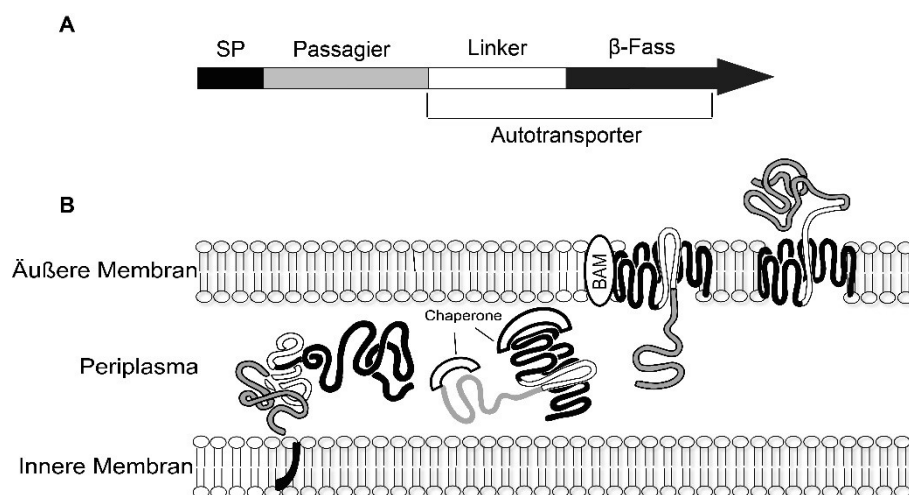


Abbildung 7: (A) Aufbau eines Autotransporter-Fusionsprotein und (B) postulierte „Alternativ-Modell“ des Autotransporter-Sekretionsmechanismus in *E. coli*. Durch das Erkennen des Signalpeptides (SP) vom Sec-Apparat wird der Transport über die innere Membran induziert. Anschließend wird das SP durch periplasmatische Signalpeptidase vom Rest des Fusionsproteins abgetrennt. Nach der Translokation über die innere Membran kommt es unter Einwirkung der periplasmatischen Chaperone, wie SurA, Skp, DnaK und DegP, zu einer partiellen Faltung des Autotransporter-Fusionsproteins. In diesem Stadium gliedert sich der Linker haarnadelartig in das nicht vollständig gefaltete β -Fass ein. Die Integration des β -Fasses in die äußere Membran wird vom Bam-Komplex, darunter Omp85, gefördert. Dabei hält Omp85 das β -Fass in einer offenen Form und der Passagier wird mittels Linker auf die Zelloberfläche befördert. Der Bam-Komplex dissoziiert von Autotransporter-Fusionsprotein und das β -Fass bildet seine Tertiärstruktur als Pore aus. Abbildung modifiziert nach Gawarzewski *et al.* (2013).

Das ursprünglich artifiziell zusammengesetzte Autotransporter-Fusionsprotein beinhaltete das SP der β -Untereinheit des Cholera-toxins (Maurer *et al.* 1997). Diese Untereinheit bildete selbst die Passagierdomäne und wurde auf der Zelloberfläche von *E. coli* präsentiert. Die Linker und β -Fass-Region stammten aus AIDA-I (Adhesin Involved in Diffuse Adherence) aus dem enteropathogenem *E. coli* 2787 (EPEC)

(Benz und Schmidt, 1992). Durch Austausch der kodierenden DNA-Sequenz für die Passagierdomäne können andere Proteine und Peptide auf der bakteriellen Zelloberfläche exprimiert werden. Damit wurden Ganzzellbiokatalysatoren mit verschiedenen oberflächenständigen Enzymen entwickelt, darunter Sorbit-Dehydrogenase (Jose und von Schwichow, 2004), Esterasen (Schultheiss *et al.*, 2002; Schultheiss *et al.*, 2008), CYP P450-Enzyme (Schumacher *et al.*, 2012; Schumacher und Jose, 2012) und Nitrilasen (Detzel *et al.*, 2011; Detzel *et al.*, 2013). Die Ganzzellbiokatalysatoren erlauben chemische Umsetzungen unter milden Bedingungen (Druck, Temperatur, pH-Wert) und brauchen keine organischen Lösungsmittel. Die Dekoration der bakteriellen Zelloberfläche mit Zielmolekülen kann für Bindungsstudien angewendet werden. Auf diese Weise wurden Protein-Protein-Interaktionen untersucht (Raaf *et al.*, 2013), evolutive Anpassung von Antikörperfragmente an beliebige Epitope ermöglicht (Thömmes, 2013) und spezifische ELISA entwickelt (Saenger *et al.*, 2014). Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Autodisplay ist die Entwicklung von Testverfahren zur Identifizierung von Enzyminhibitoren. Es wurden Enzyme auf der Zelloberfläche präsentiert, deren enzymatische Aktivität in Gegenwart von potentiellen Hemmstoffen untersucht wurde (Gratz, 2010; Kaessler *et al.*, 2011). Auch peptidische Verbindungen wurden mittels Autodisplay exprimiert und ihre Affinität zum Zielenzym untersucht. So konnten potente peptidische Inhibitoren für die humane Proteinkinase CK-2 identifiziert werden (Reicheneder, 2013). Autodisplay ermöglichte auch die rekombinante Expression der humanen Hyaluronidasen, die mittels klassischen Expressionsmethoden nicht leicht zugänglich waren und im Zytoplasma von *E. coli* Einschlusskörperchen bildeten (Kaeßler, 2009). Eine Proteinzugänglichkeit durch Oberflächenpräsentation macht eine Zellyse und aufwendige Proteinisolierung entbehrlich. Außerdem kann das an der Zelloberfläche verankerte Protein einfach durch Zentrifugation aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Die Beweglichkeit des β -Fasses in der äußeren Membran erlaubt auch eine (Hetero-) Multimerisierung von komplexen Enzymen zu funktionellen Einheiten (Gratz, 2010; Detzel *et al.*, 2011).

5 Ziele der Arbeit

Ein einfacher Zugang zu katalytisch aktiven Hyaluronidasen stellt einen experimentellen Engpass in der Wirkstoffforschung dar. Eine Aufreinigung aus prokaryotischen Expressionszellen lieferte bislang nur inaktive Einschlusskörperchen. Bisher ließen sich Hyaluronidasen mittels Autodisplay auf der Oberfläche von *E. coli* exprimieren, zeigten jedoch eine sehr geringe Aktivität. In dieser Arbeit sollten deshalb Verfahren für Aktivitätsbestimmungen von hPH-20 und hHyal-1 auf Basis von Autodisplay entwickelt und ihre Brauchbarkeit für Testung von potentiellen Hemmstoffen überprüft werden.

II Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Geräte

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Autoklav	3850 ELV	Systec, Wetttenberg
Autoklav	VX-95	Systec, Wetttenberg
Brucheisbereiter	Scotsman AF 100	Scotman, Milan, Italien
Brutschrank	P10825028	Memmert, Schwalbach
Brutschrank	Heraeus	Thermo Scientific, Schwerte
Elektroporator	2510	Eppendorf Hamburg
ECL-Imager	ChemoCam HR16-3200 Imager	INTAS, Göttingen
Feinwaage	2001 MP2	Satorius, Göttingen
Feinwaage	TE64	Satorius, Göttingen
Gefrierschank -20 °C	Mediline Lgex3410-20	Liebherr, Berlin
Gefriertruhe -80 °C	HAT 2086	Hettich, Tuttlingen
Gefriertruhe -80 °C	Forma 900	Thermo Fischer, Dreieich
Geldokumentation	Gel iX Imager	INTAS, Göttingen
Gelkammer (Agarose)	Electrophoresis Sub System 150	Labnet, Edison, NJ, USA
Gelkammer (SDS-Page)	Mini Protean Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Heiz-/Kühlblock	MKR 23	Ditabis, Pforzheim
Heiz-/Kühlschüttler	Vortemp 56	Labnet, Woodbridge, NJ, USA
Heizrührer	Magnetic Stirrer	labworld-online, Staufen
Inkubationsschüttler	Minitron, Ecotron	Infors, Einsbach
Inkubationsschüttler	Certomat	B. Braun Biotech, Melsungen
Kapillarelektrophoresesystem	PA 800 plus	Beckman Coulter, Krefeld
Kühlschrank 4 °C	Mediline LGUex 1500-20	Liebherr, Berlin
Kühl-Gefrierkombination	Fris88f (+4/-20°C)	Thermo Fischer, Dreieich
Kühlzentrifuge	Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge	Sorvall Lynx 6000 Centrifuge	Thermo Fischer, Dreieich
Kühlzentrifuge	Sorval RC-5C Plus	Thermo Fischer, Dreieich
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Microtiterplatten-Reader	Mithras LB 940	Berthold, Bad Wildbach
Microtiterplatten-Reader	Infinite 200Pro	Tecan
Multikanalpipette	Finnpipette 30-300µl	Thermo Fischer, Dreieich
Nanophotometer	Pearl	Implen, München
Partikelanalysator	Zetasizer, Version 6.20	Malvern, Worcestershire, England
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW, Weilheim
Photometer	Genesys 6	Thermo Fischer, Dreieich
Photometer	Biomate 3	Thermo Fischer, Dreieich

Gerät	Bezeichnung	Firma
Pipetten Pipetman Neo	P2N, P20N, P200N, P1000N	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Reinstwasseranlage	MilliQ Biocell	Millipore, Eschborn
Reinstwasseranlage	MilliQ Academic	Millipore, Eschborn
Rotoren (Sorval)	SS-34, SLA-1500	Thermo Fischer, Dreieich
Rotoren (Tischzentrifuge)	1612, 1617	Hettich, Tuttlingen
Schüttelinkubator	Minitron	Infors, Einsbach
Sorvall-Zentrifugenbecher	Falcon 15 und 50 ml	Greiner bio one
Spülmaschine	Compact-Desinfektor G7783CD	Miele, Gütersloh
Stromversorgung (SDS-Page)	PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, München
Tank-Blot-System	Mini protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Thermocycler	Primus 25 advanced	PeqLab, Erlangen
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, kühlbar	Mikro 120	Hettich, Tuttlingen
Trockenschrank	Hera Term Inkubator	Binder, Tuttlingen
Ultrazentrifuge	L-60	Beckman, München
UV- und LED-Tisch zur Geldokumentation	UV-Transilluminator 312nm, LED-Illuminator 470nm	INTAS, Göttingen
Vakuum-Pumpe	Membranpumpe	Vacuumbrand, Wertheim
Vortex Schüttler	Vortex Genie 2	Thermo Fischer, Dreieich
Waage	2337	Satorius, Göttingen
Wasserbad	Extratherm U3 electronic	Julabo, Seelbach
Weißlichtplatte	Weißlichtplatte	INTAS, Göttingen
Wippschüttler	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach

1.2 Chemikalien und Materialien

Tabelle 3: In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien und Materialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
1,4-Dithiotriethylol	AppliChem, Darmstadt
6x DNA PP Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Deishofen
Agar Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Albumin, human recombinant	Sigma-Aldrich, Deishofen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Apigenin	Sigma-Aldrich, Deishofen
Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Arabinose	Roth, Karlsruhe
BHT	Sigma-Aldrich, Deishofen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deishofen
Calciumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Carbenicillin	AppliChem, Darmstadt
CE-Kapillare, „silica-fused“, Silica, Länge 48 cm, ID 50 µm	Beckman Coulter, Krefeld
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva, Heidelberg

Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Dioxan	AppliChem, Darmstadt
DMSO	Fisher scientific, Schwerte
DNA-Größenmarker GeneRuler 1 kb	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Detektionslösung	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Elektroporationsküvetten, 1 mm	PeqLab, Erlangen
Ethydiamintetraacetat-Dinatriumsalz (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deishofen
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Eisessig	AppliChem, Darmstadt
GelGreen Nucleic Acid Stain	Biotium, Hayward, CA, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycin-Betain	Alfa Aeser, Karlsruhe
Glycyrrhizinsäure	Roth, Karlsruhe
Halbmicroküvetten	Alfaplast, München
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hyaluronsäure aus <i>Streptococcus equi</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Riedel-deHaen, Seelze
Magnesiumsulfat p.a.	Fluka, Seelze
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Membranfilter, HVLP, 0,45 μ m	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Membranfilter, PSE, Celluloseacetat 0,025 μ m	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Methanol	VWR
Mikroreaktionsgefäß, 1,5 und 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten, REF 655161	Greiner Bio One, Frickenhausen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Molten Top Agarose	AppliChem, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid p.a.	Sigma-Aldrich, Deishofen
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Deishofen
Natriumtetraborat	Merck, Darmstadt
Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose	Qiagen, Venlo, Niederlande
Pepstatin A	AppliChem, Darmstadt
Pageruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Pageruler Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Pipettenspitzen, 10, 200 und 1000 μ L	Sarstedt, Nümbrecht
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deishofen
Polyvinylidendifluorid-Blotting-Membran, (PVDF-Membran)	Macherey-Nagel, Düren
Robidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure 96%	Fluka, Seelze
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Stärke	Merck, Darmstadt
Stains All	Acros Organics, New Jersey, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tris / Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deishofen
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vitamin C	Roth, Karlsruhe
Vitamin C-Palmitat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Whatman Gel Blotting Paper GB004	Schleicher u. Schuell
Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Thermo Fischer, Dreieich

1.3 Bakterienstämme

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genomische Determinanten	Referenz
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B, F ⁻ , <i>dcm</i> , Δ <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>gal</i> , λ (DE3)	Studier und Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> Stellar	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>) U169, Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , λ -	ClonTech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
<i>E. coli</i> ClearColi BL21(DE3)	F ⁻ , Δ <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , λ (DE3) [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>], <i>msbA148</i> , Δ <i>gutQ</i> , Δ <i>kdsD</i> , Δ <i>lpxL</i> , Δ <i>lpxM</i> , Δ <i>pagP</i> , Δ <i>lpxP</i> , Δ <i>eptA</i>	Lucigen, Middleton, USA
<i>E. coli</i> JC8031	<i>SupE</i> , <i>hsdS</i> , <i>met</i> , <i>gal</i> , <i>LacY</i> , <i>TonA</i> , Δ <i>tolRA</i> ,	(Derouiche <i>et al.</i> , 1995)
<i>E. coli</i> JC8031(DE3)	<i>SupE</i> , <i>hsdS</i> , <i>met</i> , <i>gal</i> , <i>LacY</i> , <i>TonA</i> , Δ <i>tolRA</i> , λ (DE3)	diese Arbeit
<i>E. coli</i> JK321	Δ <i>ompT</i> , <i>proC</i> , <i>leu-6</i> , <i>trpE38</i> , <i>entA</i> , <i>zih12::Tn10</i> , <i>dsbA::kan</i>	(Jose <i>et al.</i> , 1996)
<i>E. coli</i> F470	F ⁻ , <i>met</i> ⁻ , <i>his</i> ⁻ , <i>pro</i> ⁻ , <i>mtl</i> ⁻ , (<i>Str</i>)	(Schmidt <i>et al.</i> , 1970b)
<i>E. coli</i> Rosetta	F ⁻ <i>ompT</i> ; <i>hsd SB</i> (<i>r?</i> - <i>mB</i>) <i>gal dem</i> (DE3); <i>pLys/RARE</i> ; (<i>argLL</i> , <i>argW</i> , <i>ile X</i> , <i>glyT</i> , <i>leu W</i> , <i>pro L</i>)	Novagen, Madison, USA
<i>E. coli</i> BL21 Origami(DE3)	B, F ⁻ , <i>dcm</i> , Δ <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>gal</i> , λ (DE3), <i>trxB</i>	(Di Lorenzo <i>et al.</i> , 2005)

1.4 Oligonukleotide

Tabelle 5: In dieser Arbeit eingesetzte Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Funktion
ZO01	AAAGGTACCAGATAGTGTGGAG GGTGAAGC	Amplifikation zur Deletion der DNA-Sequenz der GPI-Anker-Erkennungssequenz im C-Terminus von hPH-20, reverse
AK004	CCGCTCGAGCTGAATTCAGAG CACC	Amplifikation der hPH-20-DNA, forward
ZO09	TGCTCTGAAATTCAGATGATGGT GATGGTGGTGCATGGTATATCT	Amplifikation der Vektor-DNA zur Klonierung der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20 in pET-11d-His mittels In-Fusion, reverse
ZO10	CCCTCCACACTATCTACAAAGCC CGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTG	Amplifikation der Vektor-DNA zur Klonierung der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20 in pET-11d-His mittels In-Fusion, forward
ZO11	CTGAATTCAGAGCACCCCCTGT TATTCCA	Amplifikation der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20-DNA zur Klonierung in pET-11d-His Vektor mittels In-Fusion, forward
ZO12	AGATAGTGTGGAGGGTGAAGCA TTGTAGAA	Amplifikation der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20-DNA zur Klonierung in pET-11d-His Vektor mittels In-Fusion, reverse
ZO15	CATAGCATTTCATCCATAAGATT AGCGGATCCTACCTGA	DNA-Sequenzanalyse von p-BAD-AT-Konstrukten, Bindestelle <i>araBAD</i> , forward
ZO18	AAGCGCGTCTGAATAGGCTTCTT GTATTCC	Amplifikation der DNA-Sequenz der T7-RNA-Polymerase aus der DE3-Kassette; forward
ZO19	AAGCGCGTCTGAATAGGCTTCTT	Amplifikation der DNA-Sequenz der T7-RNA-

Bezeichnung	Sequenz	Funktion
ZO20	GTATTCC ATGAGTATTCAACATTTCCGTGT CGCCCTT	Polymerase aus der DE3-Kassette, reverse Amplifikation des β -Laktamasegenes mit der Matrize pBAD-AT, forward
ZO21	CCAATGCTTAATCAGTGAGGCA CCTATCTA	Amplifikation des β -Laktamasegenes mit der Matrize pBAD-AT, reverse
ZO22	CTGATTAAGCATTGGTAAGAATT AATTCATGAGCGGATACATATT	Amplifikation von pST003 zur Deletion des Kanamycinresistenzgens mit Überhang komplementär zum β -Laktamasegen forward
ZO23	AATGTTGAATACTCATATCCTTC CTTTTTCAATATTATTGAAGCAT	Amplifikation des Vektors pST003 zur Deletion des Kanamycinresistenzgens mit Überhang komplementär zum β - Laktamasegen, reverse
SH002	CACCACCAGACGGTCCGTAAGT G	DNA-Sequenzanalyse, Bindestelle im Linker von AIDA-I, reverse
SH015	CCATGGTTAAATTAATTTGGT GTTTTTTTACAG	DNA-Sequenzanalyse, Bindestelle im Signalpeptid von CtxB, forward

1.5 Plasmide

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Anmerkung	Quelle
pJM007	<i>bla</i> , P _{TK} Promotor, AT-Fusionsgen codierend für CtxB als Passagier, ColE1 ori*	(Maurer <i>et al.</i> 1997)
pAK011	<i>bla</i> , P _{TK} Promotor, AT-Fusionsgen codierend für hPH-20 als Passagier, ColE1 ori*	(Kaeßler <i>et al.</i> 2011)
pT7-SecA-His	<i>bla</i> , T7 Promotor, codiert für SecA mit der His Tag DNA-Sequenz, intrazelluläre Expression, ColE1 ori*	(Jilaveanu <i>et al.</i> , 2005)
pKE19	<i>Cat</i> , konstitutiver Promotor, codiert für die GFP-DNA- Sequenz, intrazelluläre Expression, p15A ori	(Engel, 2006)
pBAD-AT	<i>bla</i> , araBAD Promotor, <i>gene III</i> -Signalpeptid, Autotranportergeren ohne Passagier-domäne, pBR322 ori*	im Arbeitskreis konstruiert von Michael Goblirsch
pP _{TK} -ZO01	<i>bla</i> , P _{TK} Promotor, AT-Fusionsgen codierend für hPH-20 als Passagier, ColE1 ori*	diese Arbeit
pBAD-ZO02	<i>bla</i> , araBAD Promotor, <i>gene III</i> -Signalpeptid, AT- Fusionsgen codierend für hPH-20 als Passagier ohne die DNA-Sequenz für GPI-Anker- Erkennungssequenz, pBR322 ori*	diese Arbeit
pET-11d-His- ZO05	<i>bla</i> , T7 Promotor, codiert für hPH-20 ohne GPI-Anker- Erkennungssequenz mit 6xHis Tag DNA-Sequenz im N-Terminus, intrazelluläre Expression, pBR322 ori*	diese Arbeit
pT7-ZO08	<i>aph</i> , T7 Promotor, AT-Fusionsgen mit hPH-20 ohne GPI-Anker-Erkennungssequenz als Passagier, ColA ori	diese Arbeit
pT7-ZO09	<i>bla</i> , T7 Promotor, AT-Fusionsgen mit hPH-20 ohne GPI-Anker-Erkennungssequenz als Passagier, ColA ori	diese Arbeit
pACYC <i>pgl</i>	<i>pgl</i> Gen aus <i>C. jejuni</i> , 16 kbp, araBAD Promotor, p15A ori	(Pandhal <i>et al.</i> , 2013)
pJexpress401 <i>ptsA</i>	<i>ptsA</i> Gen aus <i>E. coli</i> , T5 Promotor, pBR322 ori*	(Pandhal <i>et al.</i> , 2013)

1.6 Antikörper

Tabelle 7: In dieser Arbeit eingesetzte Antikörper

Antikörper	Anmerkung	Bezugsquelle
Anti-β-Lactamase	Maus, monoklonal, 0,7 µg/ml*	abcam (ab12251)
Anti-GFP	Rabbit, polyklonal, 0,5 µg/ml*	GenTex (#GTX 26556)
Anti-6xHis	Maus, monoklonal, 0,5 µg/ml*	Thermo Scientific (MA1-21315)
Anti-OmpF	Rabbit, polyklonal, 0,5 µg/ml*	biorbby (orb 13626)
Anti-SPAM1	Maus, polyklonal, Stammlösung, eingesetzte Verdünnung 1:2000	Abnova (H00006677-A01)
Anti-Maus IgG H+L	Rabbit, polyklonal, Sekundär-AK, MP*-konjugiert, 0,33 µg/ml*	Abnova (ABIN 101782)
Anti-Rabbit IgG	Ziege, polyklonal, Sekundär-AK, MP*-konjugiert, 0,33 µg/ml	Promega (#W401B)

*Meerrettich-Peroxidase=MP

1.7 Enzyme

Tabelle 8: In dieser Arbeit eingesetzte Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
Restriktionsendonukleasen (KpnI, XhoI)	Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion DNA Polymerase	Thermo Fisher, Dreieich
Lysozym aus Hühnereiweiß	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
OTH (300 U/mg)	Roth, Karlsruhe
DNase I	Roth, Karlsruhe

1.8 Nährmedien

Die eingesetzten Nährmedien in dieser Arbeit wurden bei 121 °C und einem Druck von 2 bar für 20 min im Autoklav sterilisiert. Wegen ihrer Hitzelabilität wurden Zusätze wie Glucose, Magnesiumsalze und Antibiotika steril filtriert (Porengröße 0,22 µm) und den abgekühlten Medien zugegeben

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/L Trypton/Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 16 g/L Agar bei Festmedien
PPM-Medium	15 g/L Pepton, 5 g/L NaCl, 1 g/L Zulkowsky Stärke, 1 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,8 g/L K ₂ HPO ₄ , 20 % (v/v) Glycerol
SOC -Medium	20 g/L Trypton/Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 2,5 g/L KCl, 20 mM Glukose, 10 mM MgCl ₂
2x YT-Medium	16 g/L Trypton/Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl

1.9 Puffer und Lösungen

Die folgenden Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt.

Tabelle 10: Allgemeine Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS 10x	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ , pH nach einer Verdünnung einstellen
TBS 10x	34,2 mM NaCl, 27 mM KCl, 247,6 mM Tris-Base, pH 7,4

Tabelle 11: Eingesetzte Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarose-Lösung	8 g/L Agarose in 1x TAE-Puffer, Lösen durch aufkochen, Aufbewahren bei ca. 65 °C
TAE-Puffer	2 M Tris, 0,1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8
10x DNA-Probenpuffer	0,42 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerol, 10 mM EDTA, pH 8
DNA-Färbepad	Konzentrat GelRed® nach 1:3 Verdünnung mit Wasser Konzentrat GelGreen® nach 1:10.000 Verdünnung mit Wasser

Tabelle 12: Lösungen für die SDS-PAGE

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sammelgelpuffer 4x	1,25 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS, 0,4 % TEMED
Trenngelpuffer 4x	1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS, 0,4 % TEMED
Polyacrylamidtrenngel 10-12,5 %	33,3-41,6 % (v/v) Rotiphorese Acrylamid Gel 30, 25 % (v/v) Trenngelpuffer 4x, und 0,1 % APS-Lösung, Rest Reinstwasser
Polyacrylamidsammelgel 4 %	13,1 % (v/v) Rotiphorese Acrylamid Gel 30, 25 % (v/v) Sammelgelpuffer 4x, 0,1 % (w/v) APS-Lösung
APS-Lösung	10 % APS (m/v)
Laufpuffer 10x	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS, Vor Gebrauch 1:10 verdünnt
Protein-Probenpuffer 2x	100 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol; Puffer mit reduzierenden Eigenschaften enthielten 200 mM Dithiothreitol
Coomassie Brilliant Blue Färbepad	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 450 mL Methanol, 450 mL Reinstwasser, 100 mL Eisessig
Entfärbelösung	10 % Essigsäure

Tabelle 13: Lösungen für die Anreicherung der Proteine der äußeren Bakterienmembran

Bezeichnung	Zusammensetzung
Tris/HCl-Puffer	0,2 M Tris-Lösung, mit HCl auf pH 8 eingestellt
Saccharoselösung	1,0 M D-Saccharose
Lysozym	10,0 mg/mL

Bezeichnung	Zusammensetzung
PMSF	100,0 mM in 2-Propanol
EDTA-Lösung	10,0 mM Na ₂ EDTA
Aprotinin	10,0 mg/mL
DNase I	1,0 mg/mL
Proteinase K	5,0 mg/mL
Extraktionspuffer	2 % (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM MgCl ₂

Tabelle 14: Lösungen für die Proteinanalyse mittels Western Blot

Bezeichnung	Zusammensetzung
Transferpuffer	25 mM Tris, 1,92 M Glycin, 200 mL Methanol, auf 1 L mit Reinstwasser auffüllen
1x TBS	1:10 Verdünnung aus der 10x Lösung
Blockpuffer	5 % (w/v) Milchpulver-TBS-Lösung
Antikörperlösungen	Antikörper in geeigneter Konzentration in 5 % Milchpulver-TBS-Lösung
TBS-T (Waschpuffer)	0,1 % (v/v) Tween-20 in TBS

Tabelle 15: Lösungen zur Detektion der Glykanproduktion

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer zur Zellyse	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisationspuffer	1,5 M Tris/HCl pH 7,0
Waschpuffer PBS-T	0,05 % (v/v) Triton X-100 in PBS
Blockpuffer PBS-T	2 % (v/v) Tween 20 in PBS
Lösung des HRP-konjugierten SBA-Lektins	0,05 % (v/v) Tween 20, 0,1 mM CaCl ₂ , 0,1 mM MnCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , SBA-Lektin 0,375 µg/ml

Tabelle 16: Lösungen für die Hyaluronidase Aktivitätsbestimmungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Mcllvaine Puffer pH 4,5	45,4 mL 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 54,6 mL 0,1 M Citronensäure, 15 mM NaCl (Mcllvane, 1921)
Mcllvaine Puffer pH 7	82,4 mL 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 17,6 mL 0,1 M Citronensäure, 8 mM NaCl (Mcllvane, 1921)
Formiatpuffer pH 3,5	0,1 M Natriumformiat, 0,1 M NaCl, pH 3,5 (mit Ameisensäure)
CTAB-Lösung	2,5 % (w/v) CTAB in 0,5 M NaOH
„Stains-all“-Lösung	11,2 mg „Stains-all“, 17,6 mg Ascorbinsäure, 50 mL stabilisiertes Dioxan, 50 mL Reinstwasser, 13 µL Eisessig, 1 mg BHT, lichtgeschützte Lagerung
CE-Probenpuffer	100 mM Na ₂ HPO ₄ , 80 mM SDS, 20 mM Natriumtetraborat pH 9 (mit NaOH)
CE-Laufpuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM SDS, 10 mM Natriumtetraborat pH 9 (mit NaOH)
HA-Stammlösung	2 mg/mL
OTH-Stammlösung	1 mg/mL (300 U/mg)

Tabelle 17: Lösungen für die Proteinaufreinigung mittels IMAC

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	1 mM Benzamidin, 0,1 mM PMSF, 1 mg/mL Lysozym, 2,5 mM Glycin-Betain, in NPI-Puffer,
NPI-Puffer	50 mM Phosphatpuffer, 300 mM NaCl, pH 8 (mit NaH ₂ PO ₄)
Imidazol-Stammlösung	2,5 M Imidazol
Elutionspuffer	Verschiedene Imidazolkonzentrationen aus der Stammlösung in NPI-Puffer
NaOH-Lösung	0,1 M NaOH

1.10 Reagenziensätze

Tabelle 18: In dieser Arbeit verwendete Reagenziensätze

Reagenziensatz	Bezugsquelle
λDE3 Lysoigenization Kit	Novagen, MerckMillipore, USA
In-Fusion® HD EcoDry™ Cloning Kit	Clontech, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotid Removal Kit	Qiagen, Hilden

1.11 Auswertprogramme

Tabelle 19: In dieser Arbeit verwendete Computerprogramme

Bezeichnung	Bezugsquelle
GraphPad Prism	GraphPad, La Jolla, CA, USA
MikroWin 2000	Mikrotech, Overath
Isoelectric Calculator	Kozlowski L 2007-2012; Isoelectric Point Calculator. URL: http://isoelectric.ovh.org/
32Karat 7.0	Beckman Coulter, Krefeld
DNASTAR (SeqBuilder, SeqMan)	NWZNET, WWU
SignalP-Server4.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/
Amino Acid Calculator	http://proteome.gs.washington.edu/cgi-bin/aa_calc.pl
ChemDraw Ultra, Cambridge	WWU, Münster
Expaty translate tool	http://web.expasy.org/translate/
Kyte-Doolittle Hydrophathy Plot	http://gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm

2 Methoden

2.1 Arbeiten mit Bakterien

2.1.1 Kultivierung

Die verschiedenen Stämme wurden auf LB-Agarplatten und in Flüssigmedien kultiviert. Sie wurden mit einem Kügelchen aus dem Kryoröhrchen der Stammhaltung beimpft. Abhängig von der jeweiligen Resistenzdeterminante wurden den Medien

Antibiotika zugesetzt (50 µg/mL Carbenicillin, 30 µg/mL Kanamycin, 30 µg/mL Chloramphenicol). Sie wurden über Nacht bei 37 °C und gegebenenfalls 200 rpm inkubiert.

2.1.2 Herstellen elektrokompetenter Zellen

Um die Plasmid-DNA mittels Elektroporation in die Bakterienzellen einzubringen, muss die Zellsuspension salzfrei vorliegen. Zu diesem Zweck wurde eine Übernachtkultur von 25 mL mit einer Kolonie aus einer frischen LB-Agarplattenkultur beimpft und kultiviert. 500 mL YT-Medium wurden mit der gesamten Menge der Übernachtkultur inokuliert. Die Anzucht erfolgte bis zu einer OD₅₇₈ von 0,35. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 1.000 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, der Rückstand vorsichtig in 10 mL eiskaltem sterilen Reinstwasser aufgenommen, die Aliquotes vereinigt und bis 100 mL aufgefüllt. Es folgte erneut eine Zentrifugation bei 1.000 x g und 4 °C für 20 min. Dieser Waschschritt wurde zwei weitere Male mit eiskalter steriler 10 %igen Glycerollösung durchgeführt. Die gewonnenen Zellen wurden in 1 mL der 10 %igen Glycerollösung suspendiert, in vorgekühlten Reaktionsgefäße aliquotiert und in einem Ethanol-Trockeneis-Bad oder flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.1.3 Transformation elektrokompetenter Zellen

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit ca. 50 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Ligation wurden 15 µL Ligationsansatz zur Transformation eingesetzt. Bei einer Elektroporation wurden die Ansätze in eine eiskalte Küvette mit 1 mm Schichtdicke gegeben und für 5 ms einer Spannung von 1.800 V ausgesetzt. Die Zellen wurden unverzüglich in 1 mL warmen SOC-Medium aufgenommen und in ein steriles Mikroreaktionsgefäß gegeben. Nach einer Inkubation bei dem Temperaturoptimum unter mäßigem Schütteln für eine Stunde wurden sie auf LB-Agarplatten mit der jeweiligen Resistenzdeterminante ausplattiert.

2.1.4 Herstellen chemisch kompetenter Zellen

Die Kompetenz der Plasmidaufnahme bei *E. coli* kann durch kationische Zusätze erworben werden. Eine Kolonie aus einer frisch beimpften LB-Agarplatte wurde zum Animpfen einer 20 mL „Vorkultur“ verwendet. Aus dieser Kultur wurde eine 40 mL

Hauptkultur beimpft und bis zu einer OD_{578} von 0,5 kultiviert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gelagert und anschließend bei 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 mL TMF-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 1 mL sterilem Glycerin (vorsichtig vermischen) wurden die kompetenten Zellen in 250 μ L Aliquots aufgeteilt und schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zu ca. 6 Monaten bei -80 °C.

2.1.5 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit ca. 50 ng Plasmid-DNA oder 15 μ L Ligationsansatz versetzt. Die chemisch kompetenten Zellen wurden ca. 15 min mit der Plasmid-DNA inkubiert. Es wird vermutet, dass die bivalenten Kationen die Bindung der negativ geladenen DNA an die ebenfalls negativ geladene Zellmembran erleichtern. Anschließend wurden sie in ein Wasserbad mit 42 °C für 90 Sekunden inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL SOC-Medium zu den Zellen wurden sie bei 37 °C und 200 rpm für eine Stunde inkubiert und anschließend auf geeigneten LB-Agarplatten ausplattiert.

2.1.6 Stammhaltung

Die LB-Agarplatten wurden mit dem vorgesehenen Stamm beimpft, kultiviert und bis zur Nutzung für max. 2 Wochen bei 4° C gelagert. Zur Herstellung einer Dauerkultur wurde die gesamte Kultur mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens aufgenommen und in 1,5 mL PPM-Medium suspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf zwei sterile Kryoröhrchen mit Glaskügelchen verteilt und in einem Ethanol-Trockeneis-Bad oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80° C in der Gefriertruhe.

2.1.7 Proteinexpression und Zellernte

Die Kulturen wurden abhängig von enthaltenen Plasmiden behandelt. Bei einer konstitutiven Expression wurden die Zellen direkt aus der Vorkultur (16 h Inkubation) bzw. Hauptkultur (weitere 24 h) ohne Proteinexpression gewonnen. Zu diesem Zweck wurden 60-120 mL LB-Medium mit einer Kolonie aus einer LB-Platte beimpft und bei 37° C und 200 rpm für 16 h angezogen. Bei Kulturen der Zellen, bei denen die Proteinexpression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stand, wurde eine Flüssigkultur 1 %ig aus der Vorkultur nach einem Waschschrift inokuliert. Die Kulturen enthielten neben 10 μ M EDTA auch den Selektionsmarker. Nach der

Zellanzucht bis zu einer OD_{578} von 0,4-0,5 wurde die Expression des Autotransporter-Fusionsproteins durch Zugabe von 0,2 % L-Arabinose (w/v) bzw. 1 mM IPTG bei 30° C für vorgesehenen Zeiten induziert. Diese Zellen wurden bei 3.500 rpm für 2 min geerntet, mit vorgesehendem Puffer gewaschen und ihre optische Dichte für weitere Untersuchungen eingestellt. Die Kultivierung und Proteinexpression in *E. coli* BL21 ClearColi wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

2.1.8 Anreicherung von Außenmembran-Vesikeln (AMV)

Zur Anreicherung von AMV wurde der *E. coli* Stamm JC8031 eingesetzt. Dieser Stamm trägt eine Mutation in Genen *tol/RA* und ist damit in der Lage größere Mengen von AMV zu bilden. Er wurde mit den vorgesehenen Plasmiden (zur Expression des Autotransporter-Fusionsproteins und seine Modifizierung) transformiert und in 50 mL LB-Medium mit dem Selektionsmarker kultiviert. Aus der „Vorkultur“ wurden die Zellen bei 2.100 x g geerntet und mit LB-Medium gewaschen. Eine 400 mL LB-Medium wurde mit 0,7 µg/mL Pepstatin, 0,5 µg/mL Leupeptin, 10 µM EDTA und vorgesehenen Antibiotika versetzt. Diese Flüssigkultur wurde mit der gesamten gewaschenen Vorkultur beimpft und die Proteinexpression unmittelbar mit 0,2 % Arabinose oder 1 mM IPTG bei 30 °C und für 6 h bzw. 20 h induziert. Nach der Induktion der Proteinbiosynthese wurden zuerst die Zellen bei 13.000 x g und 4° C für 10 min sedimentiert und der Überstand mit einem 0,45 µm Filter (HVLP Durapore Membrane Filter) zellfrei filtriert. Aus diesem Filtrat wurden die AMV bei 85.000 x g und 4° C für 45 min angereichert (Abbildung 8), der Überstand verworfen und die Oberfläche des Sedimentes mit passendem Puffer gewaschen. Die Becher wurden für 10 min über Kopf bei 4° C gelagert, damit die Restflüssigkeit abfließen konnte. Dieser Schritt war für die Berechnung einer Volumenaktivität und Vergleichbarkeit verschiedener Chargen der Vesikel-Anreicherung wichtig. Bei allen Schritten wurde auf Eis gearbeitet. Das Pellet von acht Bechern wurde in 1 mL McIlvaine Puffer mit dem vorgesehenen pH-Wert aufgenommen und untersucht.

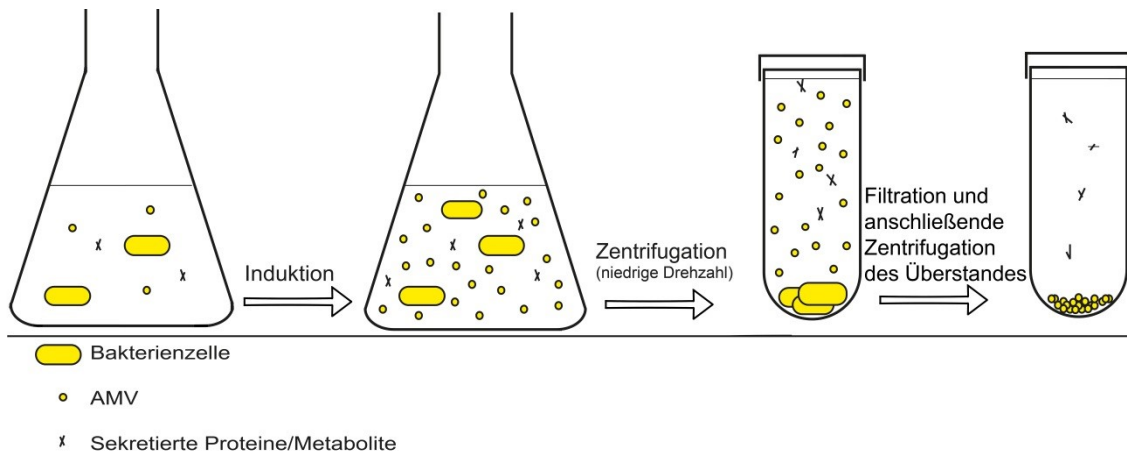


Abbildung 8: Anreicherung von AMV aus *E. coli* JC8031. *E. coli* JC8031 wurde mit geplanten Plasmiden transformiert und kultiviert. Nach der Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen bei niedriger Drehzahl sedimentiert und der Überstand filtriert. Das zellfreie Filtrat wurde bei höher Drehzahl (> 50.000 x g) zentrifugiert. Das Sediment enthielt die AMV aus diesem Stamm.

2.1.9 Lysogenisierung von *E. coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmide eingesetzt, die einen T7-Promotor zur Kontrolle der Proteinexpression enthalten. Daher wurde der λ DE3 Prophage in das Genom von *E. coli* JC8031 integriert. λ DE3 ist ein rekombinanter Phage, der das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle von *lacUV5* trägt. Die lysogenisierten Wirtszellen konnten dann für die Expression von Targetgenen unter Kontrolle des T7-Promotors eingesetzt werden. Der Lysogenisierungs-Vorgang wurde mit Hilfe des „ λ DE3 Lysogenization Kits“ (Novagen®, Merck, Darmstadt) und der beigefügten Arbeitsanleitung durchgeführt. Die gelungene Lysogenisierung wurde mittels Kolonie-PCR unter Benutzung der Oligonukleotide ZO18 und ZO19 und anschließende Agarosegelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde der richtige Klon elektrokompent gemacht und mit vorgesehendem Plasmid transformiert.

2.1.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die *E. coli* Stämme JC8031 und UT5600 wurden mit dem Plasmid pBAD-ZO02 transformiert. Mit diesen Stämmen und dem Wirtstamm ohne Plasmid wurden je 20 mL Vorkulturen beimpft und aus jeder Vorkultur eine 20 mL Hauptkultur bis zu einer OD_{578} von 0,4 angezogen. Die Zellen wurden bei 3.500 x g sedimentiert und dreimal mit steril filtriertem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 20 mL sterilem PBS aufgenommen. Diese PBS-Kulturen waren mit 10 μ M EDTA, 0,2 % Arabinose zur Induktion der Proteinbiosynthese und wenn geeignet Carbenicillin supplementiert. Sie wurden eine Stunde bei 30 °C und 200 rpm

inkubiert. Anschließend wurde aus jeder Kultur 1 mL Probe entnommen und mit 1 mL Glutardialdehyd-Lösung (2,5 % in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,4) versetzt und über Nacht bei 4 °C fixiert. Eine zellfreie Probe der AMV aus *E. coli* JC8031 wurde ebenso fixiert. Die Proteinbiosynthese wurde bei einer OD₅₇₈ von 0,4 im LB-Medium für 6 Stunden induziert. Anschließend wurden die AMV aus dieser Kultur angereichert. Die Proben wurden auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger gegeben und die Zellen für 1,5 h absetzen gelassen. Es folgte dreimaliges je 15 minütiges Waschen mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer. Mit 1 % Osmoniumtetroxid wurden die Lipide fixiert. Die Proben wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: 30, 50, 70, 90, und 96 % Ethanol (je 15 min) und anschließend getrocknet. Um die Oberflächeneffekte bei der Trocknung zu verhindern, wurde Ethanol langsam gegen flüssiges Stickstoffdioxid ausgetauscht (alle 10 min) und nachfolgend bis zum kritischen Punkt aufgeheizt (die kritischen Werte für CO₂: $t_K = 31$ °C und $p_K = 73,8$ bar). Nach Erreichen des kritischen Punktes wurde CO₂ entlassen. Um die Signalausbeute und den Kontrast zu steigern, wurden die Proben mit Platin/Kohlenstoff bedampft (2,5 nm Schicht). Die Dokumentation erfolgte mit dem Elektronenmikroskop Hitachi S5000 im Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster.

2.1.11 Nachweis von Heptasaccharid-produzierendem *E. coli*

Die *E. coli* Zellen, transformiert mit einem *pgl*-Gencluster aus dem Bakterium *Campylobacter jejuni*, sind zur N-Glykosylierung von Proteinen befähigt (Pandhal *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurden *E. coli* Zellen mit dem Plasmid pACYC*pgl* transformiert und auf einer LB-Agarplatte kultiviert. Um richtige Klone zu identifizieren und die Funktionalität des Genclusters zu überprüfen, wurden Klone direkt auf der LB-Agarplatte untersucht. Eine Nitrocellulosemembran wurde in eine Lösung mit 0,2 % Arabinose und 30 µg/mL Chloramphenicol eingetränkt, kurz getrocknet und auf die Kolonien der Platte gelegt. Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 4 °C abgekühlt. Die Membran wurde vorsichtig entnommen und zur Zellyse auf ein Whatman®-Papier gelegt, das zuvor in einer 0,5 M NaOH-Lösung mit 1,5 M NaCl eingetaucht wurde. Nach 25-minütiger Inkubation bei RT wurde die Membran mit 1,5 M Tris/HCl-Puffer (pH 7) neutralisiert und mit PBS gewaschen. Nachdem die Membran mit PBS-T (Tween 20 2 % (v/v)) für 2 min behandelt wurde, wurde sie für 16 h bei RT mit der SBA-Lektin-Lösung benetzt und

anschließend gewaschen. Da das SBA-Lektin mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war, wurde die Membran mit Peroxidase-Substrat (ECL Reagenz) versetzt und die resultierende Chemolumineszenz detektiert.

Die Proteinproben wurden vor einer Detektion mittels SBA-Lektins durch Western Blot auf eine Membran transferiert und mit der Lektin-Lösung und abschließend mit dem ECL-Reagenz versetzt und die Chemolumineszenz dokumentiert.

2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung wurden 5 mL LB-Medium, supplementiert mit geeigneten Antibiotika, mit einer Bakterienkolonie beimpft und kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und die Plasmid-DNA wurde entsprechend der Anleitung des „QIAprep Miniprep Spin Kits“ durchgeführt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Nanophotometers bestimmt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte für die Klonierung erfolgte mit Hilfe von Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Neben der „klassischen“ Klonierungsmethode, bei der die Konstruktion der Oligonukleotide das Vorhandensein von Restriktionssequenzen beim Amplikon voraussetzt, wurde auch eine Ligation-unabhängige Methode (In Fusion[®]) eingesetzt. Die Zusammensetzung der Proben erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das PCR-Programm in den Thermocycler ist in der Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Standard-PCR-Programm zur Amplifikation der DNA-Fragmente

Bezeichnung der Abläufe	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min
Denaturierung	98 °C	30 s (30 Zyklen)
Primerhybridisierung	Variabel*	30 s (30 Zyklen)
Elongation	72 °C	1 min (30 Zyklen)
Finale Elongation	72 °C	5 min (30 Zyklen)

* Berechnung der Temperatur für die Primerhybridisierung: Durchschnitt der Schmelztemperatur beider Primer minus 3 °C.

2.2.3 „In-Fusion“ Klonierung

Das „In-Fusion HD EcoDry-Kit“ erlaubt eine Ligation-unabhängige Fusion von PCR-Produkten. Zu diesem Zweck wurden jeweils zwei PCR-Oligonukleotide (forward und reverse) für Insert-DNA und Vektor-DNA konstruiert. Dabei erhielten entweder die Oligonukleotide des Inserts oder Vektors am 5'-Ende eine Verlängerung um 15 Basenpaare, die komplementär zum linearisierten Zielvektor oder Zielinsert waren. Nach der PCR und anschließender präparativer Aufreinigung der PCR-Produkte, wurden sie nach Arbeitsanleitung des Herstellers mittels Reagenziensätze zu einem zirkulären Plasmid fusioniert.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese und Färbung der DNA

Die DNA-Proben, die mit Restriktionsenzymen und Puffer der Firma Fermentas behandelt waren, wurden direkt auf Agarosegelen aufgetragen. Die restlichen DNA-Proben wurden zuerst mit einem äquivalenten Volumen an 6 x Gelladepuffer versetzt. Es wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-1 % verwendet. Als Größenmarker wurde 6 µl GenRuler™ 1 kb (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte im TAE-Puffer durch Anlegen einer Spannung von 120 V. Anschließend wurde die aufgetrennte DNA in einer „GelGreen™“-Lösung für 20 min angefärbt. Die Detektion erfolgte bei 470 nm. Anschließend wurde mittels des Kamerasystems Gel iX Imager. dokumentiert.

2.2.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Die DNA-Fragmente mit richtiger Größe wurden nach der Agarosegelelektrophorese und Anfärbung mittels eines Skalpells ausgeschnitten und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Extraktion aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit. Die DNA-Elution aus der Säule erfolgte mit 30 µL sterilem Reinstwasser. Die auszuführenden Arbeitsschritte konnten der mit dem Kit gelieferten Anleitung entnommen werden. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nanophotometer gegen Reinstwasser bestimmt.

2.2.6 Enzymatische Spaltung von DNA

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurden Plasmide und DNA-Fragmente mittels Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) gespalten. Die Proben enthielten in einem Endvolumen von 20 µL neben der zu untersuchten

DNA, Reinstwasser, Puffer und 5 U der benötigten Enzyme. Die Proben wurden für 45 min bei 37° C inkubiert und anschließend einer Agarosegelelektrophorese unterzogen.

2.2.7 Ligation und Entsalzen der DNA-Lösungen

Zur Einführung von Passagier-DNA-Fragmenten oder anderen nötigen DNA-Abschnitten in ein Plasmid wurden sie bei der PCR lateral mit passenden Restriktionssequenzen versehen (ausgenommen Klonierungen mittels In-Fusion). Sowohl der Vektor als auch das Insert wurden mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen behandelt. Nach der Deaktivierung von Restriktionsenzymen (65° C, 10 min) wurden die entsprechenden kompatiblen Enden durch T4-Ligase verknüpft. Der Reaktionsansatz beinhaltete: T4-DNA-Ligase, Ligase-Puffer, Reinstwasser, molares Vektor-DNA zu Insert-DNA-Verhältnis 1:3-5. Vor einer Elektroporation wurde der Reaktionsansatz gegen steriles Reinstwasser dialysiert (MF Membranfilter VSWPO 2500, Porenweite 25 nm) und 10-15 µL zur Transformation von elektrokompetenten *E. coli* verwendet.

2.2.8 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der zu analysierenden DNA-Bereiche wurde von SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die Analyse erfolgte anschließend mit Hilfe des Programmes DNASTAR/SeqMan von Lasergene.

2.3 Arbeiten mit Proteinen

2.3.1 Anreicherung der Außenmembranproteine

Um die Lokalisierung der Autotransporter-Fusionsproteine zu überprüfen, wurden die Proteine der äußeren Membran nach einem modifizierten Protokoll nach Hantke (Hantke, 1981) angereichert und anschließend untersucht.

Die Bakterienstämme wurden entsprechend ihrer Plasmide kultiviert. Bei einer induzierbaren Expression des Autotransporter-Fusionsproteins wurden die Außenmembranproteine der Bakterien aus einer 40 mL Hauptkultur gewonnen. Bei konstitutiver Expression wurde direkt mit der 120 mL „Übernachtskultur“ gearbeitet. Die Zellen wurden sedimentiert, zweimal mit Tris/HCl-Puffer gewaschen (3.850 x g,

4 °C, 5 min) und in 1,5 mL dieses Puffers aufgenommen. Durch Zugabe von 100 µL Saccharose (1 M), 100 µL EDTA (10 mM) und 3,2 mL Reinstwasser wurde die Zellwand für eine Hydrolyse durch Lysozym (100 µL Lösung einer Konzentration von 10 g/L) zugänglich gemacht. Dies erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Zu dieser Suspension wurden 5 mL Extraktionspuffer, 50 µL PMSF (0,1 M) und 10 µL Aprotinin (10 g/L) zugesetzt, dem eine 20-minütige Inkubation auf Eis folgte. Dabei fungierten PMSF und Aprotinin als Inhibitoren der Proteasen, die während des Verfahrens evtl. freigesetzt wurden. Außerdem wurden 100 µL DNase I (1 g/L) zugesetzt, um die freigesetzte DNA abzubauen. Dadurch verlor die Suspension an Viskosität. Die Sphäroplasten und Zelltrümmer wurden zentrifugiert (2.400 x g, 4 °C, 10 min) und der Überstand in einen frischen Zentrifugenbecher überführt. Dieser Überstand wurde bei 38.500 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 mL Reinstwasser aufgenommen, nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen in 1 mL Reinstwasser suspendiert und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Diese Suspension wurde bei 15.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20-30 µL Reinstwasser aufgenommen, mit dem 1,5-fachen Volumen an SDS-Probenpuffer versetzt und für 15 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert oder bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Proteasesensitivität der oberflächenständigen Proteine

Die Oberflächenpräsentation und Orientierung des Passagiers kann durch einen Proteasezugänglichkeits-Test belegt werden. In dieser Arbeit wurde Proteinase K eingesetzt, die bedingt durch ihre Größe eine intakte äußere Membran des Bakteriums nicht überwinden kann, und nur die oberflächenständigen Proteine abbaut.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen kultiviert, in zwei Teile geteilt und sedimentiert. Nach dem Suspendieren in Tris/HCl-Puffer, wurde zu einem Teil 200 mU/ml Proteinase K zugesetzt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden alle Proben einer Außenmembranproteinisolierung unterzogen und die angereicherten Proteine mittels SDS-PAGE, Coomassie-Färbung oder Western Blot analysiert.

2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben (Zellysate, AMV und Außenmembranproteinisolate) wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Die Trennung erfolgte in der Mini Protean Cell Apparatur mit dem Laufpuffer nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proteinproben wurden mit 2 x Proteinprobenpuffer adäquat vermischt und bei 98° C für 10 bis 30 min gekocht. Anschließend wurden die enthaltenen Proteine mittels 10-12,5 %igen Acrylamidgelen getrennt. Als Größenvergleich wurde 6 µL PAGE Ruler™ prestained eingesetzt. Die Trennung erfolgte mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel in 1 x SDS-Laufpuffer. Nachdem die blaue Bromphenolfront aus dem Gel austrat, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel entweder einem Western Blot unterzogen oder in einer Coomassie Brilliant Blue-Lösung für 30 min gefärbt. Im Anschluss an die Coomassie-Färbung wurde das Gel für mehrere Stunden in 10 %iger Essigsäure soweit entfärbt, dass die Hintergrundfärbung fast vollständig verschwand und nur die Proteinbanden zu erkennen waren. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Kamerasystems Gel iX Imager.

2.3.4 Proteinanalyse mittels Western Blot und Immunfärbung

Um die Identität der untersuchten Proteine mit Hilfe passender Antikörper nachzuweisen, wurden sie aus einem Acrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert und immobilisiert. Dieser Vorgang wurde mit Hilfe von Wet-Blotting in der Mini Protean Tetra Cell Apparatur durchgeführt. Zuerst wurde ein Stück PVDF-Membran zugeschnitten und in Methanol für eine Minute aktiviert. Die Filterpapiere und Fasermatten wurden im vorgekühlten Transferpuffer equilibriert. Das Gel und die Membran wurden luftblasenfrei zwischen den Filterpapieren und Fasermatten in einer Haltevorrichtung zu einem „Sandwich“ zusammen gebaut (Reihenfolge: Kathode, Gel, Membran, Anode). Die Halterung wurde in den mit Transferpuffer gefüllten Tank so platziert, dass die Proteine bei einer Spannung von 100 V Richtung Membran transferiert wurden. Der ganze Blot-Vorgang fand unter ständiger Kühlung statt. Nach einer Stunde wurde die Apparatur abgebaut und die Membran mit einer Pinzette entnommen und für 2 h in eine 5 %ige Milchpulverlösung in TBS gelegt, um die freien Valenzen der Membran zu blockieren. Die geblockte Membran wurde über Nacht mit einer Lösung des Primärantikörpers, gerichtet gegen das untersuchte Protein, bei 10 °C inkubiert. Sie wurde danach dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen und 2 h in einer Lösung des Sekundärantikörpers inkubiert, der

gegen den Primärantikörper gerichtet und mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Es folgten ein dreimaliges Waschen mit TBS + 5 % Milchpulver und einmaliges Waschen mit TBS. Die Trägermembran wurde auf einer Glasplatte platziert und mit einer 1:1 (v/v) Mischung Western Blotting Luminol Reagent A und B benetzt. Nach dem Abdecken der Membran mit einer durchsichtigen Folie wurde eine Minute gewartet und der Überschuss an Reagenz mit einem Zellstofftuch entfernt. Die Detektion und Dokumentation erfolgten mittels des Kamerasystems ChemCam Imager.

2.3.5 Intrazelluläre Expression und Aufreinigung der humanen PH-20

Zur intrazellulären Expression der humanen Hyaluronidase PH-20 wurde das *E. coli* Origami(DE3) als Wirtstamm eingesetzt. Aufgrund einer Defizienz in Glutathion- und Thioredoxin-Reduktase weist dieser Stamm veränderte Redoxbedingungen im Zytoplasma auf, welche eine Oxidation von Thiol-Gruppen zu Disulfidbrücken erlauben (Xiong *et al.*, 2005). Nach der Transformation von *E. coli* Origami(DE3) mit einem Plasmid, das für eine zytoplasmatische hPH-20 ergänzt um ein „His-Tag“ kodiert, wurde eine Vorkultur des Stammes angelegt, die bei 30 °C und 200 rpm inkubiert wurde. 2 L Flüssig-LB-Medium wurde mit Carbenicillin (50 µg/mL) supplementiert, mit 2 mL der Vorkultur beimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4-0,6 kultiviert. Die Proteinbiosynthese wurde durch Zugabe von 1mM IPTG gestartet. Nach 6 h wurden die Zellen sedimentiert (10.000 x g, 15 min) und in 20 mL Lyse-Puffer aufgenommen. Nach 20 min wurden sie mittels einer Ultraschall-Behandlung (7 Zyklen, je 15 s mit 15-sekündigen Unterbrechungen bei einer Amplitude von 60) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden für 30 min bei 20.000 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine mit NPI-Puffer equilibrierte Ni-NTA-Säule (ca. 3 mL) gegeben und die Austritt-geschwindigkeit gering gehalten. Nach einem Waschgang mit NPI-Puffer (5 x Säulenvolumen) wurde das Protein schrittweise mit Imidazol-Lösung steigender Konzentration (je 5 mL) eluiert und das Eluat abgefangen. Von jeder Fraktion wurden Proben entnommen und mit SDS-Proteinprobenpuffer versetzt. Nach Aufkochen für 15 min bei 95 °C wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung angefärbt und ausgewertet. Die in Frage kommenden Fraktionen wurden gegen McIlvaines Puffer (pH 4,5 oder 6) bei 10 °C dialysiert und einer Aktivitätsbestimmung unterzogen.

2.3.6 FRET-gestützter Nachweis der OmpT-Aktivität

In einem Gesamtvolumen von 100 μL wurden 10 μL Suspension der nach Standardverfahren angereicherten AMV mit 50 μL FRET-Substratlösung (2 mM) und 40 μL Tris/HCl-Puffer (pH7) in Kavernen einer schwarzen nichtbindenden Mikrotiterplatte zusammen gegeben. Die entstehende Fluoreszenz wurde über die Zeit mit dem Mikrotiterplatten-Reader bei einer Anregungswellenlänge von 355 ± 20 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 ± 5 nm detektiert.

2.4 Nachweis der Hyaluronidase-Aktivität

2.4.1 Photometrische Methoden

Testverfahren mit „Stains-all“

„Stains-all“ ist ein kationisches Molekül, das mit hochmolekularer HA einen blauen Komplex bildet, der nach Zugabe von geringen Mengen an Wasser ein scharfes Absorptionsmaximum bei 650 nm zeigt. Nach einem enzymatischen Abbau der HA ist eine Abnahme der Absorption detektierbar, die für die Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität herangezogen werden kann. Dieses Verfahren war bereits in der Arbeitsgruppe etabliert (Kaessler *et al.*, 2011) und fand in dieser Arbeit Anwendung.

Die Hyaluronidase-exprimierenden *E. coli* Zellen sowie die jeweiligen Kontrollzellen wurden kultiviert, gewaschen und zu vorgesehenen optischen Dichten in Reaktionspuffer aufgenommen. Sie wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit der HA-Lösung (Endkonzentration 0,11 mg/mL) vermischt und bei 37 °C und 1.000 rpm inkubiert. Das Endvolumen war variabel und von der Anzahl der Messpunkte abhängig. Pro Messpunkt wurde Probe aus dem Reaktor entnommen und zentrifugiert. Von dem Überstand wurden jeweils 25 μL in die Kavernen einer 96-Mikrotiterplatte (nicht bindend) überführt und nacheinander mit 112 μL „Stains-all“-Lösung und 80 μL Reinstwasser versetzt und homogenisiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von „Stains-all“ erfolgte die Absorptionsbestimmung bei 650 nm unmittelbar nach der Zugabe des Reagenzes. Bei der Testung von potentiellen Hemmstoffen wurde die Zellsuspension zuerst mit der zu testenden Substanzlösung für 5 min inkubiert, bevor die durch Zugabe von HA-Lösung startete. Der Berechnung der prozentualen Hemmung der Hyaluronidase-Aktivität lag die folgende Formel zugrunde:

$$relative\ Aktivit\at [\%] = \frac{A(Kontrolle) - A(Inhibitor)}{A(Kontrolle) - A(DMSO)} * 100\ %$$

$$Inhibition\ [\%] = 100 - relative\ Aktivit\at\ [\%]$$

A (Kontrolle) = Absorption des Reaktionsüberstandes der Kontrollprobe nach dem Versetzen mit „Stains-all“-Lösung und Wasser

A (Inhibitor) = Absorption des Reaktionsüberstandes der Hyaluronidase-haltigen Probe versetzt mit dem potentiellen Hemmstoff nach der Zugabe von „Stains-all“-Lösung und Wasser

A (DMSO) = Absorption des Reaktionsüberstandes der Hyaluronidase-haltigen Probe versetzt mit DMSO nach der Zugabe von „Stains-all“-Lösung und Wasser

Als Enzymquelle dienten nicht nur ganze Zellen, sondern auch OTH (ovine testicular hyaluronidase) (12-50 U/mL) oder AMV, die verdünnt wurden, bis sie keine störende Interaktion mit „Stains-all“ zeigten. Dabei betrug die HA-Endkonzentration immer 0,11 mg/mL.

Turbidimetrisches Testverfahren

Die hPH-20-tragenden AMV sowie die jeweiligen Kontrollzellen wurden kultiviert und mit dem Testpuffer gewaschen. Nach einer erneuten Suspendierung im Puffer wurden sie mit der HA-Lösung zu geplanten optischen Dichten und 0,5 mg/mL HA-Endkonzentration gemischt. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C und 1.000 rpm für verschiedene Zeiten inkubiert. Nach jeder Probenentnahme wurden die Zellen abgetrennt und 33 µL ihres Überstandes in die Kavernen einer 96-Mikrotiterplatte überführt. Abschließend wurde zu jedem Ansatz 200 µL CTAB-Lösung zugegeben, 10 min bei RT inkubiert und die Trübung bei 580 nm bestimmt. Die Berechnung der Inhibition erfolgte mit folgender Formel. Als Enzymquellen wurde neben AMV auch OTH eingesetzt.

$$relative\ Aktivit\at\ [\%] = \frac{\Delta OD\ Inhibitor\ (0h - 3h)}{\Delta OD\ DMSO\ (0h - 3h)} * 100\ %$$

$$Inhibition\ [\%] = 100 - relative\ Aktivit\at\ [\%]$$

Δ OD Inhibitor (0h-3h) = Differenz der optischen Dichte_{580 nm} des Reaktionsansatzes versetzt mit Testsubstanz zu Beginn (0h) und am Ende (3h) der Reaktion

Δ OD DMSO (0h-3h) = Differenz der optischen Dichte_{580 nm} des Reaktionsansatzes versetzt mit DMSO zu Beginn (0h) und am Ende (3h) der Reaktion

2.4.2 CE-gestützter Aktivitätstest

Die OTH-Lösung wurde mit HA zu einer Endkonzentration von 150 U/mL und 0,75 mg/ml gemischt. Die AMV-Lösung als hPH-20-Quelle wurde mit HA-Lösung in einem 3:1 Verhältnis gemischt. Dabei betrug die Endkonzentration von HA 0,5 mg/mL. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Nach vorgesehenen Inkubationszeiten wurden Proben entnommen, woraus die AMV bei 4 °C, 21.000 x g für 60 min sedimentiert wurden. Anschließend wurde der Überstand einer Aktivitätsbestimmung mittels CE unterzogen.

Als Laufpuffer wurde Phosphat-Boratpuffer mit einem pH-Wert von 9 eingesetzt, damit die HA vollständig als Polyanion vorliegt. Eine Kapillare mit einem Durchmesser von 50 µm und einer effektiven Länge von 48 cm wurde verwendet. Die Proben wurden zuvor in einer Mikrotiterplatte 1:1 mit dem CE-Probenpuffer versetzt, der identisch mit dem Laufpuffer aber doppelt so stark konzentriert war. Sie wurden für 5 s unter 1 psi in die 30 °C warme Kapillare injiziert. Die Trennung erfolgte unter einer Spannung von 15 kV. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 200 nm. Da die Proben Phosphat enthielten, welches die Chemie der Kapillarenwand verändern kann, wurde die Kapillare vor jedem Lauf mit 0,1 M NaOH konditioniert. Nach Ablauf der Messungen wurde die Kapillare mit 40 °C warmem Wasser unter 20 psi für 20 min gespült.

III Experimente und Ergebnisse

1 Autodisplay der humanen Hyaluronidase PH-20 (hPH-20) und Aktivitätsuntersuchungen mittels Ganzzell-Verfahren

1.1 Autodisplay und Aktivitätsuntersuchungen der hPH-20 nach konstitutiver Expression

Ausgehend von einem in der Arbeitsgruppe vorhandenen Plasmid und Arbeitsprotokoll zur Expression und Aktivitätsbestimmungen der hPH-20 sollte durch Veränderung des Arbeitsprotokolls eine höhere Aktivität des mittels Autodisplay exprimierten Enzymes erzielt und damit eine zuverlässigere Basis zur Testung von Hemmstoffen erreicht werden. Zu diesem Zweck wurde *E. coli* F470 mit dem Plasmid pAK011 zum Autodisplay von hPH-20 transformiert und kultiviert. Dieser Stamm besitzt eine reduzierte Lipopolysaccharid(LPS)-Schicht der äußeren Membran (Schmidt *et al.*, 1970a) und wurde aus diesem Grund als Wirtstamm zur Expression der Hyaluronidasen eingesetzt. Es wurde vermutet, dass die Zucker der LPS-Schicht bedingt durch ihre Ähnlichkeit zur HA die oberflächenständigen Hyaluronidasen hemmen konnten. Die Oberflächenexpression der hPH-20 in diesem Stamm war mittels passendem Antikörper bereits in früheren Arbeiten gezeigt worden (Kaessler *et al.*, 2011). Als Kontrolle wurde *E. coli* F470 mit pJM007 transformiert. Das Plasmid pJM007 ist, abgesehen von der codierenden DNA-Sequenz für den Passagier CtxB (Choleratoxin-Untereinheit B), identisch aufgebaut wie das Plasmid pAK011 und enthält alle Informationen zur Oberflächenexpression des Passagiers (Maurer *et al.*, 1997). Die Expression des Autotransporter-Fusionsgenes mittels beider Plasmide wird durch den konstitutiven Promotor P_{TK} reguliert und bedarf keiner Zugabe von Induktoren. Daher wurden die Zellen direkt aus den Vorkulturen nach einer 16-stündigen Inkubation bei 37 °C gewonnen. Sie wurden mit der HA-Lösung zu einer finalen optischen Dichte bei 578 nm (OD₅₇₈) von 20 und einer HA-Konzentration von 0,11 mg/mL versetzt und weiter inkubiert. In Anlehnung an das Ausgangsprotokoll (Kaessler *et al.*, 2011) wurde eine Inkubationszeit von 90 min gewählt, da eine lineare Umsetzungsgeschwindigkeit innerhalb der ersten 4 Stunden der Reaktion beobachtet worden war. Zu Inkubationszeiten von 0 und 90 Minuten wurden Proben entnommen, die Zellen durch Zentrifugation entfernt, 25 µL von ihrem Überstand in die Kavernen einer Mikrotiterplatte überführt, mit „Stains-all“-

Lösung und Wasser versetzt. Die Absorption bei 650 nm wurde unverzüglich bestimmt. In Abbildung 9 ist die Absorption der jeweiligen Proben beider Stämme nach 0 und 90 Minuten Inkubation dargestellt. Die Bindung von „Stains-all“ an hochmolekulare HA resultiert in einem blauen Komplex, dessen Lichtabsorption bei 650 nm bestimmt werden konnte. Eine Abnahme in der Kettenlänge der HA durch enzymatische Aktivität führt zu einer Absorptionsabnahme. Wie aus der Abbildung 9 ersichtlich, zeigte der Überstand der Probe *E. coli* F470 pAK011 mit oberflächenständiger hPH-20 nach einer 90-minütigen Inkubation eine durchschnittliche Absorptionsabnahme von etwa 0,86 Einheiten. Dies betrug bei der Probe *E. coli* F470 pJM007 mit oberflächenständiger CtxB etwa 0,57 Einheiten. Allerdings war durch die hohen Standardabweichungen in den Proben nach 90min Inkubation eine signifikante Diskriminierung der beiden Proben nicht möglich und damit auch kein zuverlässiger Nachweis der Hyaluronidase-Aktivität gegeben.

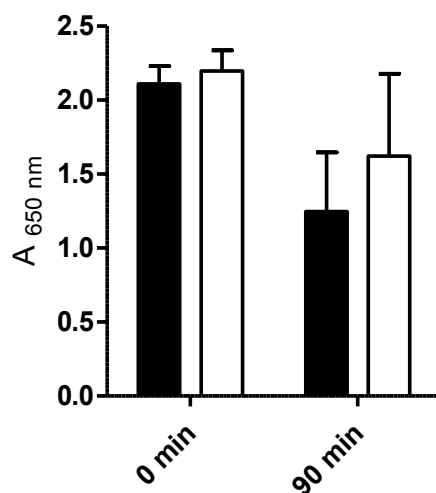


Abbildung 9: Testung von hPH-20 auf *E. coli* F470 bei pH 7 im „Stains-all“-Testverfahren. Die hPH-20 exprimierenden *E. coli* Zellen F470 pAK011 (schwarz) und CtxB exprimierenden *E. coli* Zellen F470 pJM007 (weiß) als Kontrollzellen wurden mit HA zu einer finalen OD₅₇₈ von 20 und finaler HA-Konzentration von 0,11 mg/mL versetzt. Die Probenentnahme erfolgte zu Messpunkten von 0 min und 90 min. Nach der Abtrennung der Zellen wurde der Überstand des Reaktionsansatzes sequentiell mit Stains-all-Lösung und Wasser versetzt und ihr Absorption bei 650 nm bestimmt. Dargestellt ist der durchschnittliche Absorptionswert der Proben von den jeweiligen Stämme zu den Messpunkten 0 und 90 Minuten (n=10, ± SD).

Das Ergebnis deutete darauf hin, dass die Anwesenheit der Zellen einen eindeutigen Reaktionsablauf zwischen „Stains-all“-Reagenz und HA stören könnten, da die Reaktionsüberstände der Kontrollzellen ebenfalls eine Absorptionsabnahme aufwiesen. Der Farbstoff „Stains-all“ erhielt seinen Namen, weil er neben sauren Polysacchariden auch DNA, RNA und Proteine mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima anfärbt (Dahlberg *et al.*, 1969). Die Farbbildung kann jedoch

durch pH-Wert beeinflusst werden. Dazu kommt, dass HA mit Elektrolyten und Proteinen einen nicht katalytischen Komplex bilden kann (Vincent und Lenormand, 2009) und damit für eine Komplexbildung mit „Stains-all“ nicht frei verfügbar bleibt. Dies könnte bei dem vorangegangenen Versuch ein Grund für die von der Hyaluronidase-Aktivität unabhängige Absorptionsabnahme der Proben liefern. Die Reaktionsüberstände konnten Elektrolyte und Proteine enthalten, die während der Inkubation von den Zellen als Stoffwechselprodukte freigesetzt wurden. Daher sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Reaktionsüberstände Proteine enthalten könnten und ob ihre Anwesenheit eine Quantifizierung der HA stören würde. Hierzu wurden Flüssigkulturen der Stämme *E. coli* F470 pAK011 und *E. coli* F470 pJM007 angelegt und für 16 Stunden bei 37 °C kultiviert. Die Kulturen wurden jeweils in 4 gleiche Teile geteilt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in Puffer (Formiat- und Phosphatpuffer) mit pH-Werten von 3,5; 5; 6 und 7 zu einer finalen OD₅₇₈ von 20 suspendiert und unter gleichen Bedingungen wie bei den vorangegangenen Testungen für 90 min inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert, ihr Überstand zellfrei filtriert (Porengröße 0,45 µm) und einer Acetonfällung unterzogen. Hierzu wurden sie mit dem fünffachen ihres Volumens mit eiskaltem Aceton versetzt und über Nacht bei -80 °C gelagert. Die ausgefallenen Proteine wurden sedimentiert und nach dem Dekantieren der Flüssigkeit 1:1 mit Proteinprobenpuffer versetzt. Die Proben wurden erhitzt und einer SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) unterzogen. Mit Coomassie-Lösung wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht und anschließend dokumentiert. In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass die bei saurem pH inkubierten Überstände der beiden *E. coli* Stämme deutlich weniger Proteine enthielten als die Zellüberstände, die bei schwachsaurem und neutralem pH-Wert inkubiert wurden. Möglicherweise resultieren diese Proteine aus einer höheren Stoffwechselaktivität der Zellen bei einem neutralen pH-Wert.

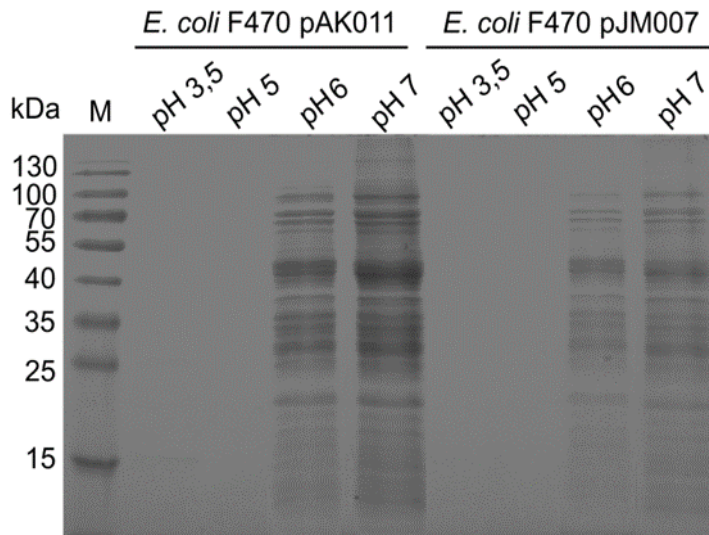


Abbildung 10: Proteinnachweis aus dem zellfreien Überstand von *E. coli* F470 pAK011 und F470 pJM007. Die Zellen wurden in Puffer verschiedener pH-Werte zu einer finalen OD_{578} von 20 aufgenommen, bei 37 °C für 90 min inkubiert und anschließend sedimentiert. Der Überstand wurde zellfrei filtriert und einer Acetonfällung unterzogen. Die ausgefallenen Proteine wurden sedimentiert und in Proteinprobenpuffer aufgenommen und abschließend via SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. M: Proteingrößenstandard.

Nachfolgend sollte der Einfluss von Proteinen auf Nachweis von HA mittels „Stains-all“ gefolgt werden. Als ein Proteinquelle wurden BSA-Lösungen (bovine serum albumin) verschiedener Konzentrationen gewählt und mit HA-Lösung (0,11 mg/mL) gemischt. Es wurden 25 μ L von jeder Mischung mit der „Stains-all“-Lösung und Wasser versetzt und ihre Absorption unverzüglich bestimmt. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, war eine Abnahme der Absorption mit einer zunehmenden BSA-Konzentration der Proben zu detektieren. Es blieb unklar, ob dies mit einer Interaktion zwischen BSA und „Stains-all“ korreliert oder mit einer Maskierung der HA durch BSA einhergeht. Zusammengefasst lässt sich anmerken, dass mit steigender Proteinkonzentration die Absorption abnahm, obwohl keine Hyaluronidase in den Ansätzen vorhanden war. Da aber die Bestimmung und Quantifizierung der Hyaluronidase-Aktivität mittels „Stains-All“-Methode auf einer Absorptionsabnahme über die Zeit beruht, kann festgehalten werden, dass diese Bestimmungsmethode durch Anwesenheit von anderen Proteinen konzentrationsabhängig gestört werden kann.

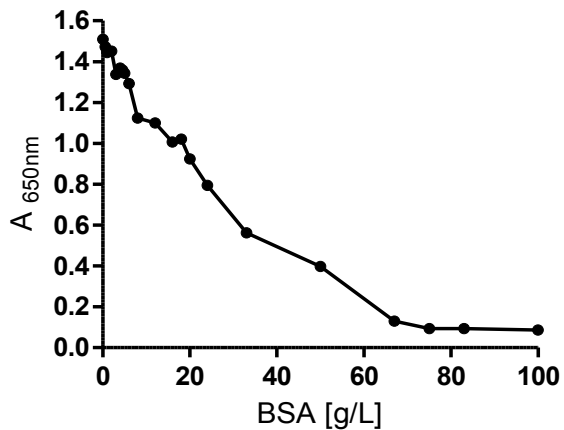


Abbildung 11: Absorption der HA-haltigen Proben in Abhängigkeit von BSA-Konzentration nach einer „Stains-all“-Färbung. Es wurden BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen mit HA-Lösung (Endkonzentration 0,11 mg/mL) gemischt. 25 µL von jeder Mischung wurde mit der „Stains-all“-Lösung und Wasser versetzt und ihre Absorption bei 650 nm unverzüglich bestimmt.

Es stellte sich die Frage, ob eine stärkere Absorptionsabnahme durch Erhöhung der Hyaluronidase-Menge der hPH-20 exprimierenden Zellen trotz Anwesenheit von Proteinen in den Reaktionsansätzen eine signifikante Differenzierung zu den Kontrollzellen erlauben würde. Frühere Arbeiten der Gruppe Jose zeigten, dass Genexpressionen unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors wie P_{TK} zu einer geringen Proteinbiosynthese führen können. Eine Expression der Autotransporter-hPH-20 reguliert durch diesen Promotor konnte nur durch eine empfindlichere Antigen-Antikörper-Reaktion im Western Blot nachgewiesen werden, während sie im SDS-Gel gefärbt mit Commassie Brilliant Blau nicht sichtbar war (Kaessler *et al.* 2011). Auch eine Präparation und Analyse der Proteine der äußeren Membran aus einer größeren Kulturmenge von *E. coli* F470 pAK011 und *E. coli* F470 pJM007 (120 mL statt protokollgemäß 40 mL) in dieser Arbeit bestätigte ebenfalls, dass das hPH-20-Fusionsprotein bei ca. 106 kDa nach einer Commassie-Färbung nicht nachweisbar ist (Abbildung 12, Spur 1). Interessanterweise war die Proteinbande des CtxB-Fusionsproteins (Kontrolle) bei ca. 59 kDa trotz der geringeren Gesamtproteinmenge der Probe deutlich zu erkennen (Abbildung 12, Spur 2). Die Proben zeigten auch Banden mit apparenten Molekulargewichten von 35-37 kDa. Es handelt sich dabei um die nativen Proteine der äußeren Membran von *E. coli*: OmpF (UniProt Code: P02931), OmpC (UniProt Code: P06996) und OmpA (UniProt Code: P0A910).

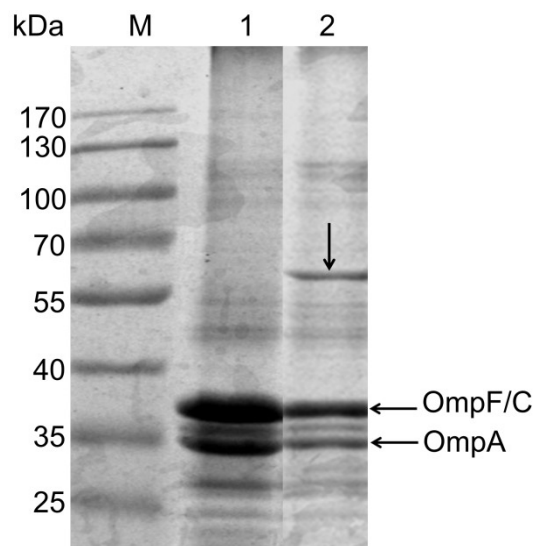


Abbildung 12: Anreicherung von Proteinen der äußeren Membran von *E. coli* F470 pAK011 und *E. coli* F470 pJM007. Dargestellt ist das Ergebnis einer SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung der Proteine. Spur 1: Membranproteine aus *E. coli* F470 pAK011 (codierend für Autotransporter-Fusionsprotein mit hPH-20 als Passagier). Spur 2: Membranproteine aus *E. coli* F470 pJM007 (codierend für Autotransporter-Fusionsprotein mit CtxB als Passagier). Der Pfeil zeigt die Proteinbande des CtxB-Fusionsproteins an. M: Protein-Größenstandard.

Die Vektor-DNA beider Plasmide, pAK011 und pJM007, ist bis auf ihre Passagierdomäne identisch aufgebaut. Folglich könnte die Menge des Fusionsproteins in beiden Membranprotein-Präparationen unter anderem durch die Eigenschaften des Passagiers bedingt sein. Die Hyaluronidase PH-20 ist ein Protein mit posttranslationalen Modifikationen wie z. B. Glykosylierung, Disulfidbrücken-Bindungen und GPI-Verankerung (GPI: Glykosylphosphatidylinositol). Ihr N-terminales Signalpeptid (SP) markiert den Weg zu den Zellkompartimenten, in denen diese Modifikationen stattfinden. Das Anhängen des GPI-Ankers geschieht am C-terminalen Ende des Proteins und hat die Aufgabe das Membranprotein an der Plasmamembran zu verankern. Die GPI-Anker-Erkennungssequenz der Proteine hat keine kanonische Sequenz, besitzt allerdings charakteristische Merkmale (Udenfriend und Kodukula, 1995). Die Aminosäure, an der der GPI-Anker verknüpft wird, weist immer eine kurze Seitenkette auf und ihr folgen C-terminal zuerst 5-10 hydrophile und anschließend 15-20 hydrophobe Aminosäuren. Nach dem Anhaften des GPI-Ankers werden diese C-terminalen Aminosäuren vom Polypeptid abgetrennt.

Anhand der Primärsequenz-Analyse der hPH-20 mit dem Programm „Kyte-Doolittle Hydropathy Plots“ wurden zwei Bereiche des Polypeptides mit überwiegend hydrophoben Eigenschaften identifiziert (Abbildung 13). Die erste Region

(Abbildung 13, Pfeil A) beinhaltet die Aminosäuren aus dem N-terminalen Signalpeptid (Aminosäuren 1-35), welche bereits bei Klonierungsarbeiten durch ein bakterielles Sec-Signalpeptid ersetzt wurden. Bei den C-terminal vorkommenden hydrophoben Aminosäuren (Abbildung 13, Pfeil B) handelt es sich sehr wahrscheinlich um die zur GPI-Anker-Erkennungssequenz gehörenden Aminosäuren. Die Aminosäure S490 (Nummerierung des Vorläuferproteins hPH-20) wird als potentieller GPI-Anker-Akzeptor angegeben (Uniprot code: P38567). Dies wurde durch eine weitere Analyse mit dem Programm SignalP-Server4.0 bestätigt.

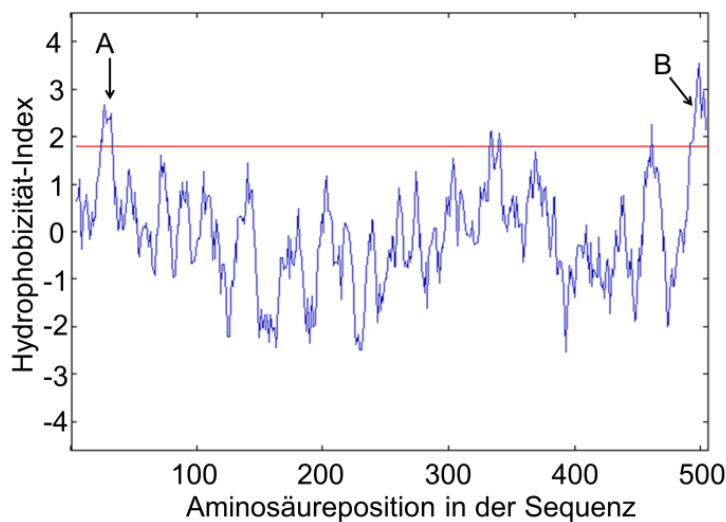


Abbildung 13: Hydrophobizitätsplot der hPH-20. Die Aminosäure-Nummerierung erfolgte nach der Primärsequenz des Vorläufer-Proteins. Die rote Linie kennzeichnet die Schwelle zu den Aminosäure-Bereichen mit überwiegend hydrophoben Eigenschaften. Pfeil A zeigt hydrophobe Bereiche der Aminosäuresequenz des eukaryotischen Signalpeptides an. Pfeil B zeigt hydrophobe Bereiche der GPI-Ankererkennungssequenz an.

Für weitere Arbeiten wurde die Passagierdomäne des hPH-20-Fusionsproteins um die auf S490 C-terminal folgenden Aminosäuren verkürzt. Damit sollte eine mögliche Einlagerung der C-terminalen Domäne in die innere Membran von *E. coli* während des Transportes verhindert werden. Die bakterielle innere Membran ist ähnlich wie die eukaryotische Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) aufgebaut. In eukaryotischen Zellen wird ein mit GPI-Anker zu verknüpfendes Protein in ER geleitet und bleibt mit seiner GPI-Ankererkennungssequenz zunächst in der ER-Membran verankert. Durch einen Transaminase-Komplex werden die Abspaltung dieser Sequenz und anschließend die Verknüpfung des GPI-Ankers an Protein katalysiert (Chen *et al.*, 1998) (Chen *et al.*, 1998). Daher wurde angenommen, dass sich die stark hydrophobe C-terminale Region des Proteins schon während des

Einschleusens des Fusionsproteins ins Periplasma in die innere Membran einlagern und einer Oberflächen-Präsentation des Passagiers entgegen wirken kann.

1.1.1 Autodisplay der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20

Die DNA-Sequenz der hPH-20 wurde mit den Oligonukleotiden AK004 und ZO01 und der Matrize pAK011 amplifiziert. Durch die verwendeten Oligonukleotide blieb die für den C terminale hydrophobe Domäne kodierende DNA-Sequenz vom Amplikon ausgeschlossen. Zusätzlich wurde das Amplikon am 5'-Ende mit der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease XhoI und am 3'-Ende mit der Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease KpnI versehen. Die Größe des Amplikons wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft und ergab eine korrekte Größe von 1.375 Basenpaaren. Das Amplikon und das Plasmid pAK011 wurden mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und KpnI behandelt und die resultierenden Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Das PCR-Produkt sowie das Vektorrückgrat von pAK011 mit der Größe von 4.393 Basenpaaren wurden aus dem Gel extrahiert und mit Hilfe von T4-DNA-Ligase verknüpft. *E. coli* DH5 α wurde mit dem resultierenden Plasmid pP_{TK}-ZO01 transformiert und kultiviert. Das Plasmid wurde aus diesen Zellen isoliert und einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Die Analyse belegte die korrekte Bildung des Leserahmens für das Autotransporter-Fusionsprotein ohne C terminale hydrophobe Domäne. Eine schematische Darstellung des Fusionsproteins ist in Abbildung 14 aufgezeigt.

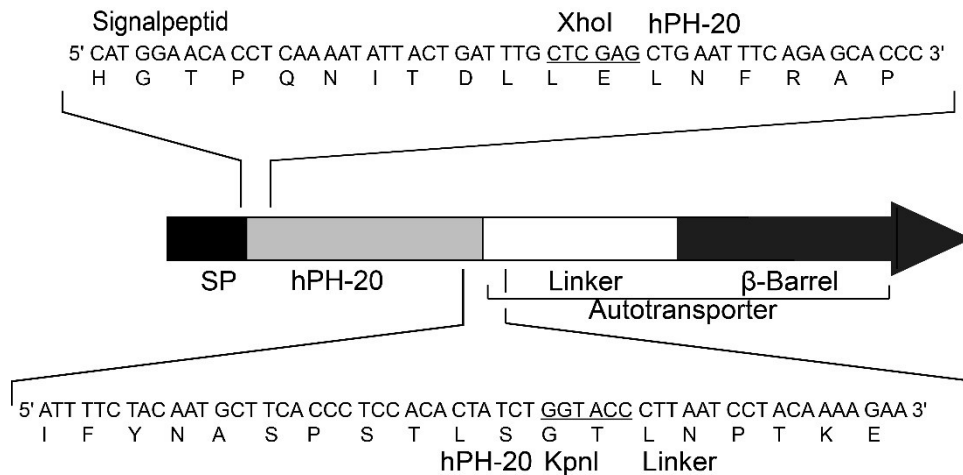


Abbildung 14: Schematische Darstellung des um die GPI-Ankererkennungssequenz verkürzten hPH-20-Fusionsproteins resultierend aus pP_{TK}-ZO01. Das Fusionsprotein besteht aus CtxB Signalpeptid (SP) (Maurer *et al.*, 1997), hPH-20 ohne GPI-Anker-Erkennungssequenz als Passagier des Autotransporters, sowie Linker und β -Fassdomäne des Autotransporters ALDA-I (Maurer *et al.*, 1997). Die Genexpression mittels dieses Plasmides wird von einem konstitutiven Promotor pP_{TK} reguliert.

E. coli F470 wurde mit pP_{TK}-ZO01 transformiert und für 16 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und die Proteine der äußeren Membran nach Zellaufschluss mittels differentieller Zellfraktionierung angereichert. Simultan wurden *E. coli* F470 pAK011 und *E. coli* F470 als Kontrollen kultiviert und identisch behandelt. Die erhaltenen Proteine der äußeren Membran wurden durch SDS-PAGE und anschließendes Anfärben mit Coomassie-Blau analysiert (Abbildung 15 A). Parallel wurden die Proben nach einer SDS-PAGE mittels Western Blot auf eine Membran transferiert und mit einem spezifischen hPH20 Antikörper versucht sichtbar zu machen (Abbildung 15 B). In den Spuren 1 bis 3 sind die angereicherten Proteine der äußeren Membran von *E. coli* F470 pP_{TK}-ZO01, *E. coli* F470 pAK011 und *E. coli* F470 gezeigt. Auf dem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 15 A) sind in allen Proben OmpF/C und OmpA gut zu erkennen. Die hPH-20-Fusionsproteine mit GPI-Ankererkennungssequenz (Spur 1) und ohne diese Sequenz (Spur 2) waren nur nach dem Immunoblot zu detektieren. Die nahezu gleiche Menge an aufgetrennten OmpA, OmpF/C in Spuren 1 und 2 (A) erlaubte einen direkten Vergleich der Menge an jeweiligen Autotransporter-Fusionsproteinen. In Spur 1 (B) ist eine Bande knapp oberhalb von 100 kDa zu sehen. Dieses Molekulargewicht entspricht dem des um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20-Fusionsprotein mit einem errechneten Molekulargewicht von ca. 104 kDa. In Spur 2 (B) ist eine weniger intensive Bande des Autotransporter-Fusionsproteins mit der nicht verkürzten hPH-20 als Passagier ebenfalls oberhalb von 100 kDa zu erkennen. Für dieses

Fusionsprotein wurde ein Gewicht von ca. 106 kDa berechnet. Der Unterschied zwischen den beiden Fusionsproteinen von 2 kDa ist auf dieser Abbildung nicht zu erkennen. Der Unterschied dürfte durch eine längere Trennung mittels SDS-PAGE sichtbar werden. In Spur 3 (B), Kontrollprobe, ist keine Bande oberhalb von 100 kDa vorhanden. Als Ergebnis bleibt festzustellen, dass mehr hPH-20-Fusionsprotein ohne die GPI-Anker-Erkennungssequenz in der angereicherten Außenmembran-Fraktion nachweisbar war. Dies bedeutet, dass die Deletion der GPI-Anker-Erkennungssequenz eine Oberflächenpräsentation sehr wahrscheinlich positiv beeinflusst hat. Deshalb wurden im Folgenden Hyaluronidase-Aktivitätsmessungen mit Zellen durchgeführt, die die verkürzte Variante der hPH-20 exprimierten. Außerdem ist die physiologische membranverankerte hPH-20 ebenfalls um die C-terminale GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzt und die Experimente in dieser Arbeit sollten dem natürlichen Protein nahe kommen.

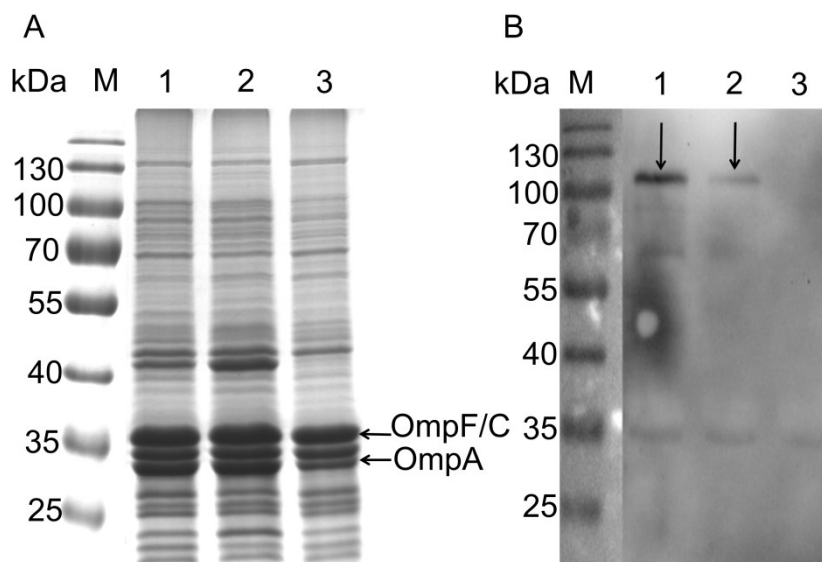


Abbildung 15: Nachweis der Expression beider hPH-20-Varianten als Passagiere der Autotransporter-Fusionsproteine. (A) SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der angereicherten Außenmembranproteine von *E. coli*. (B) Die mittels Zellfraktionierung angereicherten Außenmembranproteine wurden nach einer Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immunofärbung erfolgte durch sukzessives Behandeln der Membran mit einem murinen hPH-20-Antikörper und einem sekundären anti-Maus-IgG Antikörper, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Die Immunreaktion wurde durch Zugabe des ECL-Reagenzes sichtbar gemacht. Spur 1: Außenmembranprotein-Präparation von *E. coli* F470 p_{TK}-ZO01. Spur 2: Außenmembranprotein-Präparation von *E. coli* F470 pAK011. Spur 3: Außenmembranprotein-Präparation von *E. coli* F470. Die Pfeile zeigen die Proteinbanden von hPH-20-Fusionsprotein (Spur 1) und um die GPI-Ankererkennungssequenz verkürzten hPH-20-Fusionsprotein (Spur 2) an. M: Proteingrößenstandard.

E. coli F470 p_{TK}-ZO01 und *E. coli* F470 pJM007 wurden für 16 Stunden kultiviert und in McIlvaine Puffer pH 4,5 und 7 aufgenommen. Es ist aus der Literatur bekannt, dass hPH-20 sowohl bei pH 7 als auch bei pH 4,5 aktiv ist (Sabeur *et al.*, 1997). Die Zellsuspensionen wurden mit HA-Lösung versetzt (finale OD₅₇₈ = 20, HA

0,11 mg/mL). Zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 240 Minuten wurden aus dem Reaktionsansatz Proben entnommen und die Zellen abgetrennt. Der jeweilige Zellüberstand wurde mit der Farbstofflösung und Reinstwasser versetzt und seine Absorption bei 650 nm gemessen. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, nahm die durchschnittliche Absorption der Reaktionsüberstände von hPH-20-tragenden Zellen (schwarz) sowohl bei pH 4,5 (A) als auch bei pH 7 (B) ab. Die Absorptionsabnahme nach 240 min betrug 0,29 bei pH 4,5 und 0,52 bei pH 7. Jedoch waren die Absorptionswerte beim pH 7 mit höheren Standardabweichungen behaftet. Die Absorptionsdifferenzen zwischen Kontrolle und hPH-20-Proben sind ebenfalls dargestellt (Abbildung 16 C, D). Nach 240 min betrug diese Differenz 0,15 bei pH 4,5 (C) und 0,37 bei pH 7 (D). Bei beiden pH-Werten war dieses Messfenster, sehr klein und mit hohen Standardabweichungen behaftet. Diese Ergebnisse boten keine zuverlässige Basis zur Bestimmung des Hemmpotentials von Testsubstanzen und lieferten nur Hinweise auf die katalytische Aktivität der hPH-20-exprimierenden Zellen.

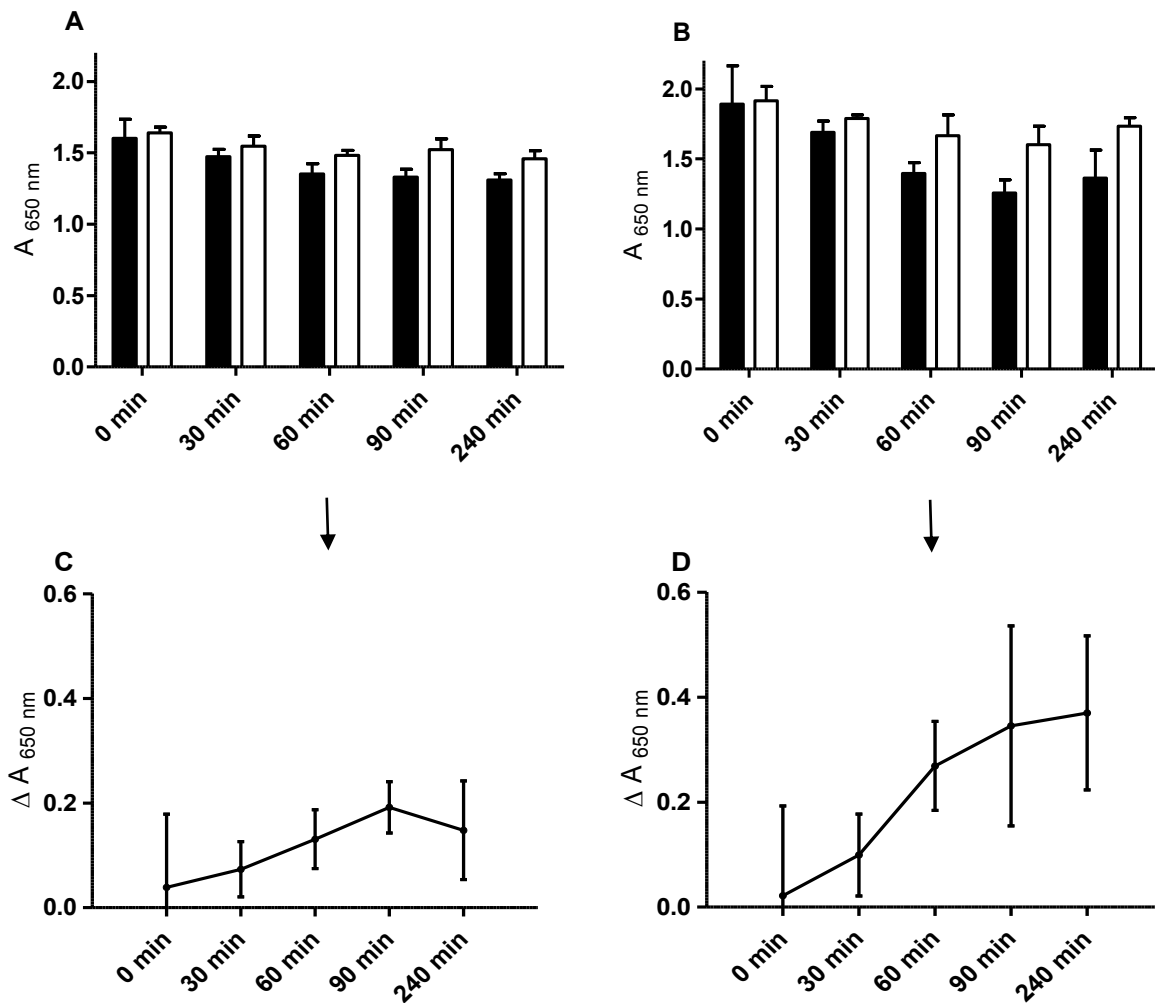


Abbildung 16: Testung von hPH-20 ohne C-terminale GPI-Anker-Erkennungssequenz exprimiert auf *E. coli* F470 pPTK-ZO01 bei pH 4,5 (A/C) und pH 7 (B/D). Die hPH-20 exprimierenden *E. coli* Zellen F470 pPTK-ZO01 (schwarz) und CtxB exprimierenden *E. coli* Zellen F470 pJM007 (weiß) als Kontrollzellen wurden mit HA zu einer finalen OD_{578} von 20 und finaler HA-Konzentration von 0,11 mg/mL versetzt und inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden Proben entnommen und die Zellen abgetrennt. Der Überstand des Reaktionsansatzes wurde sequentiell mit „Stains-all“-Lösung und Wasser versetzt und die Absorption bei 650 nm bestimmt. Dargestellt ist der durchschnittliche Absorptionswert der Proben von den jeweiligen Stämmen zu verschiedenen Messzeiten (A und B) und die Absorptionsdifferenz der Kontrollproben und hPH-20-Proben (C und D) ($n=4$, \pm SD).

Wie bereits erwähnt, wurde *E. coli* F470 aufgrund der verkürzten LPS (Abbildung 17) als Wirt zur Expression von Hyaluronidasen gewählt. Bei diesem Stamm sind jedoch die Zucker der Kernregion der LPS auf der Zelloberfläche noch vorhanden und könnten die oberflächenständigen Hyaluronidasen weiterhin hemmen. Daher wurde angenommen, dass durch ein vollständiges Fehlen der Zucker von Polysaccharidschicht und Kernregion auf der äußeren Membran eine mögliche Resthemmung der oberflächenständigen Hyaluronidasen vermieden und eine Erhöhung der Hyaluronidase-Aktivität erreicht werden kann. Aus diesem Grund wurde *E. coli* ClearColi BL21(DE3) als Wirt zur Expression der Autotransporter-

hPH-20 eingesetzt. Dieser Stamm weist mehrere Gendeletionen (*lpx*- und *kdo*-Gene) auf. Die Produkte dieser Gene sind für die Biosynthese der Polysaccharidschicht und Kernregion der LPS verantwortlich. Damit fehlen auf der Zelloberfläche nicht nur die Zuckermoleküle des O-Antigens, sondern auch die der Kernregion.

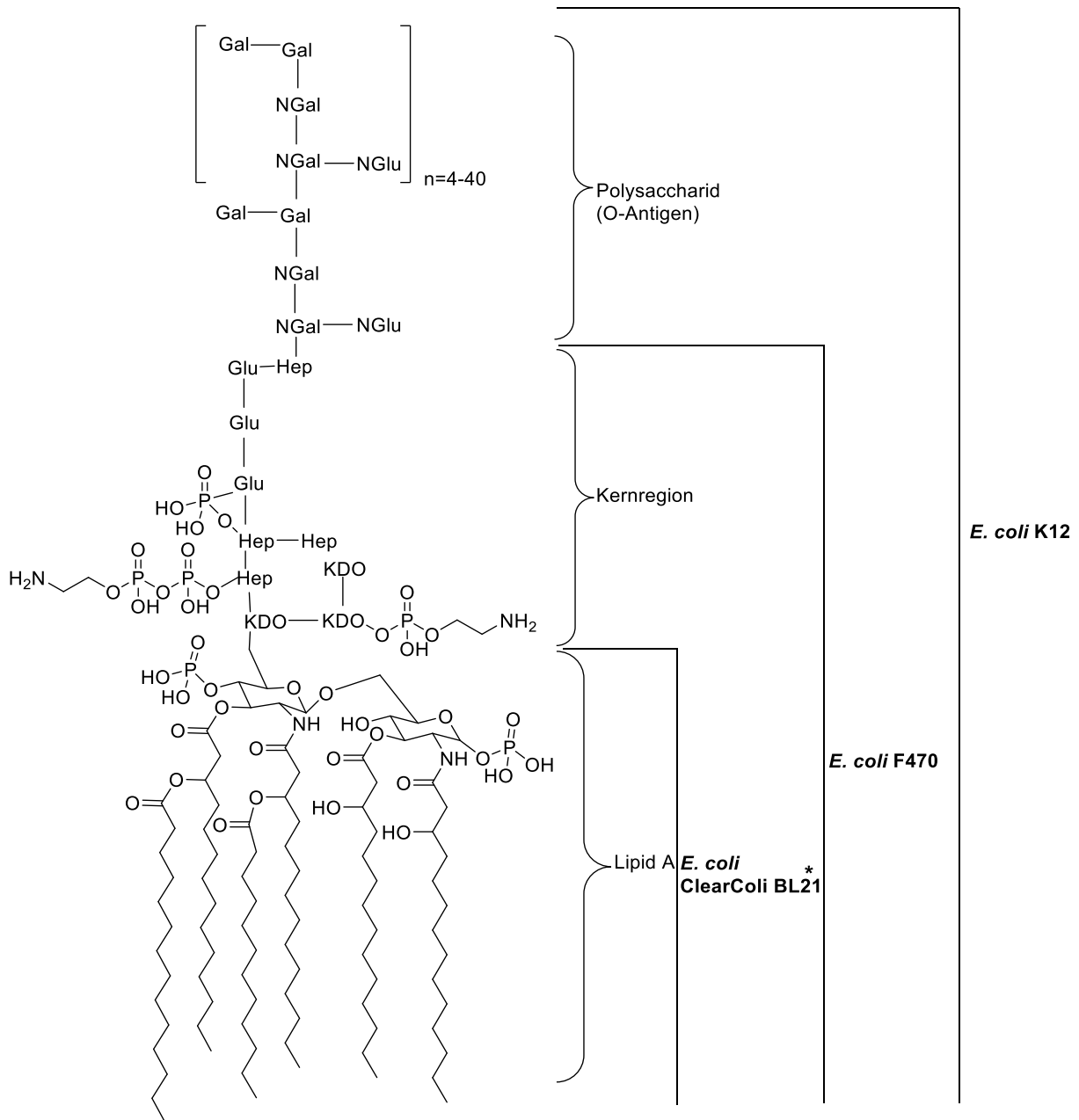


Abbildung 17: Schematischer Aufbau des LPS von *E. coli*. Die Art der Zucker kann sich je nach Stamm unterscheiden. Das normalerweise hexa-acetylierte Lipid A von *E. coli* beinhaltet bei ClearColi BL21 nur vier Acetylgruppen, was in dieser Abbildung nicht berücksichtigt ist*. Abbildung geändert nach (Ruiz *et al.*, 2009).

E. coli ClearColi BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pP_{TK}-ZO01 transformiert und kultiviert. Die Proteine der äußeren Membran wurden durch differentielle Zellfraktionierung angereichert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit

Coomassie-Blau angefärbt (Abbildung 18, Spur 2). Als Vergleich wurden die Proteine der äußeren Membran des Wirtstammes ohne Plasmid analysiert (Spur 1). In der Außenmembranprotein-Präparation von *E. coli* ClearColi BL21(DE3)pP_{TK}-ZO01 war eine Bande knapp oberhalb von 100 kDa zu erkennen (Spur 2). Diese Proteinbande könnte vom um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20-Fusionsprotein mit einer errechneten Größe von ca. 104 kDa stammen. Die Kontrollprobe zeigte ebenfalls eine Bande knapp oberhalb von 100 kDa (Spur 1). Damit konnte keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein des hPH-20-Fusionsproteins in der Außenmembran-Fraktion getroffen werden.

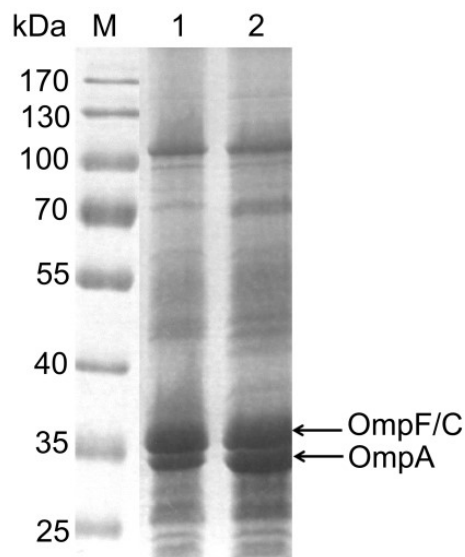


Abbildung 18: Kontrolle der Expression der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20 als Passagier vom Autotransporter-Fusionsprotein in *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pP_{TK}-ZO01. Mittels Zellfraktionierung angereicherte Außenmembranproteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Spur 1: Angereicherte Außenmembranproteine des Wirtstammes *E. coli* ClearColi BL21(DE3). Spur 2: Angereicherte Außenmembranproteine von *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pP_{TK}-ZO01; M: Proteingrößenstandard.

Aufgrund den zuvor beschriebenen Erkenntnissen über die geringe Proteinmenge bei einer konstitutiven Expression wurde *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pP_{TK}-ZO01 auch ohne eine eindeutige Bande des Fusionsproteins auf dem SDS-Polyacrylamidgel einer Aktivitätsbestimmung mittels „Stains-all“-Verfahren unterzogen. Dieser Stamm wurde über Nacht kultiviert und nach Zellernte in dem McIlvaine Puffer pH 4,5 und 7 aufgenommen. Nach Zugabe von HA-Lösung wurde eine finale OD₅₇₈ von 20 mit einer HA-Konzentration von 0,11 mg/mL erreicht. Diese Zellsuspension wurde für die Dauer von insgesamt 240 min inkubiert. Zu verschiedenen Inkubationszeiten wurden Proben entnommen, die Zellen

sedimentiert und der Überstand in der Mikrotiterplatte mit dem „Stains-all“-Reagenz und Wasser versetzt. Der Wirtstamm diente dabei als Kontrolle für das Ausmaß der möglichen Störfaktoren, die allein durch die Zellen entstehen. Abbildung 19 zeigt der Absorptionsverlauf bei 650 nm, der zu den unterschiedlichen Zeitpunkten aus den Reaktionsüberständen beider Zellkulturen (mit und ohne hPH-20) gemessen wurde. Die Absorptionsabnahme der Proben mit den oberflächenständigen hPH-20 nach 240 min betrug 0,31 bei pH 4,5 (A). Die Kontrollproben zeigten dabei eine Absorptionsabnahme von 0,05. Bei pH 7 wurde eine Abnahme von 0,66 Einheiten bei hPH-20-Proben und 0,39 bei den Kontrollproben gemessen (B). Die Absorptionsdifferenzen zwischen Kontrolle und hPH-20-Proben zu jedem Zeitpunkt sind ebenfalls dargestellt (C und D). Nach 240 min Inkubation betrug sie 0,24 bei pH 4,5 (C) und 0,29 bei pH 7 (D). Diese Werte waren teilweise mit großen Standardabweichungen behaftet. Aus Abbildung C und D ist ersichtlich, dass das Messfenster sehr klein war. Damit waren diese Zellen mit oberflächenständigen hPH-20 im Hinblick auf Testung von Substanzen ungeeignet.

Als Nächstes sollte der Einfluss einer stärkeren Expression des Fusionsgenes, reguliert durch den *araBAD*-Promotor, auf die enzymatische Aktivität der *E. coli* Zellen mit oberflächenständiger hPH-20 untersucht werden. Dadurch sollte die Menge an hPH-20-Fusionsprotein auf der Zelloberfläche gesteigert werden und damit verbunden eine gesteigerte Enzymaktivität erzielt werden.

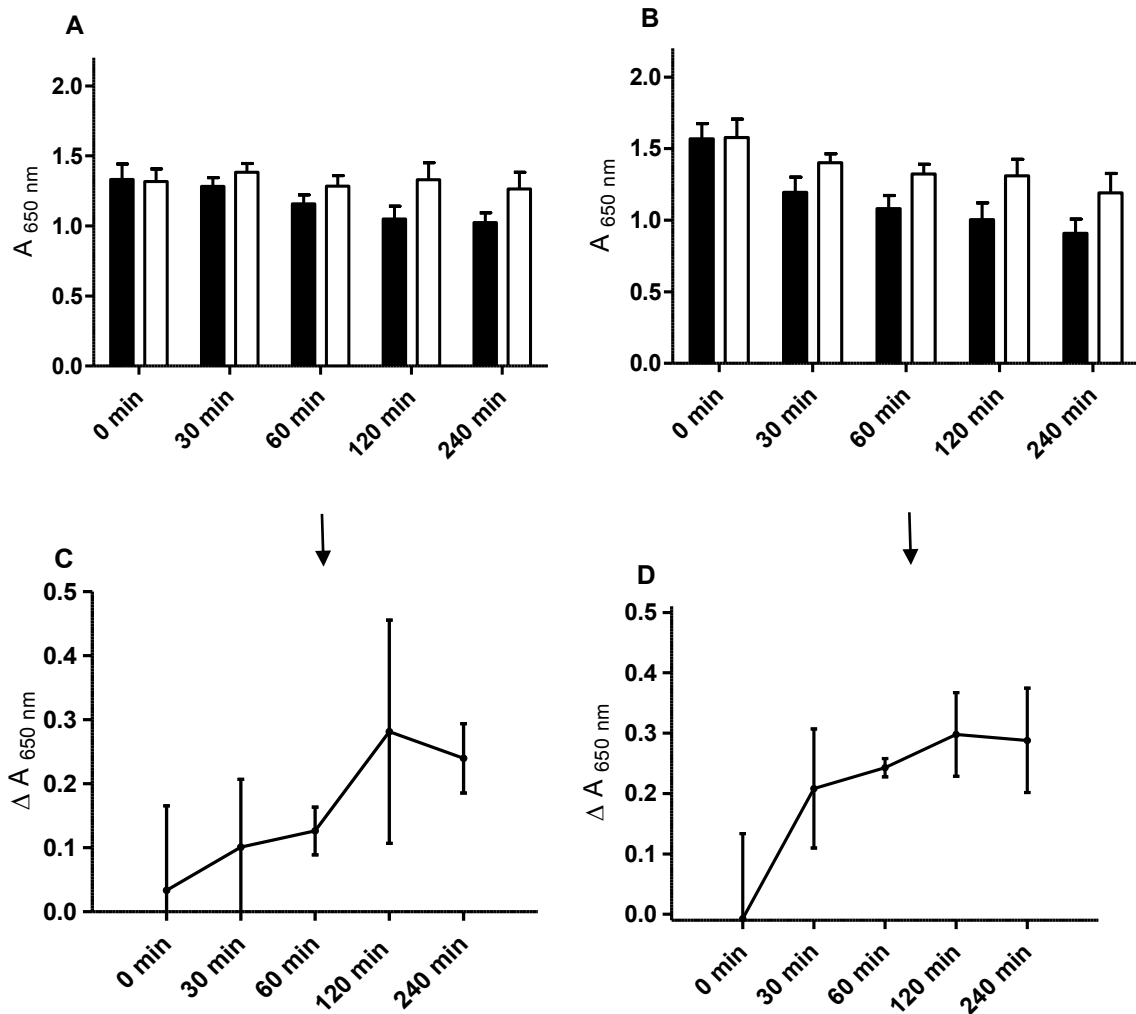


Abbildung 19: Testung von hPH-20 ohne C-terminale GPI-Anker-Erkennungssequenz exprimiert auf *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pPTK-ZO01 bei pH 4,5 (A/C) und pH 7 (B/D). Die hPH-20 exprimierenden *E. coli* Zellen ClearColi BL21(DE3) pPTK-ZO01 (schwarz) und der reine Stamm *E. coli* ClearColi BL21(DE3) (weiß) als Kontrollzellen wurden mit HA zu einer finalen OD₅₇₈ von 20 und finaler HA-Konzentration von 0,11 mg/mL versetzt und inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden Proben entnommen und die Zellen abgetrennt. Der Überstand des Reaktionsansatzes wurde nacheinander mit „Stains-all“-Lösung und Wasser versetzt und die Absorption bei 650 nm bestimmt. Dargestellt sind die durchschnittlichen Absorptionswerte der Proben von den jeweiligen Stämme zu verschiedenen Messzeiten (A und B) und die Absorptionsunterschied zwischen Kontrollen und hPH-20-Proben zu der jeweiligen Inkubationszeit (C und D) (n=3, ± SD).

1.2 Autodisplay und Aktivitätsuntersuchungen der hPH-20 nach einer *araBAD*-Promotor kontrollierten Expression

Das Plasmid pPTK-ZO01 wurde mit Endonukleasen XhoI und KpnI behandelt. Durch Agarosegelelektrophorese wurde das codierende DNA-Fragment der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20 (1.375 bp) vom Vektorrückgrat (4.393 bp) getrennt. Dieses Insert wurde aus dem Gel extrahiert, mittels T4-DNA-Ligase mit dem ebenfalls XhoI/KpnI-behandelten Autodisplayplasmid pBAD-AT (AT: Autotransporter ohne Passagier) ligiert und in chemischkompetente *E. coli* Stellar-

Zellen eingebracht. Eine anschließende Plasmidisolierung und Restriktionskontrolle des Plasmides mittels Agarosegelelektrophorese lieferten korrekte Banden des Inserts (1.375 bp) und des Vektorrückgrates (5.441 bp). Das konstruierte Plasmid enthielt ein Autotransporter-Fusionsgen der C-terminal verkürzten hPH-20 mit einer Größe von 2.790 bp und wurde im Folgenden als pBAD-ZO02 bezeichnet (Abbildung 20).

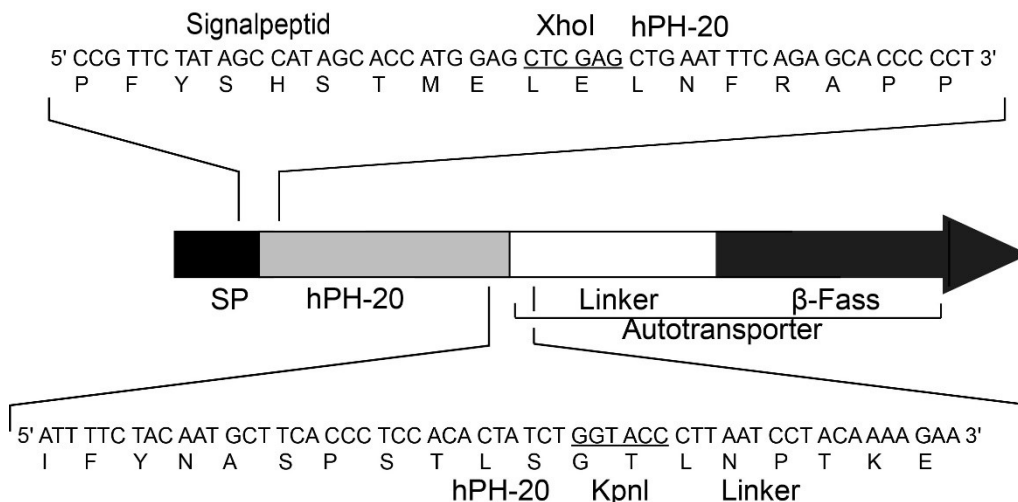


Abbildung 20: Schematische Darstellung des hPH-20-Fusionsproteins resultierend aus pBAD-ZO02. Das Fusionsprotein besteht aus Gene III Signalpeptid (SP) (Rapoza und Webster, 1993), hPH-20 ohne GPI-Anker-Erkennungssequenz als Passagier des Autotransporters, sowie Linker und β -Fassdomäne des Autotransporters AIDA-I. Die Genexpression wird vom *araBAD*-Promotor reguliert.

Zu Autodisplay und Aktivitätsbestimmungen der C-terminal verkürzten hPH-20 wurde *E. coli* ClearColi BL21(DE3) mit dem Plasmid pBAD-ZO02 transformiert und kultiviert. Eine Hauptkultur des Stammes wurde angelegt und die Expression des um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20-Fusionsproteins durch Zugabe von 0,2 % Arabinose für 4 Stunden induziert. Diese Kultur wurde in zwei gleiche Teile geteilt und ihre Bakterienzellen geerntet. Die intakten Zellen aus einem Kulturteil wurden mit Proteinase K behandelt. Anschließend wurden Außenmembranproteine beider Teile angereichert und nach Auftrennung durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 21, Spur 2 und 3). Der Wirtstamm *E. coli* ClearColi BL21(DE3) wurde ebenfalls kultiviert und seine angereicherten Außenmembranproteine als Kontrolle analysiert (Abbildung 20, Spur 1). Die Präparation der Außenmembranproteine von *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02 zeigte eine dominante Bande knapp oberhalb von 100 kDa (Spur 2). Diese Bande in der Präparation der Außenmembranproteine aus gleichen Zellen jedoch mit einer Proteinase K-

Behandlung war stark reduziert (Spur 3). Die Kontrollprobe wies keine dominante Bande bei diesem Molekulargewicht auf.

Die Proteinbande bei einem apparenten Molekulargewicht von 104 kDa stimmte mit der errechneten Größe des hPH-20-Fusionsprotein überein, welche eine korrekte Expression des Fusionsproteins durch das Vorhandensein des Plasmides pBAD-ZO02 belegte (Spur 2). Nach der Ganzzell-Behandlung mit Proteinase K (Spur 3) war diese Bande reduziert. Bedingt durch ihre Größe ist Proteinase K nicht in der Lage, die äußere Zellmembran zu überwinden. Folglich können bei intakten Zellen mit unversehrter Integrität der äußeren Membran nur die vom Außen zugänglichen Proteine proteolytisch abgebaut werden. Dabei kann die Bande des Außenmembranproteins OmpA auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel als Reporter für die Bewertung der Integrität der äußeren Zellmembran herangezogen werden. OmpA besitzt eine Protease-sensitive C-terminale Domäne im Periplasma. Bei einer gestörten Integrität der äußeren Membran von *E. coli* wird auch diese Domäne während einer Proteinase K-Behandlung proteolytisch gespalten, das eine Reduktion oder ein Verschwinden der Proteinbande bei ca. 35 kDa zur Folge hat. Wie aus Abbildung 21, Spur 3 ersichtlich, konnte OmpA in seiner vollen Größe nachgewiesen werden. Dies belegte die Unversehrtheit der äußeren Membran. Die Reduktion der Proteinbande bei ca. 104 kDa nach der Proteinase K-Behandlung wies die Oberflächenständigkeit der C-terminal verkürzten hPH-20 als Autodisplay-Passagier auf *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02 nach. Die untersuchte Bande war jedoch nicht vollständig verschwunden. Dies könnte aus einer unzureichenden Proteinase-Aktivität resultiert sein.

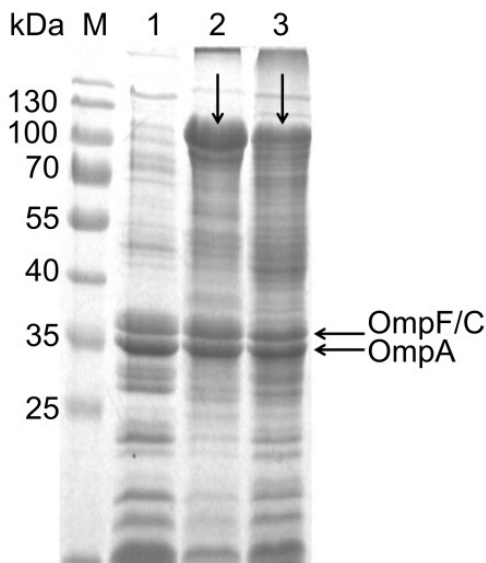


Abbildung 21: Nachweis der Oberflächenständigkeit des Autotransporter-Fusionsproteins der um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20 in *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02. Mittels Zellfraktionierung angereicherte Außenmembranproteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Spur 1: Angereicherte Außenmembranproteine des Wirtstammes *E. coli* ClearColi BL21(DE3). Spur 2: Angereicherte Außenmembranproteine von *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02. Spur 3: Angereicherte Außenmembranproteine von *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02 nach einer vorangegangenen Behandlung der Zellen mit Proteinase K. Die Pfeile zeigen die Proteinbanden von hPH-20-Fusionsprotein in Proben ohne Proteinase K-Behandlung (Spur 2) und nach einer Proteinase K-Behandlung (Spur 3) an. M: Proteingrößenstandard.

Analog zum Vorgehen mit *E. coli* ClearColi BL21(DE3) p_{TK}-ZO01 wurde *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02 einer Hyaluronidase-Aktivitätsbestimmung mittels „Stains-all“-Farbstoffes unterzogen. Als Kontrolle für den Ausschluss der Störfaktoren durch bakterielle Zellen wurde *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-AT parallel untersucht. Dieser Stamm exprimiert ein Autotransporter-Fusionsprotein ohne Passagier. Die Zellen wurden kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von 0,2 % Arabinose induziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in McIlvaine Puffer pH7 aufgenommen. Der Test startete durch Zugabe von HA-Lösung. Im Unterschied zu vorangegangenen Testungen wurde die Reaktionszeit auf 20 Stunden verlängert. Es wurden mehrere Proben nach vorgesehenen Zeiten entnommen, die nach einer Trennung der Zellen in eine Mikrotiterplatte überführt und mit „Stains-all“-Reagenz und abschließend Reinstwasser versetzt wurden. Die aufgenommenen Absorptionswerte sind in Abbildung 22 A dargestellt. Die Reaktionsüberstände der Zellen *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02 zeigten eine stetige Absorptionsabnahme über die Zeit. Diese Abnahme betrug nach 120 min 0,75 und nach 20 h 1,09 Einheiten. Auch die Kontrollproben wiesen eine Absorptionsabnahme auf (□). Dies erreichte nach 120 min 0,22 und nach 20 h 0,76

Einheiten. In Abbildung 22 B ist die Differenz der Absorptionswerte der Kontrollproben und hPH-20-Proben zu der jeweiligen Inkubationszeit dargestellt. Diese Differenz erreichte nach 20 h einen Wert von 0,82, zeigte allerdings eine hohe Standardabweichung.

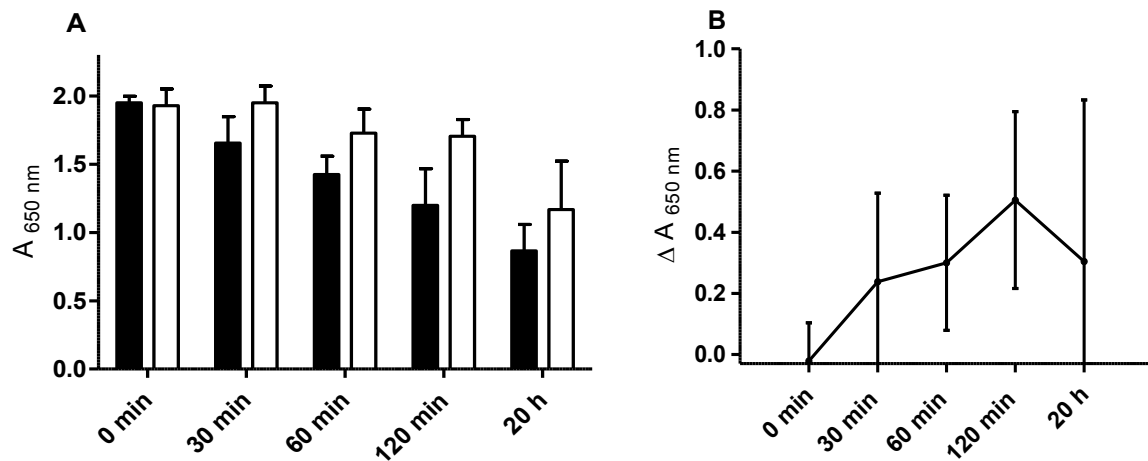


Abbildung 22: Testung von hPH-20 ohne C-terminale GPI-Anker-Erkennungssequenz exprimiert auf *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02 bei pH 7. Die hPH-20 exprimierenden *E. coli* Zellen ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02 (■) und der Stamm *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-AT (□) als Kontrolle wurden mit HA zu einer finalen OD_{578} von 20 und finaler HA-Konzentration von 0,11 mg/mL versetzt und inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden Proben entnommen und die Zellen abgetrennt. Der Überstand des Reaktionsansatzes wurde nacheinander mit „Stains-all“-Lösung und Wasser versetzt und die Absorption bei 650 nm bestimmt. Dargestellt sind die durchschnittlichen Absorptionswerte der Proben von den jeweiligen Stämmen zu verschiedenen Messzeiten (A) und die Absorptionsdifferenz zwischen Kontrollproben und hPH-20-Proben (B) ($n=4$, \pm SD).

Der hPH-20-Aktivitätstest mittels *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pBAD-ZO02 und ClearColi BL21(DE3) pBAD-AT lieferte ein ähnliches Ergebnis analog zu den vorangegangenen Aktivitätsbestimmungen. Eine Erhöhung der hPH-20-Menge auf der Zelloberfläche führte nicht zu einem signifikanten Unterschied in der Absorptionsabnahme verglichen zu den Kontrollproben. Eine eindeutige Quantifizierung der Absorptionsabnahme hervorgerufen durch reine Hyaluronidase-Aktivität war durch hohe Standardabweichungen der Absorptionswerte der Proben nicht möglich. Die während des Testverfahrens von *E. coli* sekretierten Stoffwechselprodukte bzw. die durch spontane Zellyse freigewordenen bakteriellen Zellbestandteile könnten vermutlich für das inhärente „Hintergrundrauschen“ der Proben verantwortlich sein. Insgesamt lieferten die Ergebnisse Hinweise auf eine geringe Hyaluronidase-Aktivität der hPH-20 exprimierenden *E. coli* Zellen. Allerdings war nicht immer ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollproben und hPH-20-Proben vorhanden. Zusammengefasst lässt sich anmerken, dass hPH-20-tragende Zellen keine zuverlässige Basis für Testung von Substanzen lieferten.

Neben *E. coli* F470 und *E. coli* ClearColi BL21(DE3) wurden andere Stämme ohne Modifikationen in LPS-Schicht (BL21, Rosetta, JK321) zur Expression der Autotransporter-hPH-20 eingesetzt. *E. coli* BL21 ist ein Expressionsstamm, der häufig zur Produktion von rekombinanten Proteinen in Laboratorien eingesetzt wird. *E. coli* Rosetta ist ein Derivat von BL21 und wurde zur Verbesserung der Expression von eukaryotischen Genen konstruiert, die für *E. coli* seltene Codons enthalten. In diesem Stamm sind tRNA bereitgestellt, die normalerweise in *E. coli* rar vorkommen. Weiterhin wurde ein DsbA-negativer Stamm *E. coli* JK321 zur Expression von hPH-20-Fusionsprotein verwendet. DsbA ist eine Disulfidoxidoreduktase und erleichtert die Formation von Disulfidbrückenbindungen der Proteine im Periplasma. Durch Einsatz dieses Stammes sollte eine vorzeitige Faltung des hPH-20-Fusionsproteins im Periplasma verhindert und seine Translokation auf die Zelloberfläche gefördert werden. Durch diese Versuche sollte eine größere Anzahl an hPH-20 auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Aber auch hier konnte trotz einer Oberflächenpräsentation der hPH-20 nur lediglich von einer Tendenz der Hyaluronidase-Aktivität gesprochen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die Ergebnisse mit dem Stamm *E. coli* ClearColi BL21(DE3) einerseits und LPS-haltigen Stämmen andererseits keine deutliche Steigerung bzw. Abnahme der Hyaluronidase-Aktivität zeigten, scheint ein kausaler Zusammenhang zwischen LPS und geringer Hyaluronidase-Aktivität der *E. coli* Zellen mit oberflächenständiger hPH-20 nicht sehr wahrscheinlich. In Folgendem wurden weitere Versuche durchgeführt, um hPH-20 in eine aktivere Form in *E. coli* zu produzieren.

2 Intrazelluläre Expression der hPH-20

Ein weiterer Zugang zu hPH-20 stellt die intrazelluläre Expression und anschließende Isolierung des Enzymes dar. Anhand der bis heute vorhandenen Publikationen ist bekannt, dass eine intrazelluläre Expression der Hyaluronidasen in *E. coli* nur inaktives Protein in Form von Einschlusskörperchen liefert. Eine Expression in eukaryotischen Zellen führt zum funktionellen Enzym, ist allerdings zeit- und kostenaufwendig (Jung *et al.*, 2010, Hofinger *et al.*, 2007b). Die Bildung von Einschlusskörperchen ist unter anderen eine Folge der Fehlfaltung der Proteine (Lottspeich und Engels, 2006). *E. coli* BL21 Origami(DE3) ist so konstruiert, dass das Zytoplasma aufgrund einer Defizienz in Glutathion- und Thioredoxin-Reduktase

veränderte Redoxbedingungen aufweist und eine Oxidation von Thiol-Gruppen zu Disulfidbrücken erlaubt. Zu diesem Zweck wurde versucht, die um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzte hPH-20 in diesem Stamm zu exprimieren. Zur Stabilisierung der Tertiärstruktur erfolgte die Expression in Gegenwart des chemischen Chaperons Glycinbetain (Leibly *et al.*, 2012).

Der Versuch, intrazellulär exprimierte hPH-20 zu isolieren, wurde mittels IMAC (immobilized-metal affinity chromatography) durchgeführt. Als Säulenmaterial wurde Ni-NTA (Nickel-Nitriloessigsäure) verwendet. Für eine stärkere Interaktion mit dieser Matrize sollte das Zielprotein mit einer Aminosäuresequenz bestehend aus 6 Histidinen C- bzw. N-terminal versehen werden. Die Konstruktion des Plasmids zur intrazellulären Expression der hPH-20 erfolgte mittels „In-Fusion HD EcoDry Cloning Kit“. Dieser Reagenziensatz ermöglicht ein Ligation-unabhängiges Klonieren durch Rekombination von PCR-Produkten. Die zur Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte benötigten Nukleotide werden so generiert, dass sich die Enden des Inserts und Zielvektors in ihren Sequenzen überlappen, und durch die Reagenzien des „In-Fusion“ Kits miteinander verknüpft werden. Die kodierende DNA-Sequenz der hPH-20 wurde mit Oligonukleotiden ZO11, ZO12 und der Matrize pBAD-ZO02 amplifiziert. Das Vektorrückgrat wurde mit den Oligonukleotiden ZO09, ZO10 sowie der Matrize pET-11d-His amplifiziert und entsprechend der Herstellerangaben miteinander verknüpft. Dieser Ansatz wurde in den Stamm *E. coli* Stellar eingebracht. Eine anschließende Plasmidisolierung aus dem Transformanden lieferte das Plasmid pET-11d-His-ZO05. Eine DNA-Sequenzanalyse bestätigte die angestrebte Basenfolge in einem offenen Leserahmen. *E. coli* Origami(DE3) wurde mit diesem Plasmid transformiert und kultiviert.

2.1 Aufreinigung und Untersuchung der intrazellulär exprimierten hPH-20

Eine Flüssigkultur des Stammes *E. coli* Origami(DE3) pET-11d-His-ZO05 wurde angelegt und die Proteinexpression nach Erreichen einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,6 durch Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) für die Dauer von 6 Stunden induziert. Die Zellen wurden geerntet und in Lysepuffer, supplementiert mit Proteaseinhibitoren und Lysozym, unter Zuhilfenahme von Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer sedimentiert und der Überstand auf eine mit Ni-NTA-Material befüllte Säule gegeben. Nicht bindende Proteine wurden aus der Säule gewaschen und die Elution der mit „His-tag“

versehenem hPH-20 mittels Imidazol-Lösungen steigender Konzentration (25, 50, 100 und 500 mM, keine Proteinbande in der letzten Fraktion, Ergebnis nicht gezeigt) begonnen. Die Proteine der Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Zum einen wurden sie durch Coomassie-Blau-Färbung und zum anderen durch Immunfärbung untersucht. Nach Anfärben mit Coomassie-Blau waren viele Proteinbanden schwacher Intensität auf dem SDS-Polyacrylamidgel zusehen (Abbildung 23 A). Die hPH-20-Proteinbande in den Fraktionen mit einem errechneten Molekulargewicht von ca. 56,8 kDa wurde erst eindeutig durch eine Immunfärbung unter Verwendung von spezifischen anti-His-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 23 B). Dieses Ergebnis deutete auf geringe verfügbare Menge an löslichen hPH-20 in den Fraktionen hin.

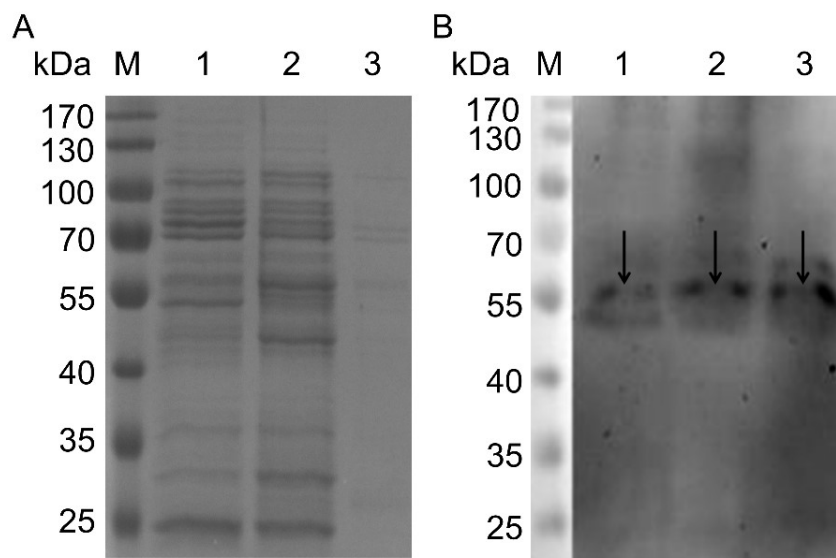


Abbildung 23: Überprüfen der Isolierung von „His-getagten“ hPH-20 nach einer intrazellulären Expression in *E. coli* BL21 Origami(DE3) pET-11d-His-ZO05. (A) SDS-PAGE und anschließendes Anfärben der Proteine mit Coomassie-Blau. (B) Immunfärbung von hPH-20 mit einer His-tag-Modifikation. Die Immunfärbung erfolgte mittels monoklonalem murinen Anti-6xHis Antikörper und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem anti-Maus-IgG-Antikörper unter Verwendung des ECL-Reagenzes. Spur 1: Elutionsfraktion mit 25 mM Imidazol. Spur 2 Elutionsfraktion mit 50 mM Imidazol. Spur 3: Elutionsfraktion mit 100 mM Imidazol. Die Pfeile zeigen die Proteinbanden von mit einem His-Tag modifizierter hPH-20 an. M: Proteingrößenstandard.

Die Fraktionen wurden gegen McIlvaine Puffer pH 4,5 und 7 dialysiert und untersucht. Da die Proben sehr heterogen zusammengesetzt waren, war eine Quantifizierung der hPH-20 mittels gängiger Verfahren, wie z. B. Bradford-Bestimmung, nicht möglich. Daher wurde die Konzentration der hPH-20 durch Absorptionsbestimmung bei 280 nm unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten der mit „His-tag“ modifizierten hPH-20 näherungsweise bestimmt. Diese betrug 32-38 µg/mL. Die Enzymlösungen wurden mit dem Substrat versetzt und einem Aktivitätstest mittels „Stains-all“-Verfahren unterzogen. In

Abbildung 24 ist das Ergebnis des Aktivitätstestes aus der Fraktion mit 100 mM Imidazol nach der Dialyse exemplarisch dargestellt. Wie in der Abbildung zu sehen ist, war während der gesamten Inkubationszeit keine Absorptionsabnahme zu registrieren. Damit konnte kein HA-Abbau in dieser Fraktion nachgewiesen werden. Auch mittels anderen Fraktionen wurde keine Hyaluronidase-Aktivität nachgewiesen.

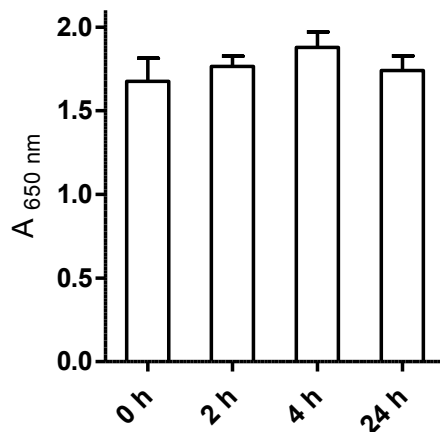


Abbildung 24: Testung der katalytischen Aktivität der mittels IMAC isolierten „His-getagten“ hPH-20 im „Stains-all“-Verfahren. Nach einer intrazellulären Expression in *E. coli* BL21 Origami(DE3) wurde die „His-getagte“ hPH-20 mittels IMAC isoliert und durch Imidazol-Lösung aus der Säule eluiert. Die verschiedenen Fraktionen dienten als Enzymquelle und wurden nach einer Dialyse einem Aktivitätstest unterzogen. Dargestellt ist der Mittelwert der Absorption erzeugt durch die Proteinlösung aus der Fraktion 100 mM Imidazol im „Stains-all“-Verfahren zu verschiedenen Messzeiten ($n=4$, \pm SD).

3 Autodisplay der hPH-20 in *E. coli* JC8031

Die Expression von hPH-20 als Teil eines Autotransporter-Fusionsproteins in *E. coli* JC8031 bietet den Vorteil, dieses Enzym in einer membrangebundener Form zellfrei anzureichern. Damit bleiben die Testungen von metabolischen Einflüssen aus *E. coli* ausgeschlossen. *E. coli* JC8031 trägt eine Mutation im Gen *tol/RA*, und ist damit zu einer Hypervesikulation befähigt (Bernadac *et al.*, 1998). Vesikulation ist eine allgemeine Eigenschaft Gram-negativer Bakterien. Sie vermittelt Kolonisation, Überleben, Virulenz, Transformation, Biofilmbildung und –erhaltung. Innerhalb des Periplasmas befindet sich eine dünne, starre Peptidoglykanschicht, die mittels membranverankerten Proteinen, wie zum Beispiel Braun’s Lipoproteinen und Proteinen aus dem Tol-Pal-Komplex, mit beiden Membranen verbunden ist (Kulp und Kuehn, 2010). Eine Mutation in Genen solcher Proteine bewirkt eine höhere Fluidität der äußeren Membran und begünstigt die Freisetzung von Außenmembran-Vesikeln (AMV). Die Vesikulation kann auch durch eine Überexpression und Akkumulation von

periplasmatischen Proteinen gefördert werden (McBroom und Kuehn, 2007). Von diesen Erkenntnissen ausgehend wurde *E. coli* JC8031 mit Autodisplay-Plasmiden zur Expression der hPH-20 transformiert und kultiviert. Nach der Induktion der Proteinexpression sollten die AMV das hPH-20-Fusionsprotein tragen (Abbildung 24). Diese wurden im Folgenden angereichert und untersucht.

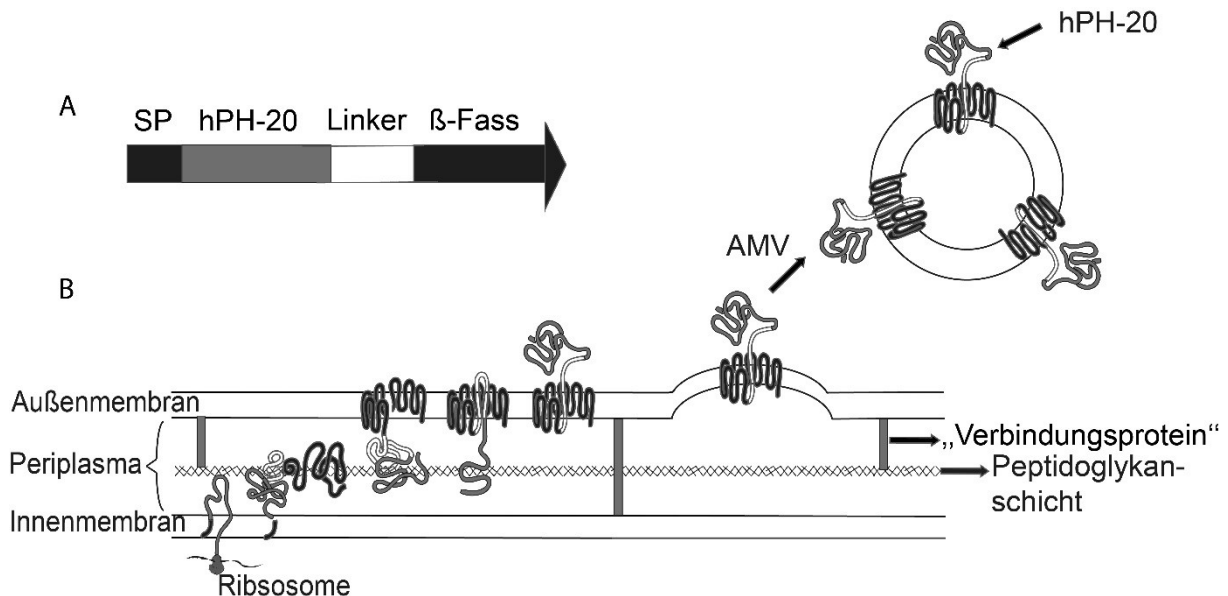


Abbildung 25: Vereinfachte schematische Darstellung des Autodisplay-Systems in Verbindung mit bakterieller Vesikulation. (A) Aufbau des Autotransporter-Fusionsproteins mit hPH-20 als Passagier. **(B)** Postulierter Sekretionsmechanismus des Autotransporter-Fusionsproteins auf die bakterielle Zelloberfläche und damit einhergehend auf die Oberfläche von AMV.

3.1 Charakterisierung der hPH-20-tragenden Außenmembran-Vesikeln (AMV)

E. coli JC8031 wurde mit dem Plasmid pBAD-ZO02 bzw. pBAD-AT (Kontrollstamm) transformiert und kultiviert. Eine Flüssigkultur dieser Stämme wurde angelegt und die Proteinexpression bei einer OD_{578} von 0,4-0,5 bei 37 °C für die Dauer von 6 Stunden induziert. Nach einer Abtrennung der Zellen wurde der Zellüberstand beider Kulturen steril filtriert und die im Filtrat enthaltene AMV mittels Hochgeschwindigkeit-Zentrifugation sedimentiert. Die AMV wurden in SDS-Proteinprobenpuffer aufgenommen und ihre Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran immobilisiert. Mit einer anschließenden Immunreaktion unter Verwendung eines spezifischen anti-hPH-20-Antikörpers wurde das Vorhandensein des um die GPI-Anker-Erkennungssequenz verkürzten hPH-20-Fusionsproteins in AMV untersucht. Dabei wurde die Membran zunächst mit einem polyklonalen, murinen anti-hPH-20-Antikörper und im Anschluss mit einem Maus

IgG-Antikörper behandelt, der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Nach Zugabe von ECL-Reagenz wurde die Chemilumineszenz detektiert. Die AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 zeigten eine Proteinbande bei ca. 100 kDa (Abbildung 26, Spur 1). Die Kontroll-AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-AT wiesen nach der Immunfärbung keine Proteinbande auf (Spur 2). Die Bande in Spur 1 knapp oberhalb von 100 kDa entsprach dem Molekulargewicht des prozessierten Autotransporter-Fusionsproteins mit einem errechneten Gewicht von 104 kDa. Ein Autotransporter-Protein wird als prozessiert bezeichnet, wenn sein Signalpeptid nach der Translokation ins Periplasma durch Signalpeptidasen vom Rest des Proteins abgetrennt wird. Knapp oberhalb dieser Bande wurde ein weiteres Signal detektiert. Dabei könnte es sich um eine unprozessierte Form des Fusionsproteins (ca. 107 kDa) handeln. Die Kontroll-AMV zeigten keine unspezifischen Kreuzreaktionen mit dem eingesetzten Antikörper. Damit wurde das Vorkommen vom hPH-20-Fusionsprotein in den AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 belegt.

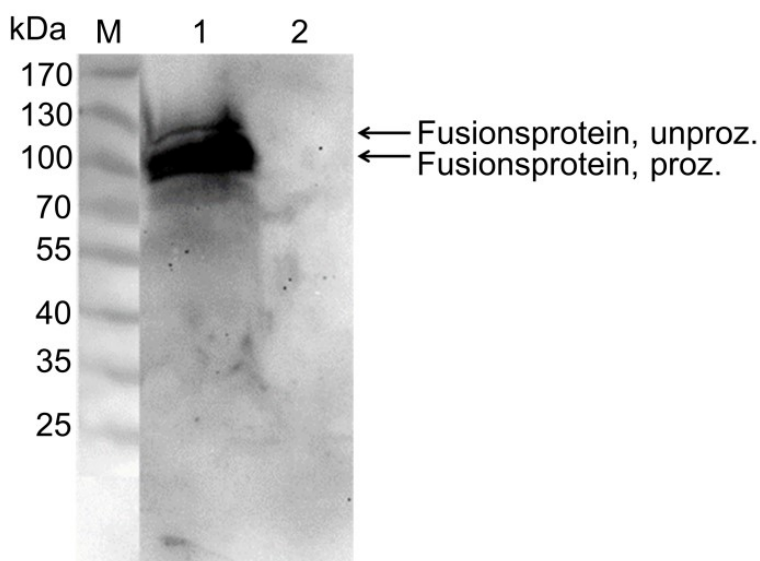


Abbildung 26: Immunologischer Nachweis vom Autotransporter-Fusionsprotein mit hPH-20 als Passagier in AMV. Das Anfärben des gesuchten Proteins erfolgte durch die Inkubation der Trägermembran mit polyklonalem murinen anti-hPH-20 Antikörper und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem anti-Maus IgG Antikörper unter Verwendung des ECL-Reagenzes. Spur 1: AMV angereichert aus dem Stamm *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02. Spur 2: AMV angereichert aus dem Stamm *E. coli* JC8031 pBAD-AT als Kontrolle. Bei dem prozessierten Fusionsprotein ist das Signalpeptid nach der Translokation ins Periplasma vom Rest des Proteins abgetrennt. Das unprozessierte Fusionsprotein enthält das Signalpeptid. M: Proteingrößenstandard.

Dieses Experiment belegte die Anwesenheit der hPH-20 in den AMV, gab allerdings keinen Aufschluss über den Aufenthaltsort der Passagierdomäne. Falls sich hPH-20 an der Oberfläche der Vesikeln befinden würde, sollte diese Oberfläche, verglichen mit der Oberfläche der Vesikeln mit hPH-20-Fusionsprotein, andere Eigenschaften aufweisen. AMV können als Teilchen in einer Suspension angesehen werden. Die

negative Ladung der Biomembran von AMV wird durch die positiven Gegenionen aus der Suspension neutralisiert. Mit steigender Distanz zur Oberfläche der AMV weisen weitere Gegenionen eine lockere Anordnung auf bis das Teilchen nach Außen eine Neutrale Ladung trägt. Diese lockere Anordnung der Ionen wird als diffuse Schicht bezeichnet. Bei einem bewegten Teilchen wird ein Teil dieser Schicht abgetragen und das Teilchen bekommt ein Potential. Als Zeta-Potential wird die Potentialdifferenz zwischen der Neutralzone und der Scherebene um die Teilchen bezeichnet. Das Zeta-Potential von Partikeln kann durch die Messung ihrer Beweglichkeit bzw. Schnelligkeit in einem elektrischen Feld bestimmt werden. Die Oberfläche von AMV kann wie Moleküle und Partikel ebenfalls ein Zeta-Potential aufweisen, wenn sie mit Flüssigkeiten in Kontakt kommen, die Ionen enthalten. Die native Oberfläche von AMV sollte, wie erwartet für eine Biomembran, eine negative Gesamtladung zeigen. Diese kann durch die Präsentation eines Autotransporter-Passagiers beeinflusst werden. Die humane Hyaluronidase hPH-20 (ohne die Erkennungssequenz für GPI-Anker) besitzt einen isoelektrischen Punkt von 4,8. Bei einem pH-Wert unterhalb von 4,8 zeigt hPH-20 eine positive Gesamtladung. Eine negative Nettoladung zeigt sie bei pH-Werten oberhalb von 4,8. Basierend auf diesen Kenntnissen wurden die AMV der Stämme *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 und *E. coli* JC8031 pBAD-AT angereichert, in 10 mM NaCl-Lösung pH 7 aufgenommen und einer Bestimmung des Zeta-Potentials unterzogen. Zu diesem Zweck wurden die Proben jeweils in eine Zelle zwischen zwei Elektroden des Kombigerätes „Zetasizer Nano“ angebracht. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes kam es zur Elektroosmose zwischen den Elektroden. Die Schnelligkeit der Partikeln war dabei proportional zu deren Zeta-Potential und zur angelegten Feldstärke. Auf Basis der elektrophoretischen Mobilität, gemessen durch einen Laser Doppler, wurde das Zeta-Potential kalkuliert. Die resultierenden Histogramme sind in Abbildung 27 dargestellt. Das durchschnittliche Zeta-Potential betrug -58,5 mV für hPH-20-tragende AMV (Abbildung 27 A) und -47,1 mV für die Kontroll-AMV (Abbildung 27 B). Damit war das durchschnittliche Zeta-Potential der hPH-20-tragenden AMV um 11,4 mV negativer als das Zeta-Potential der Kontroll-AMV. Die Kontroll-AMV enthielten bedingt durch das Plasmid pBAD-AT alle Domänen des Autotransporter-Fusionsproteins, mit Ausnahme der Passagier-Domäne. Dieses Ergebnis liefert einen ersten Hinweis für die Oberflächenständigkeit der Passagierdomäne der hPH-20-tragenden AMV. Berücksichtigt man, dass die Vesikulation bereits zum Beginn der Kultivierung

stattfindet, dürfte der Potentialunterschied von 11,4 mV unter anderen Anzuchtbedingungen stärker ausfallen. Wie oben erwähnt, wurden die *E. coli* Zellen erst bis einer OD_{578} von 0,4-0,5 kultiviert, bevor die Proteinexpression induziert wurde. Das bedeutet, dass die Proben auch AMV ohne hPH-20-Fusionsprotein enthalten, die während der Anzucht bis OD_{578} von 0,5 freigesetzt wurden. Diese nativen AMV dürften sich in ihrem Zeta-Potential kaum von den Kontroll-AMV ohne hPH-20 auf der Oberfläche unterscheiden. Dies könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung für die breitere Verteilung im Histogramm der hPH-20-tragenden AMV (Abbildung 27 A) sein.

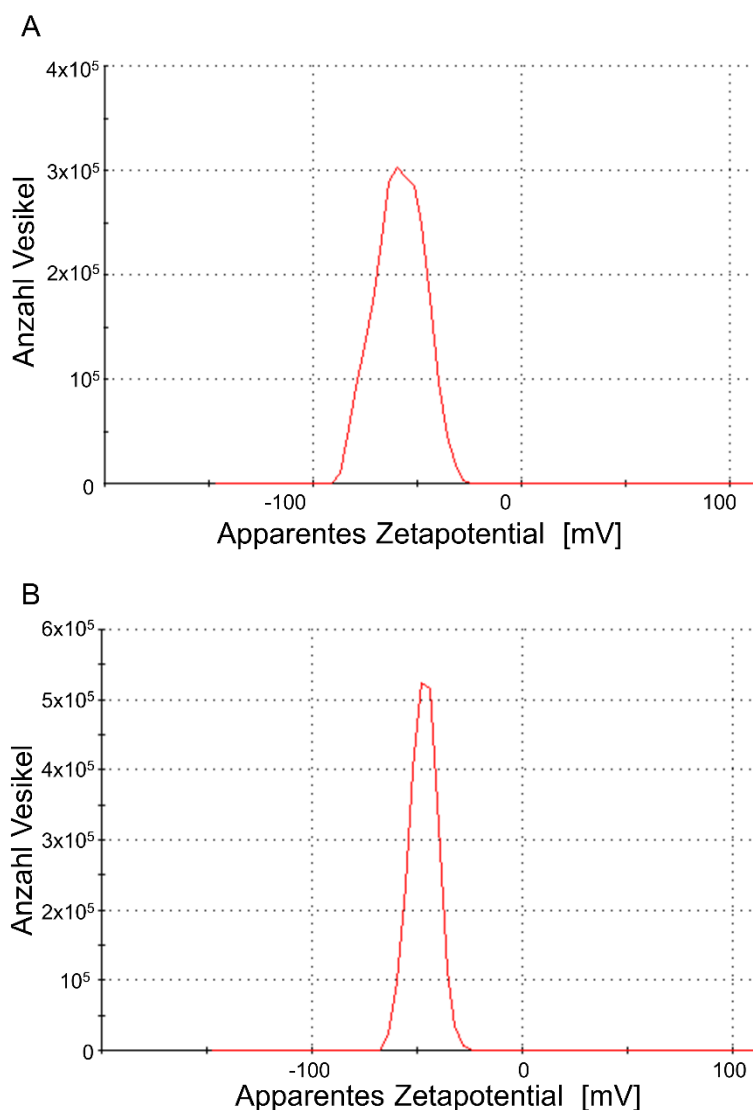


Abbildung 27: Bestimmung des Zetapotentials der AMV angereichert aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 (A) und *E. coli* JC8031 pBAD-AT (Kontrolle)(B). Das Zetapotential wurde auf Basis der Partikelmobilität im elektrischen Feld kalkuliert. Als Elektrolyt wurde 10 mM NaCl-Lösung pH 7 verwendet. Der isoelektrische Punkt von hPH-20 ohne die GPI-Anker-Erkennungssequenz beträgt 4,8.

Mit Hilfe des Kombigerätes „Malvern Zetasizer Nano“ konnte ebenfalls die Größe der AMV bestimmt werden. Dies sollte eine zellfreie Präparation der AMV belegen. Dispersierte Partikel (kleiner als 5 μm) in einer Flüssigkeit sind in ständiger thermaler Bewegung (Brownsche Molekularbewegung). Dabei diffundieren kleinere Partikel schneller als die größeren. Dieses Prinzip wurde zur Bestimmung der Partikelgröße eingesetzt. Dabei wurden die angereicherten AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 in einer 10 mM NaCl-Lösung aufgenommen, in eine Küvette gegeben und im Gerät platziert. Die Probe wurde mit einem Laser bestrahlt, der abhängig von der Partikelgröße streute. Die fluktuierende Intensität der Lichtstreuung wurde durch einen Detektor aufgenommen. Die Analyse der gemessenen Intensität der Lichtstreuung lieferte den gemittelten hydrodynamischen Radius der AMV. Dieser betrug ca. 100 nm mit einer Größenverteilung von 15 bis 250 nm (Abbildung 28). Das war damit mit der angegebenen Partikelgröße für AMV in der Literatur konform (Kim *et al.*, 2008). Im zugehörigen Histogramm sind keine Signale oberhalb von 1 μm aufgezeichnet. Dies schließt *E. coli* mit einer durchschnittlichen Länge von 2 μm im Probenansatz aus.

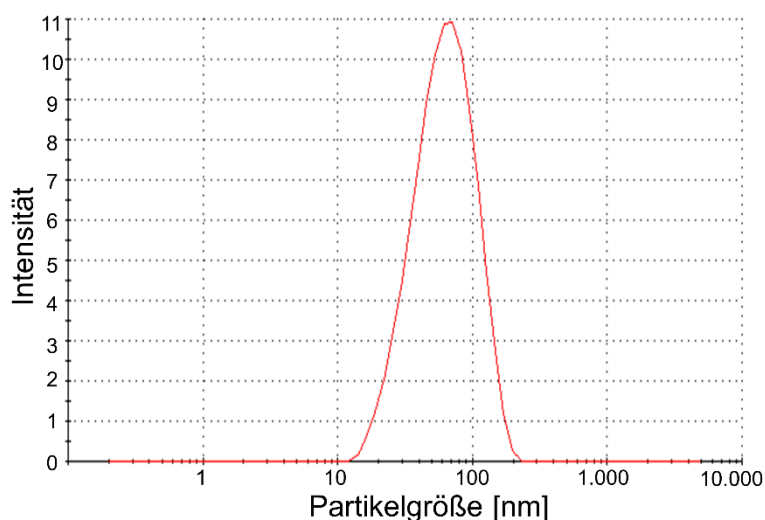


Abbildung 28: Bestimmung der gemittelten hydrodynamischen Partikelgröße der AMV angereichert aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02. Die AMV wurden in einem elektrischen Feld in Bewegung gebracht und mit Laser bestrahlt. Dargestellt ist das Histogramm der resultierenden Intensität der Lichtstreuung in Abhängigkeit der Partikelgröße.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den untersuchten Partikeln um AMV handelt, wurden die Vesikulation und die anschließend angereicherten AMV elektronenmikroskopisch untersucht. Im Verlauf der Experimente wurde beobachtet, dass aus dem Stamm *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 mehr AMV gewonnen werden konnte als

aus dem Wirtstamm. Es sollte auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen untersucht werden, ob die Bildung der AMV durch die Expression von Autodisplay-Fusionsproteinen gefördert wird.

Es wurden Kulturen von *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02, *E. coli* UT5600 pBAD-ZO02 und *E. coli* JC8031 ohne Plasmid angelegt. Nachdem eine OD_{578} von 0,4 erreicht wurde, wurden die Zellen geerntet und gründlich mit steril filtriertem PBS gewaschen. Damit sollte gewährleistet werden, dass die Proben keine Verunreinigungen aus dem LB-Medium enthielten. Anschließend wurden sie in sterilem PBS ($OD_{578} = 0,4$) suspendiert. Es wurde unmittelbar aus der PBS-Kultur des Stammes JC8031 pBAD-ZO02 eine Probe entnommen und mit der Fixierlösung versetzt. Diese Glutaraldehyd-haltige Lösung führt zur Polymerisierung der Proteine, das zum „Fixieren“ der Zelle in ihrem Zustand führt. Die restlichen Kulturen wurden mit 0,2 % Arabinose zur Proteinbiosynthese versetzt und für die Dauer von einer Stunde bei 30 °C inkubiert. Nach Ablauf der Induktionszeit wurden Proben aus jeder Kultur mit der Fixierlösung versetzt. Eine weitere Flüssigkultur des Stammes *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 wurde zur Gewinnung der AMV inkubiert. Nach 6 Stunden Induktion der Proteinexpression wurden die AMV aus dem zellfreien Medium mittels Hochgeschwindigkeit-Zentrifugation sedimentiert. Das Sediment wurde in PBS aufgenommen und mit der Fixierlösung versetzt. In Abbildung 28 A-E sind die elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proben dargestellt. Es konnte bei allen Zellproben ein Abschnüren der AMV dokumentiert werden (B-D). Die AMV waren durch einfaches Waschen von der Zellenoberfläche entfernt (A). Die sphärischen AMV zeigte eine durchschnittliche Größe von 100 nm (E). Im Vergleich zum $\Delta to/RA$ -Mutante (B) setzte *E. coli* UT5600 (D) wesentlich weniger AMV frei, da seine äußere Membran stärker mit der Peptidoglykanschicht und innere Membran verbrückt ist. Es konnte kein aussagekräftiger Vergleich der Vesikulationstendenz der Stämme *E. coli* JC8031 (ohne Plasmid) (C) und JC8031 pBAD-ZO02 (Autodisplay-Plasmid) (B) getroffen werden. Da Elektronenmikroskopie keine geeignete Methode zur Quantifizierung der Vesikulation darstellte, wurden die Trockenmassen der AMV aus *E. coli* JC8031 und JC8031 pBAD-ZO02 bestimmt. Beide Stämme wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und ihre AMV angereichert. 100 μ L der Suspensionen wurden getrocknet und anschließend ihre Masse bestimmt. Diese Bestimmung bestätigte die Beobachtung, dass die Expression des Autoporter-

Fusionsproteins die Vesikulation fördert. Die Masse der AMV aus dem Stamm mit dem Autodisplay-Plasmid war 17 % höher als die des Wirtstamms.

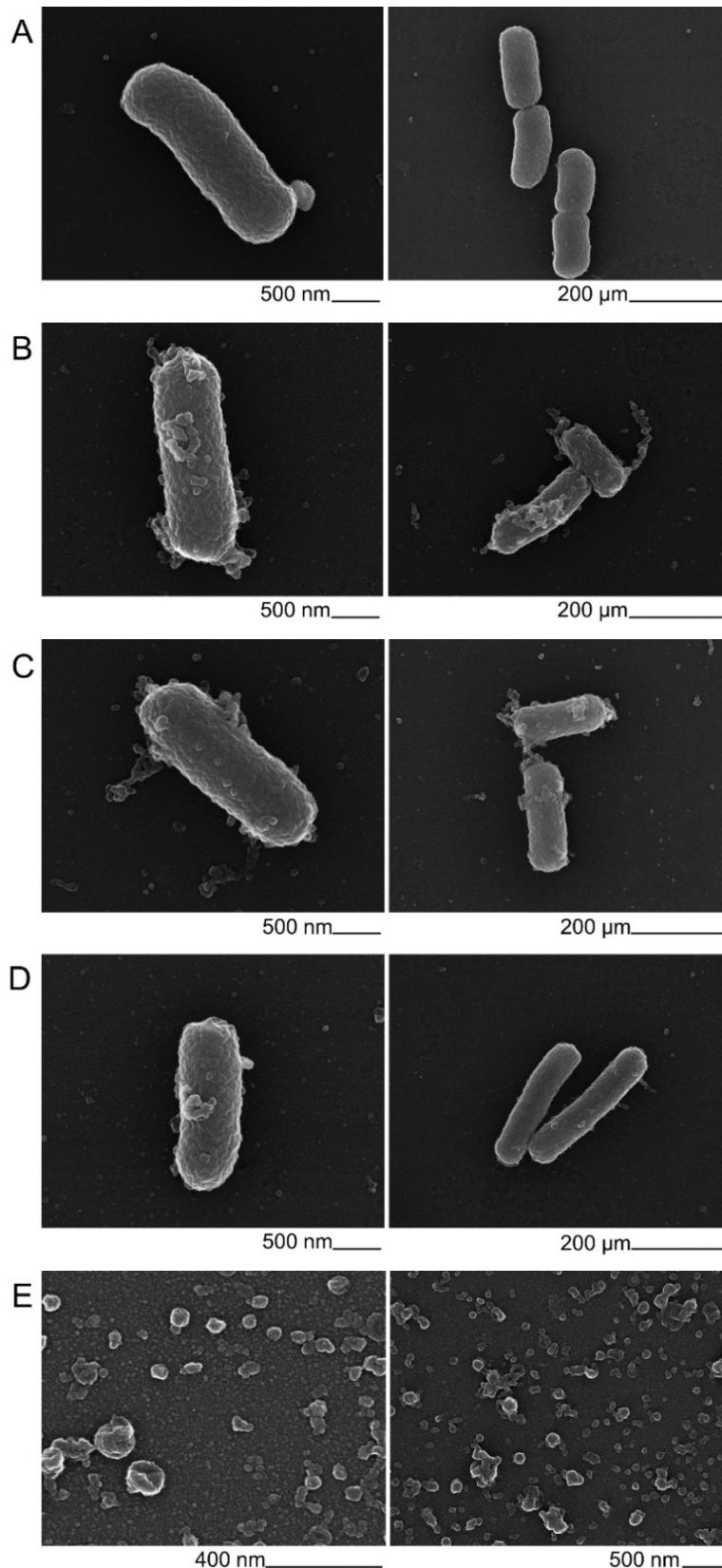


Abbildung 29: Elektronenmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der Vesikulation. Die bakteriellen Zellen wurden in PBS + Arabinose aufgenommen und bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden sie durch Zugabe von Glutaraldehyd-haltiger Lösung fixiert. AMV angereichert aus einer LB-Flüssigkultur wurden ebenfalls untersucht. **(A)** *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 nach einem Waschschrift vor Induktion. **(B)** *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 nach 1 Stunde Induktion im PBS. **(C)** *E. coli* JC8031 nach 1 Stunde Inkubation im PBS. **(D)** *E. coli* UT5600 pBAD-ZO02 nach 1 Stunde Induktion im PBS. **(E)** AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 nach 6 Stunden Induktion.

Bevor die AMV als Enzymquelle für Autotransporter-hPH-20 in Aktivitätstestungen eingesetzt wurden, sollte untersucht werden, inwieweit die Präparationen Komponenten aus verschiedenen Zellkompartimenten beinhalten. Für diese und weitere Experimente wurden Plasmide eingesetzt, die Gene mit vorgeschaltetem T7-Promotor enthielten. Eine Genexpression unter Kontrolle des T7-Promotors benötigt die T7-RNA-Polymerase. Da dieses Enzym kein natives Protein aus *E. coli* darstellt, wurde eine „DE3-Kassette“ mit Hilfe von „ λ DE3 Lysogenization Kit“ in das Genom von *E. coli* JC8031 integriert. λ DE3 ist eine rekombinante Phage, die das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle von *lacUV5* trägt. Um die Integration von λ DE3 in den Stamm zu überprüfen, wurden sowohl eine Kolonie-PCR, als auch eine Untersuchung der Expression von SecA (ein Protein der bakteriellen Sekretionsmaschinerie) mittels pT7-SecA-His durchgeführt. Dabei wurde nach der Lysogenisation eine Kolonie auf der LB-Agarplatte gewählt und in der PCR-Mixtur suspendiert, die die Oligonukleotide ZO18 und ZO19 zur Amplifikation der 1.800 mittleren Basenpaare der T7-RNA-Polymerasegenes enthielt. Nach Ablauf der PCR wurde der Ansatz mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender DNA-Färbung analysiert. Auf dem Agarosegel war eine Bande knapp unterhalb von 2.000 bp zu erkennen (Abbildung 30 A). Damit war das T7-RNA-Polymerasegen in der untersuchten Kolonie vorhanden. Der entstandene Stamm wird im Folgenden als *E. coli* JC8031(DE3) bezeichnet. Die Funktionalität der „DE3-Kassette“ wurde auch auf Proteinebene untersucht. Die gleiche Kolonie wurde kultiviert und für Elektroporation kompetent gemacht. Ein Aliquot dieser Zellen wurde mit pT7-SecA-His transformiert und kultiviert. Aus einer Vorkultur wurde 20 mL Flüssigkultur angelegt und bis $OD_{578} = 0,5$ angezogen. Anschließend wurde die Expression von SecA-His durch Zugabe von 1 mM IPTG für 1 Stunde induziert. Eine Zellprobe der Kultur wurde bei 95 °C lysiert und die enthaltenen Proteine nach einer SDS-PAGE angefärbt und analysiert. In Abbildung 30 B Spur 1 knapp oberhalb von 100 kDa ist eine Proteinbande vorhanden, die in der Kontrollprobe aus *E. coli* JC8031 pT7-SecA-His fehlt (Spur 2). Damit war diese Bande im Bereich von SecA-His mit einem errechneten Gewicht von ca. 103 kDa zu erkennen. Dies belegte die Funktionalität der λ DE3-Kassette in dem neuen Stamm und erweiterte die Verwendungsmöglichkeiten für diesen Stamm

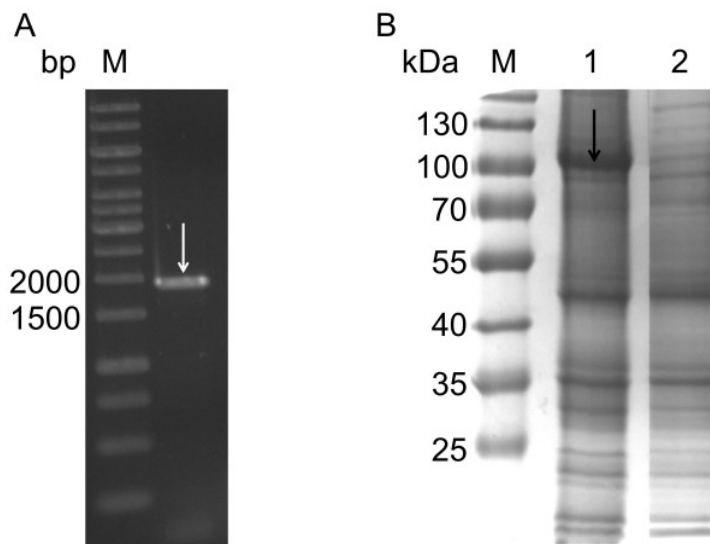


Abbildung 30: Kontrolle der Infektion von *E. coli* mit λ DE3. (A) Agarosegelelektrophorese der mittels PCR amplifizierten DNA der T7-RNA-Polymerase einer infizierten Kolonie des Stammes *E. coli* JC8031. Der Pfeil zeigt das amplifizierte DNA-Fragment der T7-RNA-Polymerase an. (B) Analyse der Funktionalität der λ DE3-Kassete in *E. coli* JC8031. Spur 1: Zellysate aus dem Stamm *E. coli* JC8031 pT7-SecA-His nach 1 Stunde Induktion mit IPTG. Der Pfeil zeigt die Proteinbande von SecA-His. Spur 2: Zellysate aus dem Wirtstamm *E. coli* JC8031 nach 1 Stunde Inkubation in IPTG-haltiger Kultur.

Für weitere Charakterisierung der AMV wurden sogenannte Markerproteine ausgewählt und die AMV auf ihr Vorkommen untersucht. Die äußere Membran von *E. coli* enthält Proteine, die bei einer Zellfraktionierung angereicht werden und als Reporter für die Außenmembran-Fraktion fungieren können. Dazu gehört OmpF. Dieses Protein sollte auch in den AMV als ein abundantes Protein vorhanden sein, welches für die Anreicherungsmethode sprechen würde. Zu diesem Zweck wurde *E. coli* JC8031 pKE19 über Nacht kultiviert. Aus dieser Kultur wurde eine 200 mL Flüssigkultur angelegt, woraus nach 8 Stunden Kultivierung bei 37 °C die AMV durch differenzierte Zentrifugation gewonnen wurden. Die Proteine in der AMV-Präparation wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend analysiert (Abbildung 31, Spur 2). Als Kontrolle wurden die Gesamtproteine des entsprechenden Ganzzellysates simultan behandelt (Abbildung 31, Spur 1). Zusätzlich zu einem Anfärben mittels Coomassie-Blau (Abbildung 31 A) sollte OmpF mittels eines polyklonalen anti-OmpF-Antikörper identifiziert werden (Abbildung 31 B). Auf dem SDS-Gel war bei beiden Proben knapp oberhalb von 35 kDa eine schwache Bande sichtbar (A). Nach der Immunfärbung konnte eine Bande ebenfalls in beiden Proben jedoch mit unterschiedlicher Intensität bei ca. 35 kDa sichtbar gemacht werden (B). Wie erwartet, bestätigten die Ergebnisse die Existenz vom OmpF mit einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa in AMV. Da die Vesikulation und eine anschließende Gewinnung der AMV eine Anreicherung der Außenmembranproteine zur Folge hat,

war OmpF, verglichen zur Gesamtproteinmenge, in einer größeren Menge in der Probe der AMV zu detektieren. Dieses Protein diente für die folgenden Proteinanalysen der AMV als ein Reporterprotein.

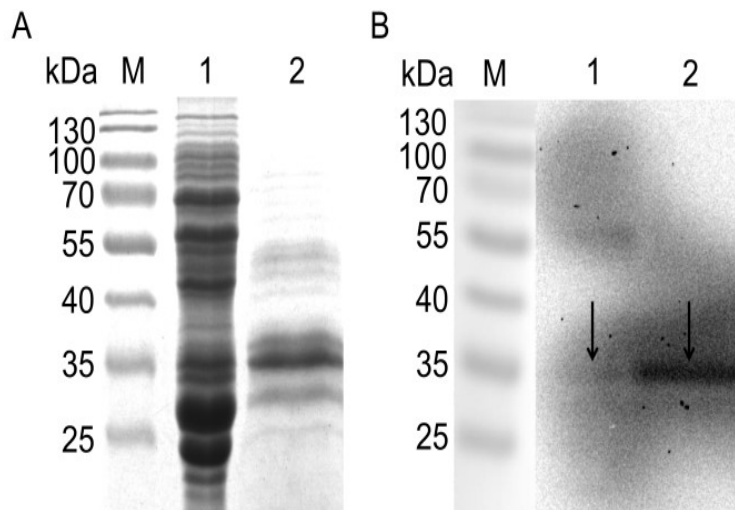


Abbildung 31: Nachweis von OmpF in AMV. (A) SDS-PAGE und anschließendes Anfärben der Proteine mit Coomassie-Blau. (B) Immunologische Analyse der Proteine mittels Western Blot. Die Trägermembran wurde mit polyklonalem Rabbit anti-OmpF Antikörper und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem anti-Rabbit-IgG Antikörper inkubiert und die Immunfärbung unter Verwendung des ECL-Reagenzes sichtbar gemacht. Das gesuchte Protein ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Spur 1: Zelllysate des Stammes *E. coli* JC8031 pKE19. Spur 2: AMV angereichert aus dem Stamm *E. coli* JC8031 pKE19. Die Pfeile zeigen die Proteinbanden von OmpF in den Proben an. M: Proteinmolekulargewichtsstandard.

Als Reporterprotein für eine zytoplasmatische Verunreinigung der AMV wurde das mittels Plasmids pKE19 intrazellulär exprimierte GFP herangezogen. Eine 200 mL Flüssigkultur des Stammes *E. coli* JC8031 pKE19 wurde angelegt und für 16 Stunden (über Nacht) kultiviert. Aufgrund der konstitutiven Expression von GFP mittels pKE19 wurden ganze Zellen und AMV direkt aus der Flüssigkultur nach 16 h Inkubation gewonnen. Sie wurden mit Proteinprobenpuffer versetzt, erhitzt und ihre Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE getrennt und anschließend mittels Coomassie-Färbung und Immunfärbung analysiert (Abbildung 32). In der Probe des Zelllysates auf dem SDS-Gel (A, Spur 1) war eine Bande zwischen 25 und 35 kDa vorhanden, die in der Probe der AMV nicht sichtbar war (A, Spur 2). Damit war diese Bande im Bereich von GFP mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa. Die Identität konnte durch eine Immundetektion unter Verwendung von spezifischem anti-GFP-Antikörper (B, Spur 1) nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 31 B, Spur 1 (Pfeil) erkennbar, wurden weitere Banden (< 28 kDa) in dieser Probe sichtbar. Es könnte sich dabei um Abbauprodukte des GFP oder auch um das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Monomer (25 kDa) handeln. Eine weitere Möglichkeit könnte das nicht vollständig

denaturierte Protein darstellen. Ein nicht denaturiertes Protein ist globulär und kann im Polyacrylamidgel weiter laufen als ein linearisiertes Protein. Das GFP war in den geernteten AMV nicht nachweisbar (B, Spur 2).

Neben OmpF sind OmpC und OmpA charakteristische Außenmembranproteine von *E. coli*. Sie wurden auch in AMV verschiedener *E. coli* Stämme identifiziert (McBroom und Kuehn, 2007). Aufgrund dieser Kenntnisse wurden die Proteinbanden entsprechender Größe in den Proben aus AMV als OmpA (ca. 35 kDa) und OmpC (ca. 37 kDa) bezeichnet.

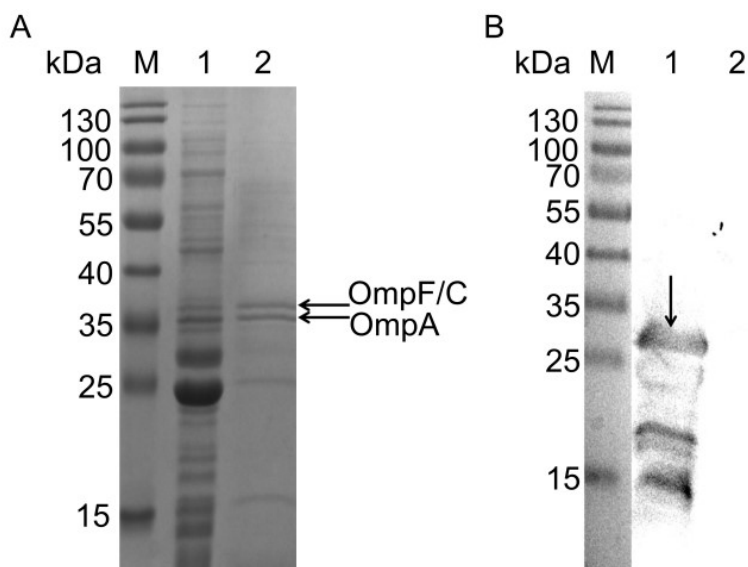


Abbildung 32: Reinheitskontrolle der AMV-Präparation mit GFP als intrazelluläres Markerprotein. (A) SDS-PAGE und anschließendes Anfärben der Proteine mit Coomassie-Blau. **(B)** Immunologische Analyse der Proben mittels Western Blot unter Verwendung von polyklonalem Rabbit anti-GFP-Antikörper und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem anti-Rabbit-IgG-Antikörper. Der Pfeil zeigt die Proteinbande von GFP an. Spur 1: Zellysate aus *E. coli* JC8031 pKE19. Spur 2: AMV angereichert aus *E. coli* JC8031 pKE19.

Für die weiteren Untersuchungen zur Reinheitsbestimmung der AMV wurden als Markerproteine β -Lactamase für den periplasmatischen Raum und SecA für die innere Membran ausgewählt und ihre Expression untersucht. Dazu wurde das Plasmid pT7-SecA-His verwendet. Das Plasmid pT7-SecA-His enthält die kodierende DNA-Sequenz zur Expression der Resistenz-Determinate β -Lactamase. Nach der Translation wird das Vorläuferprotein über ein Signalpeptid ins Periplasma sekretiert und dort zur reifen β -Lactamase prozessiert (Long, 1997). Außerdem kodiert pT7-SecA-His für das Protein SecA aus der bakteriellen Sekretionsweg (Sec-Weg) mit einem „His-tag“ (Jilaveanu *et al.*, 2005). SecA ist mit anderen Proteinen der inneren Membran, die zum Sec-Weg gehören (SecYEG), stark assoziiert. Es ist im

aktiven Zustand in der inneren Membran eingelagert und ragt teilweise auf ihrer Oberfläche ins Periplasma hinein (Kim *et al.*, 1994).

E. coli JC8031(DE3) pT7-SecA-His wurde kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG bei $OD_{578} = 0,5$ gestartet. Nach 3 Stunden Induktion wurden die Zellen geerntet und ihr Überstand zur Anreicherung der AMV unter Anwendung der beschriebenen Methode behandelt. Ein Teil der Zellen und AMV wurden jeweils in Proteinprobenpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 15 min erhitzt. Diese Proben wurden einer Analyse ihrer Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot unterzogen. Es wurde jeweils so viel Proteinprobe auf das Gel aufgetragen, dass die Intensität der OmpF-Banden als interner Standard in beiden Proben nahezu gleich war. Damit sollte ein direkter Mengenvergleich anderer Proteine möglich werden. Auf dem SDS-Gel nach einer Coomassie-Färbung wurde eine Bande in der Zellysats-Probe bei ca. 100 kDa sichtbar (Abbildung 33, A Spur 1). Diese Bande war in der AMV-Probe nicht sichtbar (A Spur 2). Die gleichen Proben wurden mittels Western Blot und einer anschließender Immunfärbung unter Verwendung des spezifischen anti-His-Antikörpers untersucht (Abbildung 33 C). Auch hier war nur in der Zellysats-Probe die Chemilumineszenz einer Bande in Höhe von ca. 100 kDa zu detektieren (C Spur 1). Damit war SecA-His als ein Markerprotein für die innere Membran mit einem errechneten Molekulargewichts von etwa 103 kDa nur im Zellysats und nicht in den AMV (C Spur 2) nachweisbar. Für den periplasmatischen Proteinmarker β -Lactamase (ca. 29 kDa) war keine Bande auf dem SDS-Gel sichtbar (Abbildung 33, A). Lediglich nach einer Immunfärbung mit anti- β -Lactamase-Antikörper war sowohl im Zellysats (Abbildung 33, B Spur 1), als auch in den AMV (B Spur 2) eine Bande zwischen 25 und 35 kDa sichtbar. Damit war dieses Protein nicht nur im Ganzzellysats nachweisbar, sondern auch in der AMV-Präparation.

Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse, dass die AMV-Präparationen unter angegebener Methodik keine Verunreinigungen aus dem Zytoplasma oder inneren Membran beinhalten. Periplasmatische Proteine können jedoch in den AMV eingeschlossen werden. Allerdings sekretieren die AMV keine Stoffwechselprodukte wie *E. coli* (Abbildung 10). Außerdem bleibt die Gesamtproteinmenge in AMV über die Dauer der Aktivitätsbestimmung unverändert. Damit bleibt auch ihr Einfluss auf die verwendete Methode und Reagenzien während der gesamten Dauer der Aktivitätsbestimmung gleich und einkalkulierbar.

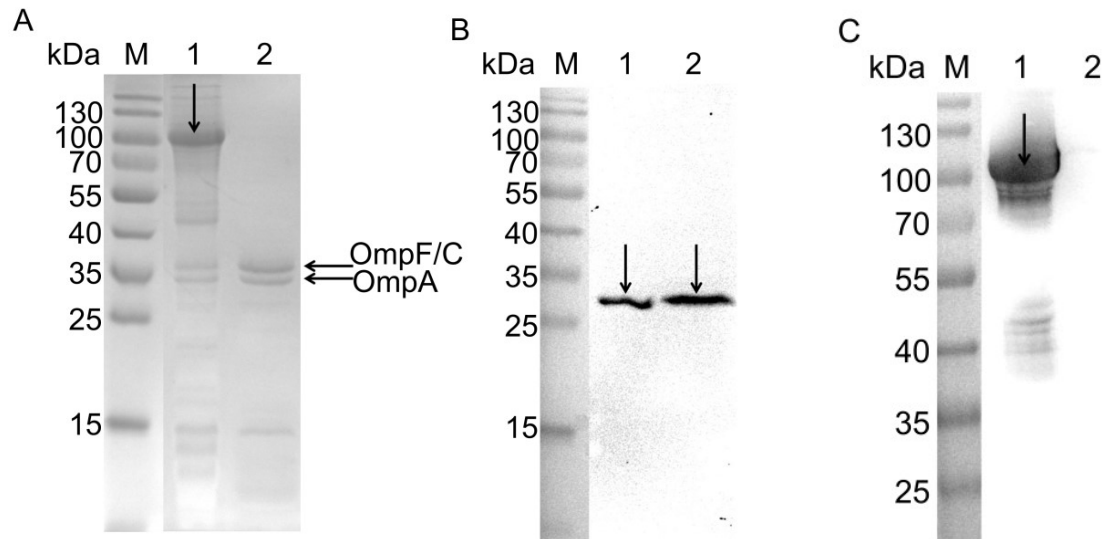


Abbildung 33: Reinheitskontrolle der AMV-Präparation mit β -Lactamase und SecA-His als Markerproteine. (A) SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Blau-Färbung der Proteinproben. Der Pfeil zeigt die Proteinbande von SecA-His im Zelllysat an. (B) Immunologische Analyse der Proben mittels Western Blot unter Verwendung von monoklonalem murinen anti- β -Lactamase Antikörper und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem anti-Maus-IgG Antikörper. Die Pfeile zeigen die Proteinbanden von β -Lactamase in den Proben an. (C) Immunologische Analyse der Proben mittels Western Blot unter Verwendung von monoklonalem murinen Anti-6xHis Antikörper und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem anti-Maus-IgG Antikörper. Spur 1: Zelllysat aus *E. coli* JC8031(DE3) pT7-SecA-His. Spur 2: AMV angereichert aus *E. coli* JC8031 pT7-SecA-His. Der Pfeil zeigt die Proteinbande von SecA-His an. M: Proteingrößenstandard.

Wie die Abbildungen zur Reinheitskontrolle der AMV verdeutlichen, sind native Außenmembranproteine von *E. coli* in den Präparationen vorhanden. Eine natürliche Außenmembranprotease ist OmpT. OmpT spaltet die Bindung zwischen basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin). Seine Erkennungssequenz befindet sich auch innerhalb der Linker-Region des hPH-20-Fusionsproteins. Bei einer gegebenen OmpT-Aktivität kann der Passagier in den Zellüberstand freigesetzt werden (Klauser *et al.*, 1992). Zur Aufrechterhaltung der Verankerung von Autotransporter-Fusionsproteinen in der Außenmembran, werden vorzugsweise *ompT*-defiziente *E. coli* Stämme eingesetzt. Aus diesem Grund wurden die AMV aus *E. coli* JC8031 auf Aktivität von OmpT überprüft.

Für eine qualitative Erfassung der OmpT-Aktivität wurde ein FRET-gestützter Test durchgeführt. FRET steht für Förster-Resonanz-Energie-Transfer und bezeichnet einen physikalischen Vorgang, bei dem unter der Voraussetzung einer definierten räumlichen Nähe zu einer strahlungslosen Energieübertragung von einem Donor (Fluorophor) auf einen Akzeptor (Quencher) kommt (Förster, 1948). Dabei überlagert sich das Anregungsspektrum des Quenchers mit dem Emissionsspektrum des Fluorophors. Infolgedessen entwickelt der Fluorophor trotz Anregung keine Fluoreszenz. Dieses Prinzip wurde bereits zur Aktivitätsbestimmung von isoliertem

OmpT eingesetzt (Kramer *et al.*, 2000) und in der Arbeitsgruppe zur OmpT-Aktivitätsbestimmung anderer *E. coli* Stämme verwendet. Das FRET-Substrat Abz-Ala-Arg-Arg-Ala-Tyr(NO₂) besitzt den FRET-Donor Abz (2-Aminobenzoessäure) und den FRET-Akzeptor Tyr(NO₂) (3-Nitrotyrosin). Die enzymatische Hydrolyse des Substrates durch OmpT unterbricht die räumliche Nähe des Fluorophors und des Quenchers, das zum Verlust des FRET-Effektes und damit zum Anstieg der Fluoreszenz führt. Zu diesem Versuch wurden AMV und Kontrollproben (AMV ohne FRET-Substrat bzw. FRET-Substrat ohne AMV) in die Kavernen einer schwarzen Mikrotiterplatte überführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des FRET-Substrates bzw. nur des Puffers als Kontrolle gestartet. Die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität (Anregung 355 nm, Emission 420 nm) ist in Abbildung 34 dargestellt. Ein Anstieg der Fluoreszenz wurde allein in der Mischung aus AMV und FRET-Substrat erfasst. Dies war ein Hinweis für das Vorhandensein der Protease OmpT und wurde in Verlauf der Testungen von hPH-20 als Passagier von Autotransporter-Fusionsprotein berücksichtigt.

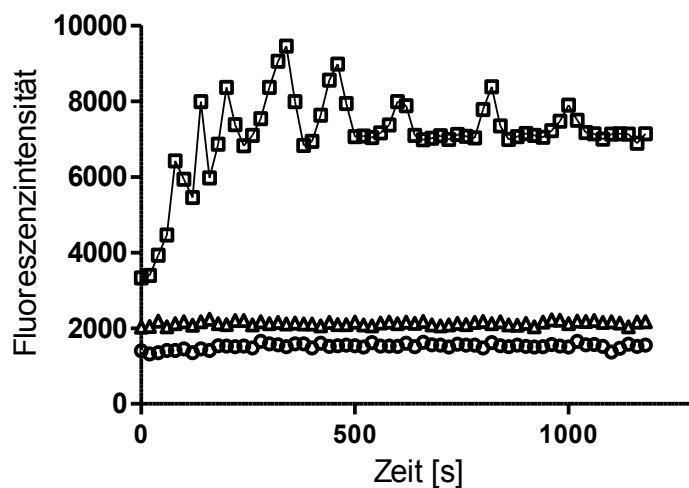


Abbildung 34: Testung der OmpT-Aktivität in AMV. Als FRET-Substrat wurde das Peptid Fluorophor-Ala-Arg-Arg-Ala-Quencher in einer Konzentration von 2 mM mit 10 μ L standardgemäß angereicherten AMV zu einem Endvolumen von 100 μ L gemischt. Die Detektion erfolgte mit einer Anregung bei 355 nm und Emission bei 420 nm. (□) AMV und FRET-Substrat. (△) FRET-Substrat ohne AMV. (○) AMV ohne FRET-Substrat.

3.2 Aktivitätsuntersuchung der hPH-20-tragenden AMV mittels „Stains-all“-Verfahren

E. coli JC8031 pBAD-ZO02 wurde in 400 mL Flüssig-LB-Medium kultiviert und die Expression des hPH-20-Fusionsproteins induziert. Die AMV wurden angereichert und in 2 mL McIlvaine Puffer (pH 7) aufgenommen. Die resultierende Suspension wurde in einem 1:1-Verhältnis mit HA-Lösung (0,11 mg/mL) versetzt und unterschiedlich lange inkubiert. Nach einer Entfernung der AMV aus den Testansätzen wurde 25 µL der Überstandes in die Kavernen einer Mikrotiterplatte überführt und mit „Stains-all“-Lösung und Reinstwasser versetzt. Die Farbentwicklung wurde unmittelbar bei 650 nm bestimmt. Als Kontrolle wurden die AMV aus dem Stamm *E. coli* JC8031 pBAD-AT (zur Expression eines Autotransporterproteins ohne Passagier) identisch behandelt. Die Ergebnisse der Testung sind in Abbildung 35 dargestellt. Die hPH-20-tragenden AMV zeigten eine kontinuierliche Absorptionsabnahme während der ersten drei Stunden. Dies betrug 0,47 Einheiten. Danach nahm die Absorption nur geringfügig ab. Eine wesentlich geringere Absorptionsabnahme war bei der Kontrolle zu detektieren. Diese erreichte 0,143 Einheiten nach drei Stunden Inkubation. Damit war ein eindeutiger Unterschied in der Absorptionsabnahme beider Proben gegeben.

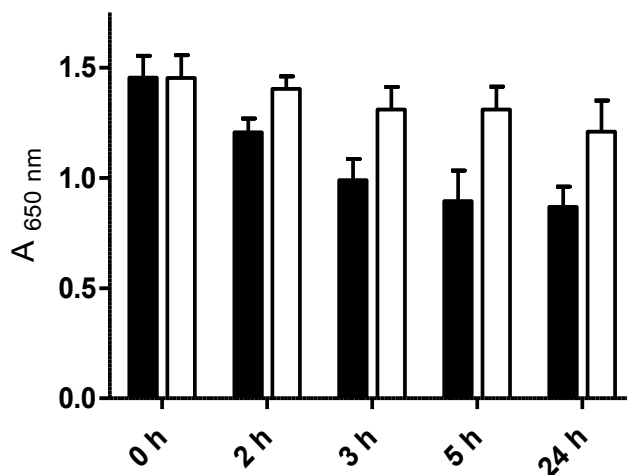


Abbildung 35: Testung der katalytischen Aktivität der hPH-20-tragenden AMV im „Stains-all“-Verfahren. Die AMV wurden aus 400 mL Flüssigkultur angereichert, in 2 mL Puffer aufgenommen und 1:1 mit HA-Lösung (0,11 mg/mL) versetzt. Nach Ablauf der Reaktionszeiten wurden die AMV aus den Proben abgetrennt und ihr Überstand mit „Stains-all“-Lösung und Reinstwasser versetzt. Schwarz: AMV mit hPH-20-Fusionsprotein Weiß: AMV mit Autotransportereinheit ohne Passagier. Dargestellt sind die mittleren Absorptionswerte der Proben (n=3, ±SD).

Im Verlauf der Untersuchungen kamen verschiedene Chargen Dioxan gleicher Bezugsquelle und anderer Anbieter zur Herstellung der „Stains-all“-Lösung zum Einsatz. Diese Chargen waren unterschiedlich stabilisiert. Damit verbunden waren

immer wieder auftauchende hohe Standardabweichungen der Messwerte. Ausgehend von dieser Problematik wurde eine alternative photometrische Methode in ihrer Brauchbarkeit für die Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität mittels AMV überprüft.

3.3 Turbidimetrische Aktivitätsuntersuchungen der hPH-20-tragenden AMV

HA-Oligomere (> 6-8 Disaccharideinheiten) und hochmolekulare HA können durch Zusatz von quartären Ammoniumsalzen wie CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) fein dispers ausfallen. Die hervorgerufene Trübung kann bei 580 nm detektiert und quantifiziert werden. Eine Abnahme der gemessenen optischen Dichte reflektiert den HA-Abbau. Die Methode wurde von Di Ferrante *et al.* zur Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität eingesetzt (1956). In dieser Arbeit wurde sie zur Aktivitätsbestimmungen mit AMV als Hyaluronidase-Quelle modifiziert.

Die AMV wurden aus 400 mL Hauptkultur des Stammes *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 angereichert. Dabei wurde die Proteinexpression für 20 Stunden bei 30 °C induziert. Die AMV wurden in 1 mL McIlvaine Puffer pH 4,5 aufgenommen. Wie bereits erwähnt, ist die Hyaluronidase hPH-20 sowohl im sauren als auch im neutralen Medium aktiv. Die Arbeit mit acidem Puffer würde eine OmpT-Aktivität unterbinden (Gill *et al.*, 2000), da diese Protease bei sauren pH-Werten nicht aktiv ist. Die AMV wurden mit HA-Lösung in einem Verhältnis 3:1 (HA-Endkonzentration 0,5 mg/mL) versetzt und zu verschiedenen Messzeiten inkubiert. Nach Entfernung der AMV in einer Tischzentrifuge bei 20.000 x g wurde 33 µL von jeder Probe mit 200 µL CTAB-Lösung inkubiert. Die Trübung wurde bei 580 nm detektiert. Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, nahm die Trübung der hPH-20-Proben bis drei Stunden Inkubationszeit kontinuierlich ab. Der Anfangswert lag bei 0,36 und nahm nach drei Stunden um 0,04 Einheiten ab. Die Trübung erreichte nach 6 Stunden einen konstanten Wert. Die Kontrollproben zeigten während der gesamten Inkubationszeit keine Trübungsabnahme. Die Werte der hPH-20-Proben und die Kontrollproben wiesen eine geringe Standardabweichung auf. Trotz eines kleinen Messfensters konnte die katalytische Aktivität der hPH-20-tragenden AMV mit dieser Methode signifikant ($p < 0,01$) belegt werden.

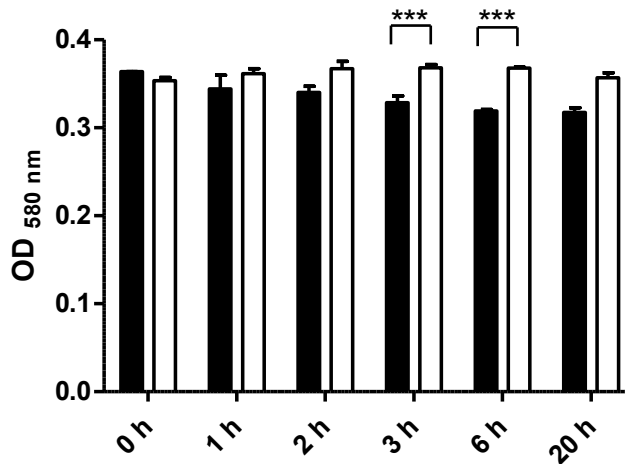


Abbildung 36: Turbidimetrische Testung der katalytischen Aktivität der hPH-20-präsentierenden AMV. Die angereicherten AMV wurden in einem Verhältnis 3:1 mit HA (0,5 mg/mL) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach einer Entfernung der AMV wurden die Testansätze mit CTAB-Lösung versetzt und ihr OD₅₈₀ bestimmt. Schwarz: AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02. Weiß: AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-AT als Kontrolle. Dargestellt ist der Absorptionsmittelwert der jeweiligen Testansätze (n=3, ±SD, ***p < 0,01).

Die HA-Spaltung durch Hyaluronidasen liefert polydisperse, komplexe Gemische. Die hier präsentierte Methode trägt bedingt durch die eingesetzte Enzymquelle zur Komplexität dieser Mischungen bei. Daher sollte die Bestimmungsmethode und der HA-Abbau durch Zusatzuntersuchungen abgesichert werden. Infolgedessen wurde die Kapillarelektrophorese zum Direktnachweis der Enzymaktivität verwendet.

3.4 Kapillarelektrophoretische Analytik der HA und der Hyaluronidase-Aktivität

Bei einer Kapillarelektrophorese (CE) wird die Probelösung in eine mit Puffer gefüllte Kapillare (Innendurchmesser bis zu 100 µm) injiziert. Nach der Injektion werden die Enden der Kapillare in Puffer eingetaucht und ein elektrisches Feld angelegt. So migrieren die Moleküle der Probe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit entlang der Kapillare und passieren dabei einen Detektor.

Das grundsätzliche Prinzip der CE zur Trennung von Hyaluronan und seinen kurzkettigen Fragmenten wurde bereits von Grimshaw *et al.* (1994) publiziert und in dieser Arbeit mit Modifikationen eingesetzt. Grimshaw *et al.* konnten damit 2-6 Disaccharid-Einheiten Basislinien getrennt von hochmolekularem HA-Polymer separieren. Die Identifikation dieser Oligomere erfolgte dabei mittels NMR-Spektroskopie. In weiteren Veröffentlichungen wurden HA-Oligomere mittels CE unter ähnlichen Bedingungen (hoher pH-Wert, normale Polarität bei der Trennung, „bare fused silica“ Kapillare) getrennt und den erhaltenen Peaks eindeutige Kettenlängen zugeordnet. Es wurde eine Trennung der HA-Oligomere in gleicher Reihenfolge wie

bei der Arbeitsgruppe um Grimshaw erhalten (Hofinger *et al.* 2007a, Grundmann *et al.* 2011)

Die Disaccharid-Einheiten der Hyaluronsäure besitzen eine Carboxylgruppe und damit einen pK_s-Wert von 4-5. Folglich liegt HA im neutralen und basischen Medium negativ geladen vor. Durch die Verwendung von Phosphat-Borat-Puffer pH 9 soll HA während der CE-Bestimmungen als Polyanion vorliegen. Die Probe wird an der Anode (+) injiziert und vor Austritt aus der Kapillare an der Kathode (-) detektiert. Die Trennung ergibt sich aus Kombination zweier Prozesse: elektrophoretischer Migration und elektroosmotischem Fluss (EOF). Als EOF wird die Strömung des Puffermediums im elektrischen Feld entlang der Kapillare bezeichnet. Unter Einfluss vom EOF können auch Anionen zur Kathode transportiert werden. Verglichen zum HA-Polymer weisen HA-Oligomere sowohl kleinere Molekülgröße als auch weniger negative Ladung auf. Sie unterliegen am stärksten dem EOF und erscheinen bei früheren Migrationszeiten an der Kathode und damit am Detektor. So können die HA-Oligomere trotz der geringen Differenz in der Ladungsdichte voneinander getrennt werden.

Generell beeinflusst das Molekulargewicht der HA die Detektionsmethode. Grimshaw *et al.* untersuchten die HA aus dem Glaskörper des Auges. Um die Anwendbarkeit der beschriebenen Methode mit den in dieser Arbeitsgruppe verfügbaren Chemikalien und Instrumente zu überprüfen, wurde initial eine HA-Spaltung mittels OTH (ovine testicular hyaluronidase) durchgeführt und die Testansätze kapillarelektrophoretisch analysiert. Zu Beginn wurde der EOF bestimmt. Das erfolgte durch Injektion des Puffers ohne Enzymquelle und Substrat (Hyaluronidase-Aktivitätspuffer und CE-Probenpuffer 1:1). Das resultierende Elektropherogramm ist in Abbildung 37 dargestellt. Das Signal des EOF erscheint bei einer Migrationszeit von 7,5 Minuten.

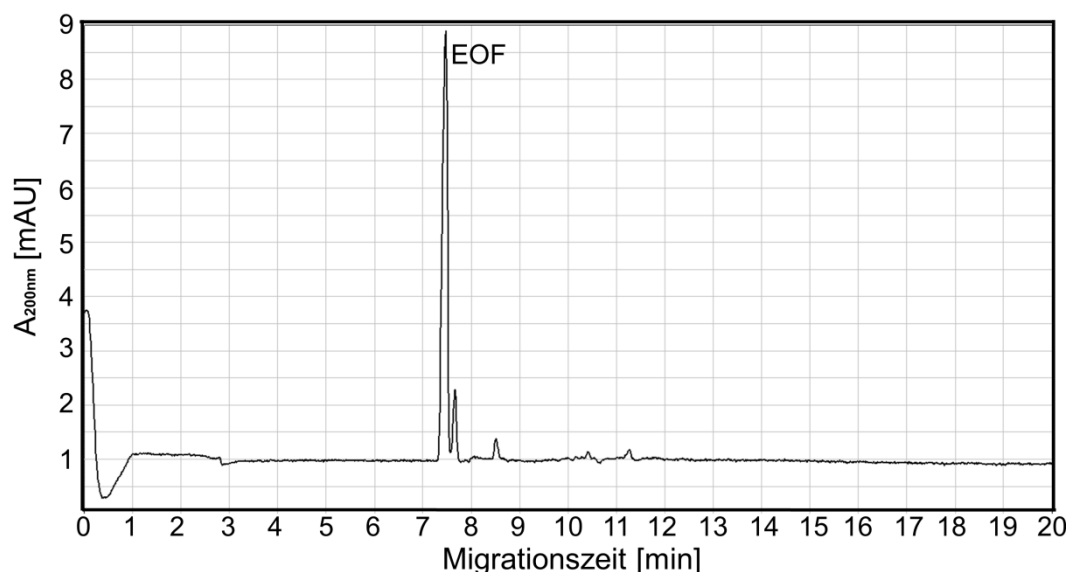


Abbildung 37: Bestimmung des EOF der Elektrolyten verwendet in der CE-Methode. Der Puffer zur Bestimmung der Hyaluronidase-Aktivität wurde mit dem CE-Probenpuffer versetzt und kapillarelektrophoretisch untersucht.

Anschließend erfolgte die Analyse der Spaltung von hochmolekularem HA-Polymer. Zu diesem Zweck wurde OTH mit HA-Polymer versetzt und bei 37 °C inkubiert (OTH 150 U/mL, HA 0,75 mg/mL). Es wurden zu unterschiedlichen Inkubationszeiten Proben entnommen und bei 98 °C zur Denaturierung des Enzyms erhitzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit dem CE-Probenpuffer versetzt. Mit den in Tabelle 21 aufgeführten Methoden und Parametern konnte eine Trennung erzielt werden. Dabei wurde die Kapillare vor jeder Probe mit NaOH konditioniert und am Ende jeder Messreihe mit warmem Reinstwasser gespült. Auf diese Weise konnte eine stabilere Basislinie erhalten werden. In Abbildung 37 ist eine Überlagerung der erhaltenen Elektropherogramme dargestellt (A-E).

Tabelle 21: Analytische Parameter der kapillarelektrophoretischen Methode.

Parameter und Methodik	Bemerkung
Initiales Konditionieren	30 min NaOH, 20 psi, 5 min Hintergrund Elektrolyt
Kurzes Konditionieren	10 min NaOH, 20 psi, 5 min Hintergrund-Elektrolyt
Trennung	10 min Hintergrund-Elektrolyt bei 20 psi, Probeninjektion 5,0 sek bei 1 psi, Detektionswellenlänge 200 nm, Detektionszeit 20 min, Temperatur der Kapillare 30 °C, Temperatur im Probenraum 22 °C,
Effektivlänge der Kapillare	48 cm, „bare fused silica“ Kapillare
Innendurchmesser der Kapillare	50 µm
Elektrolyt	Phosphat-Borat-Puffer pH 9, 40 mM SDS
Spannung	Feste Einstellung der Spannung 15 kV
Detektion	UV 200 nm
Abschließende Spülung der Kapillare	20 min Wasser, 50 psi, 40 °C Temperatur der Kapillare

Wie aus den Elektropherogrammen in Abbildung 38 zu erkennen ist, erschien das Signal des HA-Polymers zwischen 15,5 bis 16,5 min (A). Die Oligomere migrierten in einem Zeitfenster von 11,5 bis 19,5 min (B-E). Es gelang der OTH (150 U) schon nach 5 Minuten das Substrat stark abzubauen. Nach einer 3-stündigen Umsetzung war kein Signal des HA-Polymers zu erkennen (C). Schließlich dominierte ein Signal das Elektropherogramm E, welches verglichen mit den Literaturlausagen (Grimshaw *et al* 1994) höchstwahrscheinlich HA-Tetramer zugeordnet werden kann. Damit konnte die Anwendbarkeit der Methode zur Beobachtung der Hyaluronidase-Aktivität bestätigt werden.

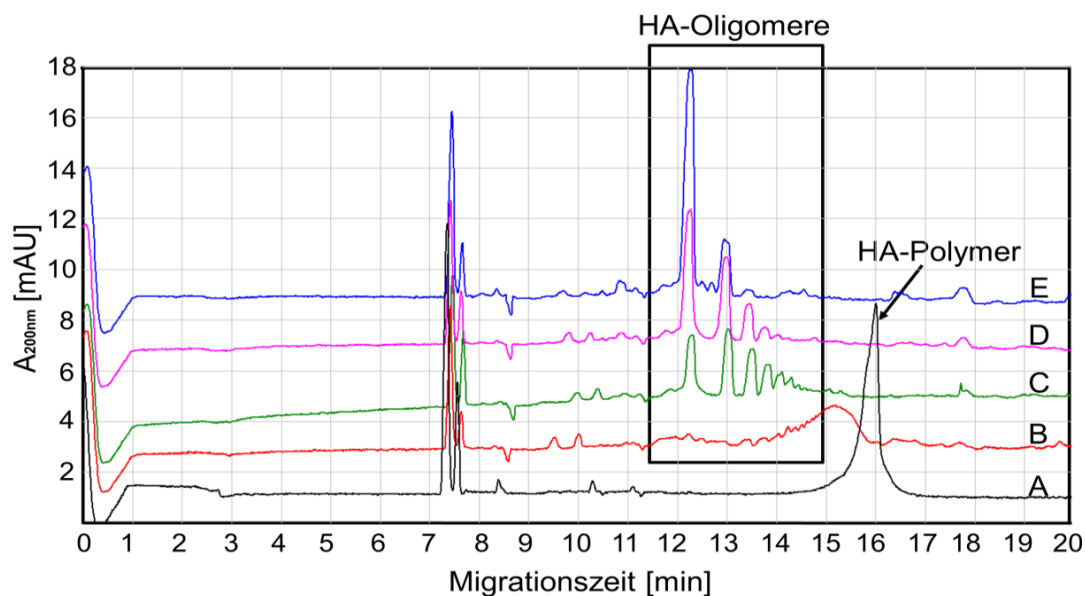


Abbildung 38: Kapillarelektrophoretische Trennung der hochmolekularen HA und HA-Oligomere nach einer enzymatischen Spaltung mittels OTH. Dargestellt ist eine Überlagerung der Elektropherogramme der Reaktionsansätze nach verschiedenen Inkubationszeiten. Die finale Aktivität an OTH betrug 150 U/mL. (A) HA-Substrat im Puffer als Nullwert (0,75 mg/mL). Der Pfeil zeigt den Peak vom hochmolekularen HA-Polymer an. (B) nach 5 min. (C) nach 3 Stunden. (D) nach 6 Stunden. (E) nach 24 Stunden. Die Peaks von entstandenen HA-Oligomeren sind im Kasten angezeigt.

3.4.1 Kapillarelektrophoretische Messung der Enzymaktivität mit AMV

Der Einsatz der Kapillarelektrophorese sollte einen eindeutigen Nachweis der katalytischen Aktivität des hPH-20-Fusionsproteins verankert in AMV liefern. Die AMV enthalten neben hPH-20-Fusionsprotein, wie oben demonstriert, native Außenmembranproteine und periplasmatische Bestandteile. Um die Migrationszeiten der Komponente aus AMV zu identifizieren, wurden die AMV ohne HA kapillarelektrophoretisch untersucht. Das aufgenommene Elektropherogramm ist in Abbildung 39 dargestellt.

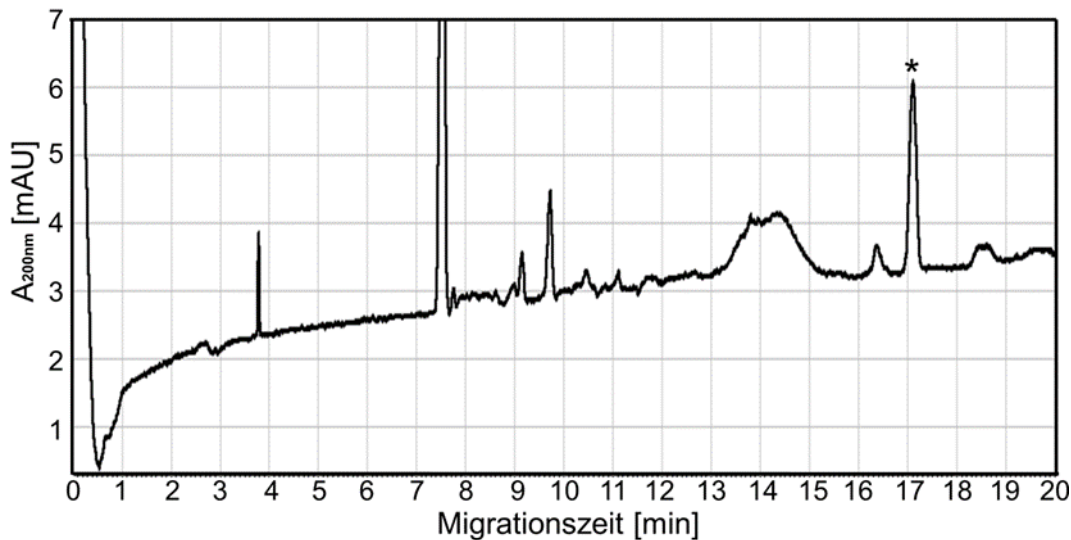


Abbildung 39: Kapillarelektrophoretische Darstellung der Komponenten aus AMV. Die angereicherten AMV wurden mit Hyaluronidase-Testpuffer analog zu Aktivitätsbestimmung jedoch ohne Substrat versetzt, anschließend mit CE-Probenpuffer (1:1) gemischt und kapillarelektrophoretisch untersucht. Mit Stern ist ein Proteinpeak aus AMV gekennzeichnet, der neben dem Peak von hochmolekularem HA-Polymer erscheint (Abbildung 40).

Neben dem EOF erschienen weitere Signale im Elektropherogramm; auch im Bereich der Migrationszeiten von Oligosacchariden, 12 bis 15 Minuten (Vergleich Abbildung 37). Das bedeutet, dass bei einer HA-Spaltung mittels Hyaluronidase-tragenden AMV eine eindeutige Identifizierung der Produktpeaks nicht einfach ist. Ausgehend von dieser Untersuchung wurde der HA-Abbau in nachfolgenden Experimenten in Abnahme der Peakhöhe des Polymers verfolgt und nicht in Entstehen von Produktpeaks. Das mit einem Stern markierte Signal erscheint in folgenden Messungen nahe am Peak des HA-Polymers (Vergleich Abbildung 40). Dieser wurde durch eine Überlagerung der Elektropherogramme von HA und OMV identifiziert (Elektropherogramm nicht gezeigt).

Wie bereits dargestellt, wurden die hPH-20-tragenden AMV in turbidimetrischer Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Die Reduktion der Trübung wurde dabei vorläufig als Folge der hPH-20-Aktivität deklariert (Vergleich Abbildung 36). Um dies als tatsächliche Folge der katalytischen Aktivität der hPH-20-tragenden AMV zu verifizieren, wurden unter gleichen Bedingungen Reaktionsansätze angelegt und kapillarelektrophoretisch analysiert. In Abbildung 40 ist eine Übertragung der registrierten Elektropherogramme dargestellt. Die Höhe des Substratpeaks (A) nahm nach 4 Stunden (B) und 20 Stunden (C) Inkubation mit hPH-20-tragenden AMV ab. Das wies auf eine geringe katalytische Aktivität hin.

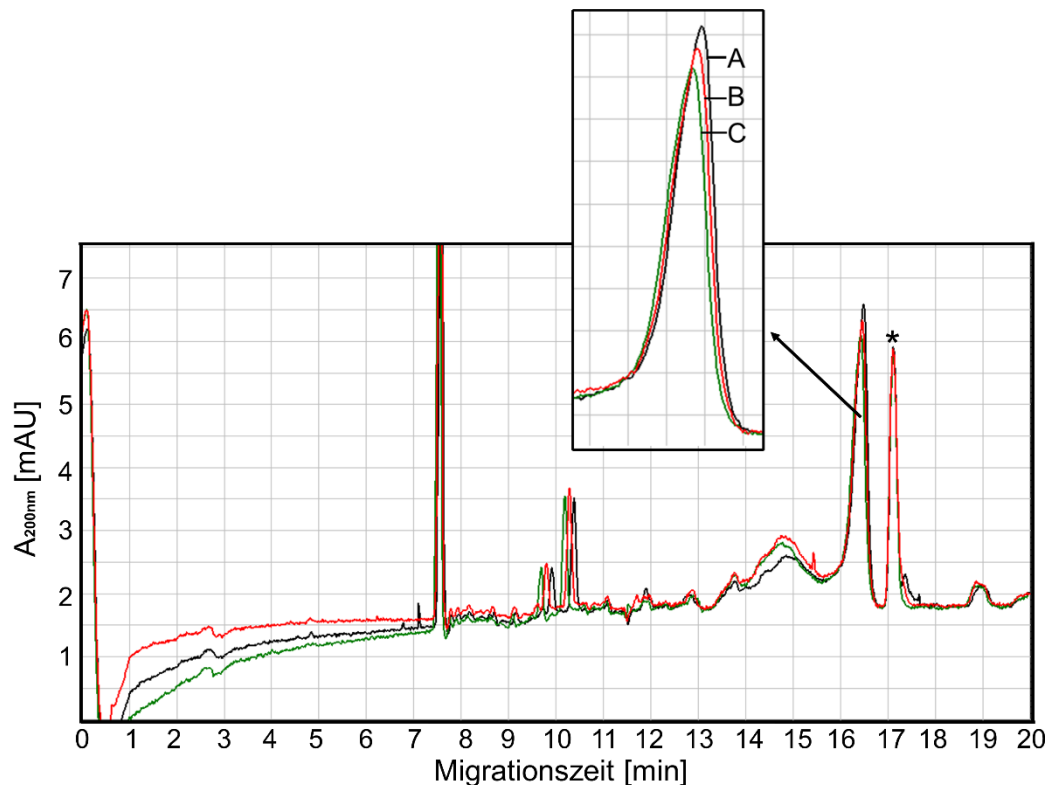


Abbildung 40: Überlagerung dreier Elektropherogramme der Aktivitätstestungen hPH-20-tragenden AMV. AMV wurden protokollgemäß angereichert und mit HA-Lösung versetzt und inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden nach einer Zentrifugation mit CE-Puffer (1:1) gemischt und mit der CE-Methode untersucht. (A) Null-Wert der Testung. (B) 4 Stunden Reaktionszeit. (C) 20 Stunden Reaktionszeit. Die Signale von HA-Oligomeren und Komponenten aus AMV migrieren zusammen bei 11,5 bis 15,5 Minuten. Mit Stern ist ein Proteinpeak aus AMV gekennzeichnet, der neben dem Peak von hochmolekularem HA-Polymer erscheint. (↗) Vergrößerter Ausschnitt der Elektropherogramme.

Wie aus den vorangegangenen Untersuchungen hervorging, besitzen die AMV aus *E. coli* JC8031 OmpT-Aktivität. Basierend auf dieser Kenntnis wurden in nachfolgenden Experimenten die Flüssigkulturen zur Anzucht des Stammes und Anreicherung der AMV mit Pepstatin A und Leupeptin versetzt. Pepstatin A ist ein Peptid und hemmt die Aspartat-Proteasen, wie OmpT. Um eine Breitband-Proteasehemmung zu erreichen, wurden die Kulturen ebenfalls mit Leupeptin als ein Hemmstoff der Serin-, Threonin- und Cysteinproteasen supplementiert. Die unter diesen Bedingungen angereicherte AMV wurden wie oben beschrieben einem Aktivitätstest mittels CE unterzogen. In Abbildung 41 ist eine Überlagerung der Elektropherogramme der Reaktionsansätze abgebildet. Die Peakhöhe des Substrates (A) nahm nach drei (B), 6 (C) und 20 Stunden (D) ab. Verglichen mit Abbildung 40 ist eine stärkere Reduktion der Peakhöhe (HA-Polymer) nach 20 Stunden Reaktionszeit zu erkennen. Auffällig ist ebenfalls eine Reduktion der Signale, die aus reinen AMV-Präparation resultieren (Vergleich Abbildung 39). Dies

wurde durch eine Proteinfällung aus den Reaktionsansätzen mit kaltem Acetonitril erreicht, bevor die Proben kapillarelektrophoretisch untersucht wurden.

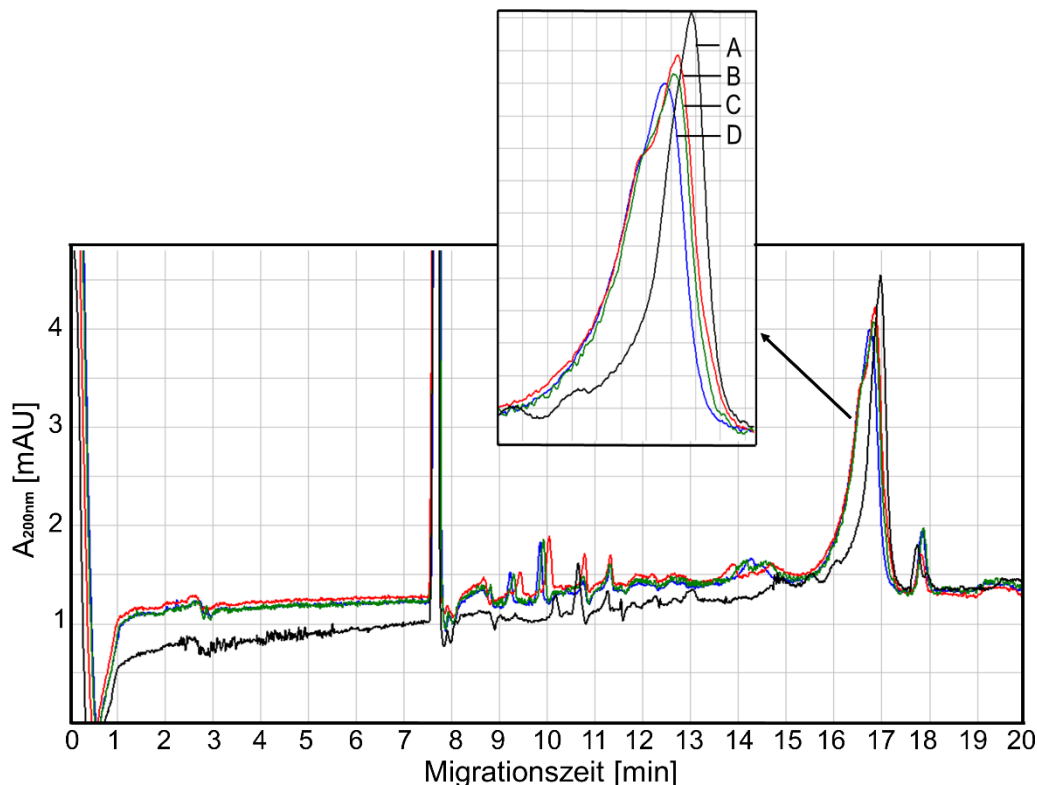


Abbildung 41: Überlagerung von Elektropherogrammen der Aktivitätstestungen hPH-20-tragender, in Gegenwart von Proteaseinhibitoren angereicherter AMV. *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 wurde in Gegenwart von Pepstatin (0,7 µg/mL) und Leupeptin (0,5 µg/mL) kultiviert und einer AMV-Anreicherung unterzogen. Die AMV wurden protokollgemäß mit HA-Lösung versetzt und inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden von AMV abgetrennt, mit CE-Puffer (1:1) gemischt und mit der CE-Methode untersucht. (A) „Null-Wert“ der Testung. (B) 3 Stunden Reaktionszeit. (C) 6 Stunden Reaktionszeit. (D) 20 Stunden Reaktionszeit. Die Signale von HA-Oligomeren und Komponenten aus AMV migrieren zusammen bei 11,5 bis 15,5 Minuten. (K) Vergrößerter Ausschnitt der Elektropherogramme.

Um eine hPH-20-unabhängige Reduktion der Peakhöhe auszuschließen, wurden die AMV aus dem Stamm *E. coli* JC8031 pBAD-AT unter gleichen Bedingungen angereichert und mit HA-Lösung inkubiert. Da die AMV aus diesem Stamm nur die Transporteinheit des Autodisplay-Fusionsproteins enthielten, sollte keine Abnahme in der Peakhöhe des HA-Polymers zu detektieren sein. Nach 20 Stunden Inkubation wurden die AMV in einer Tischzentrifuge abgetrennt und die Ansätze kapillarelektrophoretisch überprüft. Die Abbildung 42 zeigt eine Überlagerung der Elektropherogramme (schwarz: Nullwert; rot 24 Stunden Inkubation). Es wurde keine Abnahme des HA-Peaks durch diese Kontroll-AMV erzeugt. Dieses Ergebnis bestätigte die Hyaluronidase-Aktivität der hPH-20-tragenden AMV.

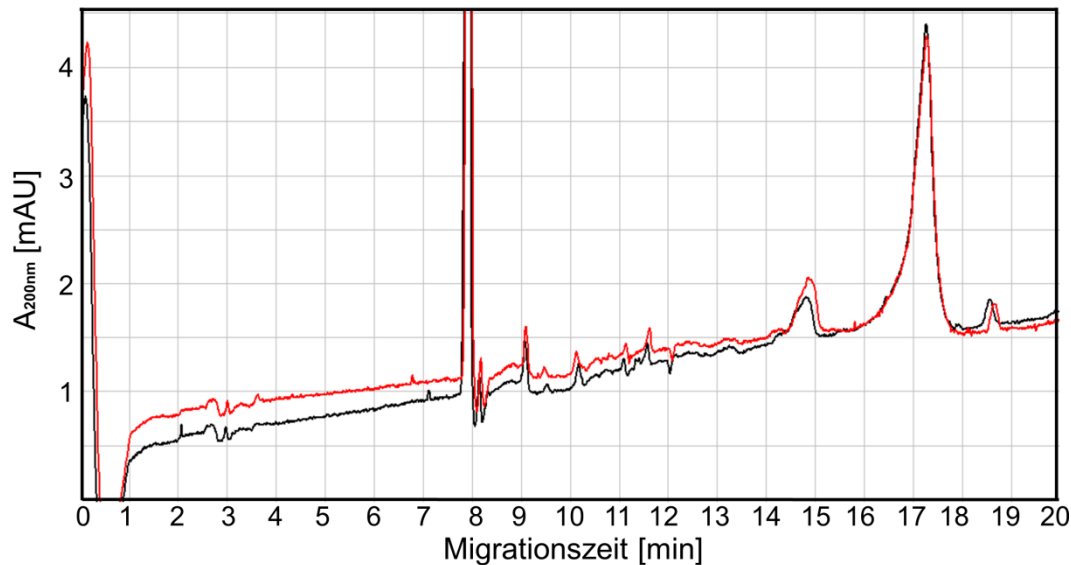


Abbildung 42: Überlagerung von Elektropherogrammen der Testungen von Kontroll-AMV. *E. coli* JC8031 pBAD-AT wurde in Gegenwart von Pepstatin (0,7 µg/mL) und Leupeptin (0,5 µg/mL) zur Expression des Autotransporter-Fusionsproteins ohne Passagier kultiviert und einer AMV-Anreicherung unterzogen. Die AMV wurden mit HA-Lösung versetzt und für 3 Stunden inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden zentrifugiert, mit CE-Puffer (1:1) gemischt und mit der CE-Methode untersucht. Rote Spur: 20 Stunden Reaktionszeit. Schwarze Spur: „Null-Wert“ der Testung.

In der Chromatographie kann die Peakhöhe für quantitative Bestimmungen herangezogen werden, wenn bei einer isothermen (Gaschromatographie) bzw. isokratischen (Hochleistungs-Flüssigchromatographie) Trennung symmetrische Peaks detektiert werden (Rücker *et al.*, 2001). Bei einer HA-Spaltung entstehen neue Produktfragmente, die ebenfalls als Substrat für weitere Umsetzung dienen. Dadurch entstehen anfänglich noch komplexere Mischungen. Der Peak des HA-Polymers in der CE wird zwar in Höhe niedriger, aber auch breiter und asymmetrischer. Ausgehend davon, dass für Kapillarelektrophorese ähnliche Gesetzmäßigkeiten existieren können, wie für chromatographische Quantifizierungen, konnte die erzielte Peakabnahme des Substrates lediglich als ein direkter Nachweis der Hyaluronidase-Aktivität dienen. Daher musste eine routinemäßige Quantifizierung der HA-Spaltung weiterhin photometrisch, genauer turbidimetrisch erfolgen. Infolge wurden die hPH-20-tragenden AMV unter Zusatz von Proteaseinhibitoren angereichert und einer turbidimetrischen Aktivitätsbestimmung unterzogen.

E. coli JC8031 pBAD-ZO02 wurde in Gegenwart von Pepstatin A und Leupeptin kultiviert und die Proteinexpression induziert. Nach der Gewinnung der AMV in 1 mL McIlvaine Puffer pH 4,5 wurde die Suspension mit HA-Lösung in einem Verhältnis von 3:1 versetzt (HA-Endkonzentration 0,5 mg/mL) und inkubiert. Nach Ablauf von Reaktionszeiten von 0 bis 20 Stunden, wurden Proben zentrifugiert und ihre

Überstände in einer Mikrotiterplatte mit CTAB-Lösung versetzt. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde die entstandene Trübung bei 580 nm bestimmt. In den Testansätzen mit dem hPH-20-Fusionsprotein konnte eine Trübungsabnahme von 0,07 Einheiten innerhalb der ersten 3 Stunden registriert werden (Abbildung 43), die einen signifikanten Unterschied zum Wert der Kontrollprobe mit AMV ohne hPH-20-Fusionsprotein auf der Oberfläche zeigte. Bei weiterer Inkubationszeit stagnierte die Trübung auf gleichem Niveau. Dies bedeutete für die anschließende Testung von Substanzen eine Reaktionszeit bis 3 Stunden, um eine ausreichende Aktivität innerhalb des linearen Bereiches zu erreichen.

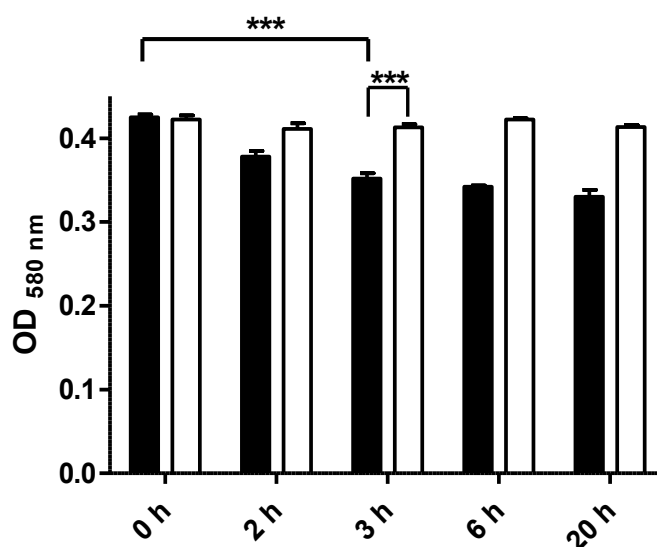


Abbildung 43: Turbidimetrische Testung des hPH-20-Fusionsproteins exprimiert in AMV angereichert aus Flüssigkultur supplementiert mit Proteaseinhibitoren. *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 (schwarz) und *E. coli* JC8031 pBAD-AT (weiß) wurden in Gegenwart von Pepstatin (0,7 µg/mL) und Leupeptin (0,5 µg/mL) kultiviert. Die angereicherten AMV wurden in einem Verhältnis 3:1 mit HA (0,5 mg/mL) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach einer Entfernung der AMV wurde die Testansätze mit CTAB-Lösung versetzt und ihr OD_{580 nm} bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionsmittelwerte jeweiliger Testansätze (n=3, ±SD, ***p<0,001).

Für die Quantifizierung der katalytischen Aktivität der hPH-20-tragenden AMV wurde die Aktivität des isolierten Enzyms OTH als Bezugswert genommen, da eine Bestimmung der spezifischen Aktivität nicht möglich war. Bei HA-Spaltung entstehen HA-Fragmente mit reduzierenden Aldehydgruppen an einem Ende, die definitionsgemäß für die Quantifizierung der Hyaluronidase-Aktivität herangezogen werden. Demnach ist eine Unit die Menge an reduzierenden Enden in µmol freiwerdend pro Minute. Dazu wird standardgemäß das Ehrlich Reagenz (DMAB: p-Dimethylaminobenzaldehyd) eingesetzt (Reissig *et al.*, 1955; Muckenschnabel *et al.*, 1998). Dieses Reagenz reagierte jedoch mit anderen reduzierenden Zucker und primären Aminen in Testansätzen mit AMV. Dies erzeugte eine hohe

Basalabsorption und konnte nicht in dem vorliegenden Test angewendet werden. Daher wurde unter gleichen Testbedingungen eine HA-Spaltung mittels OTH turbidimetrisch bestimmt. Es wurde bei einer Volumenaktivität von 50 U/mL (nach Angaben von Hersteller) eine Reduktion der Trübung von 0,035 pro Minute erzielt. Mit dem beschriebenen Verfahren zur Anreicherung und Aktivitätsbestimmung mittels AMV als Träger von hPH-20-Fusionsprotein betrug die Abnahme der Trübung $4,1 \times 10^{-4}$ Einheiten pro Minute (Abbildung 43). Dies entspricht einer Volumenaktivität von 582 mU/mL.

In den weiteren Experimenten wurde die beschriebene Prozedur als standardmäßige Anreicherungsverfahren von AMV als Enzymquelle für die Bestimmung der Testsubstanzen eingesetzt.

3.5 Testung von Hemmstoffen

Von der Arbeitsgruppe Kuckländer (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, HHU Düsseldorf) wurde eine Substanzbibliothek aus verschiedenen Stoffgruppen zur Verfügung gestellt. Diese Bibliothek umfasste unter anderem Benzofurane, Benzimidazole, Imidazolindole und Benzoxadiazine. Diese Substanzen wurden im Vorfeld dieser Arbeit auf Hemmung der OTH hin geprüft. OTH zeigt eine Aminosäure-Identität von 60 % zu hPH-20 (NCBI/Protein Blast). Dabei zeigten 5 Substanzen bei einer Konzentration von 100 μ M eine OTH-Hemmung von mehr als 50 %. Aufgrund fehlender Referenzhemmstoffe für hPH-20 und der Ähnlichkeit der beiden Enzyme, wurden diese 5 Substanzen ebenso in ihrer hemmenden Eigenschaft für hPH-20 getestet.

Dazu wurden die AMV mit oberflächenständigem hPH-20-Fusionsprotein wie beschrieben angereichert. Vor Reaktionsbeginn wurden sie für 5 Minuten mit den Testsubstanzen vorinkubiert. Nach Zugabe von HA wurde die „Nullprobe“ entnommen und die Testansätze für weitere 3 Stunden inkubiert. Die AMV wurden in einer Tischzentrifuge bei 4°C sedimentiert und ihre Reaktionsüberstände in einer Mikrotiterplatte mit CTAB-Lösung versetzt. Die entstandene Trübung wurde anschließend quantifiziert und die Inhibition anhand der nachfolgenden Formel bestimmt. Dabei wurde die Trübungsabnahme einer Probe, die statt Testsubstanz nur DMSO enthielt, als 100 % Aktivität definiert.

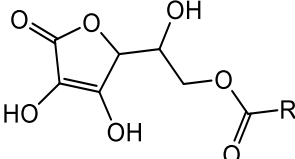
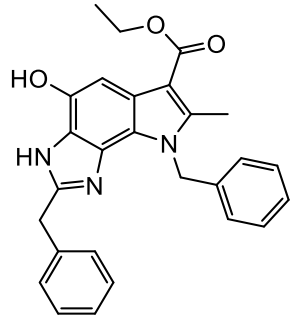
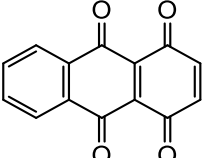
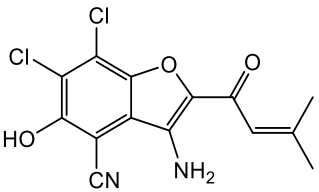
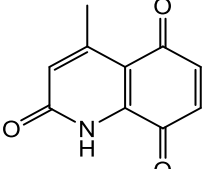
$$\text{relative Aktivität [\%]} = \frac{\Delta OD \text{ Inhibitor (0h - 3h)}}{\Delta OD \text{ DMSO (0h - 3h)}} * 100 \%$$

$$\text{Inhibition [\%]} = 100 - \text{relative Aktivität [\%]}$$

Δ OD Inhibitor (0h-3h) = Differenz der optischen Dichte $_{580 \text{ nm}}$ des Reaktionsansatzes versetzt mit Testsubstanz zu Beginn (0h) und am Ende (3h) der Reaktion

Δ OD DMSO (0h-3h) = Differenz der optischen Dichte $_{580 \text{ nm}}$ des Reaktionsansatzes versetzt mit DMSO zu Beginn (0h) und am Ende (3h) der Reaktion

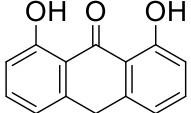
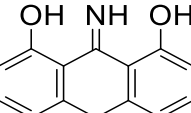
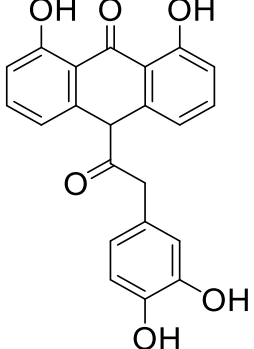
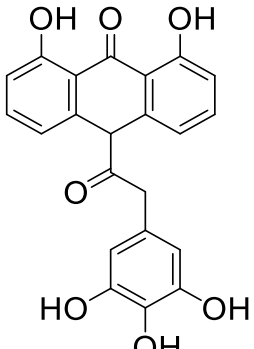
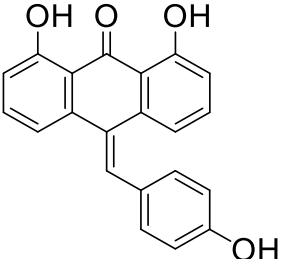
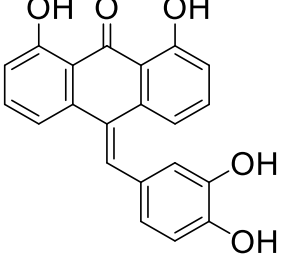
Tabelle 22: Untersuchung der OTH-Hemmstoffe auf Hemmung von hPH-20-Fusionsprotein exprimiert in AMV.

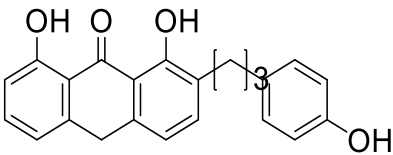
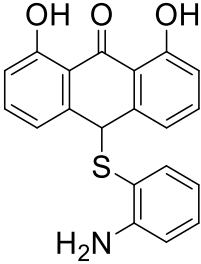
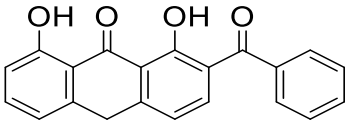
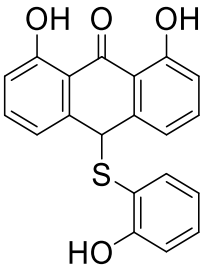
Bezeichnung	Strukturformel	OTH-Hemmung IC ₅₀ -Wert [μ M]	% hPH-20 Hemmung bei 200 μ M
Vcpal		5	42
Kuck19d		86	45
Rictetraon		81	22
Ric151		51	30
Kuck46		30	38

Wie bereits erwähnt, sind für hPH-20 keine potenten Hemmstoffe in der Literatur beschrieben, daher sollten andere Substanzgruppen in ihrer hemmenden Aktivität getestet werden. Einige Antrachinone wurden vom Arbeitskreis Müller (PharmaCampus, WWU Münster) zur Verfügung gestellt. Die Testsubstanzen

wurden initial bei einer Konzentration von 500 μM unter gleichen Versuchsbedingungen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Untersuchungen von Anthrachinon-Derivaten auf Hemmung von hPH-20-Fusionsprotein exprimiert in AMV (n. b.: nicht bestimmt).

Bezeichnung	Strukturformel	% hPH-20 Hemmung bei 500 μM	hPH-20 Hemmung IC_{50} -Wert [μM]
AA1		23	n. b.
AA11		30	n. b.
AA31		49	n. b.
AA32		52	426
AA46		39	n.b.
AA47		48	n. b.

Bezeichnung	Strukturformel	% hPH-20 Hemmung bei 500 μM	hPH-20 Hemmung IC_{50} -Wert [μM]
AA115		24	n. b.
AA179		66	376
AA122		35	n.b.
AA181		71	363

Die Testung dieser Substanzklasse lieferte keine potenten Hemmstoffe für oberflächenständige hPH-20 mit IC_{50} -Werten in submikromolaren bzw. nanomolaren Bereich. Dabei konnte das hPH-20-Fusionsprotein bei 500 μM Substanzkonzentration zwischen 24 bis 71% gehemmt werden. Es folgte die Bestimmung der IC_{50} -Werte der drei wirksamsten Verbindungen. Damit sollte ebenfalls geprüft werden, ob das Enzym überhaupt durch diese Substanzen vollständig inhibiert werden kann. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte von AA32, AA179 und AA181 wurden die hPH-20-tragenden AMV mit steigender Konzentration an Testsubstanz (0-1 mM) vorinkubiert. Nach Zugabe von HA wurde die „Nullprobe“ in ein eisgekühltes Reaktionsgefäß überführt und der Rest des Ansatzes für weitere drei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurden die von AMV befreiten Ansätze mit CTAB-Lösung versetzt und die Trübung anschließend gemessen. Die Inhibition wurde mit der oben beschriebenen Formel bestimmt. Die resultierende partielle Hemmung wurde in einem semilogarithmischen Dosis-Effektdiagramm gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen und der IC_{50} -Wert durch

Anpassen einer Ausgleichskurve unter Zuhilfenahme des Programmes GraphPadPrism (La Jolla, CA, USA) berechnet (Abbildung 44). Die IC_{50} -Werte betragen $426 \mu\text{M}$ für AA32, $376 \mu\text{M}$ für AA179 und $363 \mu\text{M}$ für AA181. Damit lag ihre Hemmwirkung auf das hPH-20-Fusionsprotein in der gleichen Größenordnung.

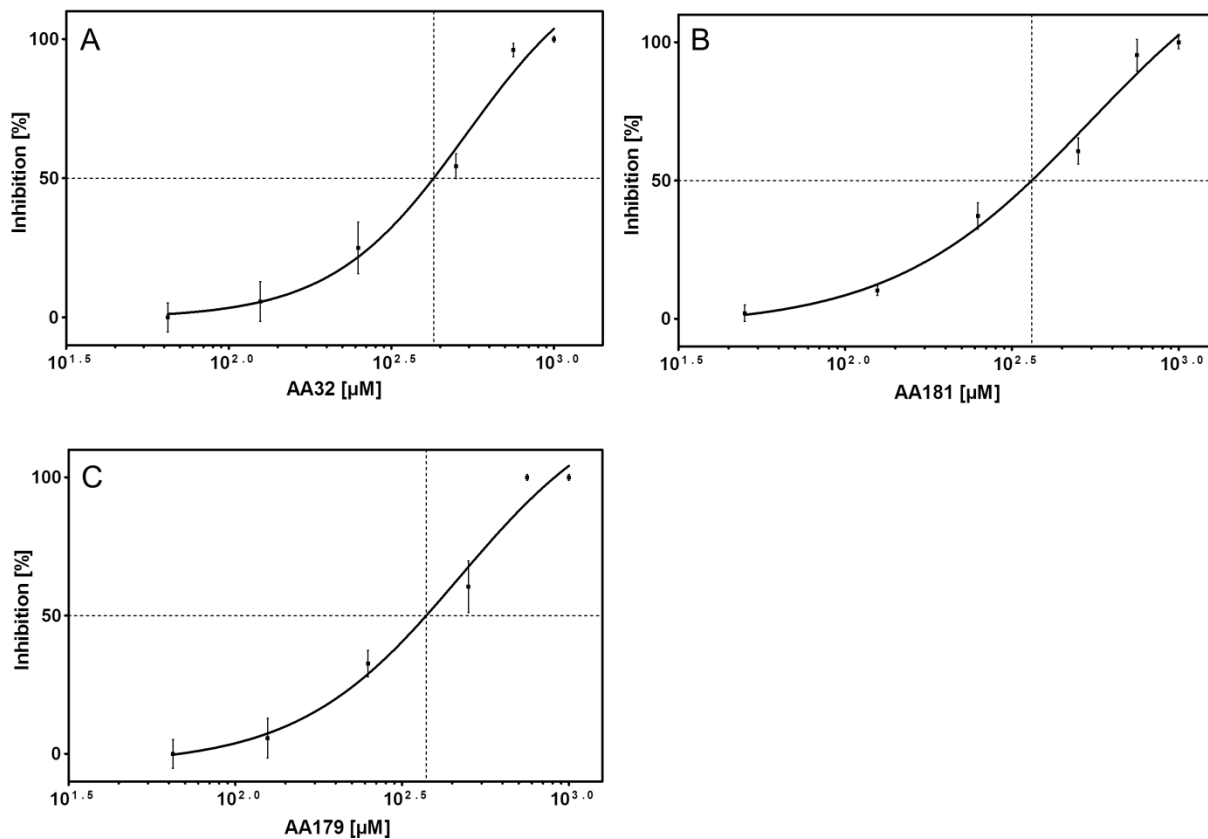


Abbildung 44: Bestimmung der IC_{50} -Werte der Hemmstoffe AA32 (A), AA181 (B) und AA179 (C) im turbidimetrischen Testverfahren. Die hPH-20-präsentierenden AMV wurden protokollgemäß angereichert und mit dem jeweiligen Hemmstoff in einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ bis 1mM präinkubiert. Die Hemmung der hPH-20 wurde nach 3 Stunden Reaktionszeit bestimmt. Dargestellt ist die partielle Hemmung [%] gegen die Hemmstoffkonzentration in einer semilogarithmischen Kurve. Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen ($\pm\text{SD}$). Der IC_{50} -Wert wurde durch die Extrapolation der Hemmstoffkonzentration bei 50 % Restaktivität der hPH-20 berechnet (gestrichelte Linie).

4 Autodisplay der humanen Hyaluronidase Hyal-1 (hHyal-1)

Im weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Hyaluronidase-Aktivität von hHyal-1-Fusionsprotein untersucht. Ausgehend vom im Arbeitskreis vorhandenen Stamm *E. coli* F470 pAK009 wurden Untersuchungen zur Aktivitätserhöhung dieser Hyaluronidase durchgeführt.

4.1 Oberflächenständigkeit der hHyal-1

Vor Beginn der Aktivitätsuntersuchungen wurde die subzelluläre Lokalisation des hHyal-1-Fusionsproteins überprüft. Zu diesem Zweck wurde *E. coli* F470 pAK009 für

16 Stunden in LB-Flüssigkultur kultiviert. Die Expression des Autotransporter-Fusionsgens bei dem Plasmid pAK009 wird durch einen konstitutiven Promotor P_{TK} reguliert (Maurer *et al.*, 1997) und bedarf keiner Zugabe von Induktoren. Aus der angelegten Kultur wurden die Außenmembranproteine mittels Zellfraktionierung vor und nach einer Proteasebehandlung ganzer Zellen angereichert und analysiert. Die angereicherten Außenmembranproteine des ebenso behandelten Wirtstammes ohne Proteasebehandlung dienten als Kontrolle. Die Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Allerdings war keine eindeutige Proteinbande, verglichen mit der Kontrollprobe (Abbildung 45, A Spur 1) bei dem errechneten Molekulargewicht von ca. 98 kDa für das Fusionsprotein sichtbar (A Spur 2). Wie bereits erwähnt, war dies für Expression unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors nicht überraschend. Folglich sollten die Außenmembranproteine mit Hilfe von Western Blot und Immunfärbung unter Verwendung vom anti-hHyal-1 Antikörper analysiert werden (Abbildung 45, B). In der Außenmembran-Präparation von *E. coli* F470 pAK009 konnte damit eine Bande unterhalb von 100 kDa detektiert werden (B Spur 2), welche in der Kontrollprobe (B Spur 1) und in der mit der Proteinase K vorbehandelten Probe (B Spur 3) nicht vorhanden war. Damit bestätigte die Immunfärbung das Vorhandensein einer Proteinbande im Bereich des für das hHyal-1-Fusionsprotein erwarteten Molekulargewichts, die in der mit der Proteinase K behandelten Probe und der Kontrollprobe nicht zu detektieren war. In Abbildung 45 A sind die natürlichen Außenmembranproteine der genauso behandelten Stämme nach einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung dargestellt. Ein Reporter für die Zellintegrität ist das Außenmembranprotein OmpA. Vor einer Präparation der Außenmembranproteine wurden die Zellen teilweise mit Proteinase K behandelt. Da die OmpA-Bande in der Proteinprobe unverändert vorhanden war (Abbildung 45 A Spur 3), war die Oberflächenpräsentation des Passagierdomäne vom hHyal-1-Fusionsprotein belegt. Außerdem würde eine detektierbare Hyaluronidase-Aktivität des Stammes *E. coli* F470 pAK009 die Oberflächenständigkeit dieses Enzyms stark untermauern, da HA bedingt durch ihre Größe die Außenmembran von *E. coli* nicht überwinden und ihre Umsetzung nur an der bakteriellen Oberfläche stattfinden kann.

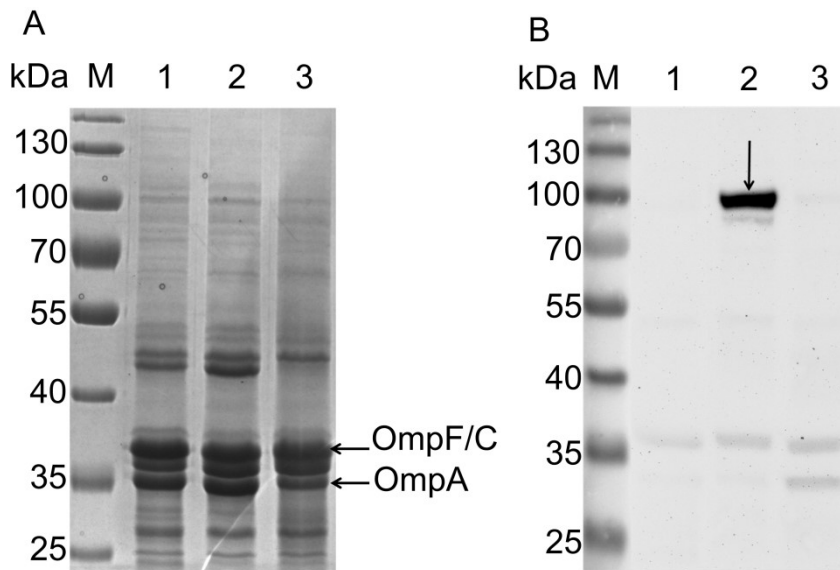


Abbildung 45: Nachweis der Oberflächenständigkeit von hHyal-1 auf *E. coli* F470 pAK009. (A) Ausschnitt aus dem Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamidgel der Außenmembranproteine. (B) Immunnachweis der hHyal-1-Fusionsproteine aus Proteinproben durch Western Blot und anschließende Inkubation der Trägermembran mit polyklonalem murinem anti-hHyal-1 Antikörper und Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem anti-Maus-IgG Antikörper. Spur 1: Angereicherte Außenmembranproteine von *E. coli* F470. Spur 2: Angereicherte Außenmembranproteine von *E. coli* F470 pAK009. Spur 3: Angereicherte Außenmembranproteine von *E. coli* F470 pAK009 nach einer Proteasebehandlung. Der Pfeil in B Spur 2 zeigt das hHyal-1-Fusionsprotein an. M: Proteingrößenstandard.

4.2 Aktivität der oberflächenständigen hHyal-1

Mit dem erbrachten Nachweis der Oberflächenständigkeit der hHyal-1 als Teil eines Autotransporter-Fusionsproteins auf F470 war die Voraussetzung für Aktivitätsbestimmungen des Enzyms in diesem Stamm gegeben.

Die ursprüngliche Arbeitsanleitung zur Expression des hHyal-1-Fusionsproteins in *E. coli* F470 pAK009 sah eine Supplementierung der Flüssigkulturen mit 15 mM 2-Mercaptoethanol vor (Kaeßler, 2009). Das Periplasma von *E. coli* besitzt unter physiologischen Bedingungen oxidierenden Charakter, der eine Ausbildung von Disulfidbrücken erlaubt. Durch Zusatz von reduzierenden Agenzien wie 2-Mercaptoethanol, sollte eine periplasmatische Ausbildung von Disulfidbrücken-Bindungen und eine vorzeitige Faltung des Passagiers unterbunden werden, da gefaltete Fusionsproteine für eine Translokation über die äußere Membran zu voluminös sein könnten (Jose und Zangen, 2005).

Nach einer 16-stündigen Anzucht in einer mit 2-Mercaptoethanol supplementierten Flüssigkultur wurde *E. coli* F470 pAK009 geerntet und in 0,1 M Formiatpuffer pH 3,5 (pH-Optimum konform mit Literaturangaben, bestimmt für *E. coli* F470 mit

oberflächenständigen hHyal-1) aufgenommen. Die Zellen wurden mit der HA-Lösung zu einer finalen OD₅₇₈ von 10 und HA-Endkonzentration von 0,11 mg/mL versetzt. Zu vorgesehenen Inkubationszeiten wurden die Proben bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen sedimentiert und 25 µL ihres Reaktionsüberstandes in die Kavernen einer Mikrotiterplatte überführt. Diese Proben wurden mit der „Stains-all“-Lösung und anschließend Reinstwasser versetzt und ihre Absorption bei 650 nm bestimmt (Abbildung 46 A). Es war jedoch verglichen mit den Kontrollproben nur eine marginale Abnahme der Absorption über die Zeit zu registrieren. Zum besseren Veranschaulichen der resultierenden Werte ist in Abbildung 46 B einen Ausschnitt aus dem Diagramm A dargestellt. Eine Absorptionsabnahme der hHyal-1 tragenden Zellen war vorhanden (0,03 Einheiten nach 60 min), das „Messfenster“ für eine spätere Testung von Inhibitoren jedoch zu schmal.

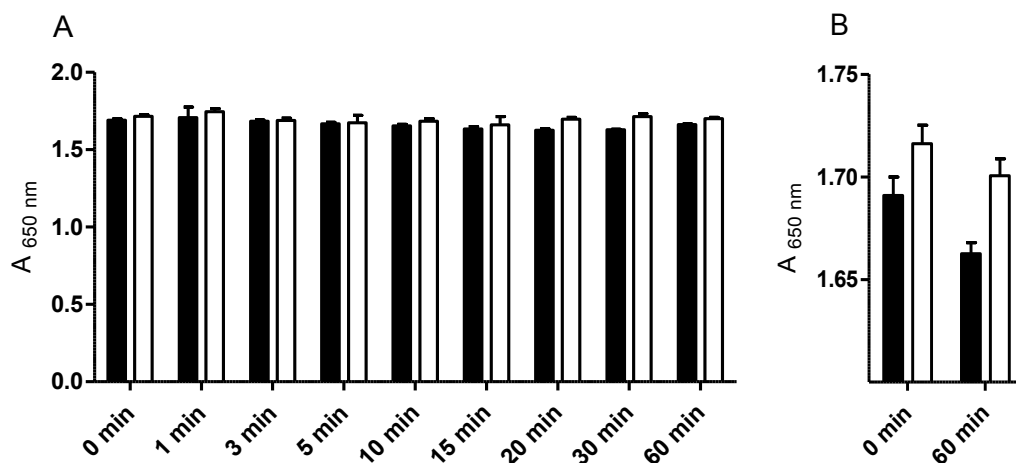


Abbildung 46: Testung von hHyal-1 exprimiert auf *E. coli* F470 pAK009 kultiviert in Gegenwart von 15 mM 2-Mercaptoethanol. Die Zellen wurden mit der HA-Lösung (Endkonzentration 0,11 mg/mL) zu einer finalen OD₅₇₈ von 10 versetzt. Nach Sedimentation der Zellen wurden die Reaktionsüberstände (25 µL) in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit „Stains-all“-Lösung (112 µL) und Reinstwasser (80 µL) versetzt und ihre Absorption bei 650 nm bestimmt (A). In B ist ein vergrößerter Abschnitt des Diagrammes A dargestellt. Schwarz: *E. coli* F470 pAK009. Weiß: *E. coli* F470. Dargestellt sind die Absorptionsmittelwerte der jeweiligen Probe (n=4, ±SD).

Die native hHyal-1 besitzt 5 Disulfidbrücken-Bindungen. Diese Bindungen sind für die Ausbildung von Tertiärstruktur der Hyaluronidasen und damit assoziierte Aktivität von besonderer Bedeutung (Li *et al.*, 2002). Die Zugabe von 2-Mercaptoethanol in den Anzuchtkulturen unterbindet die Ausbildung von Disulfidbrücken in hHyal-1. Dieser Einfluss konnte auch nach Entfernung des Anzuchtmediums und Waschschritten mit Puffer (pH 3,5) bestehen bleiben, da die Rückreaktion, also die Oxidation von Thiolgruppen zu Disulfidbrücken, im sauren Medium erschwert ist. Basierend auf dieser Überlegung wurde *E. coli* F470 pAK009 ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol für 16 Stunden bei 37 °C kultiviert. Aus dieser Kultur wurde eine weitere Kultur

angelegt, die für weitere 24 Stunden kultiviert wurde. Die verbliebenen Zellen der Vorkultur wurden geerntet und einem Aktivitätstest ($OD_{578} = 10$, HA 0,11 mg/mL) unterzogen. Zu verschiedenen Messzeiten wurde die Reaktion durch Abtrennung der Zellen beendet. Die Ansätze wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Messung gelagert. Mit den Zellen aus der Hauptkultur (24 Stunden Kultivierung) wurde ebenso verfahren. Die resultierenden Reaktionsansätze wurden simultan mit den Testproben aus der Vorkultur (16 Stunden Kultivierung) in einer Mikrotiterplatte überführt, mit „Stains-all“-Lösung und Reinstwasser versetzt und die hervorgerufene Absorption wurde bei 650 nm gemessen. *E. coli* F470 pAK009, kultiviert für 16 h, zeigte schon innerhalb der ersten 5 Minuten Reaktionszeit eine, verglichen zur Kontrolle, signifikante Reduktion der Absorption (Abbildung 47, A). Die Absorptionsabnahme betrug dabei 0,55 Einheiten. Nach 15 min nahm die Absorption nicht mehr ab. Die Kontrolle zeigte über die gesamte Inkubationszeit nahezu konstante Absorptionswerte. Die *E. coli* Zellen mit hHyal-1-Fusionsprotein, kultiviert für die Dauer von 24 h angelegt aus einer Vorkultur, zeigten bereits innerhalb der ersten 3 min eine steilere Absorptionsabnahme als die entsprechenden Zellen erzielt aus der Vorkultur (16 h Kultivierung). Es konnte nach 5 min Inkubationszeit eine Absorptionsabnahme von 1,07 Einheiten erreicht werden (Abbildung 47, B). Nach 10 Minuten war keine weitere Abnahme der Absorption zu beobachten. Es könnte sein, dass die gemessenen Werte die Basalabsorption von „Stains-all“ und Wasser darstellen. Außerdem katalysiert hHyal-1 nach einer fortgeschrittenen Hyaluronidase-Reaktion die Rückreaktion, die so genannte Transglykosylierung (Hofinger *et al.*, 2007a). Eine Hemmung der hHyal-1 durch entstandene Oligosaccharide ist ebenfalls denkbar. Die beiden Zellsuspensionen beinhalteten die gleiche Menge an Zellen ($OD_{578} = 10$). Die Zellsuspension geerntet nach einer längeren Inkubationszeit zeigte, wie beschrieben, höhere Aktivität. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass auf der Oberfläche dieser Zellen mehr funktionelles hHyal-1-Fusionsprotein vorhanden ist als auf Zellen nach einer 16-stündiger Kultivierung. Eine geringere Menge an Fusionsprotein dürfte durch entstandenes Produkt in früheren Phasen der Reaktion gehemmt werden. Bei einer größeren Menge an Fusionsprotein würden die entstandenen Oligosaccharide nicht zur vollständigen Hemmung aller Enzymmoleküle ausreichen, sodass die Reaktion weiter abläuft und die Absorptionswerte auf niedrigeres Niveau fallen. Diese Vermutung kann aber durch aktuelle Literaturlage nicht beantwortet werden.

Aus diesen Experimenten ging eindeutig hervor, dass ein Verzicht auf reduzierende Agenzien während der Kultivierung die Hyaluronidase-Aktivität von *E. coli* F470 pAK009 günstig beeinflusst (Abbildung 47 A). Das Anlegen einer Flüssigkultur aus einer Vorkultur für weitere 24 Stunden beschleunigte die Reaktionsgeschwindigkeit der Zellen mit oberflächenständiger hHyal-1 zusätzlich (Abbildung 47 B).

Das Enzym OTH erzielte im „Stains-all“ Verfahren bei einer Volumenaktivität von 15 U/mL eine Reduktion der Absorption von 0,042 Einheiten pro Minute, gemessen im linearen Bereich der Enzymaktivität. Ausgehend davon konnte für die Zellen *E. coli* F470 pAK009, kultiviert für 16 h, mit einer Absorptionsabnahme von 0,110 Einheiten pro Minute eine Volumenaktivität von 39,35 U/mL berechnet werden. Für die Zellen, die aus einer Vorkultur angelegt und für weitere 24 h kultiviert wurden, ergab sich mit einer Absorptionsabnahme von 0,214 Einheiten pro Minute eine Volumenaktivität von 76,56 U/mL. Eine OD_{578} der Zellsuspensionen von 10 wurde bei Messungen jeweils eingestellt. Mit der gleichen Bestimmungsmethode errechnete sich eine Volumenaktivität von 0,174 U/mL für die Zellen *E. coli* F470 pAK009 kultiviert unter reduzierenden Bedingungen. Damit war die Brauchbarkeit der *E. coli* Zellen mit oberflächenständiger hHyal-1 für eine verlässliche quantitative Aktivitätsbestimmung belegt.

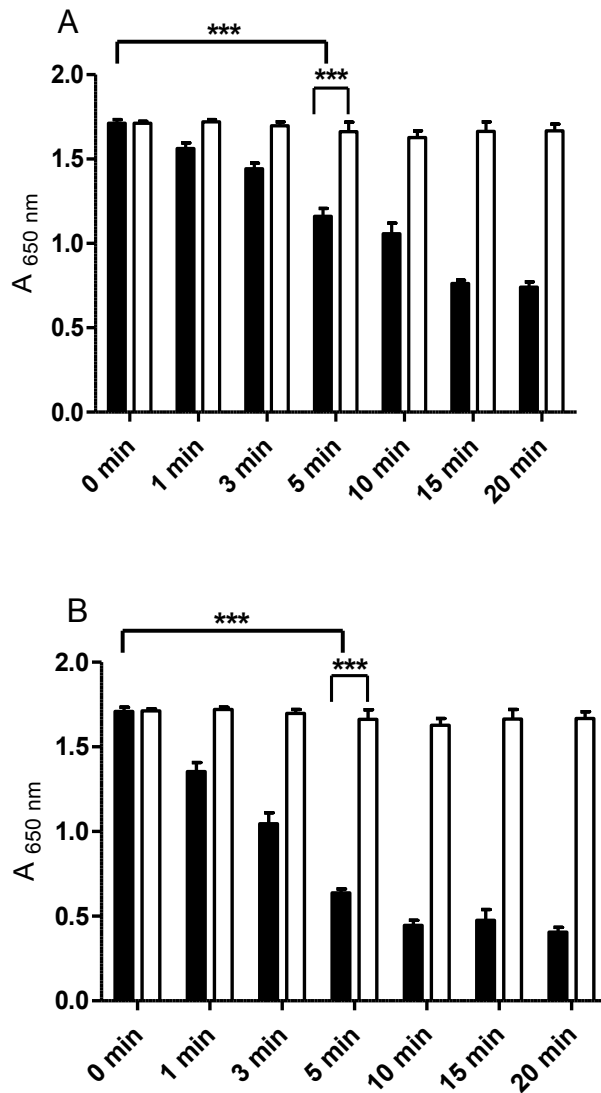


Abbildung 47: Testung von hHyal-1 exprimiert auf *E. coli* F470 pAK009 ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol. Die Zellen wurden mit der HA-Lösung (Endkonzentration 0,11 mg/mL) in einer finalen OD₅₇₈ von 10 zu verschiedenen Messzeiten inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen wurden die Reaktionsüberstände (25 µL) in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit „Stains-all“-Lösung (112 µL) und Reinstwasser (80 µL) versetzt und ihre Absorption bei 650 nm bestimmt. (A) Zellen gewonnen aus einer Vorkultur nach 16 Stunden Kultivierung. (B) Zellen gewonnen aus einer Flüssigkultur angelegt aus einer Vorkultur für weitere 24 Stunden Kultivierung. Schwarz: *E. coli* F470 pAK009. Weiß: *E. coli* F470. Dargestellt sind die Absorptionsmittelwerte der jeweiligen Probe (n=4, ±SD, ***p<0,001).

4.3 Identifizierung von pflanzlichen Inhaltsstoffen als Hemmstoffe der hHyal-1

Über Glycyrrhizinsäure, ein Saponin aus der Süßholzwurzel, ist in der Literatur als ein Hemmstoff der hHyal-1 mit IC₅₀-Werten um 30 µM berichtet worden (Isoyama *et al.*, 2006; Hofinger *et al.*, 2007b). Für die Untersuchungen zur Hemmung des hHyal-1-Fusionsproteins exprimiert auf *E. coli* F470 pAK009 wurden weitere pflanzliche Sekundärstoffe getestet. Es wurden Extrakte der traditionellen Arzneimitteldrogen vom Arbeitskreis Hensel (PharmaCampus, Münster) und drei Saponine vom

Arbeitskreis Melzig (Freie Universität, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Pflanzenextrakte wurden initial in einer Endkonzentration von 10 mg/mL eingesetzt. Bei einer mehr als 80 % Hemmung der hHyal-1-Aktivität wurde der IC₅₀-Wert bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 aufgeführt. Die Testungen wurden analog der Aktivitätsbestimmungen der hHyal-1-Fusionsprotein durchgeführt (OD₅₇₈ = 10). Die Zellen wurden mit den Testlösungen 5 Minuten inkubiert bevor die Reaktion durch HA-Zugabe gestartet wurde. Die Zellsuspension wurde aus einer Flüssigkultur (16 h Kultivierung) gewonnen. Diese Zellen mit oberflächenständiger hHyal-1 zeigten bereits nach 5 Minuten Reaktionszeit eine verlässlich ausreichende Hyaluronidase-Aktivität (Vergleiche Abbildung 47). Durch Einsatz dieser Zellen als Enzymquelle konnte auf eine weitere Kultivierung der Zellen verzichtet werden, das einen zeitlichen Vorteil von 24 h bedeutete. Darüber hinaus war die Gefahr, den linearen Bereich der Reaktion zu verlassen, geringer. Nach HA-Umsetzung wurden die Testansätze von Zellen befreit, mit „Stains-all“-Lösung und Wasser vermischt und bei 650 nm analysiert. Die Testsubstanzen zeigten keine Interaktion mit dem verwendeten Farbstoff „Stains-all“. Es erfolgte eine Endpunkt-Bestimmung. Als Nullwert diente die Absorption der Kontrollprobe mit dem Wirtstamm im Reaktionsansatz.

$$\text{relative Aktivität [\%]} = \frac{A(\text{Kontrolle}) - A(\text{Inhibitor})}{A(\text{Kontrolle}) - A(\text{DMSO})} * 100 \%$$

$$\text{Inhibition [\%]} = 100 - \text{relative Aktivität [\%]}$$

A (Kontrolle) = Absorption des Reaktionsüberstandes der Kontrollprobe nach dem Versetzen mit „Stains-all“-Lösung und Wasser

A (Inhibitor) = Absorption des Reaktionsüberstandes der Hyaluronidase-haltigen Probe versetzt mit dem potentiellen Hemmstoff nach der Zugabe von „Stains-all“-Lösung und Wasser

A (DMSO) = Absorption des Reaktionsüberstandes der Hyaluronidase-haltigen Probe versetzt mit DMSO nach der Zugabe von „Stains-all“-Lösung und Wasser

Tabelle 24: Untersuchungen von pflanzlichen Extrakten auf Hemmung der oberflächenständigen hHyal-1.

Extraktbezeichnung	% Inhibition bei 10 mg/mL	IC ₅₀ -Wert [mg/mL]
Henna Blätter	0	n.b
Schachtelhalmkraut	100	1,5
Birkenblätter	61	n. b.
Hauhechelwurzel	81	1,7

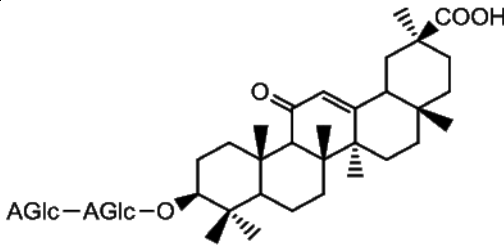
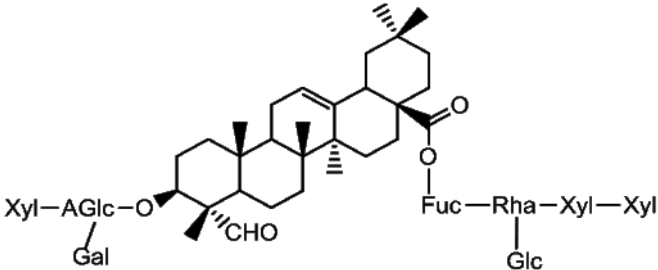
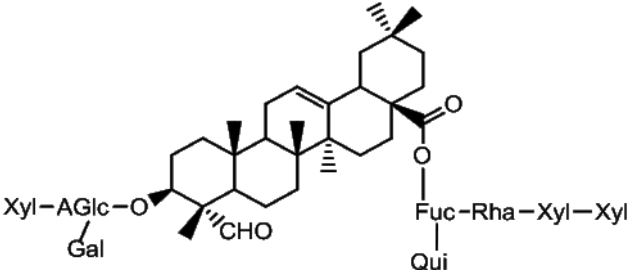
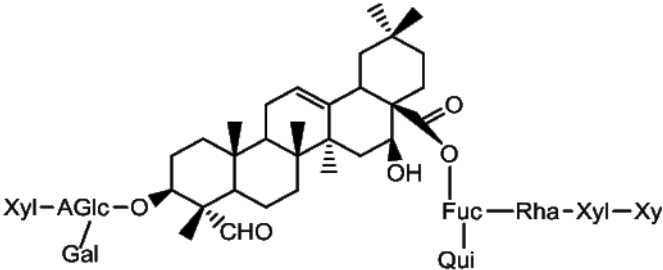
Extraktbezeichnung	% Inhibition bei 10 mg/mL	IC ₅₀ -Wert [mg/mL]
Bucco Blätter	21	n. b.
Maisbart	47	n. b.
Malvenblüten	100	1,4
Goldrutenkraut	100	4,9
Chebula Früchte	0	n. b.
Coptis rhizome	0	n. b.
Cranberry	10	n. b.
Eibischwurzel	60	n. b.
Kanadische Gelbwurzel	7	n. b.
Mahonia Wurzel	26	n. b.

Für die Extrakte Schachtelhalmkraut, Hauhechelwurzel, Malvenblüten, Goldrutenkraut wurden IC₅₀-Werte von 1,4 bis 4,9 mg/mL bestimmt. Die Drogenextrakte beinhalteten als Hauptkomponente Polysaccharide (Schleimstoffe), Flavonoide, Saponine und Gerbstoffe. Da Gerbstoffe ein Ausfallen von Proteinen verursachen können, wurde das Extrakt aus Chebula Früchten (> 45 % Gerbstoffe) als Kontrolle analysiert. Es modulierte die hHyal-1-Aktivität nicht. Saponine und Flavonoide sind in der Literatur als schwache Hemmstoffe der hHyal-1 bekannt (Facino *et al.*, 1995). In welchem Ausmaß die einzelnen Komponenten die Hyaluronidase-Aktivität beeinflussen, kann nur durch eine Fraktionierung der Extrakte und ihre anschließende Testung aufklären. Eine synergistische Wirkung ist ebenfalls denkbar.

Drei Triterpensaponine isolierte aus Kornrade (Weng *et al.*, 2010; Bottger und Melzig, 2013; Bottger *et al.*, 2013) wurden auf Hemmung der oberflächenständigen hHyal-1 hin geprüft. Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurde *E. coli* F470 pAK009 mit verschiedenen Konzentrationen an Testsubstanz vorinkubiert und anschließend ihr Vermögen zur HA-Spaltung mittels „Stains-all“-Methode untersucht. Unter Zuhilfenahme des Auswerteprogramms GraphPadPrism wurden die Hemmwerte in einem semilogarithmischen Dosis-Effekt-Diagramm gegen die Inhibitorkonzentration dargestellt und der IC₅₀-Wert berechnet (Abbildung 48). In Tabelle 25 sind die

Triterpensaponine und ihre IC_{50} -Werte aufgeführt. Um einen Vergleich der Strukturformeln zu vereinfachen, wurden die Zuckerreste bei der Darstellung abgekürzt. Die ermittelten IC_{50} -Werte betragen $108 \mu\text{M}$ für Gypsophila Saponin 2, $371 \mu\text{M}$ für SA1657 und $296 \mu\text{M}$ für SA1641. Die hemmende Wirkung dieser pflanzlichen Reinstoffe auf oberflächenständige hHyal-1 lag in der gleichen Größenordnung wie die Hemmwirkung von Glycyrrhizinsäure mit einem IC_{50} -Wert von $177 \mu\text{M}$ als bereits bekannter Hemmstoff der hHyal-1

Tabelle 25: Hemmung des hHyal-1 exprimiert auf *E. coli* F470 pAK009 durch getestete Triterpensaponine.

Extraktbezeichnung	Strukturformel	IC_{50} -Wert [μM]
Glycyrrhizinsäure		$177 \mu\text{M}$
Gypsophila Saponin 2		$108 \mu\text{M}$
SA1641		$296 \mu\text{M}$
SA1657		$371 \mu\text{M}$

Fuc: Fucose, **Gal:** Galaktose, **Glc:** Glukose, **GlcA:** Glucuronsäure, **Qui:** Quinovose, **Rha:** Rhamnose, **Xyl:** Xylose,

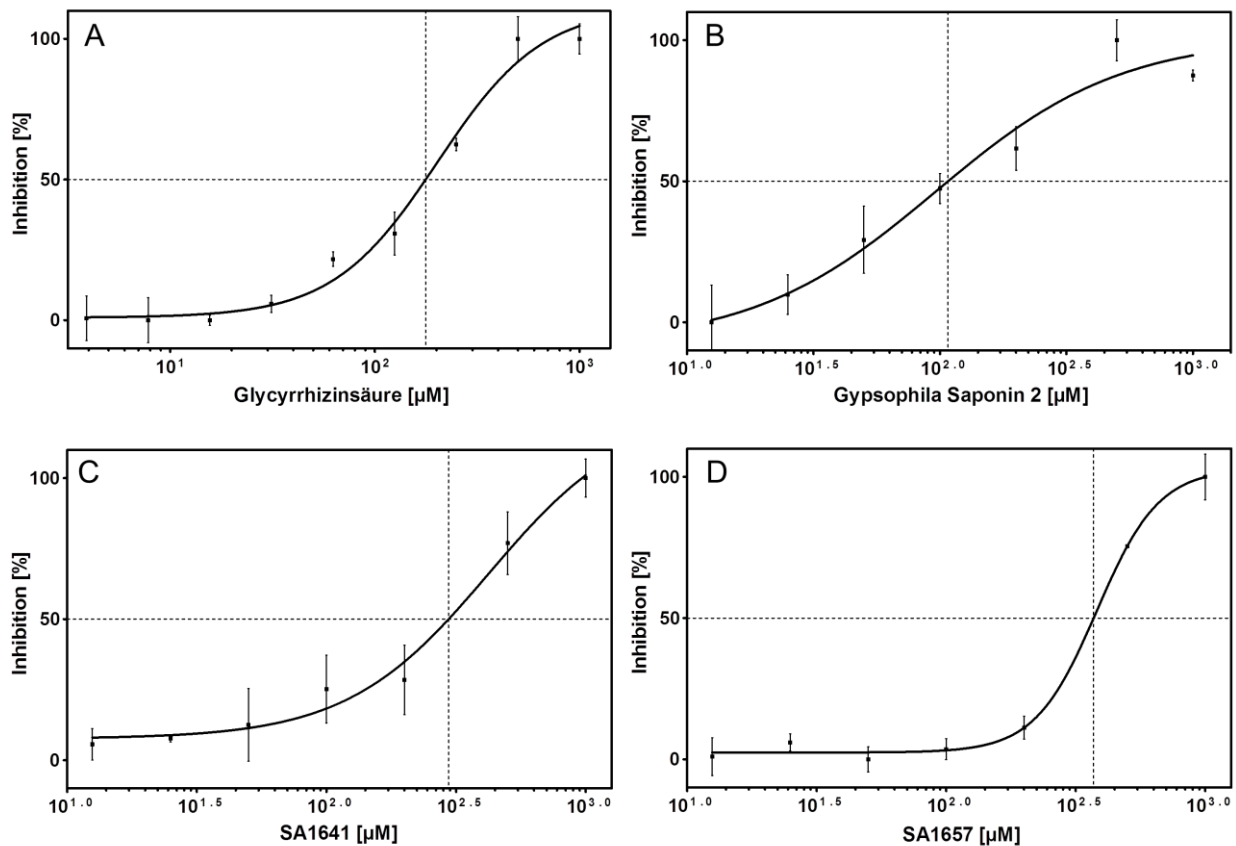


Abbildung 48: Bestimmung der IC_{50} -Werte der 4 Triterpensaponine mittels „Stains-all“-Verfahren. Die Hemmung von hHyal-1 wurde nach 5-minütiger Präinkubation der *E. coli* Zellen F470 pAK009 mit dem jeweiligen Triterpensaponin definierter Konzentration (0-1mM) bestimmt. Nach Zugabe von HA (0,11 mg/mL) zu den Zellen ($OD_{578} = 10$) wurden die Testansätze für 5 Minuten inkubiert. Nach Abtrennung der Zellen wurde der Reaktionsüberstand in Kavernen einer Mikrotiterplatte zuerst mit Stains-all-Lösung und anschließend Reinstwasser vermischt. Es folgte eine unmittelbare Bestimmung der Absorption bei 650 nm. (A) IC_{50} -Wert Bestimmung von Glycyrrhizinsäure. (B) IC_{50} -Wert Bestimmung von Gypsophila Saponin 2. (C) IC_{50} -Wert Bestimmung von SA1641. (D) IC_{50} -Wert Bestimmung von SA1657. ($n=4$, \pm SD).

Die „schäumende“ Eigenschaft der Saponine ließ eine Messung bei höheren Konzentrationen zum Erlangen eines Plateau-Levels für 100 % Hemmung (Abbildung 48 C und D) nicht zu. Damit konnte eine evtl. allosterische Hemmweise nicht ausgeschlossen werden. Trotzdem reichten die Ergebnisse für die Berechnung der Substanzkonzentration, bei der die Aktivität des Enzyms 50 % gehemmt ist.

5 Untersuchungen zur N-Glykosylierung von Hyaluronidasen als Autotransporter-Fusionsproteine

Humane Hyaluronidasen sind Glykoproteine. Glykosylierung ist eine der posttranslationalen Modifikationen an Proteinen im endoplasmatischen Retikulum. Diese Modifikation beeinflusst die Proteinkonformation und –stabilität und infolgedessen auch die katalytische Aktivität. Glykosylierung wurde lange als ein auf Eukaryoten beschränkter Prozess angesehen. Inzwischen ist dieser Vorgang auch in

einigen Prokaryoten wie Archaeobakterien erwiesen (Schaffer *et al.*, 2001). Als es Wacker *et al.* gelang, einen Gencluster aus dem enteropathogenem Bakterium *Campylobacter jejuni* nach *E. coli* zu transferieren, wurde die Kapazität von *E. coli* um N-Glykosylierung von Proteinen erweitert (Wacker *et al.* 2002). Der *C. jejuni* Proteinglykosylierungs-Locus (*pgl*) enthält Glykosyltransferasen und Enzyme, die in Zucker-Biosynthese involviert sind. Mehrere Glykosyltransferasen bilden ein Heptasaccharid (GalNAc)₂Glu(GalNAc)₃Bac. Dabei steht GalNAc für N-Acetylgalactosamin, Glu für Glukose und Bac für Bacillosamin. Dieses Oligosaccharid wird an einem ins Zytoplasma-gerichtetes Lipid in der inneren Membran addiert. Das Lipid-gebundene Oligosaccharid wird durch eine Flippase PglK ins Periplasma reorientiert. Im Periplasma angekommen wird es durch das Membranprotein, die Oligosaccharyltransferase PglB, erkannt und dem Amid-Stickstoff von Asparagin eines Zielproteins mit dem Konsensus Asn-Xaa-Ser/Thr angefügt (Xaa: beliebige Aminosäure mit Prolin als Ausnahme) (Pandhal *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurden *E. coli* Stämme mit dem Plasmid pACYC*pgl* transformiert und die Coexpression mit Hyaluronidase-Fusionsproteinen untersucht. Diese Stämme erhalten in Folgendem den Zusatz *pgl*⁺ in ihrer Bezeichnung.

5.1 N-Glykosylierung der hPH-20 in *E. coli*

E. coli JC8031 pBAD-ZO02, eingesetzt zur Anreicherung von hPH-20-tragenden AMV, wurde mit pACYC*pgl* zur N-Glykosylierung des hPH-20-Autotransporter-Fusionsproteins transformiert. Zu Beginn wurde dieser Stamm in seiner Fähigkeit, Glykoproteine zu produzieren, untersucht. Die Plasmide pBAD-ZO02 und pACYC*pgl* besitzen Gene für unterschiedliche Antibiotikaresistenzen und Replikationsursprünge aus verschiedenen Kompatibilitätsgruppen. Daher können sie problemlos in einem Stamm zusammen gehalten werden. *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 *pgl*⁺ wurde auf LB-Agarplatte kultiviert. Eine Nitrocellulose-Membran, benetzt mit Antibiotika und 0,2 % Arabinose, wurde zur Proteinexpression auf die Kolonien gelegt. Nach der Induktion wurde die Membran zur Zellyse der darauf haftenden Zellen auf Filterpapier, eingetränkt in NaOH-Lösung, platziert. Anschließend wurde sie neutralisiert und in Lösung eines mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem SBA-Lektin (Lektin aus Sojabohnen) inkubiert. Lektine sind Proteine, die spezifisch an Kohlenhydrate binden. Das SBA-Lektin hat eine hohe Bindungsaffinität zu N-Acetylgalactosamin. Der Kontroll-Stamm *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 ohne *pgl* wurde analog behandelt.

Nach Zugabe des ECL-Reagenzes (Peroxidase Substrat) wurde die Chemilumineszenz detektiert (Abbildung 49 B). Nur im *pgl*⁺-Stamm konnte die Produktion des Glykans nachgewiesen werden (B Spur 1). Bei den Kolonien ohne *pgl*-Gene war keine Chemilumineszenz detektierbar (B Spur 2). Die jeweiligen Membranstreifen unter Weißlicht sind in Abbildung 49 A dargestellt. Damit war die Funktionalität der *pgl*-Enzyme in *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 *pgl*⁺ erwiesen. Allerdings sollte man beachten, dass nicht nur das Autotransporter-Fusionsprotein, sondern auch alle im Periplasma vorkommende Proteine mit dem Konsensus Asn-Xaa-Ser/Thr glykosyliert werden können.

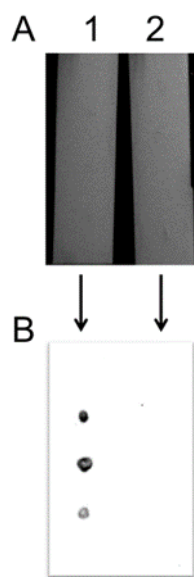


Abbildung 49: Nachweis von Glykanproduktion in *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 *pgl*⁺. *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 *pgl*⁺ (Spur 1) und *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 (Spur 2) wurden auf einer Agarplatte kultiviert. Die Proteinexpression erfolgte durch Auflegen von Nitrocellulose-Membran benetzt mit Arabinose. Nach einer Zellyse auf der Trägermembran wurden die immobilisierten Glykoproteine mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem SBA-Lektin unter Verwendung von ECL-Reagenz sichtbar (B). (A) Detektion der Trägermembran unter Weißlicht.

Um den Einfluss der Coexpression von *pgl* und pBAD-ZO02 auf die Hyaluronidase-Aktivität zu untersuchen, wurden die AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 *pgl*⁺ präpariert und einem Aktivitätstest unterzogen. Auch der Einfluss eines dritten Gens auf die Glykosylierung und Hyaluronidase-Aktivität wurde untersucht. Pandhal *et al.* (2013) fanden heraus, dass eine Coexpression von *pgl* und *ptsA* die Glykosylierung des Zielproteins um das 6,7 fache erhöht. Das Enzym *ptsA* gehört zum Phosphoenolpyruvat-abhängigen Zucker-Phosphotransferase-System und wirkt sich günstig auf die Aufnahme von Zuckern in die Zelle aus. Die Autoren vermuteten, dass die Erhöhung der Energiezufuhr in die Zelle die Proteinproduktion und damit die Effizienz der Glykosylierung steigerte. Zur Expression von *ptsA* stand das Plasmid pJexpress401*ptsA* zur Verfügung, das einen zu pBAD-ZO02 inkompatiblen

Replikationsursprung besitzt. Daher wurde die kodierende DNA-Sequenz der hPH-20 durch XhoI/KpnI Restriktionsendonukleasen gespalten und präparativ aufgereinigt. Zudem wurde das Plasmid pST003 ebenso mit beiden Enzymen XhoI/KpnI gespalten und das Vektorrückgrat ohne Passagie-Fragment gewonnen. Das Plasmid pST003 besitzt den *ColA*-Replikationsursprung, der mit dem *pBR322*-Replikationsursprung des *ptsA*-Plasmides kompatibel ist. Die Ligation der hPH-20-DNA mit dem Vektorrückgrat aus pST003 lieferte das Plasmid pT7-ZO08. Im entstandenen Plasmid pT7-ZO08 wurde die kodierende DNA-Sequenz für Kanamycinresistenz (*aph*) mittels „In-Fusion“ Methode gegen das β -Lactamasegen ausgetauscht. Dabei wurden die Oligonukleotide ZO20, ZO21 und Matrize pBAD-ZO02 für die Amplifikation des β -Lactamasegenes und Oligonukleotide ZO22 und ZO23 für die Amplifikation des Vektors pT7-ZO08 verwendet. Nach Verknüpfung dieser Fragmente entstand das Plasmid pT7-ZO09. So konnte das resultierende Plasmid pT7-ZO09 (*bla*, *ColA*-ori) neben pJexpress401*ptsA* (*aph*, *pBR322*-ori) und pACYC*pgl* (*cat*, *p15A*-ori) in *E. coli* parallel gehalten bleiben. Der neue Stamm *E. coli* JC8031 pT7-ZO09 *pgl*⁺*ptsA*⁺ wurde zur Anreicherung der AMV kultiviert und die gewonnenen AMV zur Aktivitätsuntersuchung eingesetzt. Zur Beurteilung der Hyaluronidase-Aktivität dieser AMV wurden die AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 und *E. coli* JC8031 pT7-ZO09 *ptsA*⁺ als Kontrolle simultan behandelt. Durch Zugabe der HA-Lösung zu den jeweiligen AMV startete die Reaktion für die Dauer von 3 Stunden. Nach einer Abtrennung der AMV aus den Reaktionsansätzen in einer Tischzentrifuge wurde jede Probe mit CTAB-Lösung inkubiert und die resultierende OD₅₈₀ bestimmt. In Abbildung 50 ist der Betrag der Trübungs-Abnahme nach drei Stunden Reaktionszeit dargestellt. Die Abnahme der OD₅₈₀ betrug 0,079 für AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02, 0,027 für AMV aus *E. coli* JC8031 pBAD-ZO02 mit Proteinglykosylierungsenzymen, 0,068 für *E. coli* JC8031 pT7-ZO09 mit Enzym *ptsA* und 0,011 für *E. coli* JC8031 pT7-ZO09 mit Proteinglykosylierungsenzymen und Enzym *ptsA*. Auffällig ist, dass die hPH-20-tragenden AMV gewonnen aus Zellen mit Proteinglykosylierungslocus (*pgl*) geringere Abnahme in der Trübung der Reaktionsansätze erzeugten als ihre Vergleichskontrollen ohne Proteinglykosylierungslocus. Eine Coexpression von *ptsA* zeigte ebenfalls keine Steigerung der katalytischen Aktivität.

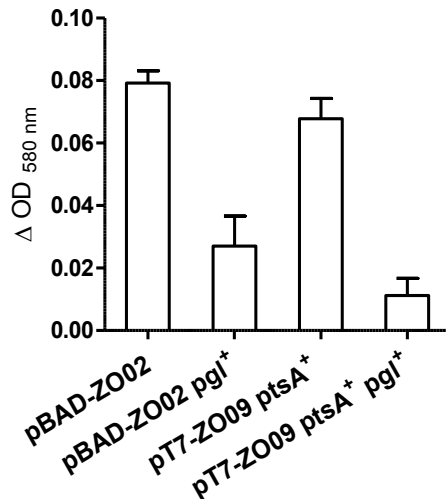


Abbildung 50: Einfluss der Coexpression von Proteinglykosylierungslocus (*pgl*) und *ptsA* auf die Hyaluronidase-Aktivität im Test mit AMV. Die *E. coli* Zellen zur Anreicherung von AMV enthielten neben dem Plasmid zur Oberflächenexpression der hPH-20 auch *pgl*- oder/und *ptsA*-Gen. Dargestellt ist die durchschnittliche Reduktion der Trübung nach 3 Stunden Reaktionszeit in der turbidimetrischen Methode ($n=3$, \pm SD).

Um den ungünstigen Einfluss der Coexpression der *pgl*-Enzyme auf die Aktivität von Hyaluronidase-Fusionsproteine zu überprüfen, wurden diese Enzyme und hHyal-1-Fusionsprotein in *E. coli* coexprimiert und die Hyaluronidase-Aktivität der Zellen untersucht. Wie bereits dargestellt (Abbildung 47), zeigte die oberflächenständige hHyal-1 eine hohe Hyaluronidase-Aktivität. Durch eine Coexpression von Proteinglykosylierungscluster sollte der negative Einfluss der Aktivität dieser Enzyme auf die Hyaluronidase-Aktivität untersucht und belegt werden.

5.2 N-Glykosylierung der hHyal-1 in *E. coli*

Die hHyal-1 ist ein N-glykosyliertes Protein (Chao *et al.*, 2007). Es wurde gezeigt, dass die Deglykosylierung der hHyal-1 eine 40 %ige Reduktion der enzymatischen Aktivität zur Folge hat (Hofinger *et al.*, 2007b). Durch eine Coexpression vom hHyal-1-Fusionsgen und Proteinglykosylierungslocus (*pgl*) aus *C. jejuni* in *E. coli* F470 sollte die erzielte Hyaluronidase-Aktivität zur Bewertung der Glykosylierung von Autodisplay-Fusionsproteinen herangezogen werden. Zu diesem Zweck wurde *E. coli* pAK009 mit pACYC*pgl* transformiert und lieferte den Stamm *E. coli* pAK009 *pgl*⁺. Zwei Flüssigkulturen der beiden Stämme wurden angelegt. Aus diesen Kulturen wurden Hauptkulturen inokuliert. Bei einer OD₅₇₈ von 0,3 wurde 0,2 % Arabinose zur Proteinbiosynthese der Glykosylierungsgene (*pgl*) zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und einem Aktivitätstest unterzogen (OD₅₇₈ 10, HA 0,11 mg/mL). Nach verschiedenen langen Inkubationszeiten mit HA wurden die Zellen

von den Ansätzen entfernt und in einer Mikrotiterplatte mit „Stains-all“-Lösung und Wasser versetzt. Die resultierenden Absorptionswerte sind in Abbildung 51 dargestellt. Beide Reaktionsansätze zeigten eine stetige Absorptionsabnahme in den ersten 10 Minuten. Es konnte jedoch eine stärkere Absorptionsabnahme durch *E. coli* F470 pAK009 ohne Proteinglykosylierungslocus (*pgl*) registriert werden. Die Coexpression von Glykosylierungsenzymen führte zu einer Reduktion der Hyaluronidase-Aktivität von Zellen mit hHyal-1-Fusionsprotein (weiße Säulen).

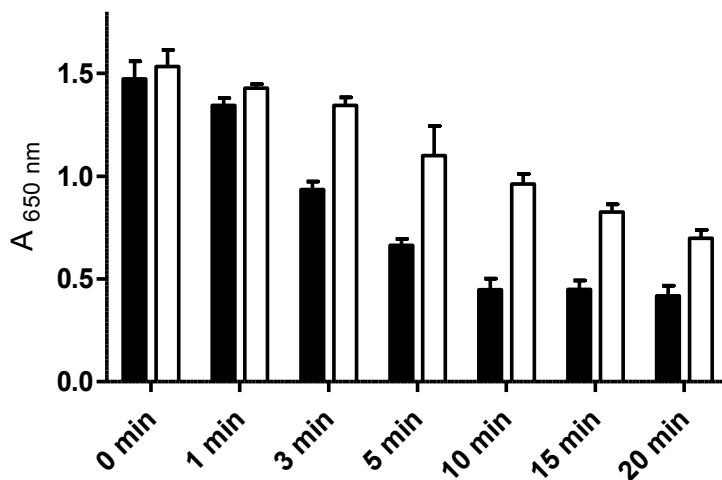


Abbildung 51: Testung des hHyal-1 exprimiert auf *E. coli* F470 pAK009 *pgl*⁺ (weiß) und *E. coli* F470 pAK009 (schwarz). Die Zellen wurden mit der HA-Lösung (Endkonzentration 0,11 mg/mL) zu einer finalen OD₅₇₈ von 10 versetzt und zur verschiedenen Messzeiten inkubiert. Nach Abtrennung der Zellen wurden die Reaktionsüberstände (25 µL) in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit „Stains-all“-Lösung (112 µL) und Reinstwasser (80 µL) versetzt und ihre Absorption bei 650 nm bestimmt. Dargestellt sind die Absorptionsmittelwerte der jeweiligen Probe (n=4, ±SD).

Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die *pgl*-Enzyme eine Oberflächenpräsentation der hHyal-1 verhindern. Die vorhandene Restaktivität der Zellen *E. coli* pAK009 *pgl*⁺ kann von Fusionsproteinen stammen, die bereits vor der Proteininduktion des *pgl* gebildet wurden (konstitutive Expression).

Als Nächstes sollte dieses Phänomen mittels Western Blot und Lektin-Behandlung weiter zu untersuchen. Dabei wurde die Expression von hPH-20-Fusionsprotein zu einer späteren Zeit induziert als die des Proteinglykosylierungslocus (Arabinose induzierbar). Zu diesem Zweck wurde der Stamm *E. coli* UT5600 pT7-ZO09 *pgl*⁺ konstruiert, der die Expression des hPH-20-Fusionsgenes unter Kontrolle des T7-Promotors erlaubt. Eine Anreicherung der Außenmembranproteine mittels Zellfraktionierung und ein Proteasezugänglichkeits-Test sollte die Oberflächenständigkeit des glykosylierten Passagiers überprüfen. Eine Hauptkultur

wurde angelegt. Bei einer OD_{578} von 0,4 wurde durch Zugabe von 0,2 % Arabinose die Proteinexpression des Proteinglykosylierungslocus (*pgl*) induziert. Nach einer Stunde wurde die Kultur mit 1 mM IPTG supplementiert. Nach Ablauf von insgesamt 3 Stunden wurden die Zellen gewonnen und in zwei Portionen geteilt. Eine Hälfte wurde einer Proteinase K-Behandlung unterzogen. Anschließend folgte die Anreicherung der Außenmembranproteine. Die Stämme *E. coli* UT5600 *pgl*⁺ und *E. coli* UT5600 wurden als Kontrollen simultan behandelt. Die Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Eine dominante Proteinbande war knapp oberhalb von 100 kDa in der Probe aus *E. coli* UT5600 pT7-ZO09 *pgl*⁺ zu erkennen (Abbildung 52, Spur 2), die nach proteolytischem Abbau mit Proteinase K stark reduziert war (Spur 3). Diese Bande war im Bereich des errechneten Molekulargewichts von hPH-20-Fusionsprotein (104 kDa). Diese Bande fehlte in den Präparationen der Außenmembranproteine von *E. coli* UT5600 (Spur 1) und *E. coli* UT5600 *pgl*⁺ (Spur 4). Da Proteinase K bedingt durch seine Größe die Außenmembran nicht passieren kann und die OmpA-Bande in voller Größe sichtbar war, konnte von einer Unversehrtheit der Zellen während des Verfahrens ausgegangen werden. Damit war die Oberflächenpräsentation des hPH-20 nachgewiesen. Der Nachweis der Glykosylierung der oberflächenständigen hPH-20 sollte durch Zucker-Detektion mit SBA-Lektin erbracht werden. Dazu wurden die Proteine nach einer Auftrennung durch SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert, die anschließend in einer Lösung des mit Meerrettich-Peroxidase gekopellten SBA-Lektins inkubiert wurde. Durch Zugabe des Peroxidase-Substrates sollte das Glykoprotein hPH-20-Fusionsprotein sichtbar gemacht werden. Allerdings konnte auf diesem Wege keine Chemilumineszenz detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Daraus ließ sich schließen, dass eine Glykosylierung des Autotransporter-Fusionsproteins den Translokationsmechanismus auf die Zelloberfläche verhindern könnte, so dass nur nicht glykosyliertes Fusionsprotein in den Präparationen der Außenmembranproteine zu detektieren war.

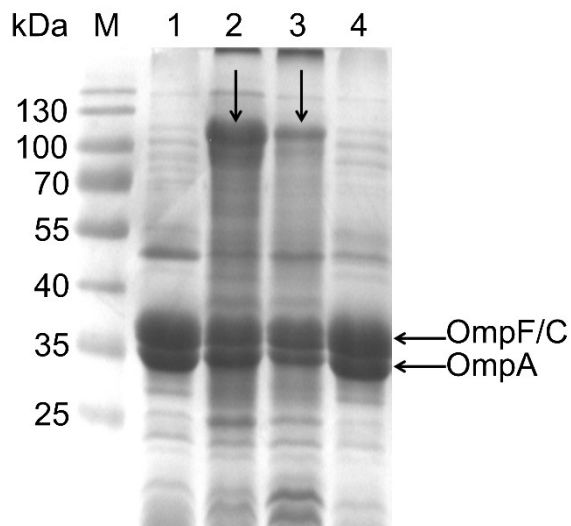


Abbildung 52: Anreicherung von Außenmembranproteinen nach einer Coexpression von hPH-20-Fusionsprotein und Proteinglykosylierungslocus (*pgl*). SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der Außenmembranproteinen aus *E. coli* UT5600 (Spur 1), *E. coli* UT5600 pT7-ZO09 *pgl*⁺ nach einer Proteinexpression ohne Proteinase K-Behandlung (Spur 2), *E. coli* UT5600 pT7-ZO09 *pgl*⁺ nach einer Proteininduktion und einer Proteinase K-Behandlung vor Zellfraktionierung (Spur 3) und *E. coli* UT5600 *pgl*⁺ als Kontrolle (Spur 4); Die Pfeile in Spur 2 und 3 zeigen die Proteinbanden von hPH-20-Fusionsprotein an. M: Proteingrößenstandard.

Nachdem die Glykosilierung von hPH-20-Fusionsprotein in der Präparation der Außenmembranproteine von *E. coli* UT5600 pT7-ZO09 *pgl*⁺ nicht nachweisbar war, wurde versucht, das Fusionsprotein in der während der Präparation anfallenden wässrigen Phase nachzuweisen. Im Verlauf einer Anreicherung von Außenmembranproteinen wird durch osmotischen Schock die im Periplasmavorliegende Peptidoglykanschicht für Hydrolyse mittels Lysozym zugänglich gemacht. Nach der Hydrolyse wird die äußere Membran fluider. Aus dieser nun lockerer sitzenden Membran werden die Außenmembranproteine mit Hilfe eines Tensidhaltigen Puffers (Extraktionspuffer) extrahiert. Auch periplasmatische Proteine sowie zytoplasmatische Proteine, die durch spontane Zelllyse freigesetzt werden, können sich in diesem Puffer befinden. Nach Abtrennen von Sphäroplasten und Zelltrümmern durch Niedergeschwindigkeit-Zentrifugation lassen sich die hydrophoben Außenmembranproteine durch Hochgeschwindigkeit-Zentrifugation von hydrophilen periplasmatischen und zytoplasmatischen Proteine in Form von Liposomen sedimentieren (Park *et al.*, 2014). Der Überstand wird dann verworfen. Beim nachfolgenden Experiment wurde *E. coli* UT5600 pT7-ZO09 *pgl*⁺ kultiviert und zuerst für zwei Stunden mit 0,2% Arabinose zur Expression von Proteinglykosylierungslocus und eine weitere Stunde mit 1 mM IPTG zur Expression von hPH-20-Fusionsprotein inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und im Tris/HCl Puffer (pH 7) für eine halbe Stunde gelagert. Es folgte eine protokollgemäße Anreicherung der

Außenmembranproteine. Dabei wurde der Extraktionspuffer mit periplasmatischen und zytoplasmatischen Proteinen nach der Sedimentation der Außenmembranproteine nicht verworfen, sondern lyophilisiert. Anschließend wurden sowohl die sedimentierten als auch die lyophilisierten Fraktionen in Proteinprobenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE, Coomassie- und Immunfärbung analysiert. In der sedimentierten Proteinprobe war eine Bande oberhalb von 100 kDa zu erkennen (Abbildung 53, A Spur 1). Sie entsprach dem Bereich des hPH-20-Fusionsproteins. Im diesem Bereich war keine eindeutige Bande in der aus dem Überstand lyophilisierten Proteinprobe zu erkennen (A Spur 2). Nach einer Immunfärbung mit SBA-Lektin wurde kein Signal in der Probe der sedimentierten Außenmembranproteine sichtbar (Abbildung 53, B Spur 1). Die aus Überstand lyophilisierte Probe zeigte keine scharfen Banden, Chemilumineszenz war jedoch zu detektieren (B Spur 2).

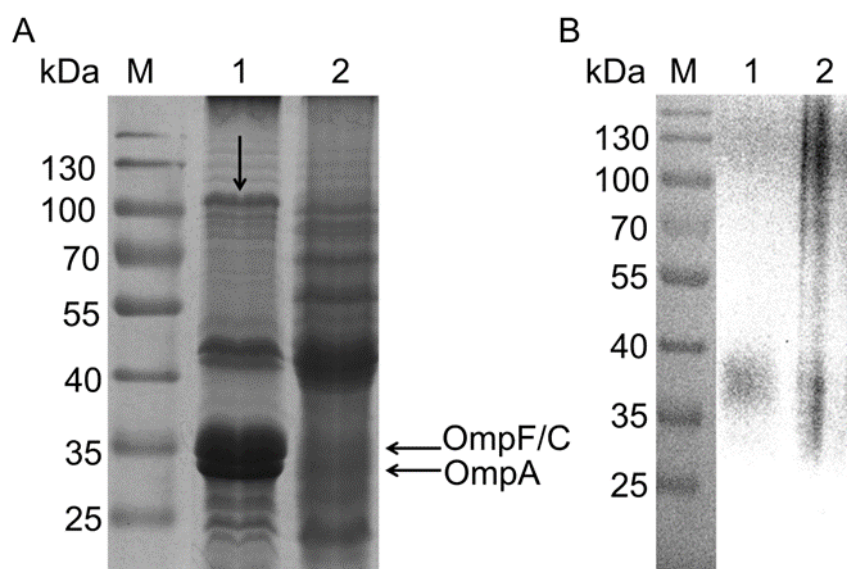


Abbildung 53: Überprüfen der Glykosylierung von hPH-20-Fusionsprotein in *E. coli* UT5600 T7-ZO09 *pgf⁺*. SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der angereicherten Außenmembranproteine (A Spur 1) und der aus dem Extraktionspuffer lyophilisierten Proteine (A Spur 2). Immunfärbung der erwähnten Proteinproben mittels mit Merrettich-Peroxidase gekoppeltes SBA-Lektins (B). Der Pfeil in A Spur 1 zeigt die Proteinbande von hPH-20-Fusionsprotein an. M: Proteingrößenstandard.

Es ist bekannt, dass glykosylierte Proteine in einem SDS-Gel nur diffuse Banden erzeugen. Außerdem enthielt die lyophilisierte Probe Elektrolyte und Triton X-100 aus dem Puffer, da dieser Probe bei der Lyophilisierung nur Wasser entzogen wird. Diese könnten das Laufverhalten von Proteinen beeinflussen. Dieses Ergebnis lässt nur vermuten, dass das Autotransporter-Fusionsprotein zwar glykosyliert werden könnte (Abbildung 49 B Spur 1 und 53 B Spur 2), dies aber seine physikochemischen Eigenschaften verändert hätte, da das glykosylierte Fusionsprotein in der Fraktion

der Außenmembranproteinen nicht nachweisbar war. Durch die Glykosylierung könnte das Fusionsprotein so verändert worden sein, dass seine Einlagerung in der äußeren Membran gestört wurde und es im Periplasma verblieb. Außerdem könnte durch die Glykosylierung das Fusionsprotein hydrophiler geworden sein und sich nicht mehr als ein typisches Außenmembranprotein aus einem wässrigen Medium sedimentieren lassen.

Zusammengefasst lässt sich bemerken, dass eine Glykosylierung der Proteine in *E. coli* zwar möglich ist (Abbildung 49), ihre Oberflächenpräsentation jedoch nicht stattfindet. Damit konnte keine eindeutige Aussage über den Einfluss der Glykosylierung auf die Aktivität der Hyaluronidase-Fusionsproteine getroffen werden.

IV Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur rekombinanten Expression der humanen Hyaluronidasen, PH-20 und Hyal-1, mittels Autodisplay im Modellorganismus *Escherichia coli* und anschließende Aktivitätsuntersuchungen durchgeführt. Für beide Fusionsproteine wurden Testverfahren entwickelt und ihre Brauchbarkeit für die Testung von Hemmstoffen überprüft.

1 Autodisplay der humanen Hyaluronidase PH-20 (hPH-20)

1.1 Testung von hPH-20-Fusionsprotein

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Autodisplay-Technologie die hPH-20 auf der Zelloberfläche von *E. coli* für Untersuchungen einfach und schnell verfügbar gemacht. Die erhaltenen Zellen wurden zur Aktivitätsbestimmungen mittels „Stains-all“ eingesetzt. Die „Stains-all“-Methode ist sehr sensitiv (Benchetrit *et al.*, 1977). Diesem Vorteil steht eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Störfaktoren wie z.B. Proteinen gegenüber. In Anbetracht der Ergebnisse in dieser Arbeit erwies sich ein Aktivitätstest mittels ganzen Zellen im neutralen Medium mit anschließender Detektion mittels „Stains-all“ als nicht verlässlich. Dabei wurde eine Absorptionsabnahme in Folge der Hyaluronidase-Aktivität durch die Stoffwechselprodukte aus *E. coli* Zellen gestört. Die Aktivitätsbestimmungen im sauren Medium lieferten nur ein relativ kleines Messfenster. Damit eigneten sich die Zellen mit oberflächenständiger hPH-20 für die Aktivitätsbestimmungen oder gar Inhibitionsbestimmungen nicht.

Eine Expression von hPH-20-Fusionsprotein unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors, *araBAD*, lieferte zwar eine höhere Konzentration an Fusionsprotein auf der bakteriellen Zelloberfläche (im Vergleich zur konstitutiven Expression), eine Steigerung der Hyaluronidase-Aktivität war jedoch nicht zu beobachten. Für eine katalytische HA-Spaltung muss das Polymer von der HA-Bindungsfurche gebunden und zum aktiven Zentrum der Hyaluronidase weitergeleitet werden (Chao *et al.*, 2007). Vermutlich existiert durch die Überexpression des Fusionsproteins eine dichte Packung der Passagierdomäne auf der Zelloberfläche, die einen Zugang des Substrates als ein Polymer zu tieferen Kavitäten des Enzyms sterisch hindern könnte.

Die Aufklärung der Kristallstruktur der Transporteinheit von AIDA-I zeigte, dass die überwiegende Anzahl der Aminosäuren der Linkerdomäne sich nach einer abgeschlossenen Translokation des Passagiers auf der Zelloberfläche befindet. Diese Aminosäuren können eine Sekundärstruktur bestehend aus mehreren β -Faltblättern bilden, die mit den in die Oberfläche ragenden Teilen des β -Fass interagieren. Damit verliert die Linkerregion teilweise an Flexibilität und kann den Passagier in einer Orientierung fixieren (Gawarzewski, 2013). In einer Veröffentlichung von Stern und Jedrzejewski (2006) wurde das Ribbon-Diagramm der hPH-20 basierend auf vorhandenen Daten über Hyaluronidasen und Kristallstruktur der hHyal-1 und Bienen-Hyaluronidase beschrieben. Ein Vergleich der Modelle beider Hyaluronidasen, hPH-20 und hHyal-1, lässt vermuten, dass die C-terminalen Domänen beider Proteine unterschiedliche Positionen zum katalytischen Zentrum einnehmen. Eine Fusion der C-terminalen Domänen mit der teilweise inflexiblen Linkerregion des Autotransporters könnte eine unterschiedliche Orientierung des aktiven Zentrums beider Enzyme auf der Zelloberfläche zur Folge haben. Aufgrund der ausgeprägten Hyaluronidase-Aktivität der *E. coli* Zellen mit hHyal-1 auf der Zelloberfläche, könnte eine freie Zugänglichkeit der katalytischen Domäne für HA vermutet werden. Da aber der C-Terminus von hPH-20 eine andere Position zum aktiven Zentrum des Enzyms einnimmt als beim hHyal-1, könnte es angenommen werden, dass die oberflächenständige hPH-20 eine andere Orientierung als die oberflächenständige hHyal-1 aufweist und ihr aktives Zentrum vermutlich Richtung Zellinnen und nicht zur äußeren Umgebung der Zelle zeigt. Diese Orientierung kann durch den nicht ausreichend flexiblen Linker des Autotransporters AIDA-I auf der Zelloberfläche fixiert werden, so dass das katalytische Zentrum beider Hyaluronidase-Fusionsproteine für ihr Substrat evtl. nicht im gleichen Maße zugänglich sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Aktivität der hPH20-tragenden Zellen auf zu niedrigem Niveau war. Eine Vergrößerung der Zellmenge in den Reaktionsansätzen ($OD_{578} > 20$) hatte eine höhere Viskosität der Suspension und damit einhergehend höhere Standardabweichungen der Messwerte zur Folge. Außerdem dürfte der Einfluss der metabolischen Störfaktoren auf die Detektion stärker ausfallen.

1.2 Intrazelluläre Expression der hPH-20

Zur intrazellulären Expression der hPH-20 wurde der *E. coli* Stamm Origami(DE3) eingesetzt. Dieser Stamm ist zur Expression von Disulfidbrücken-haltigen Proteinen konstruiert und soll die Bildung von Einschlusskörperchen verhindern. Allerdings lieferte die Expression und Aufreinigung eine sehr limitierte Menge an löslicher hPH-20. Ob hPH-20-Moleküle dennoch in Einschlusskörperchen vorlagen, wurde nicht untersucht. Weiterhin ist die Bildung von unlöslichen Aggregaten mit anderen Zellbestandteilen denkbar, da diese Hyaluronidase für ihr adhäsives Verhalten und ihre Tendenz zur Clusterbildung mit anderen Proteinen bekannt ist (Cherr *et al.*, 2001). Vermutlich können diese Merkmale die intrazelluläre Löslichkeit der hPH-20 in *E. coli* beeinträchtigen. Auch die fehlende Glykosylierung kann die Fehlfaltung des Proteins begünstigen. Die Aktivitätsbestimmung mit erhaltenen Proteinlösungen zeigte keine Hinweise auf HA-Abbau. Sicherlich ist eine nicht ausreichende Verfügbarkeit des Enzyms in den Testansätzen als limitierender Faktor anzusehen. Aber auch andere Einflussfaktoren können denkbar sein. Die fehlende Membrenumgebung für hPH-20 als ein Membranprotein dürfte dazu zählen. Außerdem wird beschrieben, dass hPH-20 verglichen mit hHyal-1 ein instabiles Protein darstellt (Hofinger *et al.*, 2007).

1.3 Aktivitätstest mittels Außenmembran-Vesikeln (AMV)

Bakterielle AMV sind diskrete und geschlossene Außenmembran-Blasen, die Produkte gesteuerter Prozesse darstellen und nicht in Folge von Zellyse oder Zelltod freigesetzt werden (Kuehn und Kesty, 2005). Die freigesetzten AMV aus *E. coli* JC8031 mit oberflächenständigen Fusionsproteinen wurden nach Entfernung von Pyrogenen bereits als Immuno-Vehikel zur Vakzination von Mäusen eingesetzt (Chen *et al.*, 2010). Dazu wurden die AMV mittels einer Affinitätschromatographie-Säule vom Lipid A des bakteriellen LPS getrennt. Die Säule (Detoxi-Gel column) enthielt immobilisiertes, kationisches Polymixin B mit einer Fettsäurekette, das das Lipid A bindet. Die aus der Säule gravimetrisch eluierten AMV wurden zur Vakzination eingesetzt. Dieser Ansatz diente als Ausgangspunkt für die Konstruktion von hPH-20-tragenden AMV. Damit sollten die Testansätze zur Bestimmung von Hyaluronidase-Aktivität vor metabolischen Einflüssen aus Bakterien während der Testungen geschützt bleiben.

Der Nachweis über die Anwesenheit der hPH-20 in AMV wurde mittels spezifischer Antikörper erbracht. Die Bestimmung des Zeta-Potentials von hPH-20-haltigen AMV und AMV ohne hPH-20-Fusionsprotein lieferte einen Hinweis für die Präsentation des hPH-20-Fusionsproteins auf der Oberfläche von AMV. Die Strategie zur Oberflächenpräsentation von Fusionsproteinen auf AMV wurde bereits von der Arbeitsgruppe um DeLisa erfolgreich angewendet (Kim *et al.*, 2008). Zu diesem Zweck wurde GFP mit C-Terminus des Virulenzfaktors Cytolysin A fusioniert (GFP-ClyA) und in *E. coli* JC8031 exprimiert. Cytolysin A ist ein Poren-bindendes Protein und wurde zur Oberflächenpräsentation von GFP eingesetzt. Die Oberflächenpräsentation von funktionellem GFP-ClyA auf AMV wurde unter Zuhilfenahme von Immuno-SPR (Surface Plasmon Resonance), Proteinase K-Behandlung und Western Blot gezeigt. Dabei wurde ebenfalls demonstriert, dass das GFP-ClyA nicht nur oberflächenständig existiert, sondern innerhalb von AMV geschützt vor äußeren Einflüssen nachweisbar war. Ein ähnliches Szenario ist auch für hPH-20-Fusionsprotein denkbar. Allerdings sollte bei der Beurteilung dieses Befundes ein Merkmal von GFP nicht außer Acht gelassen werden. GFP weist eine β -Fass-Struktur auf und gehört zu sogenannten „superfolder“ (Dinh und Bernhardt, 2011). Es ist daher denkbar, dass es seine Tertiärstruktur vollständig ausbildet, bevor die Translokation über die Außenmembran stattfindet. Dies würde sein Verbleib im Periplasma und damit im Inneren der AMV erklären. Die Arbeiten zur Charakterisierung von AMV durch Kim *et al.* wiesen ebenfalls die Anwesenheit von OmpA, ein abundantes Außenmembranprotein, und DsbA, eine periplasmatische Oxidoreduktase, in den AMV-Präparationen nach. Das zytoplasmatische Markerprotein, freies nicht fusioniertes GFP, war dabei von den angereicherten AMV ausgeschlossen (Kim *et al.*, 2008). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse stimmen mit den Befunden dieser Arbeitsgruppe überein. In dieser Arbeit wurde eine Verunreinigung der AMV-Präparationen durch die Innenmembrankomponente zusätzlich ausgeschlossen. Da die Menge an nativen Außenmembran- und Periplasmaproteinen in den Präparationen der AMV während der gesamten Aktivitätstestung gleich bleibt und eine aktive Sekretion von Stoffwechselprodukten wie bei *E. coli* Zellen und spontane Lyse der AMV ausgeschlossen wird (Kulp und Kuehn, 2010), wurde diesen Proteinen kein relevanter Einfluss auf die turbidimetrischen Detektion der hPH-20-Aktivität zugesprochen.

Die Hyaluronidase-Aktivitätstestung mit hPH-20-tragenden AMV als Enzymquelle in „Stains-all“-Verfahren zeigte einen eindeutigen HA-Abbau im Vergleich zu Kontroll-AMV. Die Werte waren jedoch mit hohen Standardabweichungen behaftet (Abbildung 35). Das lag wahrscheinlich daran, dass die AMV bei mehr als 85.000 x g angereichert, aber nach dem Aktivitätstest in einer Tischzentrifuge (ca. 20.000 x g) abgetrennt wurden. Das resultierende, weniger kompakte Sediment könnte bei der Bremsung der Zentrifuge oder Abnahme des Überstandes unterschiedlich stark aufgewirbelt worden und in die Testansätze gelangt sein. Dies konnte nicht durch die Ergebnisse mit Kontroll-AMV korrigiert werden, da diese Proben trotz der gleichen Anreicherungsmethode weniger Vesikel enthielten. Als Alternative dazu wurde die turbidimetrische Methode angewendet. Bei dieser Methode wird wie beim „Stains-all“-Verfahren die hochmolekulare HA mittels CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) detektiert. Infolge eines HA-Abbaus nimmt die Trübung ab. Die so ermittelten Trübungswerte wiesen geringe Standardabweichungen auf und die Methode zeigte ihre Brauchbarkeit für die Aktivitätsbestimmung der hPH-20-tragenden AMV. Aufgrund der Komplexität der Hyaluronidase-Aktivitätsbestimmungen sollte zusätzlich ein direkter Nachweis des HA-Abbaus erbracht werden. Dies geschah mittels Kapillarelektrophorese (CE). Die HA-abbauende Aktivität der hPH-20-präsentierenden AMV wurde über die Abnahme der Peakhöhe des HA-Polymers verfolgt, da die enzymatische Aktivität der untersuchten AMV für eine Diskriminierung der Signale von HA-Oligomeren und Komponenten aus AMV nicht ausreichend effizient war (Abbildungen 38 und 39). Die unspezifische, absorptionsspektrometrische Detektion der AMV-Komponente bei 200 nm könnte künftig durch Einsatz von fluoreszenter HA und eines Fluoreszenz-Detektors umgangen werden. Mit erhöhter Sensitivität der Detektion dürften die Peaks der HA-Oligomere mit einem ausreichenden Signal/Rausch-Verhältnis von den Peaks der Komponenten aus den AMV unterschieden werden.

Im Verlauf der Untersuchungen wurde die OmpT-Aktivität (Außenmembranprotease von *E. coli*) der AMV-Präparationen festgestellt (Abbildung 34). Um einen proteolytischen Abbau des oberflächenständigen Passagiers zu verhindern, wurde den Kulturen während der Proteininduktion die Proteaseinhibitoren Leupeptin und Pepstatin zugesetzt. Eine Aktivitätsbestimmung bei einem sauren pH-Wert sollte die OmpT-Aktivität zusätzlich unterbinden. Dies war für die hPH-20-Aktivität nicht relevant, da dieses Enzym sowohl im sauren als auch im neutralen Medium

katalytisch aktiv ist. Diese Strategie erwies sich für die Aktivitätsbestimmungen als günstig und führte zu einer Aktivitätserhöhung um 46 %. Damit wurde zum ersten Mal die Eignung der AMV als Vehikel für Autotransporter-Fusionsproteine gezeigt, das insbesondere wichtig ist, wenn sie bei Untersuchungen von zytoplasmatischen Einflüssen geschützt bleiben müssen. Auch wenn die Hyaluronidase-Aktivität auf einem niedrigen Niveau erzielt wurde, ist hervorzuheben, dass bis heute nur via Autodisplay-Technologie katalytisch aktive Hyaluronidasen rekombinant in prokaryotischen Zellen exprimiert wurden. Im Falle von hPH-20 als ein physiologisches Membranprotein könnte sich die Membranumgebung bei einer Expression via Autodisplay-Technologie trotz fehlenden posttranslationalen Modifikationen günstig auf die Aktivität wirken. Außerdem wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass eine Immobilisierung in der Außenmembran von *E. coli* eine verbesserte Stabilität des Proteins zur Folge hat (Kranen, 2010).

Mit der Entwicklung der turbidimetrischen Methode stand ein einfaches und schnelles Verfahren zur Aktivitätsbestimmung der hPH-20-tragenden AMV zur Verfügung. Diese Methode wurde zur Testung von potentiellen Hemmstoffen eingesetzt. Im Allgemeinen werden für diesen Zweck bekannte Hemmstoffe gewählt, deren Wirkung auf das Enzym von verschiedenen Autoren und Arbeitsgruppen demonstriert wurde. Allerdings ist für hPH-20 kein etablierter Referenzhemmstoff bekannt. Aus einer Reihe von Verbindungen aus verschiedenen chemischen Gruppen zeigten 5 Substanzen eine OTH-Inhibition von > 50 %. Diese Substanzen wurden auf Hemmung der hPH-20 hin geprüft. Allen war eine schwache hemmende Aktivität gemein. Sie zeigten eine maximale Hemmung von 45 % bei einer Konzentration von 200 μM (Tabelle 22). Eine weitere Substanzgruppe, die für ihre antiproliferative Wirkung bekannt war (Muller *et al.*, 1997), wurde für ihre hPH-20-Hemmung getestet. Dabei zeigte die Anthracen-Grundstruktur keine relevante Hemmung. Nur Derivate mit einer Phenylthiol-Substitution an C10 Position der Anthracen-Grundstruktur zeigten mehr als 50 % Hemmung bei 500 μM (Tabelle 23). Für diese Verbindungen, AA32, AA172 und AA181, wurden IC_{50} -Werte bestimmt. Ihre Hemmwirkung lag mit IC_{50} -Werten von 246 bis 376 μM in der gleichen Größenordnung. Obwohl in dieser Arbeit keine potenten Hemmstoffe für hPH-20 identifiziert wurden, können die erwähnten Testsubstanzen Ausgangspunkte für neue Leitstrukturen darstellen.

2 Autodisplay der humanen Hyaluronidase Hyal-1

Die humane Hyaluronidase Hyal-1 konnte aktiver Form auf der Oberfläche von *E. coli* F470 exprimiert werden. Anhand des proteolytischen Abbaus der hHyal-1 mittels Proteinase K wurde die Oberflächenständigkeit des Enzyms als ein Teil des Autotransporter-Fusionsproteins belegt. Damit stand hHyal-1 auf der bakteriellen Zelloberfläche ohne aufwendige Aufreinigung in eukaryotischen Zellen für Testungen zur Verfügung. Bislang gelang es nicht, hHyal-1 in *E. coli* in einer katalytisch aktiven Form zu exprimieren. Dabei bildete das rekombinante Protein unlösliche Einschlusskörperchen im bakteriellen Zytoplasma (Hofinger *et al.*, 2007b). Durch die Anwendung der Autodisplay-Technologie wird das Vorläufer-Fusionsprotein mit einem von Sec-Apparat abhängigen Signalpeptid markiert. Damit wird eine Faltung des Fusionsproteins bis zur Translokation über die innere Membran stark limitiert (Park *et al.*, 1988). An diesem Vorgang sind zytoplasmatische Chaperone der Sekretionsmaschinerie beteiligt. Vermutlich wird infolgedessen die Bildung von Einschlusskörperchen der Hyaluronidasen stark limitiert und ihr Transport ins Periplasma und als Nächstes auf die Zelloberfläche erlaubt.

Die ursprünglichen Arbeiten zur Oberflächenpräsentation von Cystein-haltigen Passagierdomänen sahen eine Sekretion nur unter reduzierenden Bedingungen im Periplasma vor. Es wurde angenommen, dass eine vorzeitige Proteinfaltung durch Ausbildung von Disulfidbrücken-Bindungen im Periplasma einen Export durch das β -Fass über die Außenmembran entgegen wirkt. Zur Expression solcher Autotransporter-Fusionsproteine sollten *E. coli* Stämme eingesetzt werden, die durch Deletion periplasmatischer Proteine (z. B. dsbA) statt physiologisch oxidierenden Bedingungen reduzierende Bedingungen im Periplasma aufweisen. Bei Arbeiten mit *E. coli* Stämmen mit physiologischen Bedingungen im Periplasma sollte eine Zugabe von Reduktionsmitteln, wie 2-Mercaptoethanol eine Ausbildung von Disulfidbrücken unterbinden. Die native hHyal-1 besitzt 5 Disulfidbrücken-Bindungen. Für die Expression des hHyal-1-Fusionsproteins in *E. coli* F470 pAK009 wurden die Kulturen anfänglich mit 2-Mercaptoethanol supplementiert. Allerdings zeigten die gewonnenen Zellen eine sehr schwache Hyaluronidase Aktivität von 0,174 U/mL (OD₅₇₈ = 10, „Stains-all“-Testverfahren). Da die Ausbildung von Disulfidbrücken-Bindungen für die Aktivität der Hyaluronidasen essentiell ist, wurde auf eine Supplementierung der Expressionskulturen mit Reduktionsmitteln verzichtet. Damit konnte unter den

gleichen Bedingungen eine Hyaluronidase-Aktivität der Zellen *E. coli* F470 pAK009 von 39,35 U/mL erreicht werden. Es wurde angenommen, dass der Einfluss des Reduktionsmittels auch nach einem dreimaligen Waschen mit Formiatpuffer der *E. coli* Zellen mit oberflächenständiger hHyal-1 bestehen bleibt und die Thiolgruppen im sauren Puffer zur Aktivitätsbestimmungen nicht mehr spontan zu Disulfidbrücken oxidiert werden. Allerdings steht der Export eines bereits im Periplasma gefalteten Proteins über die Außenmembran nicht im Einklang mit dem postulierten „Haarnadel“-Modell, das nur eine Translokation von nicht gefalteten Passagieren erlaubt. Dies dürfte für Fusionsproteine zutreffen, die eine schnelle Ausbildung ihrer Tertiärstruktur aufweisen und damit für einen Transport über die Außenmembran zu voluminös werden. Dazu gehört das Autotransporter-Fusionsprotein mit Aprotinin als Passagier, das nur unter reduzierenden Bedingungen oberflächenständig exprimiert wurde (Jose und Zangen, 2005).

Ein so genanntes „Alternativ“-Modell erlaubt jedoch den Export von partiell gefalteten Autotransporter-Fusionsproteinen (Gawarzewski *et al.*, 2013). Demnach faltet sich das Autotransporter-Fusionsprotein, nach der Translokation durch die innere Membran, mit Hilfe der periplasmatischen Chaperone unvollständig. Dieses Intermediat wird dann durch den Bam-Komplex in die äußere Membran integriert und das β -Fass in einer offenen Form gehalten, bis der teilweise gefaltete Passagier sich auf der bakteriellen Zelloberfläche befindet. Eine Translokation von einem Passagierdomäne im gefalteten Zustand mit inkorporiertem Coenzym wurde bereits in der Arbeitsgruppe diskutiert (Kranen, 2010). Die Experimente mit hPH-20- und hHyal-1-Fusionsproteinen können weitere Beispiele für eine Sekretion von bereits gefaltetem Fusionsprotein über die Außenmembran darstellen.

Ein weiteres Szenario für die funktionelle Translokation des Passagiers trotz der fehlenden reduzierenden Bedingungen ist auch möglich. Dabei wird angenommen, dass die Faltung des Passagiers mehr Zeit in Anspruch nimmt als der Translokationsvorgang durch das β -Fass. Angekommen auf der Zelloberfläche, kann sich die Tertiärstruktur der hHyal-1 langsam ausbilden. Dies könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung für die Steigerung der Hyaluronidase-Aktivität der Zellen gewonnen aus einer Flüssigkultur nach 24 h Inkubationszeit (Abbildung 47 B) im Vergleich zu einem aus einer Vorkultur nach 16 h Inkubationszeit (Abbildung 47 A) sein. Auch eine höhere Menge an hHyal-1-Fusionsprotein auf der Oberfläche der

einzelnen Zellen ist denkbar. Damit konnte eine Hyaluronidase-Aktivität von 76,56 U/mL ($OD_{578} = 10$) erreicht werden, die um 440-fache höher lag als die Aktivität der Zellen mit oberflächenständiger hHyal-1 kultiviert unter reduzierenden Bedingungen. Die Hyaluronidase-Aktivität der Zellen *E. coli* F470 pAK009 lieferte ein weiteres starkes Indiz für die Oberflächenständigkeit der hHyal-1, da ihr Substrat in Folge seiner Größe die Außenmembran nicht überwinden kann (Smith und Willett, 1968).

Über Glycyrrhizinsäure als ein bekannter Hemmstoff der hHyal-1 ist in verschiedenen Veröffentlichungen berichtet worden. Damit stand ein niedermolekularer Referenzhemmstoff zur Überprüfung der Brauchbarkeit der *E. coli* Zellen mit oberflächenständiger hHyal-1 für Inhibitortestung zur Verfügung. Die bis heute stärksten bekannten Hemmstoffe für hHyal-1 sind sulfatierte Polysaccharide und Polystyrole. Für Heparin wurde ein IC_{50} -Wert von 0,39 μ M für Hemmung der hHyal-1 ermittelt (Isoyama *et al.* 2006). Der Einsatz von Polymeren als Therapeutika ist jedoch aufgrund ihrer geringen Bioverfügbarkeit und teilweise vorhandenen Toxizität nicht geeignet. Die Möglichkeit der Anwendung hHyal-1-tragender *E. coli* F470-Zellen für Testung von Hemmstoffen wurde mit Glycyrrhizinsäure als Testsubstanz überprüft. Es wurde das Testverfahren mit dem „Stains-all“-Farbstoff angewendet. Die erzielte Hyaluronidase-Aktivität der Zellen *E. coli* F470 pAK009 nach 5 Minuten Reaktionszeit war ausreichend für die Testung von Hemmstoffen, und die Absorptionwerte waren hoch signifikant von den Werten der Kontrolle zu diskriminieren. Dieses Verfahren ist sensitiver als das Verfahren mit CTAB als Detektionsreagenz. Außerdem zeigten die getesteten pflanzlichen Sekundärstoffe eine starke Interaktion mit dem CTAB-Reagenz, die mit dem „Stains-all“-Farbstoff nicht zu beobachten war. Die Testung von Glycyrrhizinsäure verursachte eine Hemmung der HA-Spaltung der oberflächenständigen hHyal-1 mit einem IC_{50} -Wert von 177 μ M. Für Glycyrrhizinsäure sind in der Literatur IC_{50} -Werte von 26 μ M (Hofinger *et al.*, 2007b) und 39,4 μ M (Isoyama *et al.*, 2006) für die Hemmung der rekombinant isolierten hHyal-1 bekannt. Im Allgemeinen ist es schwierig, in verschiedenen Laboratorien erzielte IC_{50} -Werte direkt miteinander zu vergleichen. Große Diskrepanzen entstehen durch verschiedene Testparameter, Enzym- und Substratquelle, eingesetzte Farbstoffe oder instrumentelle Analytik. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass nicht nur die Menge an eingesetzter Hyaluronsäure, sondern auch ihre mittlere Kettenlänge die Bestimmung des IC_{50} -Wertes beeinflusst. Im

Allgemeines ist ein Vergleich von Inhibitionskonstanten (K_i) verlässlicher als ein Vergleich der IC_{50} -Werte. Allerdings ist eine Bestimmung vom K_i -Wert sehr aufwendig, da eine Bestimmung von Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und Inhibitionsmodus wichtige Informationen für die K_i -Bestimmung darstellen. Diese Informationen sind aber für Hyaluronidasen nicht ohne Weiteres zu bestimmen. Während des Abbaus von HA durch Hyaluronidasen entstehen neue HA-Fragmente, die ebenfalls Substrate darstellen. So verändert sich die Menge an Substrat im Reaktionsansatz, welches eine eindeutig verlaufende Kinetik verhindert. Neben Glycyrrhizinsäure wurden weitere Triterpensaponine hinsichtlich ihrer Hemmung der oberflächenständigen hHyal-1 getestet: Der ermittelte IC_{50} -Wert betrug für Gypsophila saponin 2 108 μ M, für SA1641 296 μ M und für SA1657 371 μ M. Damit befand sich die hemmende Wirkung dieser pflanzlichen Reinstoffe auf hHyal-1-Fusionsprotein auf dem gleichen Niveau wie die Hemmwirkung der Glycyrrhizinsäure. Ob das vorwiegend hydrophobe Triterpen-Grundgerüst oder die hydrophile Zuckerketten oder auch die Abwechslung von hydrophoben und hydrophilen Bereichen im Molekül für die Hemmung der hHyal-1 zuständig ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Die Frage nach einer Struktur-Wirkungsbeziehung kann anhand der limitierenden Anzahl an Testsubstanzen nicht beantwortet werden. Die relativ hohen IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich könnten vermutlich nur eine Konsequenz der physikalischen Eigenschaften der Saponine sein. Saponine sind membran-aktiv (Bottger und Melzig, 2013). Von dieser Stoffgruppe wurde eine Komplexbildung mit Cholesterol in der eukaryotischen Zellmembran nachgewiesen. Ähnliche Vorgänge an der bakteriellen Außenmembran können angenommen werden. Eine Interaktion oder gar Integration von Saponinen in die äußere Membran der hHyal-1-tragenden *E. coli* Zellen würde eine Reduktion der Konzentration an freien Saponinen bedeuten. Dies würde sich in einem hohen IC_{50} -Wert der Testsubstanz reflektieren.

Die phytochemischen Konstituenten von Pflanzenextrakten als Hemmstoffe für bovine und bakterielle Hyaluronidasen waren häufiger Gegenstand von Untersuchungen. Dabei wurden für Saponine und Flavonoide IC_{50} -Werte in mikro- bis milimolaren Bereichen ermittelt (Facino *et al.*, 1995; Hertel *et al.*, 2006; Myose *et al.*, 2012; Selenge *et al.*, 2013). Die in dieser Arbeit getesteten, traditionell angewendeten pharmazeutischen Drogen Melvenblüten, Schachtelhalmkraut und Hauhechelwurzel zeigten für oberflächenständige hHyal-1 IC_{50} -Werte von 1,4 bis

1,7 mg/mL. Eine lokal topische Anwendung dieser Drogen bei Wundheilungsprozessen ist denkbar. Die günstige Beeinflussung von Mundplaques und Gingivitis durch exogenen Zusatz von Hyaluronsäure in Mundwässern und – gellen (Jentsch *et al.*, 2003) führt zur Annahme, dass eine Erhöhung der endogenen HA-Konzentration durch Zugabe von Hyaluronidase-Hemmstoffen in Präparaten einen vergleichbaren Effekt zur Folge haben kann. Die oben genannten Drogen könnten solche Zusätze darstellen.

Die Experimente mit *E. coli* F470 pAK009 belegten die Anwendbarkeit dieser Zellen für einen routinemäßigen Einsatz als Ersatz für eine zeit- und kostenaufwendige Isolation des Enzyms aus eukaryotischen Zellen. Die Immobilisierung der hHyal-1 auf der bakteriellen Zelloberfläche bietet zusätzlich den Vorteil, dass das Enzym durch eine einfache Zentrifugation aus dem Reaktionsansatz entfernt werden kann. Es wurde mit dem vorgestellten Testverfahren zum ersten Mal eine effiziente Hyaluronidase-Aktivität von hHyal-1-Fusionsprotein mit einem geringen Aufwand demonstriert, die eine verlässliche Basis für Testung von potentiellen Hemmstoffen bietet.

3 Untersuchungen zur Glykosylierung des Autotransporter-Fusionsproteins

Ungefähr 70 % von human therapeutischen Proteinen sind glykosyliert (Sethuraman und Stadheim 2006). Die Art und Position dieser Zuckerreste beeinflussen die biologische Aktivität der Proteine. Humane Hyaluronidasen gehören zu Glykoproteinen. Bis heute ist die Kristallstruktur der hPH-20 nicht aufgeklärt. Allerdings wurden 5 potentielle Glykosylierungsstellen für hPH-20 kalkuliert (UniProt Code: P38567). In welchem Ausmaß die Glykosylierung die katalytische Aktivität der hPH-20 moduliert, wurde bislang nicht untersucht. Die Arbeitsgruppe um Cherr zeigte, dass eine Deglykosylierung der isolierten PH-20 aus Makaken-Affen zum vollständigen Verlust der Hyaluronidase-Aktivität führte (Li *et al.*, 2002). Vermutlich dürfte ein Einfluss der Deglykosylierung auf die Aktivität der hPH-20 in ähnlichem Umfang gelten. Die erzielte Hyaluronidase-Aktivität für hPH-20-Fusionsprotein in dieser Arbeit blieb deutlich hinter Literaturergebnissen, die mit isolierten Hyaluronidasen aus eukaryotischen Zellen (Hofinger *et al.*, 2007a) erreicht wurden. Dies dürfte wesentlich in einer fehlenden Glykosylierung der hPH-20 in *E. coli* begründet sein. Ausgehend von dieser Überlegung und basierend auf Arbeiten von

Wacker *et al.* (2002) und Pandhal *et al.* (2013) wurde versucht, den Passagier des Autotransporter-Fusionsproteins mit Hilfe von einem Enzymcluster aus *Camphylobacter jejuni* zu glykosylieren. Eine Coexpression von pgl-Enzymen und hPH-20-Fusionsprotein führte jedoch zu einer 65 %igen Reduzierung der Hyaluronidase-Aktivität (Abbildung 50). Um das verlässlicher zu beurteilen, wurde hHyal-1-Fusionsprotein als Zielprotein zu N-Glykosylierung herangezogen, da dieses Protein im Test mit ganzen Zellen eine ausgeprägte katalytische Aktivität zeigte. Für hHyal-1 wurde nach einer erfolgten Deglykosylierung eine Reduzierung der Hyaluronidase-Aktivität um ca. 40 % gezeigt (Hofinger *et al.*, 2007b). Dies würde bedeuten, dass eine Glykosylierung der Passagierdomäne vom hHyal-1-Fusionsprotein ihre Aktivität begünstigen würde. Paradoxerweise wurde in dieser Arbeit das Gegenteil erreicht. Eine Coexpression von pgl-Enzymen und hHyal-1-Fusionsprotein führte hier zu einem Aktivitätsverlust von 66 % (Abbildung 51). Aus diesem Grund wurde die Aminosäuresequenz der Transporteinheit (Linker und β -Fass) analysiert. Die Analyse lieferte 11 Erkennungssequenzen der PglB Oligosaccharyltransferase in diesen Abschnitten (Abbildung 53, unterstrichen). Kowarik *et al.* (2006) bestimmten dazu, dass das Vorhandensein von negativ geladenen Aminosäureresten an der Position -2 zu Asparagin (D/E-X-N-Y-S/T) die Effizienz der N-Glykosylierung stark erhöhte. Dieser Konsensus ist auch im β -Fass vorhanden. Damit weist die Sequenzanalyse einen höheren Glykosylierungsgrad der Transporteinheit des Autodisplay-Fusionsproteins als der Passagier auf (Abbildung 54, A). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Reduzierung der Hyaluronidase-Aktivität im Test mit Pgl-Enzymen liefern. Vermutlich werden durch Glykosylierung die physikochemischen Eigenschaften der Autotransporter soweit verändert, dass eine Translokation über die äußere Membran gestört ist und nur der Anteil an Fusionsprotein ohne bzw. mit geringer Modifikation eine Oberflächenpräsentation des Passagiers erlaubt. Eine gestörte Translokation würde bedeuten, dass die Fusionsproteine im periplasmatischen Raum verbleiben und zur Aktivitätsbestimmungen nicht beitragen. Ein nicht nachweisbares Glykoprotein in der Außenmembranpräparation könnte ebenfalls in vorwiegend hydrophilen Eigenschaften der N-Glykosylierten Autotransporter-Fusionsproteine begründet sein. Zur Aufklärung und Bestätigung dieser Thesen sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

A:

ELNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINNATGQGVTFYVD
 RLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW
 ARNWPKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLRPNH
 LWGYLLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAA
 TLYVRNRVREAIRVSKIIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGAS
 GIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNS
SDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADVKTDA
 VDVCIADGVCIDAFKPPMETEETEPQIFYNAPSTLSG

B:

LNPTKESAGNTLTVSNYTGTPGSVISLGGVLEGDNSLTDRLVVKGNTSGQSDIVYVNEGD
 SGGQTRDGINIISVEGNSDAEFSLKNRVVAGAYDYTLQKGNESGTDNKGWYLTSHLPTSD
 TRQYRPENNGSYATNMTLANSLFLMDLNERKQFRAMSDNTQPEASVWMRITGGRSSGKLN
 DGQNKTTTNQFINQLGGDIYKFHAEQLGDFTLGIMGGYANAKGKTINYTSNKAARNTLDG
 YSVGUYGTWYQNGENATGLFAETWMQYNWFNASVKGDGLEEEKYNLNGLTASAGGGYNLN
 VHTWTSPEGITGEFWLQPHLQAVWMetGVTPDTHQEDNGTVVQAGAKNNIQTAKGIRASW
 KVKSTLDKDTGREFRPYIEANWIHNTHFGVKMSDDSQLLSGSRNQGEIKTGIEGVITQN
LSVNGGVAYQAGGHGSNAISGALGIKYSF

Abbildung 54: Aminosäuresequenz der hPH-20 (A) und der Transporteinheit der AIDA-I (B). Der Konsensus der N-Glykosylierung ist unterstrichen. Asparagin als Akzeptor der N-Glykosylierung ist fett dargestellt.

Wenngleich eine Coexpression von Pgl-Enzymen und hPH-20- bzw. hHyal-1-Fusionsprotein zu Reduktion der Aktivität führte, kann dieses Enzymcluster künftig zur Modifikation von eukaryotischen Zielproteinen im Periplasma von *E. coli* eingesetzt werden. Dabei werden die Fusionsproteine für einen Transport über die innere Membran mit einem Signalpeptid der bakteriellen Sekretionsmaschinerie versehen. Angekommen im Periplasma, wird der Konsensus der N-Glykosylierung von der Oligosaccharyltransferase erkannt und glykosyliert. Mit dieser Methode wurden verschiedene Zielmoleküle, darunter Antikörper, modifiziert (Pandhal *et al.*, 2013). Sie kann weiterhin optimiert werden. Die Enzyme der Glykan-Biosynthese des Pgl-Clusters aus *C. jejuni* konnten durch eukaryotische Glykosyltransferasen ersetzt werden, welche einen Mannose-haltigen Glykan synthetisierten. Damit konnte ein N-Glykan mit einer für humane Zellen allgemeinen Kernstruktur an Zielproteinen addiert werden (Valderrama-Rincon *et al.*, 2012). Durch Analyse von metabolischen Netzwerken und einer Codon-Optimierung des *pglB*-Genes für eine Expression in *E. coli* gelang es ebenfalls eine Erhöhung der Glykosylierungseffizienz eines Zielproteins von 13 % auf 77 % (Pandhal *et al.*, 2011; Pandhal *et al.*, 2012). Basierend auf diesen Arbeiten können künftig humane Glykoproteine (z. B. Antikörper) auf eine günstige Weise produziert werden und als Bindungspartner für Untersuchungen mit Autotransporter-Fusionsproteinen eingesetzt werden.

4 Fazit

In dieser Arbeit konnten Verfahren für die Hyaluronidase-Aktivitätsbestimmung beider Enzyme hPH-20 und hHyal-1, als Teil von Autotransporter-Fusionsproteinen etabliert werden. Durch Einsatz der Autodisplay Technologie entfiel eine zeit- und kostenintensive Isolierung beider Enzyme. Das hPH-20-Fusionsprotein zeigte eine ausreichende enzymatische Aktivität. Eine Aktivitätsbestimmung auf Basis von AMV erlaubte die Detektion einer geringen hPH-20-Aktivität, ohne Einfluss der Stoffwechselprodukte aus *E. coli*. Die hHyal-1 wurde an der bakteriellen Zelloberfläche für Aktivitätsbestimmungen leicht zugänglich gemacht und zeigte eine verlässliche und hohe Aktivität, wodurch die Testung von potentiellen Hemmstoffen möglich gemacht wurde. Zukünftig könnten Testsubstanzen mit sulfatierten Zuckereinheiten oder mit hydrophoben und hydrophilen Bereichen (Vergleiche „tape-like“ Struktur der HA) als potentielle Hemmstoffe untersucht werden. Auch Übergangszustandsanaloga des Substrates können auf der Suche nach potenten Hemmstoffen viel versprechend sein.

V Literaturverzeichnis

- Abramson C und Friedman H (1967) Direct localization and visualization of hyaluronate lyase activity by agar gel electrophoresis. *Proc Soc Exp Biol Med* 125:256-260.
- Alburn HE und Whitley RW (1951) Factors affecting the assay of hyaluronidase. *J Biol Chem* 192:379-393.
- Asada M, Sugie M, Inoue M, Nakagomi K, Hongo S, Murata K, Irie S, Takeuchi T, Tomizuka N und Oka S (1997) Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:1030-1032.
- Back SA, Tuohy TMF, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo N, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF, Rao MS und Sherman LS (2005) Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* 11:966-972.
- Baker JR, Yu H, Morrison K, Averett WF und Pritchard DG (1997) Specificity of the hyaluronate lyase of group-B streptococcus toward unsulphated regions of chondroitin sulphate. *Biochem J* 327 65-71.
- Balazs EA, Hogberg B und Laurent TC (1951) The biological activity of hyaluron sulfuric acid. *Acta Physiol Scand* 23:168-178.
- Beech DJ, Madan AK und Deng N (2002) Expression of PH-20 in normal and neoplastic breast tissue. *J Surg Res* 103:203-207.
- Benchetrit LC, Pahuja SL, Gray ED und Edstrom RD (1977) A sensitive method for the assay of hyaluronidase activity. *Anal Biochem* 79:431-437.
- Benitez A, Yates TJ, Lopez LE, Cerwinka WH, Bakkar A und Lokeshwar VB (2011) Targeting hyaluronidase for cancer therapy: antitumor activity of sulfated hyaluronic acid in prostate cancer cells. *Cancer Res* 71:4085-4095.
- Benz I und Schmidt MA (1992) Aida-I, the Adhesin Involved in Diffuse Adherence of the Diarrheogenic *Escherichia-Coli* Strain-2787 (O126-H27), Is Synthesized Via a Precursor Molecule. *Mol Microbiol* 6:1539-1546.
- Benz I und Schmidt MA (2011) Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *Int J Med Microbiol* 301:461-468.
- Bernadac A, Gavioli M, Lazzaroni JC, Raina S und Lloubes R (1998) *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol* 180:4872-4878.

- Bottger S und Melzig MF (2013) The influence of saponins on cell membrane cholesterol. *Bioorgan Med Chem* 21:7118-7124.
- Bottger S, Westhof E, Siems K und Melzig MF (2013) Structure-activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I). *Toxicon* 73:144-150.
- Botzki A, Rigden DJ, Braun S, Nukui M, Salmen S, Hoechstetter J, Bernhardt G, Dove S, Jedrzejak MJ und Buschauer A (2004) L-ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor - X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J Biol Chem* 279:45990-45997.
- Carney SL und Osborne DJ (1991) The separation of chondroitin sulfate disaccharides and hyaluronan oligosaccharides by capillary zone electrophoresis. *Anal Biochem* 195:132-140.
- Chao KL, Muthukumar L und Herzberg O (2007) Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry* 46:6911-6920.
- Chen DJ, Osterrieder N, Metzger SM, Buckles E, Doody AM, DeLisa MP und Putnam D (2010) Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. *Proc Natl Acad Sci* 107:3099-3104.
- Chen R, Walter EI, Parker G, Lapurga JP, Millan JL, Ikehara Y, Udenfriend S und Medof ME (1998) Mammalian glycosylphosphatidylinositol anchor transfer to proteins and posttransfer deacylation. *Proc Natl Acad Sci* 95:9512-9517.
- Cherr GN, Yudin AI und Overstreet JW (2001) The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol* 20:515-525.
- Chun LE, Koob TJ und Eyre DR (1988) Quantitation of hyaluronic acid in tissues by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography of oligosaccharide cleavage products. *Anal Biochem* 171:197-206.
- Cramer JA und Bailey LC (1991) A Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance Liquid-Chromatography Method for Bovine Testicular Hyaluronidase Digests Using Postcolumn Derivatization with 2-Cyanoacetamide and Ultraviolet Detection. *Anal Biochem* 196:183-191.
- Csoka AB, Frost GI und Stern R (2001) The six Hyaluronidase-like genes in the human und mouse genomes. *Matrix Biol* 20:499-508.

- Csoka AB, Scherer SW und Stern R (1999) Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics* 60:356-361.
- Dahiya P und Kamal R (2013) Hyaluronic Acid: a boon in periodontal therapy. *N Am J Med Sci* 5:309-315.
- Dahlberg AE, Dingman CW und Peacock AC (1969) Electrophoretic Characterization of Bacterial Polyribosomes in Agarose-Acrylamide Composite Gels. *J Mol Biol* 41:139-&.
- Deed R, Rooney P, Kumar P, Norton JD, Smith J, Freemont AJ und Kumar S (1997) Early-response gene signalling is induced by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan in endothelial cells. Inhibition by non-angiogenic, high-molecular-weight hyaluronan. *Int J Cancer* 71:251-256.
- Delpech B, Bertrand P und Chauzy C (1987) An indirect enzymeimmunoassay for hyaluronidase. *J Immunol Methods* 104:223-229.
- Derouiche R, Benedetti H, Lazzaroni JC, Lazdunski C und Llobes R (1995) Protein complex within *Escherichia coli* inner membrane. TolA N-terminal domain interacts with TolQ and TolR proteins. *J Biol Chem* 270:11078-11084.
- Detzel C, Maas R und Jose J (2011) Autodisplay of Nitrilase from *Alcaligenes faecalis* in *E-coli* Yields a Whole Cell Biocatalyst for the Synthesis of Enantiomerically Pure (R)-Mandelic Acid. *Chemcatchem* 3:719-725.
- Detzel C, Maas R, Tubeleviciute A und Jose J (2013) Autodisplay of nitrilase from *Klebsiella pneumoniae* and whole-cell degradation of oxynil herbicides and related compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4887-4896.
- Di Ferrante N (1956) Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J Biol Chem* 220 (1):303-306.
- Di Lorenzo M, Hidalgo A, Haas M und Bornscheuer UT (2005) Heterologous production of functional forms of *Rhizopus oryzae* lipase in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 71:8974-8977.
- Dinh T und Bernhardt TG (2011) Using Superfolder Green Fluorescent Protein for Periplasmic Protein Localization Studies. *J Bacteriol* 193:4984-4987.
- Dorfman A, Ott ML und Whitney R (1948) The hyaluronidase inhibitor of human blood. *J Biol Chem* 174:621-629.
- Duran-Reynals F (1925) The effect of extracts of certain organs from normal and immunized animals on the infecting power of vaccine virus. *J Exp Med*:6-7.

- El-Safory NS, Fazary AE und Lee CK (2010) Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. *Carbohydr Polym* 81:165-181.
- Engel K (2006) Untersuchungen zur Rolle der äußeren Membranproteine bei der Adhärenz von *Helicobacter pylori*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Evanko SP und Wight TN (1999) Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J Histochem Cytochem* 47:1331-1342.
- Facino RM, Carini M, Stefani R, Aldini G und Saibene L (1995) Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and saponinins from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum*, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Arch Pharm* 328:720-724.
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* 2:55-57.
- Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, Weed DT, Fisher P und Lokeshwar VB (2003) Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer* 106:438-445.
- Frost GI (2007) Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. *Expert Opin Drug Deliv* 4:427-440.
- Frost GI, Csoka AB, Wong T und Stern R (1997) Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun* 236:10-15.
- Frost GI und Stern R (1997) A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents. *Anal Biochem* 251:263-269.
- Furuya T, Yamagata S, Shimoyama Y, Fujihara M, Morishima N und Ohtsuki K (1997) Biochemical characterization of glycyrrhizin as an effective inhibitor for hyaluronidases from bovine testis. *Biol Pharm Bull* 20:973-977.
- Garg A, Anderson RA, Zaneveld LJ und Garg S (2005) Biological activity assessment of a novel contraceptive antimicrobial agent. *J Androl* 26:414-421.
- Gawarzewski I (2013) Determination of the AIDA-I β -barrel crystal structure: getting the clue to the autotransporter pathway. Dissertation, HHU, Düsseldorf.
- Gawarzewski I, Smits SH, Schmitt L und Jose J (2013) Structural comparison of the transport units of type V secretion systems. *Biol Chem* 394:1385-1398.
- Gill RT, DeLisa MP, Shiloach M, Holoman TR und Bentley WE (2000) OmpT expression and activity increase in response to recombinant chloramphenicol

- acetyltransferase overexpression and heat shock in *E. coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2:283-289.
- Girish KS und Kemparaju K (2005) Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biochemistry* 70:948-952.
- Gmachl M und Kreil G (1993) Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci* 90:3569-3573.
- Gonzalez-Pena D, Colina-Coca C, Char CD, Cano MP, de Ancos B und Sanchez-Moreno C (2013) Hyaluronidase inhibiting activity and radical scavenging potential of flavonols in processed onion. *J Agric Food Chem* 61:4862-4872.
- Gratz A (2010) Autodisplay der humanen Proteinkinase CK2 und Entwicklung eines Verfahrens zur Inhibitionstestung. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Grimshaw J (1997) Analysis of glycosaminoglycans and their oligosaccharide fragments by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 18:2408-2414.
- Grimshaw J, Krane A, Trocha-Grimshaw J, Douglas A, Chakravarthy U und Archer D (1994) Quantitative analysis of hyaluronan in vitreous humor using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 15:936-940.
- Grundmann M, Rothenhofer M, Bernhardt G, Buschauer A und Matysik FM (2012) Fast counter-electroosmotic capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry of hyaluronan oligosaccharides. *Anal Bioanal Chem* 402:2617-2623.
- Guerra F (1946) Hyaluronidase inhibition by sodium salicylate in rheumatic fever. *Science* 103:686.
- Guntenhöner MW, Pogrel MA und Stern R (1992) A Substrate-Gel-Assay for Hyaluronidase Activity. *Matrix* 12:388-396.
- Haas E (1946) On the mechanism of invasion; antinvasin I, an enzyme in plasma. *J Biol Chem* 163:63-88.
- Hall CL und Turley EA (1995) Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis. *J Neurooncol* 26:221-229.
- Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* 182:288-292.

- Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM und Turley EA (1992) Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol* 117:1343-1350.
- Herd JK, Tschida J und Motycka L (1974) The detection of hyaluronidase on electrophoresis membranes. *Anal Biochem* 61:133-143.
- Hertel W, Peschel G, Ozegowski JH und Muller PJ (2006) Inhibitory effects of triterpenes and flavonoids on the enzymatic activity of hyaluronic acid-splitting enzymes. *Arch Pharm* 339:313-318.
- Hofinger ESA, Bernhardt G und Buschauer A (2007a) Kinetics of Hyal-1 and PH-20 hyaluronidases: Comparison of minimal substrates and analysis of the transglycosylation reaction. *Glycobiology* 17:963-971.
- Hofinger ESA, Spickenreither M, Oschmann J, Bernhardt G, Rudolph R und Buschauer A (2007b) Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus *Escherichia Coli* as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. *Glycobiology* 17:443-453.
- Homer KA, Denbow L und Beighton D (1993) Spectrophotometric method for the assay of glycosaminoglycans and glycosaminoglycan-depolymerizing enzymes. *Anal Biochem* 214:435-441.
- Honda S, Ueno T und Kakehi K (1992) High-performance capillary electrophoresis of unsaturated oligosaccharides derived from glycosaminoglycans by digestion with chondroitinase ABC as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. *J Chromatogr* 608:289-295.
- Ieva R und Bernstein HD (2009) Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci* 106:19120-19125.
- Ieva R, Skillman KM und Bernstein HD (2008) Incorporation of a polypeptide segment into the beta-domain pore during the assembly of a bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* 67:188-201.
- Isoyama T, Thwaites D, Selzer MG, Carey RI, Barbucci R und Lokeshwar VB (2006) Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases. *Glycobiology* 16:11-21.
- Jentsch H, Pomowski R, Kundt G und Gocke R (2003) Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol* 30:159-164.

- Jiang D, Liang J und Noble PW (2011) Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev* 91:221-264.
- Jilaveanu LB, Zito CR und Oliver D (2005) Dimeric SecA is essential for protein translocation. *Proc Natl Acad Sci* 102:7511-7516.
- Jose J, Kramer J, Klauser T, Pohlner J und Meyer TF (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene* 178:107-110.
- Jose J und Meyer TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol R* 71:600-+.
- Jose J und von Schwichow S (2004) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *Chembiochem* 5:491-499.
- Jose J und Zangen D (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 333:1218-1226.
- Jung Y, Jung MY, Park JH, Jung GC, Hong YS, Yeom CH und Lee S (2010) Production of human hyaluronidase in a plant-derived protein expression system: plant-based transient production of active human hyaluronidase. *Protein Expression Purif* 74:181-188.
- Kaeßler A (2009) Autodisplay humaner Hyaluronidasen und Entwicklung von Verfahren zur Testung von Inhibitoren. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kaessler A, Nourrisson MR, Duflos M und Jose J (2008) Indole carboxamides inhibit bovine testes hyaluronidase at pH 7.0 and indole acetamides activate the enzyme at pH 3.5 by different mechanisms. *J Enzym Inhib Med Ch* 23:719-727.
- Kaessler A, Olgen S und Jose J (2011) Autodisplay of catalytically active human hyaluronidase hPH-20 and testing of enzyme inhibitors. *Eur J Pharm Sci* 42:138-147.
- Takegawa H, Momoi Y, Matsumoto H und Satoh T (1985) Activation of Hyaluronidase by Various Inflammatory Agents and Inhibitory Effect of Hyaluronidase by Anti-Inflammatory Drugs. *J Pharmacobio-Dynam* 8:S177-S177.

- Kaya G, Rodriguez I, Jorcano JL, Vassalli P und Stamenkovic I (1997) Selective suppression of CD44 in keratinocytes of mice bearing an antisense CD44 transgene driven by a tissue-specific promoter disrupts hyaluronate metabolism in the skin and impairs keratinocyte proliferation. *Genes Dev* 11:996-1007.
- Kim JY, Doody AM, Chen DJ, Cremona GH, Shuler ML, Putnam D und DeLisa MP (2008) Engineered bacterial outer membrane vesicles with enhanced functionality. *J Mol Biol* 380:51-66.
- Kim MY, Kim YC und Chung SK (2005) Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *J Sci Food Agr* 85:633-640.
- Kim YJ, Rajapandi T und Oliver D (1994) SecA Protein Is Exposed to the Periplasmic Surface of the *Escherichia-Coli* Inner Membrane in Its Active State. *Cell* 78:845-853.
- Klauser T, Pohlner J und Meyer TF (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of Neisseria Iga beta-mediated outer membrane transport. *EMBO J* 11:2327-2335.
- Kowarik M, Young NM, Numao S, Schulz BL, Hug I, Callewaert N, Mills DC, Watson DC, Hernandez M, Kelly JF, Wacker M und Aebi M (2006) Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *EMBO J* 25:1957-1966.
- Kramer RA, Zandwijken D, Egmond MR und Dekker N (2000) In vitro folding, purification and characterization of *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *Eur J Biochem* 267:885-893.
- Kranen E (2010) Autodisplay komplexer Enzyme für biokatalytische Anwendungen. Dissertation, HHU, Düsseldorf.
- Kuehn MJ und Kesty NC (2005) Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 19:2645-2655.
- Kuhn AV, Ruttinger HH, Neubert RH und Raith K (2003) Identification of hyaluronic acid oligosaccharides by direct coupling of capillary electrophoresis with electrospray ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:576-582.
- Kulp A und Kuehn MJ (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* 64:163-184.

- Kuppusamy UR und Das NP (1991) Inhibitory Effects of Flavonoids on Several Venom Hyaluronidases. *Experientia* 47:1196-1200.
- Kuppusamy UR, Khoo HE und Das NP (1990) Structure-Activity Studies of Flavonoids as Inhibitors of Hyaluronidase. *Biochem Pharmacol* 40:397-401.
- Laurent TC und Fraser JR (1992) Hyaluronan. *Faseb J* 6:2397-2404.
- Laurent TC, Laurent UB und Fraser JR (1996) The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol* 74:1-7.
- Lee HG und Cowman MK (1994) An Agarose-Gel Electrophoretic Method for Analysis of Hyaluronan Molecular-Weight Distribution. *Anal Biochem* 219:278-287.
- Leibly DJ, Nguyen TN, Kao LT, Hewitt SN, Barrett LK und Van Voorhis WC (2012) Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. *Plos One* 7
- Lesley J, Hyman R und Kincade PW (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54:271-335.
- Li MW, Yudin AI, Robertson KR, Cherr GN und Overstreet JW (2002) Importance of glycosylation and disulfide bonds in hyaluronidase activity of macaque sperm surface PH-20. *J Androl* 23:211-219.
- Linker A (1966) Bacterial mucopolysaccharidases (mucopolysaccharide lyases). *Methods Enzymol*:650-654.
- Liu D, Pearlman E, Diaconu E, Guo K, Mori H, Haqqi T, Markowitz S, Willson J und Sy MS (1996) Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 93:7832-7837.
- Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minna JD, Block NL, Nadji M und Lokeshwar BL (2001) Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem* 276:11922-11932.
- Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, Soloway MS und Iida N (2002) Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* 277:33654-33663.
- Long DM (1997) Enzymatic assay of beta-lactamase using circular dichroism spectropolarimetry. *Anal Biochem* 247:389-393.
- Lottspeich F und Engels J (2006) Bioanalytik. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Madan AK, Yu K, Dhurandhar N, Cullinane C, Pang Y und Beech DJ (1999) Association of hyaluronidase and breast adenocarcinoma invasiveness. *Oncol Rep* 6:607-609.
- Maier U und Baumgartner G (1989) Metaphylactic effect of mitomycin C with and without hyaluronidase after transurethral resection of bladder cancer: randomized trial. *J Urol* 141:529-530.
- Marhaba R und Zoller M (2004) CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* 35:211-231.
- Maurer J, Jose J und Meyer TF (1997) Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:794-804.
- McBroom AJ und Kuehn MJ (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* 63:545-558.
- McIlvane TC (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem*:183-186.
- Meyer K, Chaffee E, Hobby GL und Dawson MH (1941) Hyaluronidases of Bacterial and Animal Origin. *J Exp Med* 73:309-326.
- Meyer K und Palmer J (1934a) The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J Biolo Chem* 107:629-634.
- Meyer K und Palmer J (1934b) The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J Biol Chem* 629-634.
- Mio K und Stern R (2002) Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biol* 21:31-37.
- Muckenschnabel I, Bernhardt G, Spruss T, Dietl B und Buschauer A (1998) Quantitation of hyaluronidases by the Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. *Cancer Lett* 131:13-20.
- Muller K, Prinz H, Gawlik I, Zierys K und Huang HS (1997) Simple analogues of anthralin: unusual specificity of structure and antiproliferative activity. *J Med Chem* 40:3773-3780.
- Myose M, Warashina T und Miyase T (2012) Triterpene saponins with hyaluronidase inhibitory activity from the seeds of *Camellia sinensis*. *Chem Pharm Bull* 60:612-623.

- Nebinger P, Koel M, Franz A und Werries E (1983) High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Even-Numbered and Odd-Numbered Hyaluronate Oligosaccharides. *J Chromatogr* 265:19-25.
- Noble PW (2002) Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol* 21:25-29.
- Noble PW, McKee CM, Cowman M und Shin HS (1996) Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *J Exp Med* 183:2373-2378.
- Novak U, Stylli SS, Kaye AH und Lepperdinger G (1999) Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res* 59:6246-6250.
- Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P und Larjava H (1995) Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem* 43:125-135.
- Pandhal J, Desai P, Walpole C, Doroudi L, Malyshev D und Wright PC (2012) Systematic metabolic engineering for improvement of glycosylation efficiency in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 419:472-476.
- Pandhal J, Ow SY, Noirel J und Wright PC (2011) Improving N-Glycosylation Efficiency in *Escherichia coli* Using Shotgun Proteomics, Metabolic Network Analysis, and Selective Reaction Monitoring. *Biotechnol Bioeng* 108:902-912.
- Pandhal J, Woodruff LB, Jaffe S, Desai P, Ow SY, Noirel J, Gill RT und Wright PC (2013) Inverse metabolic engineering to improve *Escherichia coli* as an N-glycosylation host. *Biotechnol Bioeng* 110:2482-2493.
- Park M, Yoo G, Bong JH, Jose J, Kang MJ und Pyun JC (2014) Isolation and characterization of the outer membrane of *Escherichia coli* with autodisplayed Z-domains. *Biochim Biophys Acta* 1848:842-847.
- Park SH, Liu GP, Topping TB, Cover WH und Randall LL (1988) Modulation of Folding Pathways of Exported Proteins by the Leader Sequence. *Science* 239:1033-1035.
- Park Y, Cho S und Linhardt RJ (1997) Exploration of the action pattern of *Streptomyces hyaluronate lyase* using high-resolution capillary electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1337:217-226.

- Pavlova O, Peterson JH, Ieva R und Bernstein HD (2013) Mechanistic link between beta barrel assembly and the initiation of autotransporter secretion. *Proc Natl Acad Sci* 110:E938-947.
- Payan E, Jouzeau JY, Lapicque F, Muller N, Payan JP, Gegout P, Bertin P und Netter P (1991) Assay of synovial fluid hyaluronic acid using high-performance liquid chromatography of hyaluronidase digests. *J Chromatogr* 566:9-18.
- Petrey AC und de la Motte CA (2014) Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation. *Front Immunol* 5:101.
- Poole AR und Dieppe P (1994) Biological markers in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 23:17-31.
- Preston M, Gong X, Su WP, Matsumoto SG, Banine F, Winkler C, Foster S, Xing RB, Struve J, Dean J, Baggenstoss B, Weigel PH, Montine TJ, Back SA und Sherman LS (2013) Digestion products of the PH20 hyaluronidase inhibit remyelination. *Ann Neurol* 73:266-280.
- Raaf J, Guerra B, Neundorff I, Bopp B, Issinger OG, Jose J, Pietsch M und Niefind K (2013) First Structure of Protein Kinase CK2 Catalytic Subunit with an Effective CK2 beta-Competitive Ligand. *Acs Chem Biol* 8:901-907.
- Rapoza MP und Webster RE (1993) The filamentous bacteriophage assembly proteins require the bacterial SecA protein for correct localization to the membrane. *J Bacteriol* 175:1856-1859.
- Reicheneder C (2013) Autodisplay von Peptidbibliotheken und Screening nach adhäsiven Peptiden und Inhibitoren der humanen Proteinkinase CK2. Dissertataion, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.
- Reissig JL, Strominger JL und Leloir LF (1955) A Modified Colorimetric Method for the Estimation of N-Acetylamino Sugars. *J Biol Chem* 217:959-966.
- Rigden DJ, Botzki A, Nukui M, Mewbourne RB, Lamani E, Braun S, von Angerer E, Bernhardt G, Dove S, Buschauer A und Jedrzejewski MJ (2006) Design of new benzoxazole-2-thione-derived inhibitors of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronan lyase: structure of a complex with a 2-phenylindole. *Glycobiology* 16:757-765.
- Rothenhofer M, Scherubl R, Bernhardt G, Heilmann J und Buschauer A (2012) Qualitative and quantitative analysis of hyaluronan oligosaccharides with high performance thin layer chromatography using reagent-free derivatization on

- amino-modified silica and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupling on normal phase. *J Chromatogr A* 1248:169-177.
- Rücker, Neubauer und Willems (2001) Instrumentelle pharmazeutische Analytik. Lehrbuch zu chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden. 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Ruiz N, Kahne D und Silhavy TJ (2009) Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope: the long road of discovery. *Nat Rev Microbiol* 7:677-683.
- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Primakoff P, Li MW und Overstreet JW (1997) The PH-20 protein in human spermatozoa. *J Androl* 18:151-158.
- Saenger T, Braukmann A, Vordenbaumen S, Altendorfer I, Bleck E, Hochwallner H, Valenta R, Schneider M und Jose J (2014) Development of a surface display ELISA to detect anti-IgG antibodies against bovine alpha S1-casein in human sera. *J Pharmaceut Biomed Anal* 96:144-150.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Salmen S, Hoehstetter J, Kasbauer C, Paper DH, Bernhardt G und Buschauer A (2005) Sulphated oligosaccharides as inhibitors of hyaluronidases from bovine testis, bee venom and *Streptococcus agalactiae*. *Planta Med* 71:727-732.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74:5463-5467.
- Sawabe Y, Nakagomi K, Iwagami S, Suzuki S und Nakazawa H (1992) Inhibitory effects of pectic substances on activated hyaluronidase and histamine release from mast cells. *Biochim Biophys Acta* 1137:274-278.
- Schaffer C, Graninger M und Messner P (2001) Prokaryotic glycosylation. *Proteomics* 1:248-261.
- Schmidt G, Jann B und Jann K (1970a) Immunochemistry of R Lipopolysaccharides of *Escherichia Coli* - Studies on R-Mutants with an Incomplete Core, Derived from *E-Coli-O8-K27*. *Eur J Biochem* 16:382-&.
- Schmidt G, Jann B und Jann K (1970b) Immunochemistry of R Lipopolysaccharides of *Escherichia coli*; Studies of R Mutants with an Incomplet Core, derived from *E. coli* 08: K27. *Eur J Biochem* 16:382-392.

- Schultheiss E, Paar C, Schwab H und Jose J (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in *Escherichia coli*. *J Mol Catal B-Enzym* 18:89-97.
- Schultheiss E, Weiss S, Winterer E, Maas R, Heinzle E und Jose J (2008) Esterase autodisplay: enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl Environ Microbiol* 74:4782-4791.
- Schumacher SD, Hannemann F, Teese MG, Bernhardt R und Jose J (2012) Autodisplay of functional CYP106A2 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 161:104-112.
- Schumacher SD und Jose J (2012) Expression of active human P450 3A4 on the cell surface of *Escherichia coli* by Autodisplay. *J Biotechnol* 161:113-120.
- Scott JE (1992) Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J* 6:2639-2645.
- Scott JE, Cummings C, Brass A und Chen Y (1991) Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J* 274 :699-705.
- Selenge E, Odontuya G, Murata T, Sasaki K, Kobayashi K, Batkhoo J und Yoshizaki F (2013) Phytochemical constituents of Mongolian traditional medicinal plants, *Chamaerhodos erecta* and *C. altaica*, and its constituents prevents the extracellular matrix degradation factors. *J Nat Med* 67:867-875.
- Sherman LS, Struve JN, Rangwala R, Wallingford NM, Tuohy TMF und Kuntz C (2002) Hyaluronate-based extracellular matrix: Keeping glia in their place. *Glia* 38:93-102.
- Simpson MA und Lokeshwar VB (2008) Hyaluronan and hyaluronidase in genitourinary tumors. *Front Biosci* 13:5664-5680.
- Slevin M, Krupinski J, Gaffney J, Matou S, West D, Delisser H, Savani RC und Kumar S (2007) Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol* 26:58-68.
- Slevin M, Kumar S und Gaffney J (2002) Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem* 277:41046-41059.

- Smith RF und Willett NP (1968) Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. *Appl Microbiol* 16:1434-1436.
- Soldatova LN, Cramer R, Gmachl M, Kemeny DM, Schmidt M, Weber M und Mueller UR (1998) Superior biologic activity of the recombinant bee venom allergen hyaluronidase expressed in baculovirus-infected insect cells as compared with *Escherichia coli*. *J Allergy Clin Immunol* 101:691-698.
- Spickenreither M, Braun S, Bernhardt G, Dove S und Buschauer A (2006) Novel 6-O-acylated vitamin C derivatives as hyaluronidase inhibitors with selectivity for bacterial lyases. *Bioorg Med Chem Lett* 16:5313-5316.
- Spruss T, Bernhardt G, Schonenberger H und Schiess W (1995) Hyaluronidase Significantly Enhances the Efficacy of Regional Vinblastine Chemotherapy of Malignant-Melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 121:193-202.
- Stern R (2003) Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 13:105r-115r.
- Stern R (2005) Hyaluronan metabolism: a major paradox in cancer biology. *Pathol Biol* 53:372-382.
- Stern R, Asari AA und Sugahara KN (2006) Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur J Cell Biol* 85:699-715.
- Stern R und Jedrzejewski MJ (2006) Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev* 106:818-839.
- Stern R und Maibach HI (2008) Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clin Dermatol* 26:106-122.
- Sun LK, Beck-Schimmer B, Oertli B und Wuthrich RP (2001) Hyaluronan-induced cyclooxygenase-2 expression promotes thromboxane A2 production by renal cells. *Kidney Int* 59:190-196.
- Suzuki A, Toyoda H, Toida T und Imanari T (2001) Preparation and inhibitory activity on hyaluronidase of fully O-sulfated hyaluro-oligosaccharides. *Glycobiology* 11:57-64.
- Szary A, Kowalczyk-Bronisz SH und Gieldanowski J (1975) Indomethacin as inhibitor of hyaluronidase. *Arch Immunol Ther Exp* 23:131-134.
- Takahashi T, Ikegami-Kawai M, Okuda R und Suzuki K (2003) A fluorimetric Morgan-Elson assay method for hyaluronidase activity. *Anal Biochem* 322:257-263.

- Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang LA, Ran LA, Zheng K und Ren GS (2011) HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer* 128:1303-1315.
- Tawada A, Masa T, Oonuki Y, Watanabe A, Matsuzaki Y und Asari A (2002) Large-scale preparation, purification, and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 4-mers to 52-mers. *Glycobiology* 12:421-426.
- Thömmes S (2013) Entwicklung und Autodisplay humaner Antikörperbibliotheken: neue Erythropoietin bindende Varianten. Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.
- Toida T, Ogita Y, Suzuki A, Toyoda H und Imanari T (1999) Inhibition of hyaluronidase by fully O-sulfonated glycosaminoglycans. *Arch Biochem Biophys* 370:176-182.
- Udenfriend S und Kodukula K (1995) How Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anchored Membrane-Proteins Are Made. *Annu Rev Biochem* 64:563-591.
- Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, Merritt JH, Fan YY, Reading CA, Chhiba K, Heiss C, Azadi P, Aebi M und DeLisa MP (2012) An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 8:434-436.
- Vercruysse KP, Lauwers AR und Demeester JM (1994) Kinetic Investigation of the Degradation of Hyaluronan by Hyaluronidase Using Gel-Permeation Chromatography. *J Chromatogr B* 656:179-190.
- Vincent JC und Lenormand H (2009) How hyaluronan-protein complexes modulate the hyaluronidase activity: The model. *Biophys Chem* 145:126-134.
- Volpi N und Maccari F (2003) Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Biochimie* 85:619-625.
- Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, Panico M, Morris HR, Dell A, Wren BW und Aebi M (2002) N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E-coli*. *Science* 298:1790-1793.
- Weng A, Jenett-Siems K, Schmieder P, Bachran D, Bachran C, Gorick C, Thakur M, Fuchs H und Melzig MF (2010) A convenient method for saponin isolation in tumour therapy. *J Chromatogr B* 878:713-718.
- Winkler CW, Foster SC, Itakura A, Matsumoto SG, Asari A, McCarty OJ und Sherman LS (2013) Hyaluronan oligosaccharides perturb lymphocyte slow

- rolling on brain vascular endothelial cells: implications for inflammatory demyelinating disease. *Matrix Biol* 32:160-168.
- Wohlrab W, Neubert R und Wohlrab J (eds) (2004) Hyaluronsäure und Haut. In: *Trends Clin Exp Dermatol*. Shaker Verlag, Aachen.
- Xiong S, Wang YF, Ren XR, Li B, Zhang MY, Luo Y, Zhang L, Xie QL und Su KY (2005) Solubility of disulfide-bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its "oxidizing" mutant. *World J Gastroentero* 11:1077-1082.
- Yoshinari C, Mizusawa N, Byers HR und Akasaka T (1999) CD44 variant isoform CD44v10 expression of human melanoma cell lines is upregulated by hyaluronate and correlates with migration. *Melanoma Res* 9:223-231.
- Zhang H und Martin-DeLeon PA (2003) Mouse Spam1 (PH-20) is a multifunctional protein: Evidence for its expression in the female reproductive tract. *Biol Reprod* 69:446-454.
- Zhang L, Bharadwaj AG, Casper A, Barkley J, Barycki JJ und Simpson MA (2009) Hyaluronidase activity of human Hyal1 requires active site acidic and tyrosine residues. *J Biol Chem* 284:9433-9442.
- Zimmermann K, Preinl G, Ludwig H und Greulich KO (1983) Inhibition of hyaluronidase by dextran sulfate and its possible application in anticancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol* 105:189-190.

VI Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 26: Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	„Volume per volume“ (Volumenanteil)
(w/v)	„Weight per volum“ (Massenanteil)
AIDA	Adhesin involved in diffuse adherence
aph	Gen für Aminoglycosidphosphotransferase (Kanamycinresistenz)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Autotransporter
ATP	Adenosintriphosphat
Bac	Bacillosamin
Bam	β -barrel assembly machinery (Proteinkomplex zum Einbau von β -Fass-Proteinen in die OM)
BHT	Butyl-hydroxy-toluol
<i>cat</i>	Gen für Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (Chloramphenicol-Resistenz)
CE	Kapillarelektrophorese
<i>bla</i>	Gen für β -Lactamase (Ampicillinresistenz)
bp	Basenpaare
CtxB	Signalpeptid der Cholera-Enterotoxin Untereinheit B, (ctxB in <i>Vibrio cholerae</i>)
Da	Dalton
DMAB	Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlichs-Reagenz)
DANN	„Deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazellular-Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
FP	Fusionsprotein
GAG	Glykosaminoglykan
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
Glu	Glukose
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HA	Hyaluronsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
<i>lacI</i>	Gen für lac-Repressor
LB	„Lysogeny broth“
LPS	Lipopolysaccharide
Omp	„Outer membrane protein“ (Außenmembranprotein)
ori	origin of replication
OTH	„ovine testicular hyaluronidase“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“ (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	„Polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
pgl	„protein glycosylation locus“
PH-20	Antigen des „posterior head“-Antikörpers 20

PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidifluorid
rpm	„Revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SBA	Soybean
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOP	„Super optimal broth“ (Optimalmedium)
SOC	„Super optimal broth with catabolite repression“ (Optimalmedium mit Katabolitrepession)
SP	Signalpeptid
SPAM1	Sperma-Adhäsions-Molekül 1
TAE	Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer
TBS	„Tris-buffered saline“ (Trisgepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN	Polysorbat (Polyoxyethylen-sorbitan-monofettsäureester)
Vcpal	Ascorbinsäurepalmitat (Vitamin C-Palmitat)

2 Sequenzen

```

1   CTGAATTTCA GAGCACCCCC TGTTATTCCA AATGTGCCTT TCCTCTGGGC CTGGAATGCC
61  CCAAGTGAAT TTTGTCTTGG AAAATTTGAT GAGCCACTAG ATATGAGCCT CTTCTCTTTC
121 ATAGGAAGCC CCCGAATAAA CGCCACCGGG CAAGGTGTTA CAATATTTTA TGTTGATAGA
181 CTTGGCTACT ATCCTTACAT AGATTCAATC ACAGGAGTAA CTGTGAATGG AGGAATCCCC
241 CAGAAGATTT CCTTACAAGA CCATCTGGAC AAAGCTAAGA AAGACATTAC ATTTTATATG
301 CCAGTAGACA ATTTGGGAAT GGCTGTTATT GACTGGGAAG AATGGAGACC CACTTGGGCA
361 AGAAACTGGA AACCTAAAGA TGTTTACAAG AATAGGTCTA TTGAATTGGT TCAGCAACAA
421 AATGTACAAC TTAGTCTCAC AGAGGCCACT GAGAAAAGCAA AACAAAGAATT TGAAAAAGCA
481 GGAAGGATT TCCTGGTAGA GACTATAAAA TTGGGAAAAT TACTTCGGCC AAATCACTTG
541 TGGGGTTATT ATCTTTTTCC GGATTGTTAC AACCATCACT ATAAGAAAACC CGGTTACAAT
601 GGAAGTTGCT TCAATGTAGA AATAAAAAGA AATGATGATC TCAGCTGGTT GTGGAATGAA
661 AGCACTGCTC TTTACCCATC CATTTATTTG AACACTCAGC AGTCTCCTGT AGCTGCTACA
721 CTCTATGTGC GCAATCGAGT TCGGGAAGCC ATCAGAGTTT CCAAAATACC TGATGCAAAA
781 AGTCCACTTC CGGTTTTTGC ATATACCCGC ATAGTTTTTA CTGATCAAGT TTTGAAATTC
841 CTTTCTCAAG ATGAACCTGT GTATACATTT GCGGAAACTG TTGCTCTGGG TGCTTCTGGA
901 ATTGTAATAT GGGGAACCCCT CAGTATAATG CGAAGTATGA AATCTTGCTT GCTCCTAGAC
961 AATTACATGG AGACTATACT GAATCCTTAC ATAATCAACG TCACACTAGC AGCCAAAATG
1021 TGTAGCCAAG TGCTTTGCCA GGAGCAAGGA GTGTGTATAA GGAAAAACTG GAATTCAAGT
1081 GACTATCTTC ACCTCAACCC AGATAATTTT GCTATTCAAC TTGAGAAAAGG TGGAAAGTTC
1141 ACAGTACGTG GAAAACCGAC ACTTGAAGAC CTGGAGCAAT TTTCTGAAAA ATTTTATTGC
1201 AGCTGTTATA GCACCTTGAG TTGTAAGGAG AAAGCTGATG TAAAAGACAC TGATGCTGTT
1261 GATGTGTGTA TTGCTGATGG TGTCTGTATA GATGCTTTTC TAAAACCTCC CATGGAGACA
1321 GAAGAACCTC AAATTTTCTA CAATGCTTCA CCCTCCACAC TATCT

```

Abbildung 55: Nukleinsäuresequenz der humanen Hyaluronidase PH-20 als Autotransporter-Fusionsprotein. Die codierende DNA-Sequenz des N-terminalen eukaryotischen Signalpeptides sowie des C-terminalen GPI-Anker-Signalpeptides sind deliniert.

```

1   LNFRAAPPVIP NVPFLWAWNA PSEFCLGKFD EPLDMSLFSF IGSPRINATG QGVTFIFYVDR
61  LGYYPYIDSI TGVTVNGGIP QKISLQDHL D KAKKDITFYM PVDNLGMAVI DWEEGMAVIW
121 DWEEWRPTWA RNWPKDVYK NRSIELVQQQ NVQLSLTEAT EKAKQEF EKA GKDFLVETIK
181 LGKLLRPNHL WGYLLFPDCY NHHYKKPGYN GSCFNVEIKR NDDL SWLWNE STALYPSIYL
241 NTQQSPVAAT LYVRNRVREA IRVSKIPDAK SPLPVFAYTR IVFTDQVLKF LSQDELVYTF
301 GETVALGASG IVIWGTL SIM RSMKSCLLLD NYMETILNPY IINVT LAAKM CSQVLCQEQG
361 VCIRKNWNSS DYLHLNPDNF AIQLEKGGKF TVRGKPTLED LEQFSEKFC SCYSTLSCKE
421 KADVKD TDAV DVC IADG VCI DAFLKPPMET EEPQIFYNAS PSTLS

```

Abbildung 56: Aminosäuresequenz der humanen Hyaluronidase PH-20 ohne das eukaryotische N-terminale Signalpeptid und die C-terminale GPI-Anker-Erkennungssequenz.

```

1   TTTAGGGGCC CCTTGCTACC CAACCGGCC TTCACCACCG TCTGGAATGC AAACACCCAG
61  TGGTGCCTGG AGAGGCACGG TGTGGACGTG GATGTCAGTG TCTTCGATGT GGTAGCCAAC
121 CCAGGGCAGA CCTTCCGCGG CCCTGACATG ACAATTTTCT ATAGCTCCCA GCTGGGCACC
181 TACCCCTACT ACACGCCCAC TGGGGAGCCT GTGTTTGGTG GTCTGCCCCA GAATGCCAGC
241 CTGATTGCCC ACCTGGCCCG CACATTCCAG GACATCCTGG CTGCCATACC TGCTCCTGAC
301 TTCTCAGGGC TGGCAGTCAT CGACTGGGAG GCATGGCGCC CACGCTGGGC CTTCAACTGG
361 GACACCAAGG ACATTTACCG GCAGCGCTCA CGGGCACTGG TACAGGCACA GCACCCTGAT
421 TGGCCAGCTC CTCAGGTGGA GGCAGTAGCC CAGGACCAGT TCCAGGGAGC TGCACGGGCC
481 TGGATGGCAG GCACCCTCCA GCTGGGGCGG GCACTGCGTC CTCGCGCCT CTGGGGCTTC
541 TATGGCTTCC CTGACTGCTA CAACTATGAC TTTCTAAGCC CCAACTACAC CGCCAGTGC
601 CCATCAGGCA TCCGTGCCCA AAATGACCAG CTAGGGTGGC TGTGGGGCCA GAGCCGTGCC
661 CTCTATCCCA GCATCTACAT GCCCCGAGTG CTGGAGGGCA CAGGGAAGTC ACAGATGTAT
721 GTGCAACACC GTGTGGCCGA GGCATTCCGT GTGGCTGTGG CTGCTGGTGA CCCC AATCTG
781 CCGGTGCTGC CCTATGTCCA GATCTTCTAT GACACGACAA ACCACTTTCT GCCCTGGAT
841 GAGCTGGAGC ACAGCCTGGG GGAGAGTGCG GCCCAGGGGG CAGCTGGAGT GGTGCTCTGG
901 GTGAGCTGGG AAAATACAAG AACCAAGGAA TCATGTCAGG CCATCAAGGA GTATATGGAC
961 ACTACACTGG GGCCCTTCAT CCTGAACGTG ACCAGTGGGG CCCTTCTCTG CAGTCAAGCC
1021 CTGTGCTCCG GCCATGGCCG CTGTGTCCGC CGCACCAGCC ACCCCAAAGC CCTCCTCCTC
1081 CTTAACCTTG CCAGTTTCTC CATCCAGCTC ACGCCTGGTG GTGGGCCCTT GAGCCTGCGG
1141 GGTGCCCTCT CACTTGAAGA TCAGGCACAG ATGGCTGTGG AGTTCAAATG TCGATGCTAC
1201 CCTGGCTGGC AGGCACCGTG GTGTGAGCGG AAGAGCATGT GG

```

Abbildung 57: Nukleinsäuresequenz der humanen Hyaluronidase Hyal-1 als Autotransporter-Fusionsprotein ohne die codierende DNA-Sequenz des N-terminalen eukaryotischen Signalpeptides.

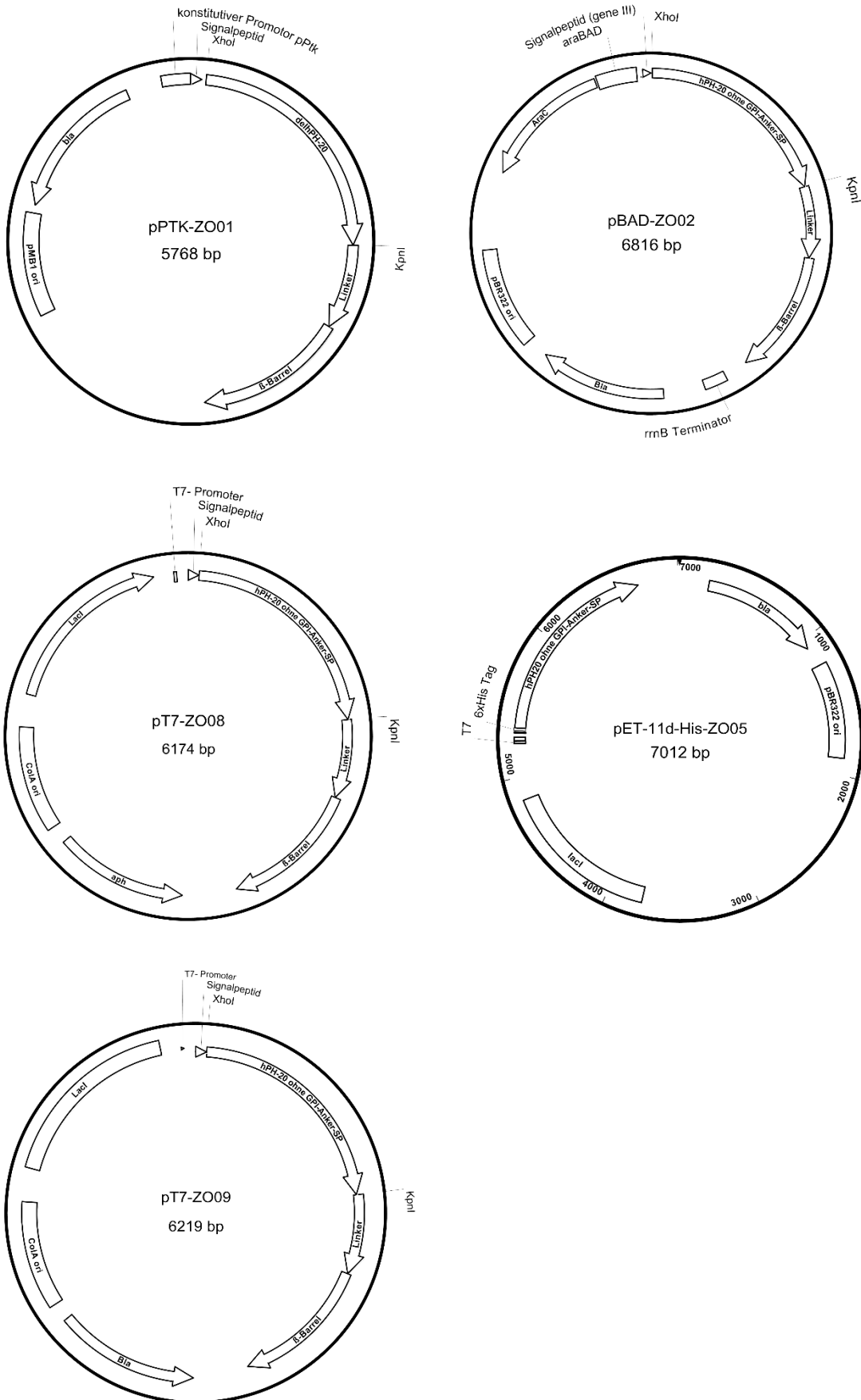
```

1   FRGPLLPNRP FTTVWNANTQ WCLERHGVDV DVSVFDVVAN PGQTFRGPDM TIFYSSQLGT
61  YPYTPTGEP VFGGLPQNAS LIAHLARTFQ DILAAIPAPD FSGLAVIDWE AWRPRWAFNW
121 DTKDIYRQRS RALVQAQHPD WPAPQVEAVA QDQFQGAARA WMAGTLQLGR ALRPRGLWGF
181 YGFPDCYNYD FLSPNYTGQC PSGIRAQNDQ LGWLWQSRRA LYPSIYMPAV LEGTGKSQMY
241 VQHRVAEAFR VAVAAGDPNL PVLPHYVQIFY DTTNHFLPLD ELEHSLGESA AQAAGVVLW
301 VSWENTRTKE SCQAIKEYMD TTLGPFILNV TSGALLCSQA LCSGHGRCVR RTSHPKALLL
361 LNPASFISIQL TPGGGPLSLR GALSLEDQAQ MAVEFKCRCY PGWQAPWCER KSMW

```

Abbildung 58: Aminosäuresequenz der humanen Hyaluronidase PH-20 ohne das eukaryotische N-terminale Signalpeptid.

3 Plasmidkarten



4 Veröffentlichungen

Poster:

- Orlando Z, Olschewski I, Brossette T, Hensel A, Jose J (2014) Autodisplay of human Hyaluronidase Hyal-1 and identification of new inhibitors among natural compounds. GP2A XXII, F-Nantes, August 28-19. P31
- Orlando Z, Olschewski I, Brossette T, Hensel, Jose J (2014) Identification of novel human Hyaluronidase Hyal1 inhibitors from saponine derivatives. Forschung der Chemischen Institute (Symposium), Münster, May 22. P17
- Orlando Z, Olschewski I, Brossette T, Jose J (2013) Autodisplay of human hyaluronidases PH-20 and Hyal-1 and testing of inhibitors. DPhG annual conference, Freiburg, 9.-11.10.2013. MC.52.
- Orlando Z, Olschewski I, Brossette T, Jose J (2013) Plant-derived inhibitors of human hyaluronidases. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Münster, September 1st-5th. PC18
- Orlando Z, Kaeßler A, Hundsdörfer C, Müller K, Jose J (2012) Autodisplay of human hyaluronidase PH-20 and testing of inhibitors. XXIIInd International Symposium on Medicinal Chemistry, Berlin, September 3-6. P140

Oralvorträge:

- Orlando Z (2014) Identification of novel human Hyaluronidase Hyal1 inhibitors from saponine derivatives. Forschung der Chemischen Institute (Symposium), Münster, May 22. P17

