HEINRICH HEINE UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Autodisplay humaner Hyaluronidasen und Entwicklung von Verfahren zur Testung von Inhibitoren

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Andre Kaeßler

aus Papenburg/Ems

Düsseldorf, Juni 2009

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent:Prof. Dr. Joachim JoseKoreferent:Prof. Dr. Matthias U. Kassack

Tag der mündlichen Prüfung:

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 12. Juni 2009

(Andre Kaeßler)

Auch diese Arbeit wäre ohne Unterstützung niemals vollendet worden! Ich möchte daher einige wichtige Personen erwähnen, die stark zum Gelingen beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt ...

- Prof. Dr. Joachim Jose f
 ür die M
 öglichkeit, diese Dissertation am Institut f
 ür Pharmazeutische und Medizinische Chemie in der Abteilung Bioanalytik anzufertigen, sowie f
 ür seine Geduld und die vielen Tipps;
- Prof. Dr. Matthias Kassack für das Koreferat sowie die gute Zusammenarbeit bei der Praktikumsbetreuung;
- Joachim Seydel vom Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, für die freundliche Bereitstellung des Stammes *E. coli* F470;
- Karin Vogt und Nora Stellisch für ihre großartige Unterstützung im Labor und die Bereitschaft, Proben auch mehr als einmal neu zu vermessen;
- Prof. Dr. Horst Weber, Magda Matyja, Elisa Winterer, Marc Heipke, Stefan Beyen, Susanne Kögel und Henriette Hansen für ihre Zusammenarbeit bei der Betreuung des Praktikums "Biochemie", das stets fröhliche Arbeitsklima und die Bereitschaft, gelegentlich auch nach 19 Uhr noch Analysen zu korrigieren;
- Felix Blasshofer und Christian Detzel für ihre Freundschaft und die vielen interessanten Gespräche und Unternehmungen innerhalb wie außerhalb des Labors;
- Andreas Gratz für das Korrekturlesen sowie die vielen fachlichen und technischen Tipps;
- Eva Kranen für ihr stets offenes Ohr sowie die Bereitschaft, sich gemeinsam um Zeitschriften und Altpapier zu kümmern;
- Klaudia Petermann für ihre Zusammenarbeit bei der Semesterplanung, der Unterstützung im Labor und ihre stets freundliche Art;
- meinen Wahlpflichtstudenten Manuela Wrodarczyk, Katrin Brosch, Dominik Kusiek, Britta Linnemann und Viktoria Fuchs, deren Ergebnisse Teil dieser Arbeit sind und deren Zusammenarbeit mir immer sehr viel Freude bereitet hat;
- allen bisher nicht genannten aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises sowie der gesamten WE Pharmazie für das produktive und stets angenehme Arbeitsklima;
- Sabrina für das Korrekturlesen, ihr Verständnis sowie ihre umfassende Unterstützung.

4

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS							
2	ZUSAMMENFASSUNG							
3	SUMMARY1							
4	EINLEITUNG1							
4.1	Hyaluronsäure							
	4.1.1	Entdeckung, Aufbau und Vorkommen	13					
	4.1.2	Biosynthese und physiologische Bedeutung	13					
	4.1.3	Technologische und medizinische Anwendungen	16					
4.2	Hyalu	ronidasen	17					
	4.2.1	Entdeckung und Einteilung	17					
	4.2.2	Übersicht und Bedeutung humaner Hyaluronidasen	18					
	4.2.3	Struktur der Hyaluronidasen	19					
	4.2.4	Medizinische Anwendungen	22					
4.3	Huma	ne Hyaluronidasen als neue Targets für Arzneistoffe	22					
	4.3.1	Hyaluronidase-Inhibitoren und -Aktivatoren als Zytostatika	22					
	4.3.2	Hyaluronidase-Inhibitoren bei Arthritis	24					
	4.3.3	Weitere Anwendungsmöglichkeiten für Hyaluronidase-Inhibitoren						
		und -Aktivatoren	24					
4.4	Mess	ung von Hvaluronidase-Aktivität	05					
			25					
	4.4.1	Physikochemische Methoden	25 25					
	4.4.1 4.4.2	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden	25 25 26					
	4.4.1 4.4.2 4.4.3	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden	25 25 26 26					
	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden	25 25 26 26 26					
	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden	25 25 26 26 27 27					
	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden	25 25 26 26 27 27 27 28					
	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6 4.4.7	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden	25 25 26 26 27 27 27 28 29					
4.5	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6 4.4.7 Inhibit	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden ion und Aktivierung von Hyaluronidasen	25 25 26 26 27 27 27 28 29 29					
4.5	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6 4.4.7 Inhibit 4.5.1	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden ion und Aktivierung von Hyaluronidasen Hyaluronidase-Inhibitoren	25 25 26 26 26 27 27 27 27 28 29 29 29					
4.5	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6 4.4.7 Inhibit 4.5.1 4.5.2	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden ion und Aktivierung von Hyaluronidasen Hyaluronidase-Inhibitoren						
4.5	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6 4.4.7 Inhibit 4.5.1 4.5.2 Rekor	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden ion und Aktivierung von Hyaluronidasen Hyaluronidase-Inhibitoren Bekannte Aktivatoren von Hyaluronidasen	25 25 26 26 27 27 27 27 28 29 29 29 29 29 29 29 23 					
4.5	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6 4.4.7 Inhibit 4.5.1 4.5.2 Rekor 4.6.1	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden ion und Aktivierung von Hyaluronidasen Hyaluronidase-Inhibitoren Bekannte Aktivatoren von Hyaluronidasen mbinante Expression						
4.5	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6 4.4.7 Inhibit 4.5.1 4.5.2 Rekor 4.6.1 4.6.2	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden ion und Aktivierung von Hyaluronidasen Hyaluronidase-Inhibitoren Bekannte Aktivatoren von Hyaluronidasen mbinante Expression Expression von Hyaluronidasen						
4.54.64.7	4.4.1 4.4.2 4.4.3 4.4.4 4.4.5 4.4.6 4.4.7 Inhibit 4.5.1 4.5.2 Rekor 4.6.1 4.6.2 Ziele	Physikochemische Methoden Radiochemische Methoden Fluorimetrische Methoden Immunologische Methoden Zymographische Methoden Photometrische Methoden Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden ion und Aktivierung von Hyaluronidasen Hyaluronidase-Inhibitoren Bekannte Aktivatoren von Hyaluronidasen mbinante Expression Expression von Hyaluronidasen Das Autodisplay-System						

5.1	Bakterienstämme						
5.2	Plasmide						
5.3	Oligonukleotide						
5.4	Enzyme 4						
5.5 Lösungen und Nährmedien für den Umgang mit Bakterien							
	5.5.1	Flüssige und feste Nährmedien zur Anzucht von Bakterien	. 42				
	5.5.2	Sonstige Lösungen für den Umgang mit Bakterien	. 43				
5.6	Puffer	und Lösungen für die Hyaluronsäureanalytik	. 43				
	5.6.1	Photometrisches Testverfahren mit "stains-all"	. 43				
	5.6.2	Photometrisches Testverfahren mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)	. 44				
	5.6.3	Hyaluronsäureanalytik mittels HPLC	. 45				
5.7	Puffer	und Lösungen für Nukleinsäure- und Protein- Analytik	. 45				
	5.7.1	Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly	. 45				
	5.7.2	Agarose-Gelelektrophorese	. 45				
	5.7.3	Membranproteinisolierung und SDS-PAGE	. 46				
	5.7.4	Western Blot	. 46				
5.8	Antikö	rper	. 47				
5.9	Chemi	kalien	. 47				
5.10	Geräte)	. 49				
6	METH	ODEN	. 52				
6.1	Arbeite	en mit Bakterien	. 52				
	6.1.1	Anzucht von Bakterien	. 52				
	6.1.2	Induktion der Proteinexpression	. 52				
	6.1.3	Stammhaltung	. 53				
	6.1.4	Herstellen elektrokompetenter Zellen	. 53				
	6.1.5	Herstellen chemisch kompetenter Zellen	. 53				
6.2	Arbeite	en mit Nukleinsäuren	. 54				
	6.2.1	Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly (modifiziert)	. 54				
	6.2.2	Plasmidisolierung mittels Festphasenextraktion	. 54				
	6.2.3	Polymerase-Kettenreaktion	. 54				
	6.2.4	DNA-Aufreinigung durch Fällung	. 56				
	6.2.5	DNA-Aufreinigung durch Festphasenextraktion	. 57				
	6.2.6	DNA-Aufreinung durch Dialyse	. 57				
	6.2.7	Restriktionsendonukleaseverdau	. 57				
	6.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	. 57				

	6 2 0	Coloutralition you DNA Fragmanton	F0
	0.2.9	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	58
	6.2.10	Ligation von DNA	58
	6.2.11		59
	6.2.12	I ransformation chemisch kompetenter Zellen	59
	6.2.13	DNA-Sequenzanalyse	59
6.3	Arbeite	en mit Proteinen	60
	6.3.1	Isolierung der Außenmembran von <i>E. coli</i>	60
	6.3.2	Proteaseverdau als Nachweis der Oberflächenständigkeit von Proteinen	60
	6.3.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
	6.3.4	Durchführung und Auswertung von Western-Blots	61
6.4	Hyalur	onsäure- und Hyaluronidaseanalytik	62
	6.4.1	Photometrisches Testverfahren mit "stains-all"	62
	6.4.2	Photometrisches Testverfahren mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)	63
	6.4.3	Hyaluronsäureanalytik mittels HPLC	64
7	EXPE	RIMENTE UND ERGEBNISSE	66
7.1	Entwic	klung von Testverfahren zur Enzymaktivitätsmessung	66
	7.1.1	Photometrisches Testverfahren mit "stains-all" bei pH 7	66
	7.1.2	Photometrisches Testverfahren mit "stains-all" bei pH 3,5	76
	7.1.3	Photometrisches Testverfahren mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)	77
	7.1.4	Enzymaktivitätsmessung mittels HPLC	83
7.2	Testur	ng potentieller Hyaluronidase-Inhibitoren	89
	7.2.1	Untersuchungen von Benzimidazol- und Benzoxazol-Derivaten	89
	7.2.2	Untersuchungen von Indol-2-acetamiden, Indol-3-acetamiden und	
		Indol-3-carboxamiden	93
	7.2.3	Untersuchungen weiterer Indol-3-acetamide	98
	7.2.4	Untersuchungen mittels HPLC	.102
7.3	Humai	ne Hyaluronidase 2	. 104
	7.3.1	Autodisplay der hHyal-2	. 104
	7.3.2	Überprüfung der Oberflächenständigkeit	. 106
	7.3.3	Aktivitätsuntersuchungen bei pH 7	. 108
	7.3.4	Aktivitätsuntersuchungen bei pH 3,5	. 113
	7.3.5	Untersuchungen mit ausgewählten Inhibitoren	.114
7.4	Humai	nes PH-20	.116
	7.4.1	Autodisplay der hPH-20	.116
	7.4.2	Überprüfung der Oberflächenständigkeit	.117

	7.4.3	Aktivitätsuntersuchungen bei pH 7 und pH 3,5	. 120
	7.4.4	Untersuchungen mit ausgewählten Inhibitoren	. 122
7.5	Humai	ne Hyaluronidase 1	. 124
	7.5.1	Autodisplay der hHyal-1	. 124
	7.5.2	Überprüfung der Oberflächenständigkeit	. 124
	7.5.3	Aktivitätsuntersuchungen bei pH 7 und pH 3,5	. 127
	7.5.4	Untersuchungen mit ausgewählten Inhibitoren	. 129
8	DISKL	ISSION	. 130
8.1	Entwic	klung von Testverfahren zur Enzymaktivitätsmessung	. 130
	8.1.1	Photometrisches Testverfahren mit "stains-all"	. 130
	8.1.2	Photometrisches Testverfahren mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)	. 132
	8.1.3	Enzymaktivitätsmessung mittels HPLC	. 134
8.2	Autodi	splay und Aktivitätsmessungen der humanen Hyaluronidasen	. 136
8.3	Identif	zierung neuer Leitstrukturen von Hyaluronidase-Modulatoren	. 141
	8.3.1	Hyaluronidase-Inhibitoren	. 141
	8.3.2	Hyaluronidase-Aktivatoren	. 143
9	LITER	ATURVERZEICHNIS	. 147
10	ANHA	NG	. 160
10.1	Abkürz	zungsverzeichnis	. 160
10.2	Nuklei	nsäure- und Aminosäuresequenzen	. 162
10.3	Plasm	idkarten	. 165
	10.3.1	Humane Hyaluronidase 2 (hHyal-2)	. 165
	10.3.2	Humanes PH-20 (hPH-20)	. 166
	10.3.3	Humane Hyaluronidase 1 (hHyal-1)	. 167
10.4	Publika	ationen	. 168
	10.4.1	Originalarbeiten	. 168
	10.4.2	Tagungsbeiträge	. 168

2 ZUSAMMENFASSUNG

Eine übermäßige Expression der humanen Hyaluronidasen hHyal-1, hHyal-2 und hPH-20 steht in Zusammenhang mit Erkrankungen wie Arthrose, Blasen-, Brust- und Prostatakrebs. Für die Suche nach Inhibitoren werden größere Mengen an humanen Hyaluronidasen benötigt, die bisher jedoch in *Escherichia coli* nur nach Aufreinigung aus "inclusion bodies" und in geringem Umfang gewonnen werden können.

Um diesen Mangel zu beseitigen, wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals humane Hyaluronidasen mittels Autodisplay in katalytisch aktiver Form auf der Oberfläche von *E. coli* F470 exprimiert. Es wurden zudem ein "stains-all" Testverfahren sowie ein Morgan-Elson Testverfahren mit Rinderhyaluronidase (BTH) auf ihre Verwendbarkeit zur Messung von Hyaluronidase-Aktivität bei pH 3,5 und pH 7 untersucht und für die Verwendung in Mikrotiterplatten optimiert. Durch Erhöhung der Sensitivität konnte zum ersten Mal ein "stains-all" Testverfahren zur Bestimmung von HA bei pH 3,5 sowie in Anwesenheit von Zellen durchgeführt werden. Die Enzymkonzentrationen an humanen Hyaluronidasen auf der Oberfläche von *E. coli* F470 waren ausreichend hoch, um diese Zellen mit dem "stains-all" Testverfahren zu kombinieren. Die gemessene Aktivität der hHyal-1 betrug 87 mU/ml bei pH 3,5, bei pH 7 konnte keine Aktivität ermittelt werden. Die Aktivität der hHyal-2 erreichte 62 mU/ml bei pH 3,5 und 400 mU/ml bei pH 7, die von hPH-20 28 mU/ml bei pH 3,5 und 582 mU/ml bei pH 7 bei einer OD_{578 nm} = 5.

Zur Prüfung der Testverfahren auf ihre Verwendbarkeit zur Suche nach neuen Leitstrukturen von Hyaluronidase-Inhibitoren wurden mehrere Benzoxazol-, Benzimidazolund Indol-Derivate auf eine Hemmung von BTH untersucht. Von diesen Verbindungen zeigte N-[1-(4-Fluorobenzyl)indol-3-yl]-2-(4-fluorophenyl)-acetamid (SO17) mit IC₅₀-Werten von 57 µM bei pH 3,5 bzw. 26 µM bei pH 7 die höchste inhibitorische Potenz und es konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden. Noch stärker inhibitorisch aktiv war das als Kontrollinhibitor verwendete Ascorbinsäurepalmitat (Vcpal) mit IC₅₀-Werten von 18 µM bei pH 3,5 und 8 µM bei pH 7. In der Gruppe der Indol-3-acetamide wiesen einige Verbindungen deutliche Hyaluronidase-aktivierende Fähigkeiten auf. Den stärksten Effekt übte N-(4,6-Dimethylpyridin-2-yl)-(1-ethylindol-3-yl)acetamid (MD9) mit einer Steigerung der BTH-Aktivität auf 134% bei 100 µM aus.

Ascorbinsäurepalmitat sowie SO3 und SO16 wurden anschließend im "stains-all" Testverfahren mit Hyaluronidase-tragenden Zellen bei pH 7 auf ihre inhibitorischen Fähigkeiten von hHyal-2 und hPH-20 getestet. Auf hPH-20 wirkte Vcpal ähnlich stark inhibierend als auf BTH, SO3 und SO16 waren jedoch nur etwa halb so stark inhibitorisch aktiv. Gegenüber hHyal-2 wirkten Vcpal und SO3 etwas halb so stark inhibierend wie gegen BTH, während die Hemmung durch SO16 in derselben Größenordnung lag. Durch die Kombination der in dieser Arbeit vorgestellten Zellen, die humane Hyaluronidasen mittels Autodisplay auf ihrer Oberfläche tragen, mit dem optimierten "stains-all" Testverfahren wird eine einfachere Suche nach Hyaluronidase-Modulatoren humaner Hyaluronidasen möglich sein.

3 SUMMARY

Overexpression of the human hyaluronidases hHyal-1, hHyal-2 and hPH-20 is involved in the pathogenesis of severe diseases like arthrosis or bladder, breast and prostate cancer. The search of hyaluronidase inhibitors requires sufficient quantities of human hyaluronidases for successful screening, but until now they are obtained only with low yield using *Escherichia coli* due to purification from inclusion bodies.

To overcome the lack of human hyaluronidases, in this work for the first time human hyaluronidases hHyal-1, hHyal-2 and hPH-20 were expressed catalytically active on the surface of *Escherichia coli* using the Autodisplay system. Furthermore, a stains-all assay and a Morgan-Elson assay using bovine testes hyaluronidase (BTH) were tested for hyaluronidase activity measurement at pH 3.5 and pH 7. Both assays were optimized for the use in microplates. An enhancement of sensitivity was achieved and allowed determination of HA using a stains-all assay also at pH 3.5 and in the presence of cells for the first time. The enzyme concentrations of human hyaluronidases on the outer surface of *E. coli* were sufficient for a use within the stains-all assay. The activity of hHyal-1 was determined as 87 mU/ml at pH 3.5. At pH 7 no activity was found. The activity of hHyal-2 was determined as 62 mU/ml at pH 3.5 and 400 mU/ml at pH 7. All activities were obtained using cell suspension with an OD_{578 nm} = 5.

In order to verify the practicability of the test procedures for the identification of new hyaluronidase inhibitors, several benzoxazole-, benzimidazole- and indole-derivatives were successfully tested for their BTH inhibiting capabilities. Structure-activity-relationships could be concluded and N-[1-(4-Fluorobenzyl)indole-3-yl]-2-(4-fluorophenyl)-acetamide (SO17) showed the highest inhibitory potency of these derivatives with IC₅₀-values of 57 μ M at pH 3.5 and 26 μ M at pH 7. Ascorbic acid palmitate, which was used as a control inhibitor, was much more inhibitory active. It showed IC₅₀-values of 18 μ M at pH 3.5 and 8 μ M at pH 7. Within the derivatives of the indole-3-acetamides, several compounds showed hyaluronidase activating capabilities. N-(4,6-Dimethylpyridine-2-yl)-(1-ethylindole-3-yl)acetamide (MD9) revealed the highest effect with an activation up to 134% at a concentration of 100 μ M.

Ascorbic acid palmitate as well as SO3 and SO16 were also tested for their inhibitory capabilities of hHyal-2 and hPH-20 in the stains-all assay using whole cells at pH 7. Against hPH-20, Vcpal was as active as against BTH, but SO3 and SO16 were approximately half active. Against hHyal-2, Vcpal and SO3 showed about half inhibitory

activity than against BTH, but the inhibitory potency of SO16 was in the same order of magnitude.

Due to the combination of cells expressing human hyaluronidases on their outer surface using Autodisplay and the optimized stains-all assay, this work enables easier hyaluronidase modulator screening.

4 EINLEITUNG

4.1 Hyaluronsäure

4.1.1 Entdeckung, Aufbau und Vorkommen

Hyaluronsäure (HA) gehört zur Gruppe der Glykosaminoglykane (GAG) und besteht aus einer Abfolge von D-Glucuronsäure (GlcUAc) und N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc), die untereinander über $\beta(1\rightarrow 3)$ -Bindungen verknüpft sind. Jede dieser Disaccharideinheiten ist mit der nächsten Einheit $\beta(1\rightarrow 4)$ -glykosidisch verbunden (Abbildung 1). Die Anzahl der Einheiten kann mehr als 10.000 erreichen, die Molmasse der Kette damit auf bis zu 4 Mio. Da ansteigen. Jede einzelne Disaccharideinheit hat eine Masse von ca. 400 Da.



Abbildung 1: Disaccharideinheit der HA. HA setzt sich aus 20 bis 25000 Disaccharideinheiten zusammen, die aus $\beta(1\rightarrow 3)$ -glykosidisch verknüpfter Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin bestehen.

Hyaluronsäure wurde 1934 aus dem Glaskörper von Rinderaugen erstmalig identifiziert (Meyer und Palmer 1934). Unter physiologischen Bedingungen ist die Verbindung allerdings keine Säure, sondern ein Salz (Natrium-Hyaluronat). Entsprechend der internationalen Nomenklatur für Polysaccharide wurde sie 1986 als Hyaluronan bezeichnet und ebenfalls mit HA abgekürzt (Balazs *et al.* 1986). Diese Bezeichnung umfasst sowohl die Säure als auch die Salzform und umgeht das Problem der für die korrekte Benennung erforderlichen Kationen-Identifizierung.

HA ist als Molekül sehr weit verbreitet. Es ist das einzige Polymer, das sowohl in höheren Organismen als auch in Bakterien sowie einer Alge vorkommt (Graves *et al.* 1999). Sogar in Viren wurde ein Gen für HA-Synthase nachgewiesen (DeAngelis 1999).

4.1.2 Biosynthese und physiologische Bedeutung

Gebildet werden kann HA von fast allen humanen Zellen, allen voran von Fibroblasten, den Vorstufen der Bindegewebszellen. Die zelluläre Synthese der HA weicht von der Synthese anderer Proteoglykane wie Chondroitin oder Heparin ab. Sie verläuft nicht über den Golgi-Apparat, sondern an der Innenseite der Plasmamembran durch abwechselnde Übertragung von UDP-Hyaluronan auf UDP-N-Acetyl-D-glukosamin (UDP-GlcNAc) und UDP-Glukuronsäure (UDP-GlcUA) (Prehm 1984). An der Synthese sind drei Enzyme beteiligt: Has-1, Has-2 und Has-3 (Weigel *et al.* 1997). Aufgrund der starken Raumforderung des gebildeten HA wird die Kette schon während der Synthese kontinuierlich in den Extrazellularraum geschleust.

Humane HA hat als Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) zahlreiche physiologische Bedeutungen. Sie gehen weit über die bekannten Funktionen der ECM als Interzellularsubstanz wie Gerüstbildung und Aufrechterhaltung von Gewebeturgor und Wasserhomöostase hinaus. HA bildet eine mechanische Barriere, ermöglicht aber auch Stofftransport, Kontakt und Informationsaustausch zwischen benachbarten Zellen. Sie unterstützt die Reparatur von Geweben bei Verletzungen, fördert die Proliferation von Fibroblasten, hemmt eindringende Krankheitserreger und speichert Elektrolyte und Cytokine (Laurent und Fraser 1992; Laurent *et al.* 1996; Noble 2002). Sie bildet die Matrix zur Anlagerung von weiteren wichtigen Bestandteilen der ECM wie Proteoglucan, Aggrecan und Versican (Toole 2004). Die Struktur (Abbildung 2) wird durch die Abstoßung der negativ geladenen Proteoglykane untereinander stabilisiert.

Auch die rheologischen Eigenschaften von Kammerwasser, Lymph- und Synovialflüssigkeit werden durch HA bedingt (Stern und Jedrzejas 2006). Aufgrund seiner Struktur nimmt hochmolekulare HA von ca. 2 x 10^3 - 10^5 Zuckermolekülen (400 – 40.000 kDa) das bis zu 1000fache seines Molekulargewichtes an Wasser auf und bildet dadurch gelartige viskose Lösungen (Laurent *et al.* 1996).

Die Bedeutung des HA-Stoffwechsels beginnt bereits vor der Embryonalentwicklung, da die Eizelle von einer Schicht HA umgeben ist, die vom Spermium durchquert werden muss. Während der Embryogenese wird das Wachstum der Gliedmaßen durch die HA-Synthese in Mesenchymzellen, den embryonalen Bindegewebszellen, angeregt (Toole 1997; Camenisch *et al.* 2002). Auch beim Wundheilungsprozeß bilden Fibroblasten verstärkt HA. Sie lösen sich dadurch von der Umgebung ab und formen eine neue ECM. Das gelingt ihnen, da HA durch seine hohe Wasserbindungskapazität raumfordernd ist und andere Zellen verdrängt. Anschließend bilden die Fibroblasten als ruhende Fibrozyten das neue Bindegewebe (Toole 1997).

Die Raumforderung können auch metastasierende Tumorzellen nutzen, um sich vom Primärtumor zu lösen und durch die umgebende HA-Hülle vor dem Zugriff von Zytostatika und Immunzellen zu schützen. Auch verschiedene Bakterien der Gattungen *Pasteurella* und *Streptococcus* umgeben sich mit einer Kapsel aus HA zum Schutz vor Phagozytose. HA stellt in diesem Zusammenhang auch einen bakteriellen Pathogenitätsfaktor dar

14

(Bisno *et al.* 2003). Eine weitere pathophysiologische Bedeutung besitzt die Bildung von HA durch glatte Muskelzellen in Blutgefäßen. Eine zu starke Synthese durch diese Zellen steht in Zusammenhang mit Nierenversagen und Herzinfarkt (Evanko *et al.* 1999; Toole *et al.* 2002).



Abbildung 2: Ausschnitt aus der extrazellulären Matrix (ECM). HA ist an CD44 der Zellmembran angeheftet, weitere Proteoglykane lagern sich an die HA an (nach Toole 2004).

Neben der hochmolekularen HA besitzen auch kürzerkettige Fragmente physiologische Bedeutung. Ihre Wirkungen sind jedoch komplex und teilweise den Effekten der langkettigen HA entgegengesetzt. Eine gute Übersicht liefert Stern (Stern *et al.* 2006). Während hochmolekulare HA anti-angiogenetisch und anti-inflammatorisch wirkt (McBride 1979; Feinberg und Beebe 1983; Delmage *et al.* 1986), stimulieren Fragmente in der Größenordnung von 20 kDa, dies entspricht etwa 50-100 Disaccharideinheiten, die Synthese von Cytokinen (Noble 2002). Sie wirken damit inflammatorisch und fördern die Angiogenese. Auch Fragmente mit 3-10 Disaccharideinheiten unterstützen die Gefäßneubildung (Slevin *et al.* 1998). Tetrasaccharide induzieren die Bildung von Hitze-Schock-Proteinen und vermitteln anti-apoptotische Effekte (Liu *et al.* 1996; Filion und Phillips 2001; Xu *et al.* 2002). Die meisten der genannten physiologischen und pathophysiologischen Effekte werden durch direkten Kontakt zu einer Reihe von HA-bindenden Rezeptoren ausgelöst oder durch die kompetetive Verdrängung der langkettigen HA durch kürzerkettige Fragmente von diesen Rezeptoren.

In den letzten Jahren wurden zellulär wie auch extrazellulär eine ganze Reihe solcher HAbindenden Rezeptoren und anderer Proteine, die sog. Hyaladherine, nachgewiesen. Als zelluläre Rezeptoren sind CD44, RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility), HARE (HA receptor for endocytosis) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) bekannt (Gustafson *et al.* 1995; Laurent *et al.* 1996; Zhou und Weigel 1996; Cheung *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2000). Für RHAMM wurde im Signalweg eine Beteiligung von erk1 (extracellular regulated kinase 1) sowie eine Wechselwirkung mit dem PDGF-Rezeptor nachgewiesen, auch CD44 gibt Signale in die Zelle unter Beteiligung von Kinasen weiter (Entwistle *et al.* 1996; Cheung *et al.* 1999). Im Lymphendothel wurde mit LYVE1 (lymphatic endothelial hyaluronan receptor) ein weiterer, für Lymphgefäße spezifischer Rezeptor nachgewiesen (Banerji *et al.* 1999).

Extrazellulär binden eine ganze Reihe von Substanzen HA, dazu gehören u.a. die Proteoglykane Versican, Aggrecan und Fibrinogen, SHAP (serum-derived Hyaluronanassociated Protein) und das Link-Protein. Das Link-Protein und die Proteoglykane sorgen durch ihre Bindung an HA für die Ausbildung und Organisation der ECM. SHAP, das auch als Inter- α -Inhibitor bezeichnet wird, spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Ovulation sowie der Ausbildung und Aufrechterhaltung der ECM (Huang *et al.* 1993; Bost *et al.* 1998).

4.1.3 Technologische und medizinische Anwendungen

Neben seiner physiologischen Bedeutung hat HA auch in Pharmazie und Medizin einen hohen Stellenwert erlangt. Es findet Anwendung vor allem im Bereich der pharmazeutischen Technologie, der Augenheilkunde und der Dermatologie. Aufgrund seiner extrem guten Verträglichkeit werden HA und verschiedene Derivatisierungen u.a. als Matrix für Arzneiformen mit modifizierter Freisetzung (Larsen *et al.* 1993; Luo *et al.* 2000a) oder als Beschichtung für Liposomen (Yerushalmi *et al.* 1994) diskutiert. Seine Anwendung als Injektionslösung in der Augenchirurgie, als künstlicher Tränenersatz beim trockenen Auge und zur intraartikulären Injektion bei Arthritis sind bereits etabliert (Liesegang 1990; Adams 1993). Im Gelenk soll es nicht nur abgebaute endogene HA der Synovialflüssigkeit ersetzen und somit als Schmiermittel dienen, es wird auch eine direkte maskierende Wirkung auf Schmerzrezeptoren diskutiert (Gotoh *et al.* 1993). In der Schönheitschirurgie wird HA für Unterspritzungen und kosmetische Polster verwendet (Tan *et al.* 1990).

Da im Laufe des Lebens der HA-Gehalt der Haut immer mehr abnimmt, ist vielen Cremes und oralen Anti-Aging-Produkten HA zugesetzt. Den oral anzuwendenden Produkten liegt der Gedankengang zu Grunde, dass sich im menschlichen GIT keine HA-spaltenden Enzyme befinden und daher HA unverdaut bis in den Dünndarm gelangen und aufgenommen werden kann. Ob auf diese Weise der endogene HA-Pool aufgefüllt und Alterungserscheinungen, z.B. an der Haut, entgegengewirkt werden kann, ist jedoch zu bezweifeln, da die Halbwertszeit von HA im Blut nur wenige Minuten beträgt (Fraser *et al.* 1981).

Neben der Anwendung von nativem HA ist auch mit Arzneistoffen verknüpfte HA im Einsatz, die als biodegradierbares therapeutisches System (Benedetti *et al.* 1993) oder zum Drug-Targeting dienen kann (Asayama *et al.* 1998; Luo *et al.* 2000b; Rouse *et al.* 2007).

4.2 Hyaluronidasen

4.2.1 Entdeckung und Einteilung

Zur Aufrechterhaltung der vielfältigen Funktionen der HA wie Gewebestabilität und -turgor, ist ein regelmäßiger Auf- und Abbau von HA erforderlich. Der Gesamtgehalt eines durchschnittlichen Menschen von 70 kg beträgt etwa 15 g, die Hälfte davon liegt - mit einer Halbwertszeit von etwa einem Tag - in der Haut vor (Harada und Takahashi 2007). Den abbauenden Teil des komplexen HA-Gleichgewichtes übernehmen zum größten Teil Hyaluronidasen.

Die erste Hyaluronidase wurde 1928 noch vor HA entdeckt, als aus Rinderhoden ein Protein isoliert wurde, das die Diffusion von Impfstoffen, Tinte und Giften ins Gewebe förderte (Duran-Reynals 1928). Entsprechend dieser Beobachtung wurde das Protein als "spreading factor" bezeichnet (Chain und Duthie 1939) und erst später als Hyaluronidase identifiziert. In den folgenden Jahren wurde Hyaluronidaseaktivität in vielen weiteren Geweben nachgewiesen und verschiedene Hyaluronidasen isoliert (Ballet *et al.* 1963).

Eine erste Einteilung aller HA abbauender Enzyme erfolgte bereits 1971 von Meyer *et al.* in Abhängigkeit ihres Spaltungsmechanismus. Diese Einteilung in drei große Gruppen hat bis heute Bestand. Demnach gehören die humanen Hyaluronidasen zu den Hyaluronat-4glucanohydrolasen (EC 3.2.1.35), die HA an beliebiger Stelle innerhalb der Kette durch Spaltung der β -1,4-glykosidischen Bindung umsetzen (Meyer 1971). Zu dieser Gruppe gehören auch die Rinderhyaluronidase (BTH) sowie die Hyaluronidasen von Bienen, Spinnen, blutsaugenden Insekten, Skorpionen und Schlangen, die als Bestandteil von Tiergiften deutlich zu deren Giftigkeit beitragen (Frost *et al.* 1996; Volfova *et al.* 2008). Hyaluronidasen von Invertebraten und Mikroorganismen gehören dagegen anderen Enzymklassen an (Meyer 1971). Während die Hyaluronat-3-glucanohydrolasen der Invertebraten (EC 3.2.1.36) die β -1,3-glycosidische Bindung schneiden und ebenfalls Tetrasaccharide entstehen, katalysieren die bakteriellen Hyaluronatlyasen (EC 4.2.2.1) eine β -Eliminierung zum ungesättigtem Disaccharid 2-Acetamido-2-deoxy-3-O-(β -D-gluco-4-enepyranosyluronsäure)-D-glucose.

4.2.2 Übersicht und Bedeutung humaner Hyaluronidasen

Bis heute sind sieben Gene für Hyaluronidasen im humanen Erbgut bekannt (Tabelle 1). Dazu gehören *HYAL1*, *HYAL2* und *HYAL3*, geclustert auf dem Chromosom 3p21.3 sowie *HYAL4*, *PHYAL1* und *SPAM1* auf Chromosom 7q31.3. Als siebtes Gen für eine Hyaluronidase wurde mg*EA5* auf dem Chromosom 10q24.1 identifiziert (Heckel *et al.* 1998), allerdings nicht weiter charakterisiert. Ihre Bedeutung ist bis heute unklar.

Chromosom	Identifizierte Hyaluronidase-Gene (kodiertes Prot				
3p21.3	<i>HYAL1</i> (hHyal-1)	HYAL2 (hHyal-2)	HYAL3 (hHyal-3)		
7q31.3	HYAL4 (hHyal-4)	PHYAL1 (-)	<i>SPAM1</i> (hPH-20)		
10q24.1	MGEA5 (meningioma expressed antigen 5)				

Tabelle 1: Bisher im humanen Genom identifizierte Hyaluronidase-Gene und ihre Proteine.

PHYAL1 ist ein Pseudogen, das zwar transkribiert, aber nicht translatiert wird. HYAL4 codiert nicht für eine Hyaluronidase, wie zunächst vermutet wurde und dem Gen seinen Namen gab, sondern für eine Chondroitinase hHyal-4 (Csoka et al. 2001). Chondroitin, das Substrat dieses Enzyms, unterscheidet sich von HA durch den Austausch des N-Acetylglucosamins in der Kette gegen N-Acetylgalaktosamin. SPAM1 codiert für das Sperma-Adhäsions-Molekül 1 (SPAM1), das auch als PH-20 bezeichnet wird. PH steht für "posterior head", den hinteren Kopfteil des Schweinespermiums, wo das Protein als Antigen eines Antikörpers mit der Nummer 20 von Primakoff und Myles identifiziert wurde (Primakoff und Myles 1983). Humanes PH-20 (hPH-20) ist ein Protein von 64 kDa Größe, das mit einem GPI-Anker in der Zellmembran der Spermienköpfe verankert ist. Es ist über einen breiten Bereich vom neutralen bis hin zum sauren Bereich aktiv und erfüllt eine wichtige Aufgabe bei der Befruchtung von Eizellen (Primakoff und Myles 2002). Es sorgt für das Vordringen des Spermiums durch die ECM der Kumuluszellen, die die Eizelle umgeben. Beim anschließenden Kontakt mit der Zona pellucida, der glykoproteinreichen Membran der Eizelle, wird hPH-20 in eine lösliche, unverankerte Form überführt, die schließlich das Eindringen in die Eizelle ermöglicht. Lösliches hPH-20 hat eine um 9 kDa geringere Größe und besitzt eine stärkere Aktivität im sauren pH-Bereich (Sabeur *et al.* 1997).

HYAL1, HYAL2 und HYAL3 codieren für die Hyaluronidasen hHyal-1, hHyal-2 und hHyal-3. hHyal-3 wurde bisher nicht umfassend untersucht und es sind nur wenige Daten über ihre enzymatische Aktivität veröffentlicht worden. Es ist daher unklar, ob hHyal-3 katalytisch aktiv ist (Csoka *et al.* 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass es sich um eine im Sauren aktive Hyaluronidase handeln könnte (Stern und Jedrzejas 2006). Eine Beteiligung von hHyal-3 am intrazellulären HA-Stoffwechsel wird vermutet, es konnte aber bisher keine Beteiligung am Abbau von HA nachgewiesen werden (Atmuri *et al.* 2008). An der Umsetzung von HA wäre demnach neben dem hPH-20 vor allem die kombinierte Aktivität der hHyal-1 und der hHyal-2 beteiligt.

hHyal-2 ist ein 51,8 kDa großes Protein, das ähnlich dem hPH-20 durch einen GPI-Anker in der Membran befestigt ist. hHyal-1 ist dagegen ein lösliches lysosomales Enzym (Gold 1982) dessen Molekulargewicht in der Literatur sowohl mit 57 kDa (Gold 1982; Frost *et al.* 1997) als auch mit 51 kDa (Chao *et al.* 2007) angegeben wird und dessen pH-Optimum im sauren Bereich zwischen pH 3,5 und 4 liegt (Hofinger *et al.* 2007b). Zum Teil wurden abweichende Molekulargewichte von 72 kDa im Serum (Afify *et al.* 1993) oder 76 kDa in der Leber (Gold 1982) gefunden. Ob es sich dabei um prozessierte Proteine handelt oder ob es eine andere Ursache für diese unterschiedlichen Molekulargewichte gibt ist unklar.

Für den Abbau der HA wird ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem langkettige HA zunächst durch CD44 gebunden und mittels hHyal-2 auf eine Größe von 20 kDa abgebaut wird (Stern 2005). Anschließend werden die Fragmente internalisiert und in Lysosomen durch hHyal-1 bis zu Tetrasacchariden abgebaut. Andere Autoren konnten keine Aktivität der hHyal-2 nachweisen (Rai *et al.* 2001), so dass ihre Funktion nach wie vor nicht endgültig geklärt ist.

4.2.3 Struktur der Hyaluronidasen

Die Struktur der hHyal-1 konnte 2007 als erste humane Hyaluronidase aufgeklärt werden (Chao *et al.* 2007). Zuvor war bereits die Struktur der Bienen-Hyaluronidase bekannt (Marković-Housley *et al.* 2000), die eine typische (β/α)₈ TIM-Fassstruktur aufweist. Allerdings besteht das Fass nur aus sieben Komponenten und ist zudem zwischen β_1 und β_2 geöffnet. Die Bindungstasche für HA liegt an den gemeinsamen C-terminalen Abschnitten der β -Faltblätter (Abbildung 3, A) und ist reich an aromatischen Aminosäuren, wie es von anderen Zucker-bindenden Proteinen bekannt ist (Chao *et al.* 2007). Die

Bindungstasche sowie alle weiteren an der Reaktion beteiligten Aminosäuren sind zwischen den verschiedenen humanen Hyaluronidasen und BTH hoch konserviert.



Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der hHyal-1. Struktur der hHyal-1 nach Chao et al. (PDB Zugriffscode 2PE4). A markiert die Bindungstasche, B die C-terminale Domäne (Chao *et al.* 2007).

Die pH-Optima der humanen Enzyme unterscheiden sich von denen der Rinderenzyme. So liegen die Aktivitätsmaxima für hHyal-1 bei pH 3,5 - 4,0 (Hofinger *et al.* 2007b) und für hHyal-2 bei 5,6 - 7,0 (Afify *et al.* 1993). hPH-20 besitzt Aktivitätsmaxima sowohl im sauren als auch im neutralen Bereich (Sabeur *et al.* 1997). Für BTH konnte ebenfalls ein bimodales Verhalten gezeigt werden, die Maxima liegen sowohl in pH-Bereichen von 4,5 – 5,0 als auch um 7,5 (Meyer 1971; Gorham *et al.* 1975; Afify *et al.* 1993). Es wurde auch ein Maximum im stärker sauren Bereich um 3,7 beschrieben (Muckenschnabel *et al.* 1998).

Zwischen allen genannten Hyaluronidasen besteht eine Sequenzhomologie (Abbildung 4 und Tabelle 2). Insbesondere der Bereich des aktiven Zentrums ist stark konserviert. Deutlichere Unterschiede finden sich dagegen am C-terminalen Ende der Aminosäuresequenz, die als Ursache für die verschiedenen pH-Aktivitätsprofile, Produktund Substratspezifitäten diskutiert werden (Chao *et al.* 2007).

C-terminal besitzen alle humanen Hyaluronidasen eine Domäne unbekannter Funktion und unterschiedlicher Länge (Abbildung 3, B). Fehlt dieser Teil, wird von einem Verlust an Aktivität berichtet (Gmachl und Kreil 1993; Arming *et al.* 1997). Der C-terminale Teil enthält mehrere Cysteine (Abbildung 4) und ähnelt der sog. EGF-like domain (Hofinger *et al.* 2007b). Viele extrazelluläre Proteine tragen eine EGF-Domäne, die an Zellanheftung und interzellulärer Kommunikation beteiligt ist (Harris *et al.* 2003; Wouters *et al.* 2005). Daher wird eine ähnliche Bedeutung bei Hyaluronidasen diskutiert. Unterstützt wird diese Theorie durch die Entdeckung, dass die C-terminale Sequenz von hPH-20 an der Anheftung an die *Zona pellucida* der Eizelle beteiligt ist (Hunnicutt *et al.* 1996). Auch eine Wechselwirkung mit CD44 wird diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass hHyal-1 und hHyal-2 für eine Aktivität *in vivo* CD44 benötigen (Harada und Takahashi 2007). Auch bei Brusttumoren, deren Progression mit HA in Verbindung gebracht wird, wurde eine direkte Wechselwirkung zwischen CD44 und hHyal-2 nachgewiesen (Bourguignon *et al.* 2004). Möglicherweise bindet die C-terminale Domäne an CD44 und leitet anschließend die HA ins aktive Zentrum (Chao *et al.* 2007).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	.	.		.						
hHval-1	MA	HLLP TC		OGERGPLLPN-	RPFTTVWNZ	NTOWCLE - RI	HGVDVDVSVFI	WVANPGOTER	GPDMTTFYSS	JLGTY
huval-2	MD		ULAVAWAME	LKDTA DDT FTC		INTODCCP-P	KVDLDLNAFT	VOAGDNEGEN	NONTTIEVED	PLCLV
hHyai-2	III				DDDCUT WND	PRANGER D		TANDOUD		
nHyal-3	MI1".	LOTChe VI	LVLGVALCLG	CGQPLPQVPE-	RPFSVLWN	/PSAHCEA-R.	GVHLPLNALG	TIANRGQHFF	IGQNMT I F Y KNG	⊋гсгх
hHyal-4	MKVLSEGQLKL-CVV(2PVHLTSWLL:	IFFILKSISC	LKPARLPIYQF	KPFIAAWNA	APTDQCL-IK	YNLRLNLKMFE	PVIGSPLAKAF	GQNVTIFYVN	RLGYY
hPH-20	MGVLKFKHIFFRSFVI	(SSGVSQIVF	rflli pcclti	LNFRAPPVIPN	IVPFLWAWNA	APSERCLG-K	FDEPLDMSLFS	FIGSPRINAT	'GQGVTIFYVDF	RLGYY
BTH	MGMFRRHHISFRSFAG	SSGTPQAVF	FFLLPCCLAI	LDFRAPPLISN	ITSFLWAWNA	APVERCVNRR	FQLPPDLRLFS	VKGSPQKSAT	GQFITLFYAD	RLGYY
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
										1
httere 1 1	DVVTD TOPDUECOLI	ONAGETAUE		TDADDECCIAS	TOWEAWDDD		TVDODODATVC		VENUNODORO	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
nHyal-1	PITTP-IGEPVFGGL		AKIFQDILAA.	I PAPDE SGLAV	TDWEAWRPF	WAFNWDIKD	LIKQKSKALVÇ	AQHPDWPAPQ	VEAVAQDQFQC	JAARA
nHya1-2	PRFDS-AGRSVHGGV	QNVSLWAHR	KMLQKRVEHY.	IRTQESAGLAV	TDWEDWRP	WVRNWQDKD	VYRRLSRQLVA	SKHPDWPPDF	IVKQAQYEFEI	FAAQQ
hHyal-3	PYFGP-RGTAHNGGI	PQALPLDRHL	ALAAYQIHHS	LR – PGFAGPAV	LDWEEWCPI	JWAGNWGRRR	AYQAASWAWAQ	QVFPDLDPQE	QLYKAYTGFEÇ	QAARA
hHyal-4	PWYTS-QGVPINGGL	PQNISLQVHLI	EKADQDINYY	IPAEDFSGLAV	IDWEYWRPÇ	QWARNWNSKD	VYRQKSRKLIS	DMGKNVSATI	IEYLAKVTFER	ESAKA
hPH-20	PYIDSITGVTVNGGI	PQKISLQDHLI	OKAKKDITFYI	MPVDNLG-MAV	IDWEEWRPI	[WARNWKPKD]	VYKNRSIELVÇ	QQNVQLSLTE	ATEKAKQEFEI	kagkd
BTH	PHIDEKTGKTVFGGI	POLGNLKSHL	EKAKNDIAYY	IPNDSVG-LAV	IDWENWRPI	WARNWKPKD	VYRDESVELVI	OKNPOLSFPE	ASKIAKVDFET	FAGKS
		~						~ ~		
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
httera 1 1	WMACTEL OL CRALEDOR	TWOEVOEDD				TWCOGDALY		TOROMVIOL		
nHyal-1	WMAGILQLGRALRPRO	JLWGF I GF PDO	JINIDFLS	PNIIGQCPSGI	RAQNDQLG	NLWGQSRALI.	PSIIMPAVLEG	FIGKSQM1 VQF	RVAEAFRVAVA	AAGD-
nHya1-2	FMLETLRYVKAVRPRI	ITMGL I TL DO	. INHDI VQNWI	ESTIGRCPDVE	VARNDQLAV	VLWAESTALF.	PSVYLDETLAS	SKHGRNFVSF	RVQEALRVAR	THHAN
hHyal-3	LMEDTLRVAQALRPHO	GLWGFYHYPA	CGN-GWHSMA	SNYTGRCHAAI	LARNTQLHV	VLWAASSALF	PSIYLPPRLPE	PAHH-QAFVRH	IRLEEAFRVAL	VGHR-
hHyal-4	FMKETIKLGIKSRPK	GLWGYYLYPD	CHNYNVYAI	PNYSGSCPEDE	VLRNNELSV	VLWNSSAALY	PSIGVWKSLGE	SENILRFSKE	RVHESMRISTN	MTSHD
hPH-20	FLVETIKLGKLLRPN	ILWGYYLFPD	CYNHHYKKI	PGYNGSCFNVE	IKRNDDLSV	VLWNESTALY	PSIYLNT-QQS	PVAATLYVRN	RVREAIRVSKI	IPDAK
BTH	FMOETLKLGKLLRPN	ILWGYYLFPD	CYNHNHNOI	PTYNGNCPDVE	KRRNDDLEV	VLWKESTALF	PSVYLNIRLKS	TONAALYVRN	RVQEAIRLSKI	IASVE
	~		~					~	~	
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
					[]	▼			♥	1
htteral 1	DNI DUI DVUOTEVD	יייייייייייייייייייייייייייייייייייייי	EUGI CEGAA		WENTETER				CCCUCDCUDD	יייין דפינדם
Innyai-i	PNLFVLFIVQIFID-		LENSLGESAA	2GAAGVVLWV2	NENIKIKE	COMINE IND	TILGPFILMVI	SGALLCSQAL	GUGUGRCVRR	
nHya1-2	HALPVIVFIRPIIS-	(RLIGLSEMD)	LISIIGESAA	LGAAGVILWGL	AGIIISIEI	LCQILKDILI.	RLLVPIVVNVS	WAIQICSRA	CHGHGRCVRRI	NP-SA
hHya1-3	HPLPVLAYVRLTHR-I	RSGRFLSQDD	LVQSIGVSAA	LGAAGVVLWGL	LSLSSSEE	SCMHTHDATA	DILGPYVINVI	RAAMACSHQF	CHGHGRCARRI	DPGQM
hHyal-4	YALPVFVYTRLGYRDI	EPLFFLSKQDI	LVSTIGESAA	LGAAGIVIWGI	MNLTASKAN	ICTKVKQFVS	SDLGSYIANVI	RAAEVCSLHI	CRNNGRCIRKN	MW-NA
hPH-20	SPLPVFAYTRIVFTD	QVLKFLSQDEI	LVYTFGETVA	LGASGIVIWGI	LSIMRSMKS	SCLLLDNYME	FILNPYIINVI	LAAKMCSQVI	CQEQGVCIRK	NW-NS
BTH	SPLPVFVYARPVFTD	GSSTYLSQGDI	LVNSVGEIVS	LGASGIIMWGS	LNLSLSVQS	SCMNLGTYLN	TTLNPYIINVI	LAAKMCSQVI	CHDGGVCTRK	HW-NS
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
		.							.	
hural 1	KALLINDAGESTOL				יע סמואר א סואר	י	- DV CMM			
huval 2	CTELU CTNCEDI VD	UNDORDOLD		DUI OTUERCOC	VICWCCEO			TOTTATAT7	Emmert	
Innyai-2	DIFLALSINGFREVE	SHAFGEPQUK.	PVGELSWADI			LQWDHRQAAG	JASEAWAGSHL		FIMID	
nHya1-3	EAFLHLWPD		GSL(JUWKS-FSCHC	YWGWAGPTC	QEPRP	JPKEAV			
hHyal-4	PSYLHLNPASYHIEA:	SEDGEFTY	VKGKASDTDL	AVMADTFSCHO	YQGYEGADO	CREIKTADGC	SGVSPSPGSLM	ITLCLLLLASY	RSIQL	
hPH-20	SDYLHLNPDNFAIQLI	EKGGKFT	VRGKPTLEDLI	EQFSEKFYCSC	YSTLSCKEP	KADVKDTDAV	D-VCIADGVCI	DAFLKPPMET	'EEPQIFYNASI	PSTLS
BTH	SDYLHLNPMNFAIQT	GEGGKYT	VPGTLTLEDL(QKFSDTFYCSC	YSNLSCKKF	RVDIKNVHSV	D-VCMAEDVCI	DAFLKPP		
					A					
	510	520			Т		тт			
	.									
hHval-1										
hural 0										
hHya1-2										
nHyal-3										
hHyal-4										
hPH-20	ATMFIVWRLEVWDQG:	ISRIGFF								

Abbildung 4: Sequenzvergleich humaner Hyaluronidasen sowie BTH. Die Sequenzen von hHyal-1 bis hHyal-4, hPH-20 und BTH wurden mittels ClustalW (Larkin *et al.* 2007) verglichen. Die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind durch einen Kasten markiert, die C-terminal gelegenen Cysteine durch Pfeile gekennzeichnet.

Enzym	hHyal-1	hHyal-2	hHyal-3	hHyal-4	hPH-20	BTH
hHyal-1	100	40	40	40	38	37
hHyal-2	40	100	42	37	34	37
hHyal-3	40	42	100	35	35	32
hHyal-4	40	37	35	100	41	39
hPH-20	38	34	35	41	100	65
BTH	37	37	32	39	65	100

Tabelle 2: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hyaluronidasen hHyal-1 bis hHyal-4, hPH-20 und BTH, berechnet als prozentuale Identität mit ClustalW (Larkin *et al.* 2007).

4.2.4 Medizinische Anwendungen

Eine bekannte Anwendung von Rinderhyaluronidase (BTH) ist ihr Zusatz zu Anästhetika in der Augenchirurgie. Die anästhetische Wirkung setzt durch den Zusatz schneller ein und wird außerdem deutlich verlängert (Kallio *et al.* 2000). In der Krebstherapie wird Hyaluronidase als Antidot bei Paravasation von Vinca-Alkaloiden eingesetzt, um Nekrosen zu verhindern (Bertelli *et al.* 1994). Kutan appliziert können Hyaluronidasen die Narbenbildung vermindern (Baurmash und Limongelli 1976) und werden seit kurzem auch als Penetrationsverbesserer geprüft (Laugier *et al.* 2000; Bookbinder *et al.* 2006; Frost 2007).

4.3 Humane Hyaluronidasen als neue Targets für Arzneistoffe

4.3.1 Hyaluronidase-Inhibitoren und -Aktivatoren als Zytostatika

Trotz großer Fortschritte bei der Behandlung von Krebserkrankungen in den letzten Jahren sind neoplastische Veränderungen nach wie vor die zweithäufigste Todesursache, mit steigender Tendenz (Minino *et al.* 2007). Eine Behandlung von Krebs sieht in vielen Fällen vor, den Tumor mittels Zytostatika-Therapie und Bestrahlung zu verkleinern. Anschließend kann er, wenn nötig, chirurgisch entfernt werden. In vielen Fällen spricht jedoch der Tumor nicht auf die Therapie an, wird resistent (O'Connor *et al.* 2007) oder es kommt trotz erfolgreicher Operation zu Rezidiven oder Metastasen, sodass eine Heilung vom Krebs nicht möglich ist. Insbesondere beim Auftreten von aggressiven Tumoren, die mit einem schnellen Wachstum und schneller Metastasierung einhergehen, haben Betroffene eine schlechte Prognose. Die Entwicklung von Zytostatika mit neuartigen Angriffspunkten ist daher ein vorrangiges Ziel der Arzneistoffforschung.

Die angiogenetischen und anti-apoptotischen Effekte der kurzkettigen HA-Fragmente machen HA und damit auch die Hyaluronidasen zu interessanten neuen Targets auf diesem Gebiet. Eine mögliche Erklärung dieser Effekte liegt möglicherweise in der Wechselwirkung mit zellulären Hyaluronidase-Rezeptoren. CD44 und RHAMM interagieren mit p185HER2/neu, MAP-Kinasen und c-src-Tyrosinkinasen. Sie sind direkt über den Ras-Kinase-Signalweg mit der Migration und der Wachstumsregulation von Zellen verknüpft (Turley *et al.* 2002; Marhaba und Zöller 2004). Es überrascht aufgrund dieser Effekte nicht, dass viele Tumorzellen verstärkt Hyaluronidasen produzieren. Dazu gehören u.a. Darm-, Prostata- und Blasenkrebszellen sowie Melanom- und metastasierende Mammakarzinomzellen (Lokeshwar *et al.* 1999; Novak *et al.* 1999; Patel *et al.* 2002; Bertrand *et al.* 2005; Kovar *et al.* 2006).

Die ECM stellt eine natürliche Barriere für Neovaskularisation und die Wanderung von Zellen dar. Um die Vorraussetzung für Vaskularisierung und Metastasierung zu schaffen, muss diese durch sezernierte Hyaluronidase und Metalloproteasen abgebaut werden (Liu et al. 1996). Es wird davon ausgegangen, dass in der Frühphase der Tumorentwicklung zunächst langkettige HA dem Wachstum förderlich ist, indem sie den Tumor gegenüber dem Immunsystem abschirmt, durch Quellung Platz für das Wachstum schafft und eine gute Versorgung mit Nährstoffen durch Diffusion zulässt. Durch weiteres Wachstum des Tumors wird die Nährstoffversorgung aber mit der Zeit zunehmend knapper. Nun wirken die kürzeren HA-Fragmente onkogen, die beim Abbau der ECM durch Hyaluronidasen anfallen. Wie bereits dargelegt, induzieren sie in der Folge Angiogenese und können Apoptose unterdrücken (Montesano et al. 1996). Dieser Funktionswechsel wird als sog. "angiogenetic switch" bezeichnet (West und Chen 2002). Hinzu kommt, dass viele Wachstumsfaktoren von Proteoglykanen gebunden werden (Ruoslahti und Yamaguchi 1991). Durch ihre lokale Freisetzung in größerer Menge beim Abbau der HA wird das Zellwachstum zusätzlich angeregt (Liu et al. 1996). Sowohl hHyal-1 als auch hPH-20 stellen daher Tumormarker dar, die mit der Metastasierungstendenz und Aggressivität des Tumors korrelieren (Novak et al. 1999; Godin et al. 2000; Lokeshwar et al. 2001; Lokeshwar et al. 2005; Aboughalia 2006; Simpson und Lokeshwar 2008). Hemmstoffe der Hyaluronidasen können die Metastasierung und das Voranschreiten einer Tumorerkrankung reduzieren oder ganz hemmen. Einen Hinweis, der diese These untermauert, brachten u.a. Lokeshwar et al. im Jahr 2006. Sie zeigten, dass eine verstärkte Expression von HYAL1-v1, einer Splice-Variante von HYAL1, zum Zellzyklus-Arrest und zur Apoptose von Tumorzellen führte (Lokeshwar et al. 2006). HYAL1-v1 kodiert für eine verkürzte hHyal-1, die keine Hyaluronidase-Aktivität aufweist, aber in der

Lage ist, mit hHyal-1 katalytisch inaktive Komplexe zu bilden. Hyaluronidase-Inhibitoren stellen somit eine Gruppe neuartiger Zytostatika dar, die auf einer anderen Ebene angreifen als alle anderen bisher eingesetzten Wirkstoffe.

Neben Hyaluronidase-Inhibitoren bieten auch Hyaluronidase-Aktivatoren, die die Aktivität von Hyaluronidasen anheben sollen, einen interessanten Ansatzpunkt. Bereits früher kam Hyaluronidase selbst als Arzneistoff bei Tumorerkrankungen zum Einsatz, indem es den Zytostatika des jeweiligen Behandlungsregimes beigemischt wurde. Untersuchungen zeigten, dass auf diese Weise das Ansprechen des Tumors auf die Therapie verbessert oder sogar eine Zytostatikaresistenz durchbrochen werden konnte (Spruss *et al.* 1995; Baumgartner *et al.* 1998). Eine Anhebung der Hyaluronidaseaktivität weit über die bereits erhöhte Aktivität in Tumorzellen führte zudem zu einem Zellzyklusarrest und zu einer Hemmung der weiteren Tumorentwicklung (Lin und Stern 2001). Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass sich wie zuvor erwähnt, viele Tumorzellen insbesondere in frühen Stadien mit einer Hülle aus HA umgeben. Sie können auf diese Weise wieder zugänglich für Zytostatika und Immunzellen werden. Je nach Tumorentwicklungsstand wäre somit eine Behandlung mit Inhibitoren oder Aktivatoren von Hyaluronidasen wünschenswert.

4.3.2 Hyaluronidase-Inhibitoren bei Arthritis

Erhöhte Hyaluronidase-Aktivität wurde nicht nur in Tumorzellen, sondern auch bei Arthritis nachgewiesen. Die Folge ist ein Abbau der HA-haltigen Gelenkflüssigkeit (Yoshida *et al.* 2004) und die Bildung kleinerer, inflammatorisch wirkender HA-Fragmente (Noble *et al.* 1996). Bisher gelingt es auch mit dem Einsatz von NSAR, den klassischen antirheumatischen Basistherapeutika sowie Biologicals nicht immer, ein weiteres Voranschreiten der Erkrankung zu verhindern. Auf diesem Gebiet könnten Hyaluronidase-Inhibitoren eine neue Therapieoption darstellen.

4.3.3 Weitere Anwendungsmöglichkeiten für Hyaluronidase-Inhibitoren und -Aktivatoren

Wie zuvor bereits erwähnt besitzt die Eizelle eine Hülle aus HA. Durch diese Schicht muss sich ein Spermium mit Hilfe seiner Hyaluronidase PH-20 arbeiten. Hyaluronidase-Inhibitoren gegen hPH-20 könnten dies verhindern und würden damit neuartige Kontrazeptiva darstellen. Besonders günstig wäre eine Kombination von inhibitorischen und zudem viruziden und bakteriziden Eigenschaften (Anderson *et al.* 2000). Kürzlich wurde auch ein Zusammenhang zwischen entzündlichen Atemwegserkrankungen und

verstärkter hHyal-1-, hHyal-2- und hHyal-3-Expression in Endothelzellen des Bronchialtraktes nachgewiesen (Monzón *et al.* 2008). Dies deutet darauf hin, dass Hyaluronidase-Inhibitoren möglicherweise auch Erkrankungen wie Asthma positiv beeinflussen könnten. Nicht zuletzt wäre auch ein Einsatz von Hyaluronidase-Inhibitoren in Cremes und anderen Hautpflegeprodukten denkbar. Da der Abbau von HA in der Haut mit zunehmendem Lebensalter zu sichtbaren Alterungserscheinungen wie Faltenbildung und Feuchtigkeitsverlust führt, können Inhibitoren der hHyal-1 und hHyal-2 im Sinne eines "anti-aging" zum Einsatz kommen.

Ein anderes Anwendungsgebiet stellt die Behandlung der Mucopolysaccharidose IX dar. Bei Mucopolysaccharidosen kommt es zu einem Mangel an Aktivität Mucopolysaccharidabbauender Enzyme. Beim Typ IX dieser Erkrankung sind Hyaluronidasen betroffen. Dabei ist die Aminosäure Glu268 gegen Lysin ausgetauscht (Triggs-Raine *et al.* 1999). Glu268 ist bei allen humanen Hyaluronidasen konserviert und spielt durch Ausbildung einer Salzbrücken zu Arg271 und einer Wasserstoffbrücke zu Asn229 eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des Proteins (Marković-Housley *et al.* 2000). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Hyal-1-defiziente Mäuse dieselben Symptome der Mucopolysaccharidose IX aufweisen wie betroffene Menschen (Martin *et al.* 2008). Zu den Symptomen zählen u.a. die Ausbildung von Osteoporose und Skelettdeformationen. Aktivatoren von hHyal-1 könnten die verbleibende Restaktivität der mutierten hHyal-1 erhöhen und zu einer Linderung von Erkrankungssymptomen führen.

4.4 Messung von Hyaluronidase-Aktivität

4.4.1 Physikochemische Methoden

Physikochemische Aktivitätstests Hvaluronidasen von basieren auf einer Viskositätsabnahme von Lösungen langkettiger HA durch Enzymaktivität (Madinaveitia und Quibell 1940; Meyer et al. 1941) oder auf Trübungsmessungen nach Ausfällen der HA mittels Cetyltrimethylammoniumbromid, Cetylpyridiniumchlorid oder Rinderserumalbumin (Schmith und Faber 1950; Di Ferrante 1956; Bohn et al. 1969). Die bei den viskosimetrischen Messungen erhaltenen Enzymaktivitäten variieren jedoch stark in Abhängigkeit der Kettenlänge der eingesetzten HA und ihrer Viskosität zu Beginn der Messung (Hadidian und Pirie 1948; Alburn und Whitley 1951). Um dieses Problem zu umgehen, wurde ab 1957 BTH lyophylisiert, in Tabletten gepresst und als internationaler Hyaluronidase-Standard eingeführt (Humphrey 1957). Basierend auf diesem Standard wurde die International Einheit (IU) der Enzymaktivität der Hyaluronidase definiert. Eine IU ist demnach die Aktivität von 0,1 mg des Hyaluronidase-Standards. Diese Definition bildet ebenfalls die Grundlage der Standardisierung der Hyaluronidase-Aktivität nach dem Europäischen Arzneibuch. Dabei wird der Grad an Viskositätserniedrigung durch die zu testende Hyaluronidase-Zubereitung mit dem internationalen Hyaluronidase-Standard unter definierten Bedingungen verglichen (Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2008). Die turbidimetrischen Versuchsansätze lassen sich auch in Petrischalen durchführen. Bei der Methode nach Smith (1968) wurden Agar und HA gemischt und wie normaler Agar in Petrischalen ausgegossen, um endogene Hyaluronidase-Aktivität von Bakterienstämmen sichtbar zu machen. Hyaluronidase baute den HA-Anteil des Mediums ab und entsprechende Bereiche wurden nach Präzipitation mittels Essigsäure als durchsichtige Flecken im trüben Hintergrund erkennbar. Für exakte quantitative Untersuchungen ist die Methode jedoch zu ungenau.

4.4.2 Radiochemische Methoden

Coulson und Girkin entwickelten 1975 einen radiochemischen Test, bei dem HA durch Deacylierung und anschließender Reacylierung mittels [³H]Acetanhydrid radioaktiv markiert wurde. Nach der Umsetzung mittels Hyaluronidasen wurde die verbleibende, langkettige HA mit Cetylpyridiniumchlorid präzipitiert. Die radioaktiven, kürzeren HA-Fragmente, die beim Abbau entstanden waren, wurden nicht präzipitiert. Durch Differenzmessung mit unverdauter HA konnte die Hyaluronidase-Aktivität ermittelt werden. An Stelle der Präzipitation kann die Mischung auch mit Hilfe einer Acrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Autoradiographie untersucht werden (Hotez *et al.* 1992). Aufgrund der umfangreichen Probenvorbereitung sowie der komplexen Handhabung radioaktiver Materialien eignen sich radiochemische Methoden jedoch kaum als schnelle und einfache Verfahren. Es wundert daher nicht, dass sich diese Methoden bisher nicht für die Untersuchung von potentiellen Inhibitoren durchgesetzt haben.

4.4.3 Fluorimetrische Methoden

Nakamura *et al.* (1990) beschrieben eine Methode zur Messung von Rinderhyaluronidase nach Fluoreszenzmarkierung von HA mittels 2-Aminopyridin. Während der Inkubation entstanden lösliche, kurzkettige HA-Fragmente, die auch nach abschließender Zentrifugation im Überstand verblieben. Aus der Fluoreszenz des Überstandes konnte somit auf die Aktivität der BTH geschlossen werden. Die Methode eignete sich insbesondere zur Vermessung schlecht aufgereinigter Hyaluronidase-Extrakte, wurde jedoch nie zur Untersuchung von Hyaluronidase-Inhibitoren eingesetzt.

Murai und Kawashima (2008) koppelten HA mit dem Fluoreszenz-Farbstoff "Alexa Fluor 488 Hydrazid" und verfolgten den Abbau mittels Messung der Fluoreszenz-Polarisation. Da bisher nur wenige Mikrotiterplattenreader über eine dementsprechende Messfunktion verfügen, lässt sich die Methode jedoch nicht ohne Weiteres als Hochdurchsatzverfahren einsetzen.

4.4.4 Immunologische Methoden

Zur immunologischen Bestimmung von Hyaluronidase-Aktivität kann Hyaluronectin eingesetzt werden, ein HA-bindendes Proteoglykan. Delpech *et al.* (1987) beschrieben ein ELISA-Verfahren, in dem Mikrotiterplatten mit HA beschichtet und anschließend mit Hyaluronidase inkubiert wurden. Nach einem Waschschritt wurde die HA mit Hyaluronectin behandelt. Nach einem erneuten Waschschritt wurden Antikörper zugefügt, die mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt waren. Nach Zugabe des Substrates wurde schließlich die Absorption bei 405 nm vermessen.

Stern und Stern (1992) setzten statt Hyaluronectin biotinyliertes HA-Bindeprotein (HABP) ein und maßen die Hyaluronidase-Aktivität nach einer Avidin-Biotin-Reaktion. Diese Methode wurde später auch für den Einsatz in Mikrotiterplatten beschrieben (Frost und Stern 1997). Eine übersichtliche Zusammenfassung weiterer ELISA-Verfahren findet sich bei Lindqvist *et al.* (1992). Zwar wurden immunologische Methoden bereits für die Testung von potentiellen Hyaluronidase-Inhibitoren eingesetzt (Stern und Stern 1992), jedoch bisher nicht als Routineverfahren verwendet.

4.4.5 Zymographische Methoden

Zymographische Methoden beruhen auf dem Aktivitätsnachweis im Anschluss an eine elektrophoretische Auftrennung. In der Literatur wurden als Träger Agar (Abramson und Friedman 1967), Celluloseacetat (Herd *et al.* 1974) oder Acrylamid (Mio und Stern 2002) beschrieben. Bei der Methode nach Abramson et al. wurde nach der Trennung eine Membran auf das Gel aufgebracht und bei 37 °C inkubiert (Herd *et al.* 1974). Die Membran wurde dann mit Alcian Blau versetzt. Nicht abgebaute HA wurde dabei blau angefärbt, helle Bereiche zeigten Hyaluronidase-Aktivität an. Fischer-Szafarz (1984) goss HA in Polyacrylamid-Gele ein und färbte diese im Anschluss mit dem Farbstoff "stains-all" an. Durch dieses Verfahren wurden nicht abgebaute HA blau und kürzere Fragmente pink angefärbt (Fiszer-Szafarz und De Maeyer 1989). Für eine Verwendung als Verfahren zur quantitativen Testung von Hyaluronidase-Inhibitoren ist die Methode jedoch zu ungenau.

4.4.6 Photometrische Methoden

Unterschiedliche Wechselwirkungen von hoch- und niedermolekularer HA mit Farbstoffen bilden die Grundlage für photometrische Messmethoden. Benchetrit et al. (1977) entwickelten eine sensitive Methode für die Aktivitätsbestimmung gereinigter Hyaluronidase mit dem Farbstoff "stains-all". Die Messung beruht auf einer und Komplexbildung zwischen hochmolekularer HA "stains-all" mit einem Absorptionsmaximum von 650 nm. Die Methode wurde später von Homer et al. (1993) zur Aktivitätsmessung in Mikrotiterplatten weiterentwickelt. Sie untersuchten damit die Aktivität von BTH sowie von Chondroitinsulfat-Depolymerase und Hyaluronidase aus Streptokokken (Homer et al. 1993a; Homer et al. 1993b). Turner und Cowman (1985) verglichen im Anschluss an eine SDS-Gelelektrophorese die Bindungskapazität verschiedener HA-Fragmente entsprechend ihrer Länge mit den Farbstoffen Alcian Blau, Acridin Orange und Azur A. Eine erste Anfärbung und guantitative Auswertung von HA in SDS-Gelen mittels "stains-all" gelang Bader et al. (1972). Volpi und Maccari (2002) färbten SDS-Gele nacheinander mit Alcian Blau und "stains-all" an, um die Empfindlichkeit der Färbung zu erhöhen. Hong Gee und Cowman (1984) gelang eine Auftrennung von HA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese, die sie anschließend erfolgreich mit "stains-all" anfärbten. Eine quantitative Testung von Inhibitoren mittels eines "stains-all" basierten Testverfahrens ist bisher nicht durchgeführt worden. Für eine solche Anwendung wäre der Einsatz von "stains-all" in einem Mikrotiterplatten-Testverfahren am aussichtsreichsten.

Ein anderer Ansatz verfolgt den Konzentrationsanstieg der beim Abbau von HA entstehenden reduzierenden Zucker (Meyer *et al.* 1941; Linker 1966). Ein reduzierender Zucker besitzt eine freie Aldehydgruppe, deren Oxidation verantwortlich für die reduzierende Eigenschaften dieser Zucker ist. Im Fall von HA ist dieser Zucker das N-Acetylglucosamin, das sich am Ende jedes HA-Fragmentes befindet. Meyer *et al.* (1941) und Linker (1966) nutzten die Reduktion von Ferricyanid zu Ferrocyanid um die Konzentration zu messen. Diese Methode wurde bereits durch Miller und van Slyke (1936) zur Blutzuckerbestimmung publiziert. Reissig *et al.* (1955) machten N-Acetylglucosamin durch Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB, Ehrlichs-Reagenz) sichtbar. Diese inzwischen weit verbreitete Methode wurde mehrfach weiterentwickelt und u.a. zur Messung von Hyaluronatlyase aus *Streptococcus dysgalactiae*, *Propionibacterium acnes* oder zur Quantifizierung von BTH eingesetzt (Ingham *et al.* 1979; Hamai *et al.* 1989; Muckenschnabel *et al.* 1998).

4.4.7 Kapillarelektrophoretische und chromatographische Methoden

Weitere Verfahren zur Trennung von HA-Fragmenten nutzen HPLC und Kapillarzonenelektrophorese. Letztere nutzt die negative Ladung der Zuckerketten, um unterschiedlich lange HA-Fragmente im elektrischen Feld aufzutrennen (Grimshaw *et al.* 1994; Pattanaargson und Roboz 1996; Toida *et al.* 1999; Suzuki *et al.* 2001).

Bei der Trennung mittels HPLC kommen sowohl Normalphasen- wie auch Umkehrphasen-Säulenmaterialien zum Einsatz. Cramer und Bailey (1991) nutzten Ionenpaarchromatographie mittels einer Umkehrphase und detektierten die HA-Fragmente nach Derivatisierung mit 2-Cyanoacetamid durch UV-Detektion. Volpi (2003; 2007) erreichte eine Auftrennung sowohl durch den Einsatz einer C18- als auch einer starken Anionenaustauscher-Säule (SAX-Säule). Alle Fragmente zwischen 2 und 15 Disaccharideinheiten konnten innerhalb von 20 Minuten aufgetrennt werden. Auch Vercruysse et al. (1999) konnten HA-Fragmente bis zu einer Größe von 9 Disaccharid-Einheiten innerhalb von 20 Minuten mittels SAX-Säule trennen. Durch den Einsatz einer Anionenaustauschersäule gelangen Tawada et al. (2002) schwächeren die Basislinientrennung von Fragmenten mit mehr als 20 Disacchariden in ca. 30 Minuten. Suzuki et al. (2001) nutzten zur Auftrennung dagegen Normalphasen-HPLC mit einer Amide-80-Säule. Innerhalb von 100 Minuten wurden alle Fragmente zwischen 2 und 16 Disaccharid-Einheiten bis zur Basislinie getrennt. Eine umfangreiche Übersicht über kapillarelektrophoretische und chromatographische Trennverfahren lieferten Malavaki et al. (2007).

Nur Toida *et al.* (1999) und Suzuki *et al.* (2001) nutzen kapillarelektrophoretische und chromatographische Trennungen der HA-Fragmente für die Durchführung eines Testverfahrens zur Bestimmung von Hyaluronidase-Inhibitoren. Zu diesem Zweck wurden die Fragmente zunächst mit 2-Cyanoacetamid derivatisiert und anschließend fluorimetrisch detektiert. Das Verfahren konnte sich jedoch bis heute nicht als Routineverfahren zur Bestimmung von Hyaluronidase-Inhibitoren durchsetzen.

4.5 Inhibition und Aktivierung von Hyaluronidasen

4.5.1 Hyaluronidase-Inhibitoren

Eine sehr große Anzahl verschiedener Substanzklassen wurde in den letzten Jahrzehnten auf Hyaluronidase-inhibierende Vertreter untersucht. Ein direkter Vergleich aller beschriebenen Inhibitoren untereinander ist jedoch schwierig bis unmöglich, da sich in vielen Fällen die Testsysteme deutlich unterscheiden. Meyer und Rapport (1951) identifizierten als erste verschiedene Metallsalze als Inhibitoren von BTH, berechneten jedoch keine IC_{50} -Werte. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu HA wurden verschiedene Glykosaminoglykane wie Heparin, Heparansulfat, sulfatiertes HA oder Dextransulfat als Hyaluronidase-Hemmer charakterisiert (Wolf *et al.* 1984; Asada *et al.* 1997; Toida *et al.* 1999; Suzuki *et al.* 2001; Mio und Stern 2002; Udabage *et al.* 2004). Die sulfatierten Glykosaminoglykane waren dabei deutlich stärkere Inhibitoren als ihre unsulfatierten Analoga. Sie erreichten IC_{50} -Werte gegen hPH-20 von 0,8 μ M für vollständig sulfatierte, langkettige Hyaluronsäure, 1,1 μ M für Heparinsulfat, 1,3 μ M für Heparansulfat und Dermatansulfat, 1,4 für Chondoitinsulfat (Toida *et al.* 1999) sowie 8,5 μ M für sulfatierte Hyaluronsäure mit einer Kettenlänge von 18 Zuckereinheiten (Suzuki *et al.* 2001). Für eine Anwendung als Arzneistoffe kommen diese Verbindungen allerdings aufgrund hoher Nebenwirkungen und schlechter Bioverfügbarkeit kaum in Frage.

Als weitere Inhibitoren von BTH oder bakteriellen Hyaluronatlyasen wurden u.a. Triterpene und Flavonoide (Hertel *et al.* 2006), darunter Apigenin und Kämpferol (Kakegawa *et al.* 1988; Kuppusamy *et al.* 1990; Kuppusamy und Das 1991; Kakegawa *et al.* 1992; Pessini *et al.* 2001; Kim *et al.* 2005), Saponine und Sapogenine (Facino *et al.* 1995), außerdem Dinatriumchromoglicinsäure und Tranilast (Kakegawa *et al.* 1985a; Kakegawa *et al.* 1992), Glycyrrhizin (Furuya *et al.* 1997), Indometacin (Szary *et al.* 1975) oder Phenylbutazon (Joyce und Zaneveld 1985) untersucht. Allen genannten Verbindungen ist gemein, dass sie nur sehr schwache Inhibitoren darstellen und erst im millimolaren Bereich wirksam sind. Eine starke Hemmung im mikromolaren Bereich wurde einzig DNCG mit einem IC₅₀-Wert von 29 μ M (Kakegawa *et al.* 1992) sowie dem Saponin Glycyrrhizin aus dem Süßholz (*Glycyrrhiza glabra*) mit einem IC₅₀-Wert von 4,5 – 9 μ M gegen BTH zugeschrieben (Furuya *et al.* 1997). Andere Autoren kamen jedoch zu abweichenden Ergebnissen und konnten nur eine Hemmwirkung auf bakterielle Hyaluronatlyasen nachweisen (Ozegowski *et al.* 2004).

Im Hinblick auf die Entwicklung eines kontrazeptiv sowie viruzid und bakerizid wirkenden hPH-20-Inhibitors wurde Natrium-Polystyren-4-sulfonat (N-PSS) untersucht (Anderson *et al.* 2000). Die Ergebnisse zeigten, dass N-PSS PH-20 vom Schaf irreversibel hemmen kann und erreichte einen IC₅₀-Wert von ca. 11 μ M. N-PSS erwies sich zudem als bakterizid und viruzid gegen verschiedene pathogene Keime, einschließlich HSV-1, HIV-1 und *Neisseria gonorrhoeae*. Isoyama *et al.* (2006) untersuchten die Wirkung verschieden langer N-PSS-Polymere auch auf hHyal-1 und fanden IC₅₀-Werte von unter 10 μ M ab einer Kettenlänge von 1400 Einheiten. Aufgrund fehlender Bioverfügbarkeit kommt dieses Polymer ebenfalls für eine Anwendung als oral verfügbarer Arzneistoff nicht in Frage.

Durch rationales Design identifizierten Rigden *et al.* (2006) und Botzki *et al.* (2005) Benzimidazole, Benzoxazole und Indole als Inhibitoren von Hyaluronatlyasen aus Streptokokken (Tabelle 3). Mit einem IC₅₀-Wert von 11 μ M war 1-Decyl-2-(4sulfamoyloxyphenyl)-1H-indol-6-yl-sulfamat (Verbindung II) der stärkste Inhibitor von *Streptococcus agalactiae* Hyaluronatlyase. Ein ähnlich starker Inhibitor war N-(3phenylpropionyl)-benzoxazole-2-thion (Verbindung IV) mit einem IC₅₀-Wert von 15 μ M. Gegen BTH waren alle Substanzen jedoch unwirksam oder wurden nicht getestet.

R₁ \dot{R}_2 Nr. Α R₁ R₂ R₃ IC₅₀ [µM] -N-COCH₃ =S -COCH₃ -H 160 L Ш -CH₂--Ph (OSO₂NH₂) -C₁₀H₂₁ -OSO₂NH₂ 11 Ш -0-=S -COCH₂Ph -H 260 IV -0-=S -CO(CH₂)₂Ph -H 15 ۷ -0-=S -CO(CH₂)₃Ph -H 110

Tabelle 3: Bekannte Benzimidazol-, Benzoxazol- und Indol-Derivate als Inhibitoren der Hyaluronatlyase von *Streptococcus agalactiae* bei pH 5 (Botzki *et al.* 2005).

Auch 6-O-Acyl-Derivate der Ascorbinsäure wurden auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber BTH, bakteriellen Hyaluronatlyasen und hHyal-1 untersucht (Li *et al.* 2001; Botzki *et al.* 2004; Rigden *et al.* 2006; Spickenreither *et al.* 2006). Ascorbinsäurestearat erreichte dabei einen IC₅₀-Wert bei pH 5 von 0,9 μ M gegen Hyaluronatlyase aus *Streptococcus agalactiae* und 39 μ M gegen BTH, Ascorbinsäurepalmitat (Vcpal) entsprechend 4,2 μ M und 57 μ M (Botzki *et al.* 2004; Spickenreither *et al.* 2006). Gegen hHyal-1 erreichte das 6-O-Tridecanoat-Derivat einen IC₅₀-Wert von 50 μ M und Ascorbinsäurepalmitat einen Wert von größer 50 μ M (Hofinger *et al.* 2007b).

4.5.2 Bekannte Aktivatoren von Hyaluronidasen

Die bisher in der Literatur beschriebene Aktivatoren von Hyaluronidasen lassen sich drei verschiedenen Gruppen zuordnen: den Metallsalzen, den Proteinen und den sonstigen Verbindungen.

Den Einfluss von Salzen auf die Enzymaktivität von Hyaluronidasen haben zahlreiche Autoren untersucht (Alburn und Whitley 1951; Brunish und Mozersky 1958; Kakegawa et al. 1985a). Die am häufigsten erwähnte Substanz ist NaCl, dem alle Autoren eine starke Aktivierungspotenz zuschreiben. Der optimale Konzentrationsbereich für eine maximale Aktivierung wird von den Autoren unterschiedlich angegeben. Alburn und Whitley stellten eine pH-Abhängigkeit der optimalen Konzentration und der Höhe der Aktivierung durch NaCl bezogen auf eine NaCl-freie Probe fest. Bei pH 7,1 lag die optimale Konzentration bei ca. 0,06 M und führte zu einer sechsfach gesteigerten Aktivität, bei pH 6,2 bei 0,09 M und einer fast achtfachen Aktivität. Bei niedrigeren pH-Werten gab es einen weiten optimalen Bereich von 0,07 M bis 0,18 M bei einer Steigerung der Aktivität um das Fünffache (pH 5,2) bzw. von 0,01 M bis über 0,24 M bei einer Steigerung um das Dreifache (pH 4,5). Die Autoren fassten zusammen, dass NaCl bei pH-Werten unter 4,5 zunehmend die Hyaluronidase-Aktivität erhöht, aber in höheren Konzentrationen auch in stärkerem Maße als Inhibitor wirkt. Brunish und Mozersky (1958) untersuchten neben NaCl auch Natriumacetat als Aktivator und empfahlen eine Konzentration von 0,05 M bzw. 0,3 M im Puffer für optimale Reaktionsbedingungen der Hyaluronatlyase aus Escherichia freundii. Für Ca- und Mg-Salze konnten sie kaum Einfluss auf Hyaluronatlyase oder BTH nachweisen. Verbindungen höherwertiger Kationen wirkten als schwache (Ni-, Zn-, Co-, Mn-Salze) oder starke Inhibitoren (Cu-, Pb-Salze) auf beide Enzyme (Brunish und Mozersky 1958). Kakegawa et al. (1985a) verglichen die Salze monovalenter Kationen (NaCl, KCl) mit denen divalenter Kationen (MgCl₂, CaCl₂). Während NaCl und KCl ab einer Konzentration von 0,01 M zu keiner weiteren Aktivierung oder Inhibition der Enzymaktivität führten, zeigte CaCl₂ ab einer Konzentration von 0.05 M und mgCl₂ sogar schon beginnend bei 0,02 M eine deutliche Inhibition.

Gold (1982) vermutete als Ursache der aktivierenden Wirkung von NaCl die Zunahme der lonenstärke des Puffers und dadurch eine Abnahme von intermolekularen Wechselwirkungen der HA-Ketten. Die inhibitorische Wirkung erklärte er durch eine Affinität des NaCl zum aktiven Zentrum der Hyaluronidase, die zu einer Hemmung der Enzymaktivität führen soll.

Eine zweite Gruppe der aktivierenden Substanzen stellen Proteine dar. Hyaluronidaseaktivierende Effekte wurden u.a. für Albumin, Protamin, Spermin, Hämoglobin, Transferrin oder beta-Globuline gezeigt (Gacesa *et al.* 1981; Gold 1982; Kakegawa *et al.* 1985b; Mandal und Bhattacharyya 1995; Maingonnat *et al.* 1999). Die Effekte von BSA wurden durch Maingonnat *et al.* (1999) ausführlich untersucht. Sie stellten eine optimale Konzentration im Bereich zwischen 0,02 und 0,2 g/I BSA fest und erreichten bei 0,1 g/I eine vierfache Aktivierung im Vergleich zu einem Ansatz ohne BSA. Wurde die Konzentration an BSA jedoch weiter erhöht, kam es zu einem erneuten Verlust an Aktivität. Die Autoren spekulierten, dass bei niedrigen Konzentrationen an BSA eine Wechselwirkung mit HA stattfindet, die zu einer Öffnung der verschlungenen HA-Ketten und damit zu einer besseren Zugänglichkeit für Hyaluronidasen führt. Bei hohen Konzentrationen soll umgekehrt die zunehmende Bindung an HA wiederum zu einer Verschlechterung der Zugänglichkeit führen (Maingonnat *et al.* 1999). Andere Autoren vermuteten einen abweichenden Mechanismus: So soll insbesondere bei hohen HA-Konzentrationen die Hyaluronidase eine unspezifische Bindung mit HA eingehen und z.T. inaktiv vorliegen. BSA könnte durch Bindung an HA Hyaluronidase aus seiner Bindung verdrängen und so befreien. Damit läge mehr aktive Hyaluronidase vor und die Enzymaktivität stiege insgesamt an (Deschrevel *et al.* 2008; Lenormand *et al.* 2008).

Neben Salzen und Proteinen existieren Verbindungen, die keiner gemeinsamen Substanzgruppe zugeordnet werden können. Dazu zählen u.a. zytostatische Platinkomplexe, der Anionenaustauscher Diethylaminoethyl-Cellulose, Histamin, 8-Methoxypsoralen-Polyamine sowie "compound 48/80", eine oligomere Mischung von Kondensationsprodukten verschiedenen der Reaktion N-Methyl-pvon methoxyphenethylamin und Formaldehyd (Kakegawa et al. 1985a; Kakegawa et al. 1987; Shigehara et al. 1991; Mandal und Bhattacharyya 1995). Auch Tranilast, ein in Japan häufig eingesetzter Mastzellstabilisator, wirkte in Anwesenheit von CaCl₂ als Aktivator. Bei Abwesenheit von CaCl₂ war er jedoch ein Inhibitor (Kakegawa et al. 1985a). Da Histamin Hyaluronidasen aktivieren konnte, antiallergische Substanzen jedoch inhibitorisch wirksam waren, vermuteten Kakegawa et al. eine Beteiligung von Hyaluronidasen an entzündlichen und allergischen Prozessen (Kakegawa et al. 1985b). Schlüssige Mechanismen, die eine Hyaluronidase-Aktivierung durch diese heterogene Gruppe an Substanzen erklären könnten, sind bis heute nicht bekannt.

4.6 Rekombinante Expression

4.6.1 Expression von Hyaluronidasen

Ein gängiges Verfahren zur Gewinnung von Proteinen zu Produktionszwecken oder für analytische Untersuchungen ist die rekombinante Expression. Dabei werden Zielzellen, z.B. *E. coli*, Hefen oder Säugetierzellen, durch Einschleusen der cDNA des gewünschten Proteins in einem Vektor mit passendem Promotor zur Herstellung des Proteins angeregt. *E. coli* ist für diesen Zweck besonders geeignet, da er sich sehr schnell vermehrt und eine hohe Proteinbildungsrate besitzt. Ein Nachteil sind jedoch seine begrenzten Möglichkeiten

zur posttranslationalen Modifikation, z.B. mangelnde Glykosylierung. Fehlende oder falsche Ausbildungen von Disulfidbrücken können zudem zu falsch gefalteten Sekundärstrukturen führen. Falsch gefaltete Proteine sind i.d.R. nicht wasserlöslich und fallen im Cytosol der Zelle als sog. "inclusion bodies" (IB) aus. Das Protein muss daher aus den Zellen nach deren Aufschluss aufgereinigt werden. Dazu wird es zunächst in einem Hochsalzpuffer entfaltet und anschließend renaturiert (Misawa und Kumagai 1999). Dabei nimmt es häufig seine native Konformation ein. In vielen Fällen gelingt dies jedoch nur teilweise und die optimalen Bedingungen müssen empirisch ermittelt werden. Zudem ist der gesamte Prozess mit einem nicht zu vernachlässigen Verlust an Produkt behaftet. So berichteten Soldatova et al. (1998), dass in E. coli rekombinant exprimierte Bienen-Hyaluronidase nach Aufreinigung nur 20-30% ihrer nativen Aktivität erreichte. Die Bindung von spezifischen Antikörpern war ebenfalls auf 20-30% reduziert, was auf eine falsche Faltung des Enzyms hindeutete. Es gelang ihnen nicht, Bienen-Hyaluronidase in nativer Form zu isolieren. Sie wählten daher ein eukaryontes Expressionssystem basierend auf Insektenzellen von Spodoptera frugiperda. Die nun exprimierte Bienen-Hyaluronidase erreichte eine zum nativen Enzym gleichwertige Aktivität und Antikörper-Bindung (Soldatova et al. 1998). Aufgrund der komplizierteren Transfektion und dem langsameren Wachstum der eukaryotischen Zellen verlängerte sich jedoch die Zeit bis zum Nachweis der Hyaluronidase auf mehrere Tage, während in E. coli die Hyaluronidase bereits eine Stunde nach Induktion der Expression in detektierbarer Menge gebildet wurde.

Bookbinder *et al.* (2006) exprimierten hPH-20 in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) und isolierten das Enzym mit einer Reinheit von über 90%. Zu diesem Zweck mussten sie allerdings eine Serie von insgesamt vier aufeinanderfolgenden Chromatographieschritten durchführen, die den Aufwand der Enzymisolierung erheblich erhöhten. Eine Testung von Inhibitoren erfolgte nicht.

Auch Hofinger *et al.* (2007) verglichen die Expression einer Hyaluronidase, hHyal-1, durch *E. coli* mit der Expression durch Insektenzellen. Sie wählten dazu *Drosophila melanogaster* Schneider DS2-Zellen und stellten eine um den Faktor 78 höhere spezifische Aktivität im Vergleich zur hHyal-1 aus *E. coli* fest. Auch in diesem Fall führte der Wechsel zu eukaryotischen Zellen zu einer deutlich langsameren Bildung des Proteins. Zudem wurde nur eine sehr geringe Menge des Proteins gewonnen, so dass lediglich einige wenige Aktivitäts- und Inhibitor-Untersuchungen durchgeführt werden konnten (persönliche Mitteilung).

Die Verwendung von eukaryonten Zelllinien stellt daher nicht nur deutlich höhere technologische Anforderungen, sondern führt aufgrund einer niedrigeren

Reproduktionsgeschwindigkeit und Proteinsyntheserate als bei prokaryotischen Zellen zu einer deutlich verringerten Proteinausbeute. Ein höherer Anspruch an das Nährmedium ist ein weiterer Nachteil bei der Verwendung eukaryotischer Zellen. Eine ausreichende Menge an Hyaluronidase ist jedoch nötig, um Hochdurchsatzverfahren zur Testung von Hyaluronidase-Inhibitoren und -Aktivatoren zu ermöglichen.

Durch die Verwendung des Autodisplay-Systems könnten diese Schwierigkeiten überwunden werden. Es ermöglicht die Expression von Enzymen in aktiver Form auf der Oberfläche von *E. coli* und umgeht die Ausbildung von IB. Die Enzyme werden in Form ganzer Zellen für Aktivitätsmessungen eingesetzt. Auf diese Weise kann die hohe Syntheserate von *E. coli* ohne eine verlustbehaftete Aufreinigung ausgenutzt werden.

4.6.2 Das Autodisplay-System

Das Autodisplay-System beruht auf dem natürlichen Autotransporter-Sekretionsmechanismus Gram-negativer Bakterien (Jose und Meyer 2007). Der Aufbau eines Autotransportergens sowie der Transport des zugehörigen Proteins auf die Oberfläche von E. coli sind schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Über die innere Membran gelangt das Protein mit Hilfe des Sec-Mechanismus. Während dieses Transports in den periplasmatischen Raum wird das Signalpeptid abgespalten. Im weiteren Verlauf (Abbildung 5, B) lagert sich die β-Domäne in die äußere Membran ein und bildet dabei eine Pore mit fassartiger Struktur bestehend aus β-Faltblättern (Meyer et al. 1987; Henderson et al. 1998). An das letzte β-Faltblatt schließt sich der Linker an, der eine Haarnadelschlaufe ausbildet und sich in das Zentrum des β-Fasses einlagert. Erst wenn dieser Teil anschließend auf die extrazelluläre Seite gelangt, beginnt die Faltung des Passagierproteins. Durch die zunehmende Faltung wird der Passagier weiter durch die Pore auf die Außenseite der äußeren Membran gezogen. Die freiwerdende Energie treibt den Transportprozess voran, bis das Passagier-Protein auf der extrazellulären Seite gefaltet vorliegt (Kajava und Steven 2006). Die Größe des Barrels ist so beschaffen, dass nur ungefaltete Proteine transportiert werden können (Klauser et al. 1992; Klauser et al. 1993; Jose et al. 1996).

Von der Arbeitsgruppe um Prof. Jose wurde auf der Basis dieses Sekretionsmechanismus ein System zur Expression rekombinanter Proteine auf der Zelloberfläche von *E. coli* entwickelt und als "Autodisplay" bezeichnet (Maurer *et al.* 1997; Jose 2006; Jose und Meyer 2007). Zu seiner Anwendung wird ein Gen für ein künstliches Fusionsprotein aus Signalpeptid, dem gewünschtem Passagier, einem ausreichend langen Linker und der Translokatordomäne geschaffen, das mittels eines Vektors in *E. coli* eingebracht wird. Der in dieser Arbeit verwendete artifizielle Autotransporter bestand aus dem Signalpeptid für das Choleratoxin B (CtxB) und der Translokatordomäne des Adhäsins AIDA-I (Adhesin Involved in Diffuse Adherence) aus *E. coli*.



Abbildung 5: Aufbau (A) des Genkonstruktes, das für das Autotransporter-Fusionsprotein kodiert und Prinzip des Proteintransports (B) durch die Außenmembran mittels Autodisplay. Das Genkonstrukt (A) des Autodisplay-Fusionsproteins besteht aus den Gensequenzen für Signalpeptid SP, Passagier, Linker und ß-Fass. Durch Translation am Ribosom entsteht zunächst ein Vorläuferprotein, das in den Sec-Transportweg eingeschleust und nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides ins Periplasma gelangt (B). Die C-terminale Domäne lagert sich spontan mit einer fass-ähnlichen Struktur in die äußere Membran ein. Der Linker bildet in der Pore eine Haarnadelstruktur aus und transportiert den Passagier durch die äußere Membran (Maurer *et al.* 1999).

Die Faltung des Passagierproteins findet erst außerhalb der Zelle statt und ist nicht von den Bedingungen im Cytoplasma von *E. coli* abhängig, sondern von denen im umgebenden Puffer. Die Bildung von IB wird damit vermieden und eine korrekte Faltung ermöglicht. Ein weiterer Vorteil ist die Zugänglichkeit der Proteine von außen. Dadurch ist keine weitere Aufreinigung notwendig, um Enzyme auf ihre Aktivität zu prüfen oder die Wirkung von potentiellen Inhibitoren zu testen. Die ganzen Zellen können einem Testsystem direkt zusetzt werden und verhalten sich idealerweise wie das native Enzym.

Mit Hilfe des Autodisplay-Systems konnte in der Vergangenheit bereits eine ganze Reihe von Enzymen in aktiver Form auf die Oberfläche von *E. coli* gebracht werden. Dazu gehörten u.a. Hydrolasen (Lattemann *et al.* 2000), Esterasen (Schultheiss *et al.* 2002) oder Dehydrogenasen (Jose und von Schwichow 2004).
4.7 Ziele der Arbeit

Bisher ließen sich biotechnologisch nur geringe Mengen an katalytisch aktiven humanen Hyaluronidasen gewinnen, die für Untersuchungen potentieller Inhibitoren nicht ausreichend waren. Die wesentliche Ursache ist die Ausbildung von IB bei der Gewinnung von humanen Hyaluronidasen in *E. coli*, aus denen das Enzym nur mit hohem Verlust aufgereinigt werden kann. Ziel der Arbeit war es, dieses Problem zu lösen, indem die drei wesentlichen humanen Hyaluronidasen hHyal-1, hHyal-2 und hPH-20 unter Verwendung des Autodisplay-Systems in aktiver Form auf der Oberfläche von *E. coli* exprimiert werden. *E. coli* ist unter einfachsten Bedingungen selbst-replikativ und transportiert das Enzym mittels Autodisplay selbsttätig an die Oberfläche. Das Enzym steht dann ohne komplexe Aufreinigung in ausreichenden Mengen für Hochdurchsatz-Untersuchungen zur Verfügung.

Gleichzeitig sollten mit Hilfe von BTH schnell und einfach durchzuführende Testverfahren für eine Hochdurchsatzuntersuchung von Hyaluronidase-Inhibitoren im Mikrotiterplattenformat bei pH 3,5 und pH 7 optimiert werden. Anschließend sollten diese Testverfahren mit den Hyaluronidase-tragenden Zellen kombiniert werden. Auf diese Weise sollte ein Testverfahren erhalten werden, das eine einfache Suche nach neuen Leitstrukturen für die Entwicklung von Inhibitoren humaner Hyaluronidasen ermöglicht. Um die Verwendbarkeit der Testsysteme zu prüfen, sollten mehrere Chargen von Benzimidazol-, Benzoxazol- und Indol-Derivaten untersucht und Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden.

5 MATERIALIEN

5.1 Bakterienstämme

Die Oberflächenexpression wurde mit den Stämmen E. coli UT5600(DE3) (F⁻, ara-14, *leuB6*, *secA6*, *lacY1*, *proC14*, *tsx-67*, Δ (*ompTfepC*)266, *entA403*, *trpE38*, *rfbD1*, rpsL109(StrR), xyl-5, mtl-1, thi-1, λ (DE3)), *E.* coli BL21(DE3) (B, F⁻, dcm, ompT, lon, $hsdS(rB^- mB^-)$, gal, λ (DE3)), E. coli F470 (F⁻, met, his⁻, pro⁻, mtl⁻, (Str['])) und E. coli F515 (F⁻, met, his, pro⁻, mtl, (Str')) durchgeführt. Die Stämme E. coli F470 und F515 unterscheiden sich zu den anderen Stämmen zusätzlich im Aufbau der Lipopolysaccharide (LPS) der Außenmembran. Dem Stamm E. coli F470 fehlen die äußeren Seitenketten, jedoch sind das Lipid A sowie die innere und äußere Kernregion (R1-core region) vorhanden (Schmidt et al. 1970). Dem Stamm E. coli F515 fehlen zusätzlich die innere und äußere Kernregion (Schmidt et al. 1970). Beide Stämme wurden von J. Seydel vom Center for Medicine and Biosciences, Biophysics, Borstel Research Center, Parkallee, D-23845 Borstel, Germany, zur Verfügung gestellt.

5.2 Plasmide

Die in der Tabelle 5 aufgeführten Plasmide fanden in dieser Arbeit Verwendung. Die Plasmide pCMVSport6H (ImaGenes clone ID: IRATp970C1157D) und p998N2310771 (ImaGenes clone ID: IRATp970A1228D) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Armin Buschauer und Dr. Edith Hofinger, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt. Das Plasmid pRZPDHyal2 (ImaGenes clone ID: IRAUp969E0510D) wurde vom RZPD, heute ImaGenes GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, D-13125 Berlin, erworben.

Plasmid	Größe	Resistenz	Insert kodiert für	Verwendung
pCMVSport6H	6422 hn	Amp ^R		Matriza für belval 1
(IRATp970C1157D)	0432 DP	Атр	II - I	Matrize fui firiyai-i
pRZPDHyal2	2710 hr	Cm ^R		Matrino für bl.b.al. 2
(IRAUp969E0510D)	3710 bp	Cm	li⊓yai-z	Matrize fui finyai-z
p998N2310771	5076 hr	AmaR		Matrice für bDLL 20
(IRATp970A1228D)	0370 DD	Атр	IIPH-20	Mathze fur hPH-20

Tabelle 5: Verwendete Plasmide.

Tabelle 5, Fortsetzung

pET-Cyp13	8312 bp	Amp ^R	Cytochrom P450- Autotransporter- Fusionsprotein	Vektor-Rückgrat
pJM007 (Maurer <i>et al.</i> 1997)	4652 bp	Amp ^R	Choleratoxin B- Autotransporter- Fusionsprotein	Vektor-Rückgrat
pAK002	8324 bp	Amp ^R	hHyal-1- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hHyal-1
pAK003	8057 bp	Amp ^R	hHyal-1- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hHyal-1
pAK004	8510 bp	Amp ^R	hPH-20- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hPH-20
pAK005	8085 bp	Amp ^R	hPH-20- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hPH-20
pAK006	8441 bp	Amp ^R	hHyal-2- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hHyal-2
pAK007	8081 bp	Amp ^R	hHyal-2- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hHyal-2
pAK009	5645 bp	Amp ^R	hHyal-1- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hHyal-1
pAK010	5378 bp	Amp ^R	hHyal-1- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hHyal-1
pAK011	5831 bp	Amp ^R	hPH-20- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hPH-20

pAK012	5402 bp	Amp ^R	hPH-20- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hPH-20
pAK013	5762 bp	Amp ^R	hHyal-2- Autotransporter- Fusionsprotein	Autodisplay hHyal-2
pET-Adx04	7466 bp	Amp ^R	Adrenodoxin- Autotransporter- Fusionsprotein	Negativkontrolle für das Autodisplay der Hyaluronidasen
pET-Hyd	8147 bp	Amp ^R	Bakterienhydrolase- Autotransporter- Fusionsprotein	Negativkontrolle für das Autodisplay der Hyaluronidasen

Tabelle 5, Fortsetzung

5.3 Oligonukleotide

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden für diese Arbeit durch die Firma Sigma-Genosys synthetisiert.

Tabelle 6: V	erwendete	Oligonukleotide.
--------------	-----------	------------------

Name	Nukleotidsequenz 5' \rightarrow 3'	Bindungs- richtung	Zweck
AK001	CCGCTCGAGTTTAGGGGCCC CTTGCTACC	forward	Amplifikation der hHyal-1-DNA aus pCMVSport6H unter Einfügen einer flankierenden Xhol-Schnittstelle
AK002	CGGGGTACCCCACATGCTCT TCCGCTC	reverse	Amplifikation der hHyal-1-DNA mit C- terminaler Domäne aus pCMVSport6H unter Einfügen einer flankierenden Kpnl-Schnittstelle
AK003	CGGGGTACCGGGCCCCAGT GTAGTGTCC	reverse	Amplifikation der hHyal-1-DNA ohne C-terminale Domäne aus pCMVSport6H unter Einfügen einer flankierenden KpnI-Schnittstelle
AK004	CCGCTCGAGCTGAATTTCAG AGCACC	forward	Amplifikation der hPH-20 aus p998N2310771 unter Einfügen einer flankierenden Xhol-Schnittstelle

belle 6	, Fortsetzung	

Tabelle 6	Fortsetzung		
AK005	CGGGGTACCGAAGAAACCAA TTCTGC	reverse	Amplifikation der hPH-20 mit C- terminaler Domäne aus p998N2310771 unter Einfügen einer flankierenden KpnI-Schnittstelle
AK006	CGGGGTACCGTTGATTATGT AAGGATTC	reverse	Amplifikation der hPH-20 ohne C- terminale Domäne aus p998N2310771 unter Einfügen einer flankierenden KpnI-Schnittstelle
AK007	AAGTAGATGCATATGGACAT	reverse	Sequenzierung des Plasmids p998N2310771
AK008	CCCTGATTGGCCAGCTCCTC	forward	Sequenzierung des Plasmids p998N2310771
AK009	CCGCTCGAGATGGAGCTCAA GCCCACAGC	forward	Amplifikation der hHyal-2 aus pOTB7Hyal2 unter Einfügen einer flankierenden Xhol-Schnittstelle
AK010	CGGGGTACCCAAGGTCCAGG TAAAGGCCAGG	reverse	Amplifikation der hHyal-2 mit C- terminaler Domäne aus pOTB7Hyal2 unter Einfügen einer flankierenden Kpnl-Schnittstelle
AK011	CGGGGTACCGGGGACCAGC AGCCGTGTCAGG	reverse	Amplifikation der hHyal-2 ohne C- terminale Domäne aus pOTB7Hyal2 unter Einfügen einer flankierenden Kpnl-Schnittstelle
AK014	AAATGATGATCTCAGCTGGTT GTG	forward	Sequenzierung des Plasmids p998N2310771

5.4 Enzyme

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Enzyme wurden in dieser Arbeit verwendet.

Enzym	Hersteller / Lieferant
Asp 718	Roche
BamHI	NEB
Hyaluronidase	Serva, Roth
Kpnl	NEB, Takara, Hybaid
Lysozym	Roth
Proteinase K	Fluka
RNase	Sigma
T4-DNA-Ligase	NEB
Taq-DNA-Polymerase (Mastermix)	Eppendorf, 5Prime, Peqlab
Xhol	NEB

Tabelle 7: Verwendete Enzyme.

5.5 Lösungen und Nährmedien für den Umgang mit Bakterien

5.5.1 Flüssige und feste Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

Bei allen Angaben ist mit Wasser stets steriles, hochgereinigtes Wasser gemeint, das durch Reinigung mittels einer Milli-Q Biocel-Anlage der Firma Millipore® erhalten wurde. Alle Protokolle sind dem Standardwerk "Molecular Cloning - A laboratory manual" (Sambrook *et al.* 2001) entnommen.

LB-Medium: 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl und 10 g Trypton/Pepton wurden in 1 l Wasser gelöst. Der pH wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Zum Gießen von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 15 g Agar-Agar hinzugegeben.

Der sterilen Lösung wurde ggf. Ampicillin zugesetzt und die Platten gegossen. Die Endkonzentration betrug für Ampicillin-Na 50-100 µg/ml;

YT-Medium: 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und 16 g Trypton/Pepton wurden in 1 l Wasser gelöst. Der pH wurde auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

GYT-Medium: 1,25 g Hefeextrakt, 2,5 g Trypton/Pepton und 10 g Glycerol 99,5% wurden in 1 l Wasser gelöst und die Lösung autoklaviert.

42

SOC-Medium: 5 g Hefeextrakt, 20 g Trypton/Pepton, 2 ml KOH 1 M und 10 ml NaCl 1 M wurden in 1 l Wasser gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden mgCl2 und Glucose zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt.

PPM-Medium: 15 g Trypton/Pepton, 5 g NaCl, 1 g Zulkowsky Stärke, 1 g KH2PO4, 0,8 g K2HPO4, 232,5 ml Glycerin 86% wurden in 767,5 ml Wasser gelöst und autoklaviert.

5.5.2 Sonstige Lösungen für den Umgang mit Bakterien

CaCl₂-Lösung: Eine 75 mM CaCl₂–Lösung wurde mit Glycerin auf eine Endkonzentration von 15% Glycerin eingestellt und autoklaviert.

5.6 Puffer und Lösungen für die Hyaluronsäureanalytik

Alle hergestellten Lösungen wurden, wenn nichts anderes angegeben ist, lichtgeschützt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

5.6.1 Photometrisches Testverfahren mit "stains-all"

Stammlösung A für Phosphatpuffer (0,2 M): 28,4 g Na₂HPO₄ wurden in 1 I Wasser gelöst und autoklaviert.

Stammlösung B für Phosphatpuffer (0,2 M): 24 g NaH₂PO₄ wurden in 1 I Wasser gelöst und autoklaviert.

Phosphatpuffer pH 7 (50 mM): 19,5 ml Stammlösung A und 30,5 ml Stammlösung B wurden gemischt und auf 200 ml mit Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure / NaOH eingestellt.

Phosphatpuffer pH 7 (0,2 M): 39 ml Stammlösung A und 61 ml Stammlösung B wurden gemischt und der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure / NaOH eingestellt.

Ameisensäurepuffer pH 3,5: 6,8 g Natriumformiat und 5,85 g Natriumchlorid werden in 1 I Wasser gelöst und mit Ameisensäure auf pH 3.5 eingestellt.

Dioxan-Reinstwasser-Gemisch: 100 ml Dioxan (stabilisiert mit BHT) und 100 ml Wasser wurden gemischt und mit 1,3 mg BHT versetzt.

Färbelösung ("stains-all"-Farbstofflösung): 22,4 mg "stains-all" und 35,2 mg Ascorbinsäure wurden mit 23,08 ml Eisessig versetzt und auf 200 ml mit Dioxan-Reinstwasser-Gemisch aufgefüllt. Die Lösung konnte etwa 2 Wochen lang verwendet werden.

Hyaluronsäurelösung 2 mg/ml: 4 mg HA wurden über Nacht in 2 ml Reinstwasser rehydratisiert und anschließend bei -30 °C gelagert.

Hyaluronidase-Stammlösung für Messungen bei pH7: 1 mg Hyaluronidase (gefriergetrocknetes Pulver mit 3100 U/mg) wurde mit 2 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7 rehydratisiert. Die Lösung wurde kurzfristig bei 4 °C aufbewahrt und möglichst zügig weiter verarbeitet.

Hyaluronidase-Stammlösung für Messungen bei pH 3,5: 1 mg Hyaluronidase (gefriergetrocknetes Pulver mit 3100 U/mg) wurde in 2 ml Reinstwasser rehydratisiert. Die Lösung wurde kurzfristig bei 4 °C aufbewahrt und möglichst zügig weiter verarbeitet.

verdünnte Hyaluronidaselösung für Messungen pH 7 und pH 3,5: Die jeweilige Hyaluronidase-Stammlösung wurde je nach Bedarf mit 50 mM Phosphatpuffer oder 0,1 M Ameisensäure-Puffer auf die gewünschte Aktivität verdünnt. Die Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und maximal fünf Tage lang verwendet.

Inhibitor-Stammlösungen: Die zu untersuchenden Substanzen wurden in DMSO zu Konzentrationen von 10 mM gelöst. Die Stammlösungen wurden anschließend bei -30 °C aufbewahrt.

Substratlösung pH 7: 390 µl 0,2 M Phosphatpuffer, 110 µl Hyaluronsäurelösung und 500 µl Wasser wurden gemischt und für 10 Minuten auf 37 °C erwärmt.

Substratlösung pH 3,5: 390 µl 0,1 M Ameisensäure-Puffer, 110 µl Hyaluronsäurelösung und 500 µl Wasser wurden gemischt und für 10 Minuten auf 37 °C erwärmt.

5.6.2 Photometrisches Testverfahren mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)

Phosphat-Citrat-Puffer pH 7: 25,81 g Natriumcitrat, 24 g Natrium-dihydrogenphosphat und 5,85 g Natriumchlorid wurden in 1 l Wasser gelöst und mit Ameisensäure auf pH 3,5 eingestellt.

Ameisensäurepuffer pH 3,5: 6,8 g Natriumformiat und 5,85 g Natriumchlorid wurden in 1 I Wasser gelöst und mit Ameisensäure auf pH 3,5 eingestellt.

Hyaluronsäurelösung 5 mg/ml: 5 mg HA wurden in 1 ml Wasser über Nacht rehydratisiert und anschließend bei -30 °C gelagert.

BSA-Lösung 0,02%: 2 mg BSA wurden in 10 ml Reinstwasser gelöst und bei -30 °C gelagert.

Borsäurelösung: 4,94 g Borsäure und 1,98 g KOH wurden in 100 ml Wasser gelöst.

Färbelösung (DMAB-Lösung): 5 g DMAB (Dimethylaminobenzaldehyd) wurden mit 6,25 ml 10 N HCl versetzt und auf 50 ml mit Eisessig aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 4 °C und lichtgeschützt gelagert. Sie war unter diesen Bedingungen zwei Wochen lang verwendbar.

Hyaluronidase-Stammlösung: 1 mg Hyaluronidase (gefriergetrocknetes Pulver mit 3100 U/mg) wurde in 2 ml Reinstwasser rehydratisiert. Die Lösung wurde kurzfristig bei 4 °C gelagert und möglichst zügig weiter verarbeitet.

verdünnte Hyaluronidaselösung pH 7 und pH 3,5: Die Hyaluronidase-Stammlösung wurde je nach Bedarf mit Phosphat-Citrat-Puffer oder Ameisensäure-Puffer auf die gewünschte Aktivität verdünnt. Die Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und maximal fünf Tage lang verwendet.

Inhibitor-Stammlösungen: Die zu untersuchenden Substanzen wurden in DMSO zu Konzentrationen von 10 mM gelöst und bei -30 °C gelagert.

5.6.3 Hyaluronsäureanalytik mittels HPLC

Hyaluronidase-Stammlösung: 1 mg Hyaluronidase (gefriergetrocknetes Pulver mit 3100 U/mg) wurde in 2 ml Reinstwasser gelöst.

Substratlösung: 60 mg HA wurden über Nacht in 1 ml Wasser und 1 ml des gewünschten Puffers (siehe Kapitel 5.6.1) gelöst.

Fließmittel: NaH₂PO₄-Lösung 16 mM und 800 mM.

5.7 Puffer und Lösungen für Nukleinsäure- und Protein-Analytik

Alle folgenden Zusammensetzungen sind dem Standardwerk "Molecular Cloning - A laboratory manual" (Sambrook *et al.* 2001) entnommen.

5.7.1 Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly

Lösung 1: Na₂EDTA 10 mM wurden in Tris/HCI 50 mM pH 8,0 gelöst und RNAse A 100 µg/ml zugegeben.

Lösung 2: Natriumdodecylsulfat (SDS) 1% in NaOH 0,2 M.

Lösung 3: Kaliumacetat 3 M / Eisessig pH 4,8 - 5,3.

5.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

1 x TAE-Puffer: Tris 40 mM, Na₂EDTA 1 mM, mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt. **Färbebad:** Ethidiumbromid 1 µg/ml in 1 x TAE-Puffer.

Gelladepuffer: SDS 1%, Glycerol 50%, Bromphenolblau 0,02%.

Größenmarker: Felix 1 kb-Marker (QBiogene), Lambda Hind III Digest (New England Biolabs) sowie GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

5.7.3 Membranproteinisolierung und SDS-PAGE

PBS: KCI 0,2 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l, pH 7,4.

Extraktionspuffer: Triton X 100 2%, Tris (0,2 M/HCI, pH8) 25%, MgCl₂ (1 M) 1%.

Trenngelpuffer: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%, TEMED 0,4%.

Trenngel 12,5%: 2,1 ml Rotiphorese-Gel, 1,25 ml Trenngelpuffer, 1,6 ml Wasser, 50 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lsg. 1% (APS).

Trenngel 10%: 1,65 ml Rotiphorese-Gel, 1,25 ml Trenngelpuffer, 2,05 ml Wasser, 50 µl Ammoniumperoxodisulfat-Lsg. 1% (APS).

Sammelgelpuffer: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4%, TEMED 0,4%.

Sammelgel: 0,22 ml Polyacrylamidlösung, 0,42 ml Sammelgelpuffer, 1,03 ml Wasser und 10 µl APS-Lösung.

DTT-Lösung: 250 mg Dithiothreitol in 0,5 ml Reinstwasser.

nichtreduzierender Probenpuffer: Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4%, Glycerol 20%, EDTA 2 mM, Bromphenolblau 0,02%.

reduzierender Probenpuffer: 10 ml nichtreduzierender Probenpuffer, 100 µl DTT-Lösung.

SDS-Laufpuffer: Tris 0,025 M, Glycin 0,192 M, SDS 0,1%.

Coomassie-Lösung: Coomassie Brilliant-Blue 0,25 g, 45 ml Methanol, 45 ml Wasser, 10 ml Eisessig.

Größenmarker: Prestained uns unstained Protein Marker PageRuler (Fermentas).

5.7.4 Western Blot

10 x Transferpuffer: Tris 250 mM, Glycin 1,5 M, mit HCI / NaOH auf pH 8,3 eingestellt.
10 x TBS: 80 g NaCl, 2 g KCl und 30 g Tris/HCl wurden in 1 l Wasser gelöst und mit HCl / NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

TBS/3% BSA: 50 ml TBS wurden mit 3% BSA versetzt.

TBST: 50 ml TBS wurden mit 0,1% Tween 20 versetzt.

Primärantikörper-Lösung: 8 μl Primärantikörper-Stammlösung (anti-hPH-20 Antikörper,
polyklonal) wurden auf 20 ml mit TBS/3% BSA verdünnt.Sekundärantikörper-Lösung:3 μlSekundärantikörper-Stammlösung (Kaninchen
anti-Maus Immunglobulin G, Peroxidase-gekoppelt, 2 mg/ml) wurden auf 20 ml mit
TBS/3% BSA verdünnt.

5.8 Antikörper

Folgende Antikörper fanden in dieser Arbeit Verwendung (Tabelle 8):

Tabelle 8: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Primärantikörper anti-hPH-20, polyklonal	Abnova
Sekundärantikörper Kaninchen anti-Maus Immunglobulin G,	antibodies online GmbH
Meerrettich-Peroxydase-gekoppelt	

5.9 Chemikalien

Die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der folgenden Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Weitere verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Albumin Fraktion V, BSA	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ampicillin-Natrium	Roth
Aprotinin	Roth
Ascorbinsäurepalmitat	Eluko
(6-O-Palmitoyl-L-ascorbinsäure)	
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Acros
Butylhydroxytoluol	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma

Tabelle 9, Fortsetzung

Chloramphenicol	Roth
Coomassie Brilliant Blue	Serva
D(+)-Saccharose p.a.	Roth
Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)	Acros
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros
Dinatrium-ethylendiamintetraessigsäure - dihydrat (Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O)	Applichem
Dioxan	Acros
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Eisessig	Fluka
Ethanol p.a.	Riedel-de Haën
Ethidiumbromid-Lösung 1%	Roth
Fetal Calf Serum (FCS)	BioWest
Glucose (wasserfrei)	Fisher Scientific
Glycerol p.a. wasserfrei	Roth
Glycerol reinst 86%	Roth
Glycin p.a.	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Applichem
Hyaluronsäure	Serva, Fluka
Isopropanol p.a.	Fluka
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid	Fermentas
Kaliumacetat	J.T. Baker
Kaliumchlorid	Acros
Kaliumhydroxid	Sigma
Magnesiumchlorid	VWR Prolabo
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	VWR Prolabo

Tabelle 9, Fortsetzung

Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat	J.T. Baker
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natriumformiat	Sigma
Natriumhydrogensulfat	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
n-Laurylsarcosinat-Na	Sigma
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas
Page Ruler Unstained Protein Ladder	Fermentas
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Rotiphorese Gel 30 37,5:1	Roth
Salzsäure konz.	Merck
Stärke	Merck
"stains-all"	Acros
TEMED	Roth
Tris	Sigma
Triton X	Serva
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
TWEEN 20	Roth
Western Blot Detektionsreagenzkit ECL Plus	GE Healthcare

5.10 Geräte

Die in der Tabelle 10 aufgeführten Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Geräte.

Gerät und Modellbezeichnung	Hersteller	
-70 °C Gefriertruhe HT2086	Hettich	
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Lohnot	
Electrophoresis Sub System 150		

Tabelle 10, Fortsetzung

Autoklav 3850 ELV	Systec
Brutschrank	Memmert
Elektroporator 2510	Eppendorf
Feinwaage 2001 MP2	Sartorius
Hochgeschwindigkeitszentrifuge RC5C Plus	Thermo Scientific
HPLC-System Alliance 2695	Waters
Kamerasystem zur Detektion von Agarose- und Polyacrylamidgelen "Gel iX Imager"	INTAS
Kamerasystem zur Detektion von Western Blots "Chemocam HR16"	INTAS
Kühl-/Gefrierkombination Fris88f	Thermo
Magnetrührer RCT	Ikamag
Mikrotiterplatten klar, 96 Vertiefungen, glatter Boden, steril	Greiner BioOne
Mikrotiterplattenreader Mithras LB 940	Berthold Technologies
Mikrowelle MW 1000	Alaska
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Photometer Genesys 6	Thermo Electron
Power Pack Standard P25	Biometra
Rotoren Sorvall SS-34, SLA-1500	Thermo Scientific
Schüttelinkubator Minitron	Infors
SDS-Gelelektrophoresekammern	Diorad
Mini Protean 3 und Mini Protean IV	Diorau
Thermoblock AccuBlock	Labnet
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf
Thermocycler Primus	MWG
Thermocycler Primus 25 advanced	Peqlab
Tischzentrifuge Mikro 120 (ohne Kühleinheit)	Hettich

Tabelle 10, Fortsetzung

Tischzentrifuge Universal 32R (mit Kühleinheit)	Hettich
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio Rad
Vakuumpumpe PC5	vacuubrand
Vibrationsmischer Votex-1 Genie Touch Mixer	Scientific Industries
Vivaspin 500 3.000 MWCO PES Zentrifugalkonzentrator	Sartorius Vivascience
Vivaspin 500 10.000 MWCO PES Zentrifugalkonzentrator	Sartorius Vivascience
Wasseraufbereiter Biocel Milli-Q	Millipore
Wasserbad	Memmert
Wasserbad Haake D1 L	Haake

6 METHODEN

6.1 Arbeiten mit Bakterien

6.1.1 Anzucht von Bakterien

Zur Anzucht der Bakterien wurden Vorkulturen in LB-Medium ausgehend von Glycerinoder LB-Agarplattenkulturen angesetzt und bei 37 °C über Nacht mit 200 rpm geschüttelt. Kulturen von Stämmen, die *bla*-exprimierende Plasmide enthielten, wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Zur Beimpfung diente entweder eine Einzelkolonie einer Agarplatte oder ein Teil einer Glycerinkultur, der 1% des Volumens der angesetzten Übernachtkultur entsprach. Die Anzucht der Hauptkultur erfolgte am nächsten Tag durch Animpfen von LB-Medium mit der Menge Übernachtkultur, die 1% des Volumens der Hauptkultur entsprach. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden bei Kulturen von Stämmen mit Plasmid anschließend neben Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zusätzlich 10 µM EDTA und 15 mM 2-Mercaptoethanol zugegeben. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von OD_{578 nm} = 0,5-0,7 angezogen und in der Regel anschließend die Proteinexpression mittel Zugabe von IPTG induziert.

Bei Kulturen des Stammes *E. coli* F470 entfiel die Induktion der Proteinexpression und es wurde ausschließlich mit der Übernachtkultur gearbeitet, da die Anzucht einer weiteren Kultur aufgrund einer geringeren Teilungsrate im Vergleich zu *E. coli* BL21(DE3) oder UT5600(DE3) sehr lange dauerte.

Zur Anzucht auf Agarplatten wurden die Zellen auf LB-Platten, in die Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml eingegossen wurde, ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Kulturen von plasmidfreien Stämmen wurden auf ampicillinfreien LB-Platten angezogen. Zur Beimpfung wurde jeweils 1 µl einer Flüssigkultur oder eine Einzelkolonie ausgestrichen.

6.1.2 Induktion der Proteinexpression

Um die Proteinexpression des Autotransporter-Fusionsproteins zu induzieren, wurde nach der Zellanzucht bis zu einer $OD_{578 \text{ nm}} = 0,5-0,7$ IPTG in einer Konzentration von 1 µM zur Hauptkultur hinzugefügt. Die Kulturen wurden anschließend 1 Stunde bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt.

Bei Kulturen der Stämme *E. coli* F470 und F515 entfällt die Induktion der Proteinexpression, doch wurden auch diese Stämme vor der weiteren Verwendung 1 Stunde bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt.

6.1.3 Stammhaltung

Zur kurzfristigen Lagerung der Stämme über 1-4 Wochen wurden Ausstriche auf Agarplatten angelegt und nach Bebrütung im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Zur Lagerung über längere Zeit wurden die wie unter 4.1.1 beschriebenen Flüssigkulturen mit 20% reinem Glycerol versetzt und bei -20 °C eingefroren.

Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen von zwei Agarplatten zur Stammhaltung mittels steriler Wattestäbchen geerntet und in 1 ml PPM-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in gleich großen Anteilen in zwei sterile, mit Glaskugeln gefüllte Kryoröhrchen überführt, in einem Ethanol/Trockeneis-Bad schockgefroren und bei -70 °C eingelagert.

6.1.4 Herstellen elektrokompetenter Zellen

Der benötigte Bakterienstamm wurde als 2 x 200 ml Hauptkultur mit YT-Medium angesetzt und mit je 2 ml einer Vorkultur angeimpft. Bei einer optischen Dichte von $OD_{578 nm} = 0.5$ wurden die Kolben für 30 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C bei 2.500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem, sterilen Reinstwasser gewaschen und einmal mit steriler, 10%-iger Glycerollösung. Das Sediment wurde in 750 µl GYT-Medium resuspendiert und in Aliquots zu je 40 µl aufgeteilt. Die Aliquots wurden im Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

6.1.5 Herstellen chemisch kompetenter Zellen

Der benötigte Bakterienstamm wurde als 100 ml Hauptkultur mit LB-Medium angesetzt und mit 1 ml einer Übernachtkultur angeimpft. Bei einer optischen Dichte von $OD_{578 nm} =$ 0,6-0,7 wurden die Kolben für 30 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C bei 2.500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 2,5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 10 ml CaCl₂-Lösung wurden die Zellen erneut für 30 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden sie bei 4 °C bei 2.500 x g für 5 Minuten sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 2,5 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu je 200 µl aufgeteilt. Die Aliquots wurden im Ethanol/Trockeneis-Bad schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

6.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

6.2.1 Plasmidisolierung nach Birnboim und Doly (modifiziert)

Die Plasmidisolierung erfolgte durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979), deren Protokoll geringfügig modifiziert wurde. Aus Flüssigkulturen wurden bis zu 6 ml der Übernachtkultur abzentrifugiert und das erhaltene Sediment in 300 µl Lösung 1, der 1% RNase beigefügt wurde, durch Vortexen und Scratchen gründlich resuspendiert. Zur Plasmidisolierung aus Kulturen von der Agarplatte wurden analog zwei volle Impfösen verwendet. Es folgte die Zugabe von 300 µl Lösung 2. Nach vorsichtigem Invertieren und drei Minuten Inkubation wurden 300 µl Lösung 3 zugegeben. Nach erneutem Schwenken wurde für 10 Minuten bei 15.500 x g zentrifugiert und der Überstand (ca. 700µl) partikelfrei in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Lösung wurden 700 µl Isopropanol p.a. zugegeben. Anschließend wurde die DNA gefällt und bei 4 °C für 30 Minuten bei 15.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 900 µl Ethanol p.a. 70% zugegeben. Nach kurzem Schütteln wurde erneut bei 4 °C für 15 Minuten bei 15.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment durch Unterdruck für ca. 5-10 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe eines angemessenen Volumens sterilen Reinstwassers (ca. 30-60 µl) gelöst.

6.2.2 Plasmidisolierung mittels Festphasenextraktion

Bei sensiblen Anwendungen wie Sequenzierung, PCR, Elektroporation oder zu langfristigen Aufbewahrungszwecken wurden Plasmidisolierungen mit Hilfe kommerziell erhältlicher Fertigsäulen durchgeführt. Bei der Isolierung aus Flüssigkulturen wurden bis zu 6 ml der Übernachtkultur abzentrifugiert und das erhaltene Sediment gemäß den Angaben der Anleitung des jeweiligen Fertigkits resuspendiert und weiter bearbeitet. Bei der Isolierung aus Kulturen von der Agarplatte wurden zwei volle Impfösen verwendet. Dies entspricht jeweils einer größeren Menge als in der jeweiligen Anleitung vorgesehen, da festgestellt wurde, dass sich auf diese Weise die erhaltene Plasmidmenge deutlich steigern ließ. Zum Einsatz kamen sowohl das "Plasmid Miniprep Kit" der Firma Peqlab sowie das "Qiaprep Spin Miniprep Kit" der Firma Qiagen.

6.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten zur Vorbereitung auf die Klonierung erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki *et al.* 1988). Als Matrize wurde das

Plasmid verwendet, das die zu vervielfältigende Sequenz trägt (siehe Kap. 5.2). Dazu wurde das entsprechende Plasmid nach Erhalt zunächst mittels Elektroporation in E. coli UT5600(DE3) eingebracht. Die Zellen wurden angezogen und das Plasmid für die Amplifikation der Hyaluronidaseseguenz mittels PCR in größerer Menge isoliert.

Die eingesetzten Oligonukleotide (Tabelle 11) begrenzten die Sequenz unmittelbar zu beiden Seiten. Oligonukleotiden 5'-Ende Den wurde am entweder die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Xhol oder für Asp718 angefügt, um diese durch anschließende Ligation in den ausgewählten Vektor pET-Cyp13 einzufügen. Da Restriktionsenzyme am äußeren Ende einer Sequenz nur mit geringer Effizienz schneiden, wurden drei weitere Basen willkürlich angehängt.

Hyal ¹⁾	A ²⁾	B ³⁾	C ⁴⁾	Name
hHyal-1+/-C ⁵⁾	CCG	CTCGAG	TTTAGGGGCCCCTTGCTACC	AK001
hHyal-1-C ⁵⁾	CGG	GGTACC	CCACATGCTCTTCCGCTC	AK002
hHyal-1+C ⁵⁾	CGG	GGTACC	GGGCCCCAGTGTAGTGTCC	AK003
hPH-20+/-C ⁵⁾	CCG	CTCGAG	CTGAATTTCAGAGCACC	AK004
hPH-20+C ⁵⁾	CGG	GGTACC	GAAGAAACCAATTCTGC	AK005
hPH-20-C ⁵⁾	CGG	GGTACC	GTTGATTATGTAAGGATTC	AK006
hHyal-2+/-C ⁵⁾	CCG	CTCGAG	ATGGAGCTCAAGCCCACAGC	AK009
hHyal-2+C ⁵⁾	CGG	GGTACC	CAAGGTCCAGGTAAAGGCCAGG	AK010
hHyal-2-C ⁵⁾	CGG	GGTACC	GGGGACCAGCAGCCGTGTCAGG	AK011

Tabelle 11: Aufbau der Oligonukleotide zur Amplifikation der hHyal-1, hPH-20 und hHyal-2.

¹⁾ Name der Hyaluronidase, deren Gen amplifiziert wird ²⁾ willkürliche Basensequenz zur Effizienzsteigerung des Restriktionsenzyms ³⁾ Erkennungssequenz des jeweiligen Restriktionsenzyms

⁴⁾ komplementare Hyaluronidase-Gensequenz

⁵⁾ + C kennzeichnet den Einschluss der C-terminalen Domäne, - C den Ausschluss dieser Domäne

Zur Vervielfältigung wurde der "MasterMix" der Firma Eppendorf und 5Prime eingesetzt, eine vorgefertigte Mischung aus Tag-Polymerase aus dem Bakterium Thermophilus aquaticus, Nukleotide sowie allen benötigten Puffersubstanzen. Zur PCR wurden die Bestandteile in folgender Weise gemischt: 27,0 µl Reinstwasser, 1,0 µl Primer 1 (10 µM), 1,0 µl Primer 2 (10 µM), 1,0 µl Template-DNA, 20,0 µl Mastermix-Lösung.

Die anschließende PCR wurde im Thermocycler durchgeführt. Einer initialen Denaturierung der DNA bei 94 °C für 5 Minuten folgte die Amplifikation in 30 Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus 30 s Denaturierung der Doppelstränge bei 94 °C, 30 s Anlagerung der Oligonukleotide (Annealing) bei variabler Temperatur T_A und der Verlängerung der DNA (Elongation) bei 72 °C in variabler Zeit t_{el}. Zum Abschluss wurde die Probe für 6 Minuten bei 72 °C temperiert (finale Elongation) und danach auf 4 °C abgekühlt.

Zur Berechnung der Annealingtemperatur wurde das Programm Vector NTI Advance 10 der Firma Invitrogen verwendet. Die Länge der Elongationszeit wurde unter Berücksichtigung der Amplifikationsgeschwindigkeit der *Taq*-Polymerase von ca. 1 kBp pro Minute gewählt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht über die zur Amplifizierung der verschiedenen humanen Hyaluronidasen verwendeten Annealingtemperaturen (T_A) und Elongationszeiten (t_{el}).

Programmname	amplifizierte Hyaluronidase	T _A	t _{el}
AKPCR01	hHyal-1	65,9 °C	30 s
AKPCR02	hPH-20	62,0 °C	30 s
AKPCR03	hHyal-2	66,0 °C	30 s

Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf die korrekte Größe der entstandenen Fragmente geprüft. Nach einer Extraktion aus dem Gel mit Aufreinigung durch Fällung (siehe Kap. 6.2.4) oder Festphasenextraktion (siehe Kap. 6.2.5) erfolgte ein Restriktionsendonukleaseverdau mittels Xhol und Asp718, das dieselbe Sequenz wie Kpnl erkennt und nach dem Schneiden kompatible überhängende Enden erzeugt.

6.2.4 DNA-Aufreinigung durch Fällung

Zur einfachen aber effektiven Reinigung der DNA-Präparationen von Pufferbestandteilen und Proteinen wurde die DNA mittels alkoholischer Fällung aufgereinigt. Dazu wurde das doppelte Volumen der zu fällenden Lösung an Isopropanol p.a. zugegeben und für eine Stunde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 30 Minuten bei 19.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und mit dem Vierfachen des Ausgangsvolumens an Ethanol p.a. 70% (V/V) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C für 10 Minuten bei 19.000 x g wurde das Sediment mittels Unterdruck getrocknet und in der gewünschten Menge sterilen Reinstwassers gelöst.

6.2.5 DNA-Aufreinigung durch Festphasenextraktion

Eine schnellere Aufreinigung als durch alkoholische Fällung (siehe Kap. 6.2.4) konnte mittels kommerziell erhältlicher Fertigsäulchen erreicht werden, allerdings gab es hierbei auch die größten Verluste an DNA. Bei der Durchführung wurden die Anleitungen der jeweiligen Fertigkits befolgt. Zur Anwendung kamen das "Gel Extraction Kit" der Firma Peqlab sowie das "Qiaquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen.

6.2.6 DNA-Aufreinung durch Dialyse

Vor der Durchführung von Transformationen mittels Elektroporation wurde die jeweilige DNA-Lösung mittels Dialyse aufgereinigt. Dazu wurden MF Millipore Membranfilter mit einer Porenweite von 25 nm (VSWP02500) verwendet. In eine Petrischale wurde steriles Reinstwasser gefüllt und eine auf die benötigte Größe zugeschnittene Membran auf die Wasseroberfläche aufgelegt. Auf die Oberfläche der Membran wurde nun die zu reinigende DNA-Lösung aufgetragen. Durch Diffusion, angetrieben durch osmotischen Ausgleich zwischen DNA-Lösung und Reinstwasser, kommt es zu einer Entsalzung der Probe. Nach ca. einer Stunde wurde die DNA-Lösung erneut aufgenommen und zur Elektroporation eingesetzt.

6.2.7 Restriktionsendonukleaseverdau

Die für den Restriktionsendonukleaseverdau benötigten einzelnen Bestandteile (DNA, Puffer für die Restriktionsendonukleasen, Wasser, Enzyme) wurden nach den Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme zusammengefügt. Die Wahl der Inkubationstemperatur und -dauer erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben für die jeweils verwendeten Enzyme. Wenn nichts anderes angegeben wurde, erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden. Wurde der Restriktionsendonukleaseverdau für rein analytische Zwecke benötigt, wurde die Inkubation alternativ durch eine 45-sekündige Behandlung mit Mikrowellen bei 600 W ersetzt, die zu gleichwertigen Ergebnissen führte.

6.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Agarose-Gelektrophorese wurden die DNA-Fragmente in 0,8%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Gele wurden durch Aufkochen einer entsprechenden Menge Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei 65 °C, zum Ausgießen auf den Gelträger wurde die

Agarosegel-Lösung auf 50 °C abgekühlt. Nach dem Polymerisieren und Aushärten des Gels wurde der Gelträger in die mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt.

Um die Dichte der Proben zu erhöhen, wurden diese mit einem Ladepuffer gemischt. Zudem enthielt der Puffer Bromphenolblau, um eine visuelle Kontrolle der bereits zurückgelegten Trennstrecke zu gewährleisten. Die eigentliche Trennung erfolgte bei konstant 120 V. Nach der Beendigung der Trennung wurde die DNA mittels 20 minütigem Einlegen in eine 1%-ige Ethidiumbromidlösung angefärbt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm.

6.2.9 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde eine Gelextraktion mittels kommerziell erhältlicher Gelextraktionskits durchgeführt. Dazu wurde das Stück Gel, das die gewünschte DNA enthielt, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein zuvor tariertes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Masse des Gelstückes ermittelt. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung der jeweils verwendeten Fertigkits. Zum Einsatz kamen das "Gel Extraction Kit" der Firma Peqlab, das "Qiaquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen sowie das "MegaPure DNA Purification Kit" der Firma Genecraft.

6.2.10 Ligation von DNA

Eine Verknüpfung von DNA-Fragmenten, die über entsprechend kompatible Enden verfügen, erfolgte durch Ligation mittels T4-DNA-Ligase. In Gegenwart von ATP wird durch dieses Enzym die Ausbildung von Phosphodiesterbrücken zwischen dem 3'-OH und dem 5'-Phosphat der beiden doppelsträngigen Fragmente katalysiert.

Um eine möglichst hohe Effizienz beim Einbau des Fragmentes zu erzielen, wurde das kleinere Insert in fünffachem molarem Überschuss zum größeren Vektor eingesetzt. Die weiteren Bestandteile des Ligationsansatzes bestanden aus sterilem Reinstwasser, T4-DNA-Ligase-Puffer sowie 1 µl der T4-DNA-Ligase. Sowohl Puffer als auch das Enzym wurden von der Firma NEB eingesetzt. Die Gesamtmenge des Ansatzes betrug für eine einzelne Transformation 10 µl, bei mehreren Ansätzen wurde die Menge entsprechend vervielfacht. Die Berechnung der Reaktionsvolumina erfolgte mittels eines Excel-Programms basierend auf einer Gleichung zur Ermittlung der Zusammensetzung von Ligationsansätzen (Cranenburgh 2004). Es wurde darauf geachtet, dass im Ansatz Gesamt-DNA-Konzentrationen von über 100 ng erreicht wurden, da sich geringere Mengen negativ auf die Transformationseffizienz auswirkten. Vor der Ligation wurden die

Ansätze für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren. Der gesamte Ansatz wurde anschließend für 16 Stunden bei 16 °C inkubiert, mittels Dialyse aufgereinigt (siehe Kap. 6.2.6) und zur Transformation verwendet (siehe Kap. 6.2.11 und 6.2.12).

6.2.11 Transformation elektrokompetenter Zellen

Zellen von *E. coli* können DNA nicht ohne weiteres aktiv aufnehmen, sie besitzen nur eine sehr geringe natürliche Kompetenz. Um dennoch Plasmide in *E. coli* einzubringen, wurden diese vorbehandelt und anschließend zusammen mit der DNA einem Wärmeimpuls (siehe Kap. 6.2.12) oder Spannungsimpuls ausgesetzt. Letztere Methode wird als Elektroporation bezeichnet (Neumann *et al.* 1982). Dazu wurde ein tiefgefrorenes Aliquot elektrokompetenter Zellen (siehe Kap. 6.1.4) auf Eis lagernd aufgetaut. Anschließend wurden 10 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µl einer Plasmidlösung hinzugefügt. Der Ansatz wurde in sterile Elektroporationsküvetten überführt und in einem Elektroporator für 5 ms einem Spannungsimpuls von 1.800 V ausgesetzt. Nach Ende des Impulses wurde 1 ml SOC-Medium hinzugefügt. Der Ansatz wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und für 1 Stunde bei 37 °C und 50 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden verschiedene Volumina auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

6.2.12 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein tiefgefrorenes Aliquot chemisch kompetenter Zellen wurde auf Eis lagernd aufgetaut. Nach Zugabe von 10 μ l eines Ligationsansatztes oder 1 μ l einer Plasmidlösung wurde die Suspension gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurde das Reaktionsgefäß für 90 Sekunden in einem Wasserbad einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt, anschließend 1-2 Minuten auf Eis gestellt und dann mit 800 μ l 37 °C warmem SOC-Medium versetzt. Der Ansatz wurde für 45 Minuten bei 37 °C und 50 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden verschiedene Volumina auf Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 μ g/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

6.2.13 DNA-Sequenzanalyse

Die Analyse der DNA-Sequenz wurde extern im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (BMFZ) durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden die Oligonukleotide AK001 bis AK014 oder der im BMFZ vorrätige T7II-Primer (Sequenz: 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') verwendet, der an der

Basensequenz der T7-Polymerase bindet. Die eigenen Primer binden jeweils 50-100 bp upstream der interessierenden Sequenz. Alle erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der Software Chromas Lite 2.0 ausgewertet.

6.3 Arbeiten mit Proteinen

6.3.1 Isolierung der Außenmembran von E. coli

Zur Außenmembranproteinisolierung wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hantke verwendet (Hantke 1981). Dabei wurde eine Hauptkultur der Zellen bis zu einer $OD_{578 \text{ nm}} = 0.6$ angezogen, anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit IPTG (siehe Kap. 6.1.2). Die Zellsuspension wurde bei 2.000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde zweimal mit Tris/HCI-Lösung 0,2 M (pH 8) gewaschen, bevor es in 1,5 ml dieser Lösung resuspendiert wurde. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl Saccharose-Lösung 1 M, 100 µl EDTA-Lösung 10 mM, 100 µl Lysozym 1% und 3,2 ml Reinstwasser. Während der anschließenden Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur bildeten sich Sphäroplasten. Diese wurden nun durch Zugabe von 50 µl PMSF 100 mM in Isopropanol, 10 µl Aprotinin 1% in HEPES 10 mM (pH 8), 5 ml Extraktionspuffer und 100 µl DNase 0,1% aufgeschlossen. Es folgte eine 25minütige Inkubation auf Eis, bevor bei 1.500 x g abzentrifugiert wurde. Das Sediment verworfen. der Überstand in ein Gefäß überführt. wurde neues Die Membranproteinfraktion wurde nun durch Zentrifugation bei 25.000 x g sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment kurz mit 2 ml n-Laurylsarcosinat-Na 1% in PBS gespült, aber nicht resuspendiert. Anschließend wurde erneut mit 25.000 x g zentrifugiert und mit 1 ml gewaschen. Das Sediment wurde abschließend in einer angemessenen Menge Probenpuffer für SDS-Gele resuspendiert. Je nach Verwendungszweck enthielt der Probenpuffer zusätzlich DTT um vorhandene Disulfidbrücken zu reduzieren (reduzierender Probenpuffer). Alle Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

6.3.2 Proteaseverdau als Nachweis der Oberflächenständigkeit von Proteinen

Proteine, die sich in der äußeren Membran von *E. coli* befinden und nach außen gerichtet sind, lassen sich durch Proteasen abbauen, die zu intakten Zellen dazu gegeben werden. Sind sie ins Periplasma gerichtet oder befinden sich im Cytosol, werden sie nicht

angegriffen, da Proteasen aufgrund ihrer Größe nicht ins Cytosol oder Periplasma eindringen können. Fehlen nach der Proteasebehandlung Protein-Banden im SDS-Gel, ist dies ein Indiz für Oberflächenständigkeit und erfolgreichen Transport mittels Autodisplay. Für den Proteaseverdau wurde dem Protokoll zur Isolierung der äußeren Membranproteine von *E. coli* (siehe Kap. 6.3.1) gefolgt, nach dem Waschen des Zell-Sediments mit Tris-Lösung jedoch ein Protease-Verdau eingeschoben. Dazu wurde das Sediment in 1 ml Tris/HCI-Lösung 0,2 M pH 8 resuspendiert und 50 µl Proteinase K 2%, gelöst in NaCl 0,9%, zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C und 50 rpm wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml FCS 10% in Tris 0,2 M/HCI pH 8 gestoppt. Es schloss sich ein zweimaliges Waschen mit derselben FCS-Lösung an, bevor das Protokoll zur Membranproteinisolierung mit der Lysozym-Zugabe weiter bis zum Ende befolgt wurde.

6.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden zur Untersuchung der enthaltenen Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dazu wurden 10%-ige oder 12,5%-ige Polyacrylamid-Trenngele gegossen (siehe Kap. 5.7.3). In diesem Konzentrationsbereich ist die Auftrennung der untersuchten Proteine optimal. Über die Trenngele wurden Sammelgele gegossen, um durch eine Fokussierung der Proteine schärfere Banden zu erreichen. Der Trennvorgang wurde bei einer Spannung von 100 V gestartet und auf 140 V gesteigert, nachdem die Proteine das Sammelgel verlassen hatten. Zum Größenvergleich wurde der "Page Ruler unstained" Protein-Größenstandard der Firma Fermentas verwendet. Diente das Gel im Anschluss für einen Western Blot, wurde an Stelle des "Page Ruler unstained" der vorgefärbte "Page Ruler prestained" Protein-Größenstandard der Firma Fermentas benutzt.

Nach Beendigung der SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele in einer Coomassie-Lösung für 30 Minuten gefärbt. Die anschließende Entfärbung wurde mittels Schütteln in 10%-iger Essigsäure über Nacht durchgeführt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe des Kamerasystems "Gel iX Imager" der Firma Intas.

6.3.4 Durchführung und Auswertung von Western-Blots

Um nach einer SDS-PAGE Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper gezielt zu markieren, wurden sie auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) transferiert. Die

Übertragung fand mit Hilfe von Gleichstrom in einer "semi-dry"-Apparatur statt. Für dieses Verfahren wurde die Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell der Firma Bio Rad eingesetzt.

Die PVDF-Membran wurde entsprechend der Größe des SDS-Gels zugeschnitten und eine Minute in Methanol eingelegt, anschließend zusammen mit dem SDS-Gel für 20 Minuten in Transferpuffer eingelegt. Ebenso wurden zwei dicke Filterpapiere in Transferpuffer getränkt. Der Zusammenbau der Apparatur erfolgte gemäß Anleitung in der Reihenfolge Kathode, getränktes Filterpapier, SDS-Gel, PVDF-Membran, getränktes Filterpapier. Filterpapier und PVDF-Membranen wurden von der Firma Bio Rad eingesetzt. Lufteinschlüsse wurden vermieden, um einen homogenen Stromfluss zu gewährleisten. Für den Transfer wurde anschließend für 60 Minuten ein maximaler Strom von 5,5 mA/cm² angelegt. Nach Abschalten des Stroms wurde die Membran über Nacht in TBS/3% BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach der Inkubation wurden 20 ml der Primärantikörper-Lösung (anti-hPH-20, siehe Kap. 5.8) zugegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 20 ml der Sekundärantikörper-Lösung (anti-Maus IgG, Peroxydase-gekoppelt, siehe Kap. 5.8) sowie weitere zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde erneut zweimal für 10 Minuten mit TBS/3% BSA gewaschen. Danach erfolgte ein finaler Waschschritt von 10 Minuten mit TBS.

Die Betrachtung des Western-Blots erfolgte mit dem Kamerasystem "Chemocam HR16", einem Chemolumineszenz-Imager der Firma Intas. Nach ausreichender Vorlaufzeit der Kamera-Kühlung auf -30 °C wurde die Membran in eine Kunststoffhülle überführt und der überschüssige Puffer entfernt. Die Substratlösung wurde durch Mischen von 25 µl Lösung A zu 1000 µl Lösung B des ECL Westen Blot Kits hergestellt, auf die Membran pipettiert und gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubation von 1 Minute wurde überschüssiges Substrat entfernt, die Membran samt Folie in den Chemoimager überführt und für jeweils 1 Minute und 15 Minuten belichtet. Zur Aufnahme des Markers erfolgte eine Belichtung unter Weißlicht für 30 ms.

6.4 Hyaluronsäure- und Hyaluronidaseanalytik

6.4.1 Photometrisches Testverfahren mit "stains-all"

Die Enzymlösung wurde auf die gewünschte Konzentration verdünnt (in der Regel 100 U/ml) und mit Inhibitor-Stammlösung versetzt, um verschiedene Inhibitor-

Zielkonzentrationen im Bereich von 25 μ M bis 100 μ M zu erreichen. Das Inhibitor/Enzym-Gemisch wurde eine Stunde bei 37 °C vorinkubiert. Für jede Inhibitorkonzentration wurde eine Positivkontrolle mit reinem DMSO ohne Inhibitor angesetzt sowie eine einzelne Negativkontrolle mit dem verwendeten Puffer an Stelle von Enzymlösung. Anschließend wurden die Mischungen mit dem gleichen Anteil Substratlösung pH 7 oder pH 3,5 versetzt und 25 μ I zur Messung des Nullwertes auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Die erreichten DMSO-Endkonzentrationen lagen damit während der Enzymreaktion zwischen 0,13% und 1% für Inhibitorkonzentrationen zwischen 25 μ M und 100 μ M. Nach Zugabe von 112,5 μ I Färbelösung und 62,5 μ I Reinstwasser erfolgte die Messung der Absorption im Mikrotiterplattenreader bei 650 nm.

Die Substrat/Enzym-Lösungen wurden bei 37 °C für einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen ebenfalls auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und wie die Nullwerte vermessen. Die Enzymaktivitäten der Positivkontrollen mit reinem DMSO ohne Inhibitorzusatz wurden als 100% gerechnet. Die Aktivitäten der mit Inhibitor versetzten Enzymlösungen wurden bei jeder getesteten Konzentration dann entsprechend folgender Formel berechnet:

Enzymaktivität [%] = (($A_{Inhibitor} - A_{Nullwert(Inh)}$) / ($A_{Positivkontrolle} - A_{Nullwert(Pos)}$)) x 100 Beim Einsatz ganzer Zellen statt des gereinigten Enzyms wurde die induzierte Zellsuspension zunächst auf OD_{578 nm} = 10 eingestellt. Je nach gewünschter Messung wurde sie entweder mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7 oder 0,1 M Ameisensäure-Puffer pH 3,5 gewaschen und in derselben Menge des Puffers resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für Messungen bei pH 7 auf eine NaCl-Konzentration von 20 mM eingestellt, um den Hyaluronidase-aktivierenden Effekt des NaCl auszunutzen. Die anschließende Verwendung entsprach der gereinigten Enzymlösung. Nach der Enzymreaktion wurden die ganzen Zellen sedimentiert und 25 µl des Überstands auf die Mikrotiterplatte aufgetragen.

6.4.2 Photometrisches Testverfahren mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)

Die Enzymlösung wurde auf die gewünschte Aktivität verdünnt und mit Inhibitor-Stammlösung in reinem DMSO versetzt, um verschiedene Inhibitor-Zielkonzentrationen im Bereich von 25 µM bis 100 µM zu erreichen. Das Inhibitor/Enzym-Gemisch wurde eine Stunde bei 37 °C vorinkubiert. Für jede Inhibitorkonzentration wurde eine Positivkontrolle wurde mit reinem DMSO ohne Inhibitor angesetzt sowie eine einzelne Negativkontrolle mit dem verwendeten Puffer an Stelle von Enzymlösung. 100 µI BSA-Lösung, 150 µI Reinstwasser, 50 µl des Inhbitor/Enzym-Gemisches und je nach verwendetem pH-Wert 100 µl Ameisensäure- oder Phosphat-Citrat-Puffer wurden gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl HA-Lösung 5 mg/ml gestartet. Die erreichten DMSO-Endkonzentrationen lagen damit während der Enzymreaktion zwischen 0,25% und 1% für Inhibitorkonzentrationen zwischen 25 µM und 100 µM. Direkt nach dem Start wurden für den Nullwert Proben zu je 45 µl abpipettiert, mit 10 µl Borsäurelösung versetzt und für 4,5 Minuten auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurde die erhitzte Lösung auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte auf Eis gelagert.

Die Substrat/Enzym-Lösungen wurden bei 37 °C für einen Zeitraum von 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden ebenfalls Proben zu je 45 µl abpipettiert und wie die Nullwerte behandelt. Nach dem Auftragen auf die Mikrotiterplatte wurde alle Proben mit 300 µl Färbelösung versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 590 nm mittels Mikrotiterplattenreader. Die Enzymaktivitäten der Positivkontrollen mit reinem DMSO ohne Inhibitorzusatz wurden als 100% gerechnet. Die Aktivitäten der mit Inhibitor versetzten Enzymlösungen wurden dann entsprechend folgender Formel berechnet:

Aktivität [%] = ((A_{Inhibitor} – A_{Nullwert(Inh)}) / (A_{Positivkontrolle} - A_{Nullwert(Pos)})) x 100 Beim Einsatz ganzer Zellen an Stelle von gereinigtem Enzym wurde die induzierte Zellsuspension zentrifugiert und je nach gewünschter Messung entweder mit Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 oder Ameisensäure-Puffer pH 3,5 gewaschen und mit demselben Puffer auf eine OD von 40 eingestellt. Die anschließende Verwendung entsprach der gereinigten Enzymlösung. Vor der Zugabe von Borsäure wurden die ganzen Zellen jeder Probe sedimentiert und der Überstand weiterverwendet.

6.4.3 Hyaluronsäureanalytik mittels HPLC

Die Enzymlösung wurde mit Ameisensäure-Puffer pH 3,5 oder Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 auf 200 U/ml verdünnt und mit Inhibitor-Stammlösung versetzt, um die gewünschte Inhibitorkonzentrationen zu erreichen. Diese lag, wenn nichts anderes angegeben ist, bei 50 µM. Das Inhibitor/Enzym-Gemisch wurde eine Stunde bei 37 °C vorinkubiert. Eine Positivkontrolle wurde mit DMSO ohne Inhibitor angesetzt.

Die Enzymreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml Enzymlösung zu je 2 ml Substratlösung gestartet. Die Proben wurden mit NaCl auf eine Konzentration von 75 mM eingestellt, um den Hyaluronidase-aktivierenden Effekt von NaCl auszunutzen. Für den Nullwert wurden nach dem Mischen sofort 500-750 µl Lösung entnommen und aufgereinigt. Dies ist nötig, da Ansätze mit HA je nach Inkubationszeit der Hyaluronidasen

größere Mengen hochmolekularer HA enthalten, die vor der Untersuchung mittels HPLC abgetrennt werden müssen um Säulen und Ventile zu schonen. Zudem kann durch die Aufreinigung das Enzym abgetrennt und dadurch die Enzymaktivität gestoppt werden, ohne die Probe aufheizen zu müssen. Beim Aufheizen könnte HA hydrolytisch gespalten werden und zu einer Verfälschung der Messwerte führen. Zur Aufreinigung wurden die Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 500 der Firma Sartorius Vivascience eingesetzt. Die Röhrchen hatten ein Volumen von 500 µl und einen Größenausschluss von 10 kDa. Bis zu mehreren ml Ansatz konnten durch parallele oder aufeinanderfolgende Zentrifugation bei 15.000 x g aufgereinigt werden. Die Dauer der Zentrifugation variierte dabei zwischen 20 und 60 Minuten je nach Viskosität der Lösung. Der Durchfluss wurde anschließend als Probe für die HPLC eingesetzt. Das restliche Enzym/Substrat-Gemisch wurde bei 37 °C inkubiert. Jeweils nach 24 und 48 Stunden wurden Proben entnommen und auf dieselbe Weise für die HPLC vorbereitet.

Die Trennung erfolgte bei 40 °C auf einer NH₂-Säule (200 x 4,6 mM, 5 µM) der Firma Hewlett-Packard (Modell HP79915AP). Als Fließmittel wurden 16 mM und 800 mM NaH₂PO₄-Lösung verwendet. Die Trennung erfolgte mittels linearer Gradientenelution beginnend bei 100% NaH₂PO₄-Lösung 16 mM bis zu 100% NaH₂PO₄-Lösung 800 mM innerhalb von 60 Minuten und einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 210 nm. Zur Auswertung wurden die Peakflächen der HA-Fragmente ermittelt, für jede Probe addiert und der Quotient aus den Peakflächen von Positivkontrolle und Proben gebildet. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte gemäß der Formel:

Aktivität [%] = (EA-Peakflächen_{Inhibitor} / AA-Peakflächen_{Positivkontrolle}) x 100

7 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

7.1 Entwicklung von Testverfahren zur Enzymaktivitätsmessung

7.1.1 Photometrisches Testverfahren mit "stains-all" bei pH 7

Ausgehend von den Originalprotokollen des auf Anfärbung der hochmolekularen HA-Fragmente mittels "stains-all" basierenden Testverfahrens (Benchetrit *et al.* 1977; Homer *et al.* 1993a), sollte durch Variation einfacher Parameter wie "stains-all"-Konzentration, Volumen an Färbelösung und Wasser sowie der Pufferkonzentration eine möglichst maximale Sensitivität und minimale Störanfälligkeit gegenüber Schwankungen beim pH-Wert sowie gegenüber Proteinzusätzen erreicht werden. Die Methode sollte in Mikrotiterplatten und mit Zellen in Form eines Ganzzell-Testverfahrens zum Einsatz kommen.



Abbildung 6: Strukturformel des Farbstoffs "stains-all" (4,5,4',5'-dibenzo-3,3'-diethyl-9-methyl-thiacarbocyaninbromid).

Nach Homer *et al.* (1993a) wurde der Farbstoff "stains-all" (Abbildung 6) in einem 1:1 Gemisch von Dioxan/Wasser gelöst und zur untersuchten Lösung gegeben. Anschließend wurde eine geringe Menge Wasser hinzugefügt, die bei Anwesenheit von HA zu einem zusätzlichen Auftreten eines Absorptionsmaximums bei einer Wellenlänge von 654 nm führt. Ursache des Auftretens dieses als "J-Bande" bezeichneten zusätzlichen Absorptionsmaximums ist eine Bindung des positiv geladenen "stains-all" an negativ geladene Makromoleküle (Sharma *et al.* 1989). Der Mechanismus für die Entstehung bzw. die Verschiebung des Absorptionsmaximums ist von vielen Faktoren abhängig, u.a. vom Volumen des nachträglich zugefügten Wassers, und ist nicht im Detail verstanden (Edstrom und Koenst 1973). Die Lösung färbt sich blau, wobei die Intensität der Färbung linear von der HA-Konzentration abhängig ist.

Bevor die Methode entsprechend optimiert werden konnte, wurde zunächst mittels Photometer das Protokoll der Methode im ml-Maßstab geprüft, um das Messprinzip zu bestätigen. Dazu wurden 100 µl HA-Lösung (0,11 mg/ml) mit 100 µl Rinderhyaluronidase (BTH) (100 U/ml) versetzt und zu verschiedenen Zeiten (0, 10, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten) Proben genommen. Die Proben wurden mit 900 µl Färbelösung und 500 µl Wasser versetzt. Abbildung 7 zeigt die erhaltenen Absorptionsspektren.



Abbildung 7: Absorptionsspektren von HA nach Inkubation mit BTH und Anfärbung mit "stains-all" nach Homer et al. (1993a). Es wurden eingesetzt: 100 µl BTH (100 U/ml), 100 µl HA (0,1 mg/ml), 900 µl "stains-all"-Lösung und 500 µl Wasser. Die Inkubationszeiten betrugen (a) 0 Minuten, (b) 10 Minuten, (c) 20 Minuten, (d) 30 Minuten, (e) 90 Minuten und (f) 120 Minuten.

Der lineare Zusammenhang zwischen der Absorption bei 654 nm und der BTH-30 Konzentration innerhalb der ersten Minuten war bereits mit bloßem Auge zu erkennen. Damit war das Messprinzip erfolgreich getestet worden und wurde nun auf die Größe von Mikrotiterplatten skaliert. Zur Verwendung kamen klare Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und flachem Boden, um auch bei unterschiedlichen Messpositionen immer eine gleich hohe Schichtdicke der Lösung zu gewährleisten. Da grundsätzlich Messungen mit Zellen über mehrere Tage möglich sein sollten, wurden die Platten zusätzlich steril gewählt.

Homer *et al.* (1993a) passten die Messmethode ebenfalls an die Größe von Mikrotiterplatten an. Nach ihren Bedingungen wären die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit ca. 300 µl Flüssigkeit voll befüllt worden. Um auch bei schnellen Schüttelbewegungen im Mikrotiterplattenreader keine Flüssigkeit aus den Vertiefungen herauszuschleudern, sollten diese aber maximal mit 200 µl Flüssigkeit befüllt werden. Die Menge an Färbelösung und Wasser wurde daher auf 25 µl Probe (HA-Lösung), 112,5 µl Färbelösung ("stains-all"-Lösung) und 62,5 µl Wasser verringert. Zudem verwendeten Homer *et al.* 620 nm als Messwellenlänge, die vom Absorptionsmaximum bei 654 nm

relativ weit entfernt lag. Für die Optimierung des Testverfahrens wurde daher stattdessen eine Messwellenlänge von 650 nm verwendet. Abbildung 8 zeigt den schematischen Ablauf des "stains-all" Testverfahrens bei pH 7. Dabei wurden Phosphatpuffer pH 7, HA-Lösung und Hyaluronidase-Lösung gemischt und bei 37 °C inkubiert. Zu festgelegten Zeiten wurden Proben entnommen und auf die Mikrotiterplatte übertragen. Nach Zugabe von "stains-all"-Lösung und Wasser erfolgte die Messung bei 650 nm.



Abbildung 8: Schematischer Ablauf des "stains-all" Testverfahrens bei pH 7. Phosphatpuffer pH 7, HA-Lösung und Hyaluronidase wurden gemischt und bei 37 °C inkubiert. Zu festgelegten Zeiten wurden Proben entnommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe von "stainsall"-Lösung und Wasser erfolgte die Messung der Absorption bei 650 nm.

Für eine Optimierung sollten die Bedingungen für eine möglichst hohe Sensitivität untersucht werden. Dazu wurden die Parameter "stains-all"-Konzentration, Volumen Färbelösung, Volumen Wasser sowie Pufferkonzentration variiert (Tabelle 13). Als Testlösungen wurden HA-Lösungen von 0,5 bis 3 mg/ml hergestellt. Als Maß für die Sensitivität wurde bei linearem Zusammenhang der Absorptionsunterschied zwischen der Lösung mit 0,5 mg/ml und 3 mg/ml HA verwendet. Die erhaltenen Messwerte sind in den Abbildungen 7 bis 10 dargestellt. Alle Messungen erfolgten dreifach und die Standardabweichungen lagen in allen Fällen jeweils unter 5%.

Wie zu erkennen ist, hat ein Wechsel der Pufferkonzentration und damit auch der lonenstärke von 0,05 M und 0,2 M Phosphatpuffer keinen Einfluss auf die Sensitivität oder Linearität (Abbildung 9). Nur reines Wasser, das keine Pufferkapazität besitzt, wirkte sich ungünstig auf die Sensitivität aus. Da es allgemein günstig ist, einen Puffer mit ausreichend hoher Stärke zu verwenden, um insbesondere nach Zusatz von schlecht aufgereinigter Enzymlösungen eine Abweichung des pH-Wertes zu vermeiden, wurde der Puffer mit der höchsten Konzentration (0,2 M) als beste Bedingung ausgewählt. Alle weiteren Versuche wurden nun mit dieser Pufferkonzentration durchgeführt.



Abbildung 9: Einfluss der Pufferkonzentration auf die Absorption von HA-haltigen Lösungen nach Anfärben mit "stains-all". HA-Lösungen der Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 3 mg/ml wurden mit Phosphatpuffer pH 7 verschiedener Konzentration angesetzt und nach Zugabe von 112,5 μ l "stains-all"-Lösung und 62,5 μ l Wasser bei 650 nm vermessen. **=**: Wasser, **\equiv**: 0,05 M Phosphatpuffer, **\epsilon**: 0,2 M Phosphatpuffer.

Das zugesetzte Volumen an Färbelösung hatte einen erheblichen Einfluss auf die Linearität und einen etwas geringeren auf die Sensitivität (Abbildung 10). Bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml waren alle drei Konzentrationen im linearen Bereich, doch änderte sich dies bei 3 mg/ml HA. Ein Zusatz von 225 µl "stains-all"-Lösung, wie von Homer *et al.* (1993a) vorgeschlagen, führte unter diesen Bedingungen reproduzierbar zu keinem weiteren Anstieg der Absorption bei einer Konzentration von 3 mg/ml. Trotz der größeren Menge an "stains-all"-Lösung kam es bei keiner der untersuchten HA-Konzentrationen zu einer stärkeren Färbung als nach Zugabe von 112,5 µl. Der stärkeren Färbung wirkten wahrscheinlich Verdünnungseffekte entgegen, die insgesamt zu einer schwächeren Absorption führten. Die Verwendung einer geringeren Menge an "stains-all"-Lösung von 56 µl zeigte dagegen einen Verlust an Sensitivität. Die zu Beginn gewählte Menge von 112,5 µl stellte sich also als bereits gut geeignet heraus.

In Bezug auf das zugesetzte Wasservolumen, das nach der "stains-all"-Lösung der Probe zur erfolgreichen Färbung zugefügt werden muss, zeigten die Messungen keine Unterschiede in der Sensitivität oder Linearität. Getestet wurde die Zugabe von 31 µl, 62,5 µl oder 125 µl Wasser (Abbildung 11). Das zunehmende Volumen an Wasser führte zu keinem Verdünnungseffekt und damit zu keiner Abnahme der Absorption. Ursache für dieses zunächst überraschende Verhalten ist die Zunahme der Absorption der J-Bande bei 654 nm (stärkere Blaufärbung), die durch vermehrte Zugabe von Wasser ausgelöst wird und dem Verdünnungseffekt entgegenwirkt. Beide Effekte scheinen sich im getesteten Bereich der Zugabe von 31 bis 125 µl Wasser gegenseitig aufzuheben.



Abbildung 10: Einfluss des Volumens zugesetzter "stains-all"-Lösung auf die Absorption von HA-haltigen Lösungen. HA-Lösungen der Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 3 mg/ml wurden mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 angesetzt und nach Zugabe verschiedener Volumina "stains-all"-Lösung (56 mg/l) und 62,5 µl Wasser bei 650 nm vermessen. ▲: 56 µl "stains-all"-Lösung, ◆: 112,5 µl "stains-all"-Lösung, ■: 225 µl "stains-all"-Lösung.



Abbildung 11: Einfluss des Volumens an zugesetztem Wasser auf die Absorption von HAhaltigen Lösungen nach Färbung mit "stains-all". HA-Lösungen der Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 3 mg/ml wurden mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 angesetzt und nach Zugabe von 112 µl "stains-all"-Lösung (56 mg/l) und verschiedenen Mengen Wasser bei 650 nm vermessen. ▲: 31 µl Wasser, ♦: 62,5 µl Wasser, ■: 125 µl Wasser.

Als weiterer Parameter sollte der Einfluss der Konzentration der "stains-all"-Lösung geprüft werden. Dazu wurde eine Lösung mit doppelter Konzentration (112 mg/l) hergestellt, aber das gleiche Volumen von 112,5 µl den Proben zugesetzt, das sich bereits als gut geeignet erwiesen hatte. Hintergedanke war, dass die Sensitivität durch stärkere Färbung evtl. deutlich gesteigert werden könnte. Tatsächlich ergab sich bei Verwendung der doppelt konzentrierten Färbelösung eine erheblich größere Absorptionsänderung von 0,5 mg/ml HA auf 2 mg/ml (Abbildung 12). Im Anschluss kam es jedoch zu einem Verlust an Linearität und keinem weiteren Absorptionsanstieg. Da das "stains-all"-Testverfahren bei einer Gesamtkonzentration von 2 mg/ml HA durchgeführt

werden sollte, erschien dieser Verlust an Linearität bei 3 mg/ml von geringerer Bedeutung als der Gewinn an Sensitivität im Bereich von 0,5 bis 2 mg/ml. Die "stains-all"-Lösung mit einer Konzentration von 112 mg/ml "stains-all" kann somit als optimalere Zusammensetzung angesehen werden. Alle getesteten Parameter sowie die als optimal identifizierten Bedingungen sind in Tabelle 13 zusammengefasst.



Abbildung 12: Einfluss der Konzentration zugesetzter "stains-all"-Lösung auf die Absorption von HA-haltigen Lösungen. HA-Lösungen der Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 3 mg/ml wurden mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 angesetzt und nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung mit einer Konzentration von 56 mg/l bzw. 112 mg/l und 62,5 µl Wasser bei 650 nm vermessen. ♦: 56 mg/l "stains-all"-Lösung, ■: 112 mg/l "stains-all"-Lösung,.

Tabelle 13: Getestete Parameter und ihre Bedingungen für das "stains-all" Testverfa	hren.
---	-------

Getesteter Parameter	Getestete Bedingungen
Pufferkonzentration	0,2 M ¹⁾ ; 0,1 M; 0,05 M; 0 M (Wasser);
Volumen Färbelösung	56 μΙ; 112,5 μΙ ¹⁾ ; 225 μΙ;
Volumen Wasser	31,5 μΙ; 62,5 μΙ ¹⁾ ; 125 μΙ;
"stains-all"-Konzentration	56 mg/l; 112 mg/l ¹⁾ ;

¹⁾ optimale Bedingungen

Als nächstes sollte geprüft werden, wie stabil sich das Testverfahren gegen Einflüsse von Proteinen und anderen Bestandteilen aus Medien und Ganzzell-Suspensionen verhält. Um eine Störung durch Proteine sowie andere Zell- und Medien-Bestandteile zu simulieren, wurde HA statt mit reinem Wasser mit einer Zellsuspension von *E. coli* BL21(DE3) in LB-Medium angesetzt. Die Zellsuspension hatte eine optische Dichte von $OD_{578 \text{ nm}} = 1$. Um Effekte der Zellsuspension auf die Absorption bei 650 nm zu berücksichtigen, wurde eine gleich behandelte Suspension als Kontrolle verwendet. Auch

wenn bei späteren Messungen mit ganzen Zellen ein störender Einfluss durch vorherige Zentrifugation und Benutzung des klaren Überstandes minimiert werden sollte, wurde zur Optimierung bewusst ein möglichst maximaler Einfluss simuliert.

Durch die zugesetzten Zellen verringerte sich die Absorption bei allen getesteten HA-Konzentrationen deutlich. Der Effekt war sowohl bei einer Verringerung als auch bei einer Erhöhung der Menge der zugesetzten Färbelösung noch stärker ausgeprägt (Abbildung 13). Auch der Einfluss der Wassermenge, die nach der Färbelösung dem Ansatz hinzugefügt werden muss, hatte jetzt einen größeren Einfluss. Die vorab gewählte Menge von 62,5 µl erwies sich erneut als optimal, da der Unterschied zwischen den Absorptionswerten nach Zugabe von "stains-all" zu 0,5 mg/ml HA und zu 2 bzw. 3 mg/ml HA am größten war (Abbildung 14). Dies entsprach einer möglichst großen Sensitivität.

Eine Messung bei Verwendung der einfach konzentrierten Färbelösung (56 mg/l "stainsall"), wie sie sowohl von Benchetrit *et al.* (1977) als auch von Homer *et al.* (1993a) eingesetzt wurde, war nicht möglich und führte zu einem kompletten Verlust an Sensitivität (Abbildung 15). Nur bei Verwendung der verdoppelten "stains-all"-Konzentration von 112 mg/l war eine Messung möglich.

Die besten getesteten Bedingungen wurden in Tabelle 13 markiert und in das in Kapitel 6.4.1 aufgeführte Protokoll übernommen. Sie wurden im Folgenden für alle Messungen mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens bei pH 7 herangezogen.



Abbildung 13: Einfluss des Volumens zugesetzter "stains-all"-Lösung auf die Absorption einer HA-haltigen Zellsuspension. HA-Lösungen der Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 3 mg/ml wurden mit einer Zellsuspension von *E. coli* BL21(DE3) in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 (OD_{578 nm} = 1) angesetzt und nach Zugabe von 56 µl, 112,5 µl oder 225 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser bei 650 nm vermessen. ▲: 56 µl "stains-all"-Lösung, ◆: 112,5 µl "stains-all"-Lösung, ■: 225 µl "stains-all"-Lösung.


Abbildung 14: Einfluss des Volumens an zugesetztem Wasser auf die Absorption einer HAhaltigen Zellsuspension nach Anfärbung mit "stains-all". HA-Lösungen der Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 3 mg/ml wurden mit einer Zellsuspension von *E. coli* BL21(DE3) in 0,2 M Phosphatpuffer (OD_{578 nm} = 1) angesetzt und nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und verschiedenen Mengen Wasser bei 650 nm vermessen. ■: 125 µl Wasser, ♦: 62,5 µl Wasser, ▲: 31 µl Wasser.

Alle bisherigen Messungen erfolgten mit reinen HA-Lösungen ohne Enzym. Als nächster Schritt sollte nun der Abbau der HA durch BTH verfolgt werden und die optimale Menge an BTH für die Methode ermittelt werden. Dazu wurde BTH zu Konzentrationen von 0 bis 200 U/ml gemäß dem Protokoll in Kapitel 6.4.1 verdünnt und jeweils nach Inkubationszeiten von 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 105 und 120 Minuten vermessen (Abbildung 16).



Abbildung 15: Einfluss der Konzentration der "stains-all"-Lösung auf die Absorption einer HA-haltigen Zellsuspension. HA-Lösungen der Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml und 3 mg/ml wurden mit einer Zellsuspension von *E. coli* BL21(DE3) in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 (OD_{578 nm} = 1) angesetzt und nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung mit den Konzentrationen 56 mg/l bzw. 112 mg/l und 62,5 µl Wasser bei 650 nm vermessen. ◆: 56 mg/l "stains-all"-Lösung.



Abbildung 16: BTH-Aktivitätsmessung bei pH 7 für verschiedene BTH-Konzentrationen mittels "stains-all" Testverfahren. Enzymlösungen unterschiedlicher Konzentration von 0 U/ml bis 200 U/ml BTH in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 wurden mit 2 mg/ml HA versetzt, bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 112,5 μ l "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 μ l Wasser bei 650 nm vermessen. \blacksquare : 0 U/ml BTH, \blacklozenge : 12,5 U/ml BTH, \blacktriangle : 25 U/ml BTH, \Box : 50 U/ml, \diamondsuit : 100 U/ml BTH, \triangle : 200 U/ml BTH.

Während des Tests war eine stetige Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit zu beobachten (Abbildung 16). Besonders gut zu erkennen ist dies bei der Probe mit 50 U/ml BTH, nach ca. 30 Minuten nimmt die Absorptionsänderung pro Zeiteinheit zunehmend ab. Dies ist auf die Besonderheit der Hyaluronidasen zurückzuführen, dass die Produkte ihrer Enzymreaktionen ebenfalls wieder Substrate darstellen, bis eine minimale Größe des HA-Fragments erreicht wurde. Für BTH wäre dies das Hexasaccharid. Durch die stetige Zunahme kürzerer Fragmente, die ähnlich kompetitiven Inhibitoren mit der langkettigen HA um Bindung am Enzym konkurrieren, werden die längeren HA-Fragmente immer langsamer abgebaut. Da "stains-all" nur langkettige Fragmente anzufärben vermag, scheint mit der Zeit die Reaktionsgeschwindigkeit abzunehmen. In Wirklichkeit nimmt die Umsetzung der langkettigen HA ab, allerdings nur nicht jedoch die Gesamtgeschwindigkeit der Enzymaktivität. Es wird deutlich, dass genau genommen Angaben zur Enzymkinetik der Hyaluronidasen nur in Bezug auf ausgewählte Fragmente gemacht werden können.

Ein linearer Absorptionsabfall konnte für eine BTH-Aktivität von 12,5 U/ml bis 120 Minuten, für 25 U/ml bis 90 Minuten, für 50 U/ml bis 30 Minuten und für 100 U/ml bis 10 Minuten beobachtet werden. Die Absorptionen bewegten sich dabei in einem Bereich von 1 bis 2,5 Absorptionseinheiten. Bei Werten unter 1 wird offenbar der lineare Bereich verlassen und die Absorptionen streben einer minimalen Absorption von etwa 0,3 AE entgegen. Die Steigungen der Ausgleichsgeraden durch die ersten drei Messpunkte nach 0, 5 und 10 Minuten wurden gegen die eingesetzten Enzymkonzentrationen von 0 bis 100 U/ml BTH aufgetragen. Es ergab sich ein linearer Zusammenhang, der durch Anlegen einer Ausgleichsgerade mit einem Regressionskoeffizienten von 0,99 bestätigt werden konnte. Dieser lineare Zusammenhang bestätigt die Verwendbarkeit des Testverfahrens in diesem Bereich für quantitative Messungen (Abbildung 17).

Da eine kürzere Inkubationszeit immer einer längeren vorzuziehen ist, eine Messung innerhalb von 10 Minuten jedoch bei vielen parallelen Ansätzen schwierig durchführbar ist, wurde eine Konzentration von 50 U/ml und eine Messdauer von 30 Minuten als optimal angesehen und für Inhibitor-Messungen verwendet. Da die Linearität für diesen Bereich gezeigt werden konnte, wurde das Messverfahren aus Praktikabilitätsgründen im Folgenden als Endpunktbestimmung nach 30 Minuten durchgeführt. Unter den angegebenen Standard-Bedingungen (50 U/ml BTH, 2 mg/ml HA, pH 7) verringerte sich die Absorption durchschnittlich um 43,4 mAE (milli Absorptions-Einheiten) pro Minute. Da bei jedem Messdurchgang zusätzlich eine interne Kontrolle ohne Inhibitor-Zusatz verwendet wurde, war eine exakte Einhaltung der 50 U/ml jedoch nicht unbedingt erforderlich, solange die Messwerte im linearen Absorptionsbereich zwischen 1 und 2,5 blieben.



BTH-Aktivität [U/ml]

Abbildung 17: Zusammenhang zwischen mittlerer Absorptionsänderung über 10 Minuten und der BTH-Konzentrationen im "stains-all" Testverfahren bei pH7. Die mittleren Absorptionsänderungen bei 650 nm über 10 Minuten der in Abbildung 15 dargestellten Aktivitätsmessungen von 0 U/ml bis 100 U/ml wurden ermittelt und gegen die eingesetzte BTH-Konzentrationen aufgetragen. Der lineare Regressionskoeffizient der erhaltenen Ausgleichsgerade betrug 0,99.

7.1.2 Photometrisches Testverfahren mit "stains-all" bei pH 3,5

alle humanen Hyaluronidasen im sauren pH-Bereich Da aktiv sind, sind Aktivitätsmessungen auch bei pH 3,5 sinnvoll. Färbelösungen von "stains-all" verlieren jedoch bei pH-Werten kleiner 4 sehr schnell ihre Farbe, möglicherweise durch Protonierungen ihres Ringsystems und nachfolgender Zerstörung des Chromophors. Um dies zu bestätigen wurde "stains-all"-Lösung mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Tatsächlich kam es zu einer völligen Entfärbung der Lösung. Darüber hinaus ergaben Messungen der Absorption einer HA-Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 nach einer Anfärbung mit "stains-all"-Lösung nach den Bedingungen von Homer et al. (1993a) einen Wert von nur ca. 0,4 Absorptionseinheiten (AE) im Vergleich zu 1,8 AE in Phosphatpuffer pH 7. Es sollte nun geprüft werden, ob durch die optimierten Bedingungen mit verdoppelter Konzentration der "stains-all"-Lösung auf 112 mg/l auch eine verringerte Störanfälligkeit gegen Abweichungen des pH-Wertes in den sauren Bereich erreicht wurde. Dazu erfolgten Messungen unter den zuvor als optimal ermittelten Bedingungen mit einer Konzentration von 112 mg/l "stains-all" in der Färbelösung. Tatsächlich konnten bessere Werte von ca. 1,6 AE im Ameisensäure-Puffer bei pH 3.5 gemessen werden. Diese waren zwar geringer als bei pH 7, doch ausreichend für Messungen der Enzymaktivität (Abbildung 18). Die Messungen zeigten, dass die BTH bei pH 3,5 eine deutlich höhere Aktivität aufwies als bei pH 7, so dass geringere BTH-Konzentrationen von 6,25 U/ml, 12,5 U/ml und 25 U/ml über einen Zeitraum von 0, 15, 30 und 60 Minuten eingesetzt wurden. Soweit es aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten gesagt werden konnte, schien die Umsetzung von 1,6 bis unter 0,4 AE linear zu verlaufen. Da zwischen Mischen von HA- mit BTH-Lösung und der Zugabe der "stainsall"-Lösung bereits Enzymaktivität einsetzt, liegen die Absorptionswerte der BTH-Konzentrationen von 12,5 U/ml und 25 U/ml bereits zu Beginn niedriger als der Absorptionswert von 6,25 U/ml BTH. Da sich bei einer Konzentration von 25 U/ml BTH diese Aktivität am stärksten bemerkbar macht, ist der Absorptionsunterschied bei dieser Konzentration am größten. Dieser Effekt tritt bei pH 7 nicht in Erscheinung, da die Enzymaktivität von BTH im neutralen Bereich deutlich niedriger liegt (Muckenschnabel et al. 1998).

Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Erhöhung der Konzentration an "stains-all" in der Färbelösung nicht nur die negativen Effekte von Verunreinigungen minimiert, sondern auch die Unempfindlichkeit gegen pH-Wert-Änderungen in den sauren Bereich optimiert werden konnte. Bei einer Konzentration von 6,25 U/ml erreichte BTH in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 eine Absorptionsänderung von 25,1 mAE pro Minute.



Abbildung 18: BTH-Aktivitätsmessung bei pH 3,5 für verschiedene BTH-Konzentrationen mittels "stains-all" Testverfahren. Enzymlösungen mit BTH-Aktivitäten von 6,25 U/ml, 12,5 U/ml und 25 U/ml BTH in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 wurden mit 2 mg/ml HA versetzt, bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser bei 650 nm vermessen. ♦: 6,25 U/ml BTH, ■: 12,5 U/ml BTH, ▲: 25 U/ml BTH.

7.1.3 Photometrisches Testverfahren mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)

Eine häufig eingesetzte photometrische Methode für die Messung von Hyaluronidase-Aktivität stellt das auf DMAB basierende Morgan-Elson Testverfahren dar. Obwohl dieser Test bereits 1955 von Reissig *et al.* publiziert sowie von verschiedenen Autoren eingesetzt und weiterentwickelt wurde (Ingham *et al.* 1979; Hamai *et al.* 1989; Muckenschnabel *et al.* 1998), wird sein Einsatz im Mikrotiterplattenformat bisher in der Literatur lediglich in einem Nebensatz erwähnt (Salmen *et al.* 2005). Im Unterschied zum "stains-all" basierten Testverfahren, das nur den Nachweis langkettiger HA-Moleküle erlaubt, können mit dem Morgan-Elson Testverfahren nur die kurzkettige Fragmente nachgewiesen werden. Aus diesem Grund erschien es lohnenswert, diesen Test als Ergänzung zum "stains-all" Testverfahren in der Mikrotiterplatte bei pH 7 und pH 3,5 zu nutzen.

Das Prinzip der Messung beruht auf dem Nachweis reduzierender Zucker. Beim Abbau von HA durch BTH oder humane Hyaluronidasen entstehen Fragmente mit N-Acetylglucosamin als endständigem Zucker. Dieser kann spontan von seiner Pyranosid-Form in die Furanosid-Form wechseln. Unter alkalischen Bedingungen, die durch Zugabe von KOH erreicht werden, sowie hohen Temperaturen um 100 °C findet eine sogenannte Morgan-Elson-Reaktion statt. Als Ergebnis entstehen verschiedene chromogene Substanzen, wie 3-Acetamid-5-(1,2-dihydroxy-ethyl)furan (Abbildung 19, A). Dieses kann

unter sauren Bedingungen durch Reaktion mit DMAB ein rot-gefärbtes Produkt bilden (Abbildung 19, B), das ein Absorptionsmaximum bei 585 nm aufweist.

Als Ausgangspunkt für ein Protokoll wurden die von Reissig *et al.* (1955) und Muckenschnabel *et al.* (1998) gewählte Durchführung sowie die angegebenen Mengen auf die Größe von Mikrotiterplatten skaliert. Dazu wurden 100 µl BSA-Lösung, 150 µl Reinstwasser, 50 µl der Enzymlösung und je nach verwendetem pH-Wert 100 µl Ameisensäure- pH 3,5 oder Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl HA-Lösung (5 mg/ml) gestartet. Als Probe wurde von diesem Ansatz 45 µl vermessen. Um die Morgen-Elson-Reaktion zu starten, wurden 10 µl Borsäure in KOH hinzugegeben und die Probe für 4,5 Minuten auf 100 °C erhitzt. Die Färbung erfolgte dann durch Zugabe von 300 µl DMAB-Lösung in einem Gemisch von konzentrierter Salz- und Essigsäure. Die Farbentwicklung setzte nach wenigen Minuten ein und soll nach 20 Minuten maximal sein (Reissig *et al.* 1955), deshalb erfolgte die Messung nach genau dieser Entwicklungszeit. Gemessen wurde mit einer Wellenlänge von 590 nm. Abbildung 20 zeigt den Ablauf des Tests schematisch.



Abbildung 19: Vorgeschlagener Reaktionsablauf während des Morgan-Elson Testverfahrens nach Muckenschnabel *et al.* (1998). Der endständige Zucker der HA-Fragmente reagiert in seiner furanoiden Form in einer Morgan-Elson-Reaktion u.a. zum 3-Acetamid-5-(1,2-dihydroxy-ethyl)furan (A), das wiederum mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB) zu einem roten Farbstoff (B) mit einem Absorptionsmaximum bei 585 nm weiterreagiert.



Abbildung 20: Schematischer Ablauf des Morgan-Elson Testverfahrens. Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 oder Ameisensäure-Puffer pH 3,5 wurden mit HA-Lösung, Hyaluronidase und BSA gemischt. Nach festgelegten Inkubationszeiten bei 37 °C wurden Proben entnommen, mit Borsäure/KOH versetzt, aufgekocht und auf eine Mikrotiterplatte übertragen. Nach Zugabe von DMAB-Lösung und einer weiteren Inkubation bei 37 °C von 20 Minuten erfolgte die Messung bei 590 nm.

Muckenschnabel et al. (1998) schlugen den direkten Zusatz von BSA zum Puffer vor. Bei Messungen der Enzymaktivität nach Zugabe von potentiellen Inhibitoren führte dies in allen Versuchen zu einem Verlust jeder inhibitorischen Aktivität bis zu den höchsten getesteten Konzentrationen von 100 µM Inhibitor. Die Ursache ist offensichtlich eine Bindung der getesteten Inhibitoren an BSA. Bindungen von Substanzen, insbesondere Arzneistoffen, an BSA ist ein in der Literatur häufig beschriebenes Phänomen (Peters 1985; Carter und Ho 1994; Liu et al. 2004) und keineswegs unerwartet, da Albumin auch im Blut eine Aufgabe beim Transport insbesondere wasserunlöslicher Stoffe übernimmt. Die große Oberfläche von BSA bietet Möglichkeiten für eine ganze Reihe von spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen mit Verbindungen und führt dazu, dass die Inhibitoren nicht mehr für eine Bindung an die Hyaluronidase zur Verfügung stehen. Der Verzicht auf BSA brachte keine Lösung, da es als Aktivator der Hyaluronidase-Aktivität fungiert und ein Verzicht gleichzeitig zu einem Verlust an Aktivität der Hyaluronidase und damit auch an Sensitivität führt. Zur Lösung wurde BSA erst nach der Inkubation der BTH mit den zu testenden Verbindungen, aber noch vor der Messung der Enzymaktivität dem Testansatz zugefügt. So wurde ein Kompromiss zwischen ausreichender Enzymaktivität auf der einen und ausreichend Möglichkeiten zur Wechselwirkung mit Inhibitoren auf der anderen Seite gefunden.

Zur Testung der Methode mit BTH wurde das Enzym in Konzentrationen von 0 bis 100 U/ml eingesetzt. Die Umsetzung ist graphisch in Abbildung 21 dargestellt. Bis zu einer

Inkubationszeit von einer Stunde und einer Absorption von 1,2 AE kann ein linearer Zusammenhang beobachtet werden. Wie zuvor beim auf "stains-all" Testverfahren dargestellt, sind auch hier die Steigungen im linearen Bereich der Geraden proportional von der Aktivität der BTH abhängig (Abbildung 22). Für die weiteren Messungen wurde analog zum "stains-all" Testverfahren bei pH 7 eine Enzymkonzentration von 50 U/ml ausgewählt. Für eine sichere Auswertung sollten die Absorptionswerte zwischen 0 und 1,2 liegen. BTH erreicht bei 50 U/ml eine durchschnittliche Absorptionsänderung von 13,5 mAE pro Minute.



Abbildung 21: Einfluss der BTH-Konzentration auf die Absorption bei 590 nm im Morgan-Elson Testverfahren bei pH 3,5. BTH-Lösungen in Ameisensäurepuffer pH 3,5 mit Konzentrationen von 0 bis 100 U/ml wurden mit Reinstwasser, BSA- und HA-Lösung (5 mg/ml) versetzt. Nach 0, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten Umsetzung bei 37 °C wurden je 45 µl mit Borsäurelösung versetzt und aufgekocht. Nach Zugabe von DMAB-Lösung und einer Inkubation von 20 Minuten bei 37 °C wurde die Absorption bei 590 nm vermessen. ■: 0 U/ml BTH, ♦: 12,5 U/ml BTH, ▲: 25 U/ml BTH, □: 50 U/ml, ◇: 100 U/ml BTH.

Für Messungen im neutralen pH-Bereich wurde an Stelle des Ameisensäure-Puffers pH 3,5 ein Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 eingesetzt. Es zeigte sich, dass nicht nur die Aktivität der BTH bei pH 7 deutlich schwächer war als im sauren Bereich, sondern auch die Sensitivität des Morgan-Elson Testverfahrens bei gleicher Enzym-Aktivität um den Faktor 8,4 niedriger lag als die des auf "stains-all" basierten Systems (Abbildung 23).

Ähnlich der Vorgehensweise beim "stains-all" Testverfahren sollte auch das Morgan-Elson Testverfahren auf eine Verwendbarkeit in einem Ganzzellsystem geprüft werden. Dazu wurde eine Suspension von *E. coli* F470 pAK013 mit einer optischen Dichte $OD_{578 nm} = 10$ bei pH 7 in Phosphat-Citrat-Puffer und bei pH 3,5 in Ameisensäure-Puffer angesetzt und als Probe im Morgan-Elson Testverfahren vermessen. Wie sich herausstellte, störten zugesetzte Zellen das Testverfahren bei einer sofortigen Messung zunächst nicht.



Abbildung 22: Zusammenhang zwischen mittlerer Absorptionsänderung über 60 Minuten und der BTH-Konzentration im Morgan-Elson Testverfahren bei pH 3,5. Die mittleren Absorptionsänderungen bei 590 nm über 60 Minuten der in Abbildung 19 dargestellten Aktivitätsmessungen von 0 U/ml bis 100 U/ml BTH wurden ermittelt und gegen die eingesetzte BTH-Konzentration aufgetragen. Der lineare Regressionskoeffizient der erhaltenen Ausgleichsgerade betrug 0,99.



Abbildung 23: BTH-Aktivitätsmessungen bei pH 7 mittels Morgan-Elson Testverfahren (A) und "stains-all" Testverfahren (B) im Vergleich. Die Ansätze enthielten BTH in Konzentrationen von 0 bis 100 U/ml in Phosphatpuffer pH 7 (A) bzw. Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 (B) und wurden mit HA-Lösungen von 2 mg/ml (A) bzw. 5 mg/ml (B) versetzt. Nach Inkubationszeiten von 0 bis 90 Minuten erfolgte die Messung gemäß der Protokolle der beiden Testverfahren bei 590 nm (A) bzw. 650 nm (B).

Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden, wie sie für die Aktivitätsmessungen im Ganzzell-Testverfahren geplant war, führte die Zugabe von DMAB jedoch zu einer Rotfärbung, die mit einer Absorption bei 570 nm verbunden war (Abbildung 24, a). Das Absorptionsmaximum lag nahe an dem der DMAB-HA-Chromophore von 585 nm (Abbildung 24, b). Dadurch würde die gemessene Konzentration von HA falsch positiv beeinflusst, da selbst bei Abwesenheit von HA eine erhöhte Absorption bei 570 nm verursacht durch den absteigenden Teil des Absorptionsmaximums bei 570 nm gemessen werden könnte. Da bei Kontrollmessungen weder reines LB-Medium noch eine frisch angesetzte Zellsuspension in Puffer oder Medium zu einer Absorption im Bereich um 570 nm führte, lag der Verdacht nahe, dass die Färbung in Zusammenhang mit

Substanzen aus dem Zellstoffwechsel von *E. coli* stehen könnte. Die Aktivität des Zellstoffwechsels ist selbst bei Zellen einer Charge nicht immer gleichmäßig. Der zusätzliche Absorptionsbetrag bei 590 nm, der die Messung der HA-Konzentration nach der Inkubationszeit stören würde, könnte daher nur ungenau und mit hohen Standardabweichungen durch die Messung einer Negativkontrolle korrigiert werden.



Abbildung 24: Absorptionsspektren einer Suspension von *E. coli* F470 pAK013 nach einer Inkubationsdauer von 24h (a, blaue Linie) sowie einer zellfreien, HA-haltigen BTH-Lösung nach einstündiger Inkubation (b, rote Linie) nach Anfärben mit DMAB. Die Zellsuspension (OD_{578 nm} = 10) sowie die BTH-Lösung (100 U/ml) wurden mit Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 angesetzt und mit Reinstwasser sowie BSA-Lösung versetzt. Anschließend wurde die Suspension für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der BTH-Lösung wurde zusätzlich HA-Lösung (5 mg/ml) zugefügt und nur für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit 45 µl Borsäurelösung versetzt und aufgekocht. Nach Zugabe von DMAB und einer Inkubation von 20 Minuten wurde das Absorptionsspektrum aufgenommen. Die Absorptionsmaxima sind mit Pfeilen gekennzeichnet. *E. coli* F470 pAK013 trug die humane Hyaluronidase 2 mit C-terminalem Teil auf ihrer Oberfläche.

Es sollte aber versucht werden, den Stoffwechsel von *E. coli* durch verschiedene Maßnahmen zu reduzieren oder sogar ganz zum Erliegen zu bringen. Ein verlangsamter Stoffwechsel würde den störenden Einfluss verringern, die Bestimmung der Enzymaktivität in einem Ganzzelltest jedoch nicht negativ beeinflussen, da zum Zeitpunkt der Stoffwechselreduktion die Enzyme bereits in großer Zahl auf der Oberfläche von *E. coli* vorlägen. Um dies zu erreichen, sollten die Bakterien während der Inkubationszeit von der Sauerstoffversorgung abgeschnitten werden. Dazu wurde die Zellsuspension mehrere Minuten lang mit Stickstoff begast, um den Sauerstoff zu verdrängen (Jose und von Schwichow 2004). Anschließend wurde sie luftdicht verschlossen. Als Alternative zur Reduzierung des Stoffwechsels wurde den Zellen Natriumfluorid in einer Konzentration von 6 mM als Glykolysehemmer zugefügt. Hier bestand allerdings bereits der Verdacht,

dass NaF nicht in der Lage sein könnte, die Zellmembran zu durchdringen und den Zellstoffwechsel zu beeinflussen (Holland und Hongslo 1978).

Wie erwartet führte die Zugabe von Natriumfluorid nicht zum Erfolg (Abbildung 25, b). Auch die Begasung mit Stickstoff zeigte nicht den gewünschten Effekt (Abbildung 25, c). Es ergab sich keine Verringerung der Absorption bei 570 nm, sie wurde in beiden Fällen sogar leicht erhöht. Es bleibt daher festzuhalten, dass die Anwendung des Morgan-Elson Testverfahrens für Bestimmungen der HA-Konzentration in Ganzzellsystemen bisher nur mit einem Fehler möglich ist, dessen Größe sich von Messung zu Messung unterscheidet. Eine Verwendung dieses Testverfahrens zur Aktivitätsbestimmung von Hyaluronidasetragenden Zellen ist daher zurzeit nicht sinnvoll.



Abbildung 25: Absorptionsspektren einer unbehandelten Zellsuspension (a, rote Linie) sowie einer mit NaF (b, blaue Linie) bzw. N₂ (c, grüne Linie) behandelten Zellsuspension von *E. coli* F470 pAK013 nach Anfärbung mit DMAB. Die Zellsuspensionen ($OD_{578 nm} = 10$) wurden mit Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 angesetzt und mit Reinstwasser und BSA-Lösung versetzt. Anschließend wurden die Suspensionen unbehandelt, oder mit NaF bzw. N₂ behandelt für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 45 µl Borsäurelösung versetzt und aufgekocht. Nach Zugabe von DMAB und einer Inkubation von 20 Minuten wurde das Absorptionsspektrum aufgenommen. *E. coli* F470 pAK013 trug die humane Hyaluronidase 2 mit C-terminalem Teil auf ihrer Oberfläche.

7.1.4 Enzymaktivitätsmessung mittels HPLC

Mit den beiden photometrischen Enzymaktivitätstests, dem "stains-all" Testverfahren und dem Morgan-Elson Testverfahren, lässt sich der Gehalt an HA nur indirekt durch eine Farbreaktion bestimmen. Eine direkte Beobachtung des Abbaus der langkettigen HA sowie des Entstehen der kurzkettigen Fragmente ist mit diesen Verfahren nicht möglich. Ein chromatographisches Verfahren wie die HPLC ermöglicht dies jedoch und sollte aus

diesem Grund als weiteres Verfahren die indirekten, photometrischen Tests ergänzen und bestätigen.

Die Konzentrationsbestimmung der HA-Fragmente sollte nach einer Auftrennung mittels Anionenaustausch erfolgen. Die Bedingungen nach Tawada *et al.* (2002) erschienen besonders geeignet, da sie ohne weitere Derivatisierung eine Auftrennung von HA-Fragmenten bis über 20 Disaccharideinheiten in etwa 30 Minuten ermöglichten (Tabelle 14).

 Tabelle 14:
 Zur quantitativen
 Bestimmung von
 HA mittels
 HPLC
 herangezogene

 Bedingungen nach Tawada et al. (2002).

Parameter	Einstellung
Detektionswellenlänge	210 nm
Säule	NH_2 -Anionenaustauscher 20 cm, 5 μM
Säulentemperatur	40 °C
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min
Fließmittel	16 - 800 mM NaH ₂ PO4-Lösung
Gradient	linear, 60 Minuten

Es wurden drei Ansätze einer Mischung von 2 ml 30 mg/ml HA im gewünschten Puffer (Phosphatpuffer pH 7 oder Ameisensäure-Puffer pH 3,5) und 1 ml 600 U/ml BTH-Lösung hergestellt. Den Proben wurde NaCl in einer Konzentration von 75 µM zugesetzt, um den Hyaluronidase-aktivierenden Effekt von NaCl auszunutzen. Nach 0, 1, 2, 4, 24 und 48 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde jeweils ein Drittel des Ansatzes durch Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin 500 bei einem Größenausschluss von 10 kDa zentrifugiert. Der Durchfluss war auf diese Weise für die HPLC aufgereinigt und wurde als Probe eingesetzt. Die nachfolgenden Trennungen ergaben gleichmäßige Muster der jeweils enthaltenen HA-Fragmente. Eine Umsetzung konnte allerdings erst ab einer Inkubationsdauer von 24 Stunden ausgewertet werden, da die zuvor erhaltenen Signale zu schwach für eine quantitative Auswertung waren. Tawada *et al.* (2002) gelang dies bereits nach 45 Minuten, obwohl bei gleicher HA- und BTH-Konzentration gearbeitet worden war. Möglicherweise ist dieser Unterschied auf unterschiedliche Enzymaktivitäten bedingt durch eine abweichende Enzymaufreinigung der BTH zurückzuführen, da Tawada *et al.* das Enzym von einer anderen Quelle bezogen.

Da eine Untersuchung der einzelnen Fragmente mittels MS nicht möglich war, erfolgte eine Zuordnung entsprechend den Angaben über Retentionszeiten von Tawada *et al.* (2002). Dies war leicht möglich, da die einzelnen Fragmente streng nach aufsteigender Molekülmasse eluierten und somit ein klares Muster ergaben, das nicht durch weitere Signale gestört wurde (Abbildung 26). Das kleinste Fragment aus 4 Zuckern (HA4) gelangte nach ca. 10 Minuten Retentionszeit zum Detektor, nach 30 Minuten wurde die Trennung mit der Elution des Fragments mit 22 Zuckern (HA22) beendet.



Abbildung 26: Chromatogramme der Trennungen von HA-Fragmenten nach einer Inkubation mit BTH von 0 (1), 24 (2) und 48 Stunden (3). Die Probe enthielt eine HA-Konzentration von 20 mg/ml, eine BTH-Aktivität von 200 U in Phosphatpuffer pH 7 sowie eine NaCI-Konzentration von 75 μ M. Trennbedingungen: 20 cm NH₂-Anionenaustauschersäule, Partikelgröße 5 μ M, Säulentemperatur 40 °C, Fließgeschwindigkeit 1 ml/min, Fließmittel 16 – 800 mM NaH₂PO₄-Lösung, linearer Gradient über 60 Minuten, Detektion mittels UV/VIS-Detektor bei 210 nm. (A) möglicherweise Mono- (HA1) oder Disaccharide (HA2), (B) unbekannte Bestandteile aus der HA-Lösung, (C) HA-Fragment mit 11 Zuckern (HA11).

Im Bereich um 3 und 7 Minuten sind Verbindungen sichtbar, die zu Verunreinigungen aus der Hyaluronidase oder der HA zu zählen sein müssen (Abbildung 26 A, B). Da die Intensität des Peaks A mit zunehmender Inkubationszeit stark zunimmt, handelt es sich möglicherweise um Mono- oder Disaccharide (HA1, HA2), die ebenfalls beim Abbau der HA anfallen können. Obwohl für Hyaluronidasen von Säugetieren (EC 3.2.1.35) Tetrasaccharide die kleinsten Produkte darstellen, wurde das Auftreten von Disacchariden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Takagaki *et al.* 1994; Hofinger *et al.* 2007a). Bei der mit B bezeichneten Peak-Gruppe handelt es sich um Verbindungen unbekannter Struktur, die in der gefriergetrockneten HA enthalten waren, da sie auch bei Untersuchungen von HA-Lösungen als Negativkontrolle ohne NaCl- oder Hyaluronidase-

Zusatz zu finden waren. In dieser Blindprobe konnten bereits einige schwache Signale der HA-Fragmente HA4 bis HA10 detektiert werden, die höchstwahrscheinlich durch spontane hydrolytische Spaltungen beim Herstellungs- oder Lagerungsprozess von der langkettigen HA abgetrennt wurden. Diese sind daher auch in der ersten Probe nach fehlender Inkubation zu erkennen (Abbildung 26, Chromatogramm 1). NaCl-Lösung oder BTH-Lösung in Puffer führten zu keinen messbaren Signalen.

Als Besonderheit aller Messungen, bei denen HA einer Charge der Firma Serva eingesetzt wurde, war zudem ein zusätzlicher Peak exakt zwischen HA10 und HA12 zu erkennen (Abbildung 26, C), der im Laufe der Inkubation kleiner wurde. Dabei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein kurzkettiges HA-Fragment, das als Verunreinigung in dieser Charge hochmolekularer HA enthalten war. Aufgrund der Lage besaß es vermutlich 11 Zucker (HA11) und wurde während der Inkubation von BTH abgebaut. Da keine Abbauprodukte mit den erwarteten Größen von 7 (HA7) oder 3 Zuckern (HA3) zu finden waren, wurde wahrscheinlich zunächst ein Monosaccharid abgetrennt bevor es zum weiteren Abbau kam. Das Auftreten dieses Fragments war sehr interessant, da so nicht nur die Konzentrationszunahme verschiedener HA-Fragmente, sondern auch der Abbau eines HA-Fragmentes beobachtet werden konnte. Der Abbau der hochmolekularen HA kann nicht direkt verfolgt werden, da diese die Säule sowie weitere Bestandteile der HPLC schädigen oder verstopfen könnte und deshalb bei der Probenaufreinigung abgetrennt wurde. Leider enthielten die nachfolgend erhaltenen Chargen HA keine derartigen Verunreinigungen mehr, so dass nur einige wenige Messungen bei pH 7 und 3,5 mit dem Fragment HA11 durchgeführt werden konnten.

Eine quantitative Auswertung der HA-Fragmente durch Integration der Peakflächen aus Abbildung 26 ergab, dass der Aufbau der niedermolekularen HA-Fragmente nicht linear verlief (Abbildung 27). Ganz im Gegenteil schien die Enzymaktivität mit der Zeit deutlich zuzunehmen. Dieser Effekt war identisch mit dem beim "stains-all" Testverfahren beobachteten Phänomens der Enzymaktivitätsabnahme. Während dort der zunehmend gehemmte Abbau der hochmolekularen HA verfolgt werden konnte, wurde jetzt die zunehmende Geschwindigkeit im Aufbau der niedermolekularen HA sichtbar. Eine stabile maximale Umsetzungsgeschwindigkeit v_{max} bezogen auf die mittels HPLC erfassbaren HA-Fragmente war auch nach 48 Stunden nicht erreicht. Auch der Abbau des als Verunreinung enthaltenen Fragmentes HA11 zeigte kein deutlich lineares Verhalten (Abbildung 27).



Abbildung 27: Konzentrationsentwicklung dargestellt als Peakflächen der Fragmente HA4, HA11, HA12 und HA14 in Abhängigkeit von der BTH-Inkubationszeit bei pH 7. Die Probe enthielt eine HA-Konzentration von 20 mg/ml, eine BTH-Aktivität von 200 U in Phosphatpuffer pH 7 NaCl-Konzentration von 75 μM. Trennbedingungen: 20 cm sowie eine NH₂-Anionenaustauschersäule, Partikelgröße 5 µM, Säulentemperatur 40 °C, Fließgeschwindigkeit 1 ml/min, Fließmittel 16 – 800 mM NaH₂PO₄-Lösung, linearer Gradient über 60 Minuten, Detektion mittels UV/VIS-Detektor bei 210 nm. ■: Aufbau HA4, ◆: Aufbau HA12, ▲: Aufbau HA14, □: Abbau HA11.

Die Trennung bei pH 3,5 (Abbildung 28) lieferte ein ähnliches Bild wie die Trennung bei pH 7, allerdings waren die Peakflächen deutlich größer, da die Aktivität der BTH im sauren Bereich höher liegt als im neutralen. So war der Peak für HA11 (Abbildung 28, A) nach 24 Stunden Inkubationszeit mit BTH bereits nicht mehr zu erkennen, das Fragment offensichtlich vollständig abgebaut. Es gelang jedoch im Gegensatz zur Trennung bei pH 7 keine Basislinientrennung der Fragmente HA10 und HA11.

Im Chromatogramm der ersten Probe nach einer BTH-Inkubation von 0 Stunden macht sich bemerkbar, dass es bereits während der Probenvorbereitung zu einer Umsetzung kam (Abbildung 28, Chromatogramm 1). Da die Probe aufgrund noch fehlenden HA-Abbaus sehr dickflüssig war, musste sie in den Zentrifugalkonzentratoren bis zu einer Stunde zentrifugiert werden. Während dieser Zeit wurde bereits deutlich HA umgesetzt. Dieses Problem könnte in Zukunft durch Zentrifugation bei 4 °C umgangen werden. Bei pH 7 trat dieses Problem nicht auf, da die Enzymaktivität der BTH deutlich niedriger lag.

Um störende Signale im Chromatogramm durch Zellbestandteile oder DMSO als Lösungsmittel der zu testenden Inhibitoren zuordnen zu können, wurden Zellsuspensionen sowie DMSO-haltige Puffer über Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren aufgereinigt und mittels HPLC untersucht. Es erfolgte keine Zugabe von HA oder BTH. Im Durchfluss der Zellsuspension konnten drei Signale identifiziert werden, die jedoch nicht basisliniengetrennt wurden und unbekannten Verbindungen aus dem Stoffwechsel der *E. coli* - Zellen zugerechnet wurden. DMSO verursachte ein starkes Signal nach ca. 4 Minuten. In keinem Fall gab es Signale in dem Bereich, in dem die HA-Fragmente eluierten.



Abbildung 28: Chromatogramme der Trennungen von HA-Fragmenten nach einer Inkubation mit BTH von 0 (1) und 24 Stunden (2). Die Probe enthielt eine HA-Konzentration von 20 mg/ml, eine BTH-Aktivität von 200 U in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 sowie eine NaCI-Konzentration von 75 μ M. Trennbedingungen: 20 cm NH₂-Anionenaustauschersäule, Partikelgröße 5 μ M, Säulentemperatur 40 °C, Fließgeschwindigkeit 1 ml/min, Fließmittel 16 - 800 mM NaH₂PO₄-Lösung, linearer Gradient über 60 Minuten, Detektion mittels UV/VIS-Detektor bei 210 nm. (A) möglicherweise Mono- (HA1) oder Disaccharide (HA2), (B) unbekannte Bestandteile aus der HA-Lösung, (C) HA-Fragment mit 11 Zuckern (HA11).

Eine Enzymaktivitätsmessung mittels HPLC ist demnach für den Einsatz von Untersuchungen mit aufgereinigtem Enzym (BTH) als auch mit Zellen geeignet. Es wird allerdings eine deutlich höhere Konzentration an HA benötigt als in den photometrischen Tests (20 mg/ml statt 2 - 5 mg/ml) sowie ebenfalls eine deutlich stärkere Hyaluronidase-konzentration (200 U/ml statt 50 U/ml).

Es kann zusammengefasst werden, dass es mit Hilfe der HPLC möglich ist, das Entstehen kurzkettiger HA-Fragmente direkt zu verfolgen. Die Ergebnisse der indirekten Messungen der photometrischen Testverfahren konnten damit bestätigt werden.

7.2 Testung potentieller Hyaluronidase-Inhibitoren

Die mit Hilfe von BTH erfolgreich etablierten Testverfahren wurden eingesetzt, um eine Reihe von verschiedenen Substanzen mit Benzimidazol- und Indol-Grundstrukturen auf ihre Hyaluronidase-inhibierenden Fähigkeiten zu testen.

7.2.1 Untersuchungen von Benzimidazol- und Benzoxazol-Derivaten

Die untersuchten Benzimidazol- und Benzoxazol-Derivate wurden von Prof. Dr. Oztekin Algul (Mersin Universität, Türkei) synthetisiert und bereitgestellt. Dazu gehörten acht Benzimidazole, ein Benzoxazol sowie drei Bis-Benzimidazole (Tabellen 15 und 16). Alle Verbindungen waren in DMSO löslich und wurden zunächst im photometrischen Testverfahren mit "stains-all" bei pH 7 und einer Konzentration von 100 µM auf ihre inhibitorische Potenz gegen BTH getestet.

R_2 R_1							
Nr.	X	R ₁	R ₂				
OA1	NH	Н	Н				
OA2	NH	-CH ₃	н				
OA3	NH	-C ₂ H ₅	н				
OA4	NH	-CH ₂ OH	н				
OA5	NH	-CH ₂ SH	н				
OA6	NH	-CH ₂ OH	-CH ₃				
OA7	NH	NH ₂	н				
OA8	0	OCH3	н				
OA9	NH	-CH ₂ OH	CI				

Tabelle 15: Untersuchte Benzimidazole- und Benzoxazol-Derivate.

	H_{N} (CH_2) N N (CH_2) N
Nr.	n
OA10	0
OA11	1
OA12	2

Tabelle 16: Untersuchte Bisbenzimidazole.

Als Kontrollinhibitor wurde Ascorbinsäurepalmitat (Vcpal) verwendet, das bereits als BTH-Inbhibitor bekannt war (Botzki *et al.* 2004). Es zeigte eine Inhibition von 99% bei einer Konzentration von 100 μ M. Von den weiteren getesteten Verbindungen führten nur die Bisbenzimidazol-Derivate OA10, OA11 und OA12 bei 100 μ M zu einer Inhibition von mehr als 50%. Daher wurden im Folgenden nur von diesen drei Verbindungen die IC₅₀-Werte aus den Messungen bei Konzentrationen von 0 μ M, 50 μ M, 75 μ M und 100 μ M (Abbildung 29) bestimmt. Die jeweils erhaltene prozentuale BTH-Aktivität wurde dazu gegen den dekadischen Logarithmus der verwendeten Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und anschließend mittels Regressionsanalyse ausgewertet (Abbildung 30). Der IC₅₀-Wert wurde dann mit Hilfe der erhaltenen Gleichung berechnet.

Eine Bestimmung der inhibitorischen Aktivität bei pH 3,5 mittels Morgan-Elson Testverfahren inkl. Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte im Anschluss nur bei diesen drei Verbindungen. Die Ergebnisse bei pH 7 und pH 3,5 für eine Inhibitorkonzentration von 100 μ M sowie die IC₅₀-Werte sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen lagen jeweils unter 10%.

Die an Position 2 substituierten Verbindungen OA2-OA9 besaßen bei pH 7 mit einer Hemmung von 25 – 46% eine deutlich höhere inhibitorische Aktivität gegen BTH als das völlig unsubstituierte Benzimidazol OA1, das mit 1% Hemmung keinen Effekt ausübte. Dabei waren aromatische Substituenten offenbar besser geeignet als Alkylgruppen, denn OA7 und OA8 inhibierten BTH mit 40% und 46% aus der Reihe der substituierten Benzimidazole und Benzoxazole am stärksten. Ob der Austausch des Benzimidazolgegen das Benzoxazol-Gerüst einen eigenen Einfluss auf die Inhibition besitzt, konnte nicht ausgewertet werden, da insgesamt nur dieses Benzoxazol-Derivat getestet wurde.

Tabelle 17: Hemmung der BTH durch OA1 bis OA12 und Vcpal bei pH 7 und pH 3,5 in einer Konzentration von 100 $\mu M.$

Nr	Struktur	Inhibiti	on [%]	IC₅₀ [µM]		
NI.			рН 7	рН 3,5	рН 7	
OA1	H N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	n.b.	1	n.b.	n.b.	
OA2		n.b.	35	n.b.	n.b.	
OA3		n.b.	35	n.b.	n.b.	
OA4		n.b.	34	n.b.	n.b.	
OA5	H N CH ₂ SH	n.b.	33	n.b.	n.b.	
OA6	H ₃ C H ₂ OH	n.b.	31	n.b.	n.b.	
OA7		n.b.	40	n.b.	n.b.	
OA8		n.b.	46	n.b.	n.b.	
OA9		n.b.	25	n.b.	n.b.	
OA10		59	63	79	85	
OA11	NH HN	63	67	72	78	
OA12		53	60	98	93	
Vcpal	HO OH OH CH ₃	99	99	18	8	



Abbildung 29: Hemmung der BTH bei pH 7 durch OA1 bis OA12 in den Konzentrationen 0 μ M, 50 μ M, 75 μ M und 100 μ M. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens. BTH-Konzentration 100 U/ml in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7, HA-Lösung 2 mg/ml. Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 μ l "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 μ l Wasser.



Abbildung 30: Ermittlung des IC₅₀-Wertes am Beispiel des Inhibitors OA11 bei pH 7. Die Konzentrationen des Inhibitors OA11 wurden logarithmisch gegen die jeweilige Aktivität der BTH aufgetragen und eine Ausgleichsgerade berechnet. Der Regressionskoeffizient der Ausgleichsgerade beträgt 0,99.

Insgesamt war die inhibitorische Aktivität der Verbindungen OA1 bis OA9 sehr gering. Eine etwas bessere Aktivität zeigten dagegen die Bisbenzimidazole OA10 bis OA12 bei pH 7 und pH 3,5 (Tabelle 17). Sie erreichten im Gegensatz zu den zuvor getesteten Benzimidazolen IC₅₀-Werte von unter 100 μ M, sowohl im neutralen als auch im sauren pH-Bereich. Der beste Inhibitor der gesamten Reihe war Di(1H-benzo[d]imidazol-2yl)methan (OA11) mit einem IC₅₀-Wert von 78 μ M bei pH 7 und 72 μ M bei pH 3,5. Diese Verbindung besaß eine einzelne Methylengruppe zwischen beiden Benzimidazolgruppen. Wurde diese entfernt (OA10) oder durch eine weitere Methylengruppe ergänzt (OA12), kam es zu einem Nachlassen der Wirkung. Der Effekt war nicht statistisch signifikant, könnte aber einen Trend angeben. Möglicherweise führt mangelnde Flexibilität der Verbindung bei fehlender Methylengruppe zu einer schlechteren Positionierung des Moleküls in seiner Bindungstasche. Zwei Methylengruppen könnten wiederum zuviel Drehung ermöglichen, so dass keine ausreichend stabile Konformation ausgebildet werden kann.

7.2.2 Untersuchungen von Indol-2-acetamiden, Indol-3-acetamiden und Indol-3-carboxamiden

Die untersuchten Indol-2- und Indol-3-acetamid-Derivate SO1-SO19 wurden von Prof. Dr. Sureyya Olgen (Universität von Ankara, Türkei) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Indol-3-carboxamide MD1 bis MD6 wurden von Prof. Dr. Muriel Duflos (Universität Nantes, Frankreich) synthetisiert und ebenfalls zur Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Die Messung der inhibitorischen Aktivität erfolgte zunächst bei pH 7 mit Hilfe des "stainsall" Testverfahrens zur groben Evaluierung auf ausreichend hohe Aktivitäten für weiterführende Untersuchungen. Erst wenn bei einer Konzentration von 50 µM eine mindestens 50%-ige Hemmung der BTH-Aktivität erreicht werden konnte, wurde durch weitere Messungen bei Konzentrationen von 12,5 µM und 25 µM für die Indol-2acetamide bzw. 25 µM und 75 µM für die Indol-3-acetamide der IC₅₀-Wert bestimmt. Anschließend wurden diese Inhibitoren ebenfalls im sauren Milieu mittels Morgan-Elson-Testverfahren untersucht. Die Ergebnisse sind für die Indol-2-acetamide SO1 bis SO10 und die Indol-3-acetamide SO11 bis SO19 in Tabelle 18 sowie in den Abbildungen 31 und 32 zusammengefasst. Die inhibitorische beste Wirkung erzielte N-[1-(4-Fluorobenzyl)indol-3-yl]-2-(4-fluorophenyl)-acetamid (SO17) mit einem IC₅₀-Wert von 26 µM bei pH 7 und 57 µM bei pH 3,5. Diese Substanz stellt somit einen guten Ausgangspunkt für weitere Derivatisierungen dar.

Allgemein lässt sich feststellen, dass eine Substitution an Position R_2 zu einer geringeren Inhibition führte. Dabei ergab sich eine Aktivitätsreihenfolge von H >> Cl > F. Die Einführung von elektronegativen, stark Elektronen-ziehenden Gruppen erwies sich damit als nicht günstig. Für die Position R_1 ergab sich dagegen eine abweichende Aktivitätsreihenfolge von H < Cl << F. An dieser Position führte die Substitution mit Elektronen-ziehenden Substituenten zu einer Steigerung der inhibitorischen Potenz gegen BTH. Bei der Gruppe der Indol-2-acetamide (SO1 - SO10) hatte die Substitution an X keinen deutlichen Einfluss, ganz im Gegensatz zu den Indol-3-acetamiden SO11 bis SO19. Bei diesen Verbindungen erwies sich die Substitution an Position X mit Fluor als deutlich vorteilhaft.



Abbildung 31: Hemmung der BTH bei pH 7 durch SO1 bis SO3, SO6 bis SO8 sowie SO15 bis SO17 in den Konzentrationen 0 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M und 50 μ M. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens. BTH-Konzentration 100 U/ml in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7, HA-Lösung 2 mg/ml. Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 μ I "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 μ I Wasser. $12,5 \mu$ M, $12,5 \mu$ M, $12,5 \mu$ M, $12,5 \mu$ M Inhibitorkonzentration.



Abbildung 32: Hemmung der BTH bei pH 3,5 durch Zugabe von SO1 bis SO3, SO6 bis SO8 sowie SO15 bis SO17 in den Konzentrationen 0 μ M, 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des Morgan-Elson Testverfahrens. BTH-Konzentration 100 U/ml in Ameisensäure-Puffer pH 3,5, HA-Lösung 5 mg/ml. Messung bei 590 nm nach Zugabe von DMAB.

Tabelle 18: Hemmung der BTH durch die Indol-2-acetamide SO1 bis SO10 und Indol-3-acetamide SO11 bis SO19 bei pH 7 und pH 3,5.

					R_2	₹ ₁		
Nr.	x	R1	R₂	Inhibit 50	ion [%] μΜ	IC ₅₀ [μM]		
				рН 7	рН 3,5	pH 7	рН 3,5	
SO1	Н	Н	Н	57	30	40	78	
SO2	Н	CI	Н	65	30	33	64	
SO3	Н	F	Н	80	21	27	67	
SO4	Н	CI	CI	37	n.b.	n.b.	n.b.	
SO5	Н	F	F	24	n.b.	n.b.	n.b.	
SO6	F	Н	Н	56	13	41	88	
SO7	F	CI	Н	66	20	33	68	
SO8	F	F	Н	75	18	30	83	
SO9	F	CI	CI	29	29 n.b.		n.b.	
SO10	F	F	F	47	n.b.	n.b.	n.b.	
SO11	Н	Н	Н	0	n.b.	n.b.	n.b.	
SO12	Н	F	Н	0	n.b.	n.b.	n.b.	
SO13	Н	CI	CI	29	n.b.	n.b.	n.b.	
SO14	Н	F	F	19	n.b.	n.b.	n.b.	
SO15	F	H	Н	66	38	33	62	
SO16	F	CI	Н	66	33	34	73	
SO17	F	F	Н	83	45	26	57	
SO18	F	CI	CI	40	n.b.	n.b.	n.b.	
SO19	F	F	F	5	n.b.	n.b.	n.b.	

Bei den Indol-3-carboxamid-Derivaten MD1 bis MD6 erfolgte bei pH 7 zusätzlich zu einer Messung bei 50 μ M auch bei allen Verbindungen eine Messung bei 100 μ M. Der IC₅₀-Wert wurde jedoch nur dann ermittelt, wenn dieser sicher unter 100 μ M lag, d.h. wenn bei einer Konzentration von 100 μ M mindestens 50% der BTH-Aktivität gehemmt wurde. Dies war nur bei der Verbindung N-(Pyridin-4yl)-[5-bromo-1-(4-fluorobenzyl)indol-3-yl]carboxamid (MD5) mit einem IC₅₀-Wert von 46 μ M der Fall, sowie bei N-(4,6-Dimehyl-pyridin-2yl)-[5-brom-1-methyl-indol-3-yl]carboxamid (MD2) mit einem IC₅₀-Wert von 78 μ M.

Die Messungen bei pH 3,5 erfolgten zunächst nur bei einer Konzentration von 100 µM und sollten bei ausreichender inhibitorischen Aktivität auch mit niedrigeren Konzentrationen wiederholt werden. Pyridine zeigen im neutralen pH-Bereich normalerweise eine sehr gute Wasserlöslichkeit, da das freie Elektronenpaar des Stickstoffs mit den polaren Wassermolekülen gut in Wechselwirkung treten kann. Im sauren Bereich wird jedoch der Stickstoff zunehmend protoniert und sein Elektronenpaar steht nicht mehr für polare Wechselwirkungen zur Verfügung. Die positive Ladung wird zudem im Ring delokalisiert und kann ebenfalls nur unzureichend mit Wassermolekülen interagieren. Die Folge ist eine verringerte Wasserlöslichkeit, die sich auch bei den untersuchten Verbindungen MD1 bis MD6 bemerkbar machte. Trugen die Verbindungen einen zusätzlichen lipophilen Benzylring, wie dies bei MD4, MD5 und MD6 der Fall war, waren sie im wässrigen Puffer nicht ausreichend löslich, um eine Konzentration von 100 µM zu erreichen. Um trotzdem Messungen durchführen zu können wurden daher maximal gesättigte Lösungen eingesetzt, deren Konzentrationen jeweils unter 100 µM lagen. Die mit diesen Lösungen erzielten Messwerte können natürlich nicht mit anderen Ergebnissen verglichen werden, jedoch einen ersten Hinweis auf inhibitorische Eigenschaften des Moleküls vermitteln. Die Mittelwerte von jeweils drei Messungen bei pH 7 und pH 3,5 sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Die Standardabweichungen lagen jeweils unter 7 %.

Bei pH 7 waren die Verbindungen MD5 (N-(Pyridin-4yl)-[5-brom-1-(4-fluorobenzyl)indol-3yl]carboxamid) und MD2 (N-(4,6-Dimehyl-pyridin-2yl)-[5-brom-1-methyl-indol-3yl]carboxamid) die weitaus aktivsten dieser Charge mit IC₅₀-Werten von 46 μM bzw. 78 μM. Insgesamt zeigten die N-Methyl substituierten Vertreter (MD1-MD3) nur sehr geringe Aktivität, es sei denn, der Pyridinring wurde zusätzlich mit zwei Methylgruppen in meta-Position substituiert (MD2). Diese Substitution machte diesen Teil des Moleküls deutlich lipophiler. Es kann vermutet werden, dass der Austausch des Protons an R₃ gegen Brom zu keiner Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften führt, da MD1 und MD3 nahezu gleich niedrige Hemmdaten aufweisen. Um diese Frage genauer zu beurteilen, fehlen allerdings entsprechende Vergleichssubstanzen von MD2 und MD4 -MD6 ohne Br-Substitution. Ganz im Gegensatz steht dazu die Einführung eines p-Fluor-Benzyl-Ringes, dieser lässt die inhibitorische Aktivität von 3% (MD3) auf 20% (MD5) bei einer Konzentration von 50 µM steigen. Dieser Effekt ist analog den Verbindungen SO15 -SO17. Auch dort führte ein para-fluorierter Benzylring zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung. Dabei ist der Effekt offensichtlich auf das Fluor und nicht auf den Ring zurückzuführen. Die Einführung sowohl der Methylgruppen in meta-Position des Pyridins als auch des p-Fluor-Benzyl-Ringes lässt dagegen die Aktivität erneut sinken (MD4). Möglich wäre, dass eine Wechselwirkung des p-Fluor-Benzylring mit den Methylgruppen zu einer für die Hemmung der BTH ungünstigeren Konformation des Moleküls führt.

R_3 N R_2 H R_2 H R_1									
N	_	-	-	Inhibiti	on [%]	IC ₅₀ [μΜ]			
Nr.	R ₁	\mathbf{R}_2	K ₃	pΗ 7 ¹⁾ 50 μΜ	pH 3,5 ²⁾ 100 μΜ	рН 7 ¹⁾	р Н 3,5 ²⁾		
MD1	-CH ₃	Z	н	6	3	> 100	n.b.		
MD2	-CH ₃	CH ₃ CH ₃	Br	37	-17	78	n.b.		
MD3	-CH ₃	N	Br	3	-16	>100	n.b.		
MD4	F	CH ₃ CH ₃ CH ₃	Br	17	-5 ³⁾	> 100	n.b.		
MD5	F	Z	Br	50	-20 ³⁾	46	n.b.		
MD6	F	Z	Br	15	-15 ³⁾	> 100	n.b.		

Tabelle 19: Hemmung der BTH durch die Indol-carboxamide MD1 bis MD6 bei pH 7 und bei pH 3,5.

¹⁾ "stains-all" Test ²⁾ Morgan-Elson Test

³⁾ gemessen mit einer maximal gesättigten Lösung, deren Konzentration unter 100 µM lag

Bei pH 3,5 zeigten die Indol-carboxamide keinerlei nennenwerte Inhibition. Ganz im Gegenteil waren einige offensichtlich in der Lage, die Aktivität der BTH geringfügig zu verstärken (MD2 – MD6). Die höchste Steigerung zeigte dabei MD5 mit einer Gesamtaktivität der BTH von 120%. Da die Konzentration wegen unzureichender Löslichkeit von MD5 in der Lösung nicht genau bekannt ist, lässt sich der Wert nicht mit anderen vergleichen. Dies ist nur zwischen MD1 – MD3 möglich. Hier erreichte MD2 die höchste Steigerung der BTH-Aktivität auf 117% bei einer Konzentration von 100 μ M. MD1 zeigte keinerlei steigernden Effekt, dies könnte mit der fehlenden Substitution des Protons durch Brom an Position R₃ in Zusammenhang stehen. Für eine genauere Auswertung wären jedoch weitere Verbindungen mit unterschiedlichen Substituenten erforderlich.

7.2.3 Untersuchungen weiterer Indol-3-acetamide

Auch bei den Indol-3-acetamide MD7 bis MD15 erfolgten bei pH 7 Messungen mit Konzentrationen von 50 μ M und 100 μ M, doch ergab sich bei keiner Substanz eine Inhibition von mehr als 50%, so dass keine IC₅₀-Werte bestimmt wurden.

Bei pH 3,5 ergab sich erneut das Problem, dass die Einführung eines Benzylringes an Position R₁ die Löslichkeit so stark senkte, dass keine Lösungen mit einer Konzentration von 100 μ M mehr erreicht werden konnten. Nur die Verbindungen MD7, MD8 und MD9 waren ausreichend löslich. Zur Messung der übrigen Substanzen wurden maximal gesättigte Stammlösungen eingesetzt, ein Vergleich der Ergebnisse dieser Verbindungen untereinander und mit anderen ist deshalb ebenfalls nicht möglich. Die gemittelten Messergebnisse bei pH 7 (50 μ M) und pH 3,5 (100 μ M) sind in Tabelle 20 dargestellt.

Im neutralen Milieu waren die Acetamid-Verbindungen deutlich weniger inhibitorisch aktiv als ihre Carboxamid-Analoga. Offensichtlich führten die längere Kette und die damit veränderte Position der einzelnen Substituenten zueinander zu einer Abschwächung der Wechselwirkungen mit BTH. Auch in dieser Charge konnte das Phänomen beobachtet werden, dass die Einführung des p-Fluor-Benzyl-Ringes an R₁ zu einer Steigerung der inhibitorischen Aktivität führte. Die Einführung von Methylsubstituenten in meta-Position des Pyridins hatte dagegen keinen Einfluss auf die Inhibition.

Unter sauren Bedingungen zeigten die Substanzen ähnlich den Carboxamid-Derivaten kaum inhibitorische Aktivität, stattdessen aktivierten sie die BTH. Den stärksten Effekt übte dabei MD9 (N-(4,6-Dimethylpyridin-2yl)-(1-ethylindol-3-yl)acetamid) mit einer Steigerung bis auf 134% bei einer Konzentration von 100 µM aus. Auch MD7 und MD8 erreichten mit 125% und 127% BTH-Aktivität mehr als ihre Carboxamid-Analoga.

R_{3}									
NI-	P	_		Inhibit	ion [%]	IC ₅₀	IC₅₀ [µM]		
Nr.	K 1	K 2	К3	pΗ 7 ¹⁾ 50 μΜ	pH 3,5 ²⁾ 100 μΜ	pH 7 ¹⁾	р Н 3,5 ²⁾		
MD7	н	CH ₃	Н	9	-25	n.b.	n.b.		
MD8	н	N	н	8	-27	n.b.	n.b.		
MD9	-CH ₂ CH ₃	CH ₃ N CH ₃	н	3	-34	n.b.	n.b.		
MD10		CH ₃	Н	0	-10 ³⁾	n.b.	n.b.		
MD11		N	н	9	1 ³⁾	n.b.	n.b.		
MD12		N	н	12	-3 ³⁾	n.b.	n.b.		
MD13	F	CH ₃	Н	5	-4 ³⁾	n.b.	n.b.		
MD14	F	N	Н	10	7 ³⁾	n.b.	n.b.		
MD15	F	N	н	14	-2 ³⁾	n.b.	n.b.		

Tabelle 20: Einfluss der Indol-3-acetamide MD7 bis MD15 auf BTH bei pH 7 und pH 3,5.

¹⁾ "stains-all" Test
 ²⁾ Morgan-Elson Test
 ³⁾ gemessen mit einer maximal gesättigten Lösung, deren Konzentration unter 100 μM lag

Eine mögliche Reaktion des Lösungsmittels DMSO oder des zur Färbung zugesetzten DMAB mit den untersuchten Verbindungen kann ausgeschlossen werden, da Negativkontrollen ohne Enzym unter sonst identischen Bedingungen keine Reaktion zeigten. Um sicherzustellen, dass es sich nicht um Artefakte des Morgan-Elson-Testverfahren handelt, sondern tatsächlich um eine pH-Wert abhängige Eigenschaft, wurde das Testverfahren für die Verbindungen MD7, MD8 und MD9 bei pH 7 wiederholt. Im neutralen pH-Bereich verloren die Substanzen ihre aktivierenden Eigenschaften wieder und zeigten inhibitorische Effekte im selben Größenbereich wie sie zuvor im "stains-all" Testverfahren bei pH 7 festgestellt wurden (Tabelle 21). Geringfügige Abweichungen zwischen den Ergebnissen beider Testsysteme sind unvermeidbar.

Tabelle 21: Vergleich der prozentualen Hemmung der BTH durch die Indol-3-acetamide MD7, MD8 und MD9 bei pH7 im Morgan-Elson- und im "stains-all"-Testverfahren.

Nr.	Morgan-Elson Testverfahren (50 μM)	"stains-all" Testverfahren (50 μM)
MD7	4	9
MD8	2	8
MD9	6	3

Wie bereits erwähnt, sind außer den hier getesteten Indol-3-acetamiden in der Literatur weitere Substanzen bekannt, die Hyaluronidase-Aktivität steigern können. Bei einigen davon wurde ebenfalls eine Abhängigkeit vom pH-Wert festgestellt, z.B. für BSA (Deschrevel *et al.* 2008; Lenormand *et al.* 2008). Auch BSA übt im sauren pH-Bereich eine deutlich stärkere BTH-steigernde Aktivität aus als bei pH 7. Sowohl die untersuchten Indol-3-acetamide als auch BSA sind basische Verbindungen. Es lag daher nahe, zur weiteren Charakterisierung den aktivierenden Effekt der untersuchten Indol-3-acetamiden mit dem von BSA zu vergleichen.

Zu diesem Zweck wurde der Effekt von BSA auf die Aktivität von BTH mit Hilfe des Morgan-Elson Testverfahren bei pH 3,5 geprüft. Da das Protokoll bereits die Zugabe von 0,044 g/l BSA vorsieht um den Effekt der Aktivierung auszunutzen, wurde zunächst ohne, dann mit steigenden Konzentrationen von BSA (0; 0,022; 0,044; 0,1; 0,5 und 1 g/l) gearbeitet (Abbildung 36, A). Die Aktivität von BTH bei Standard-Bedingungen des Morgan-Elson-Testverfahrens (0,044 g/l BSA) wurde auf 100% Aktivität gesetzt.



Abbildung 33: Einfluss von BSA (A) und MD7 (100 μM) + BSA (B) auf die BTH-Aktivität bei pH 3,5. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des Morgan-Elson Testverfahrens. BTH-Konzentration 100 U/ml in Ameisensäure-Puffer pH 3,5; HA-Lösung 5 mg/ml. Messung bei 590 nm nach Zugabe von DMAB.

Es ist zu erkennen, dass ohne Zugabe von BSA die Aktivität der BTH nur etwa 34% der Aktivität mit 0,044 g/I BSA beträgt. Ein Maximum an Aktivität von ca. 140% war nach der Zugabe von 0,1 g/I BSA erreicht und konnte durch weitere Erhöhung der BSA-Konzentration nicht mehr gesteigert werden. Dieser Wert entsprach etwa einer Vervierfachung der Aktivität ohne BSA und steht in absoluter Übereinstimmung mit den von Maingonnat *et al.* (1999) ermittelten Werten.

Um die Effekte von BSA und den Indol-3-acetamiden zu vergleichen, wurde die Verbindung MD7 ausgewählt und in einer Konzentration von 100 µM der gleichen Versuchsreihe als Aktivator beigemischt (Abbildung 36, B). Obwohl kein BSA im Ansatz enthalten war, konnte die Aktivität durch MD7 auf 119% gesteigert werden. Wurde dann zusätzlich die BSA-Konzentration erhöht, erreichte die Aktivität mit 148% bei 0,1 g /l BSA einen ähnlich hohen Wert gesteigert werden wie zuvor ohne Anwesenheit von MD7. Dieser nicht-additive Effekt ist ein Hinweis darauf, dass BSA und MD7 die Aktivität der BTH durch einen ähnlichen Mechanismus beeinflussen, der bei ca. 140% eine Sättigung erreicht. Bei einem unterschiedlichen Mechanismus wäre ein additiver Effekt der beiden Substanzen mit einer stärkeren Aktivierung wahrscheinlicher gewesen. Obwohl MD7 in deutlich niedrigerer Konzentration als BSA vorliegt, kann es BSA als Aktivator der Umsetzung von HA ersetzen.

7.2.4 Untersuchungen mittels HPLC

Das Ascorbinsäurederivat Vcpal als bisher stärkster getesteter Inhibitor sowie SO16, eines der aktivsten Indol-3-carboxamide, wurden zusätzlich mittels HPLC auf ihre Inhibition der BTH bei pH 7 und pH 3,5 untersucht. Die Messungen erfolgten bei Konzentrationen von 5 μ M (Vcpal) bzw. 50 μ M (SO16) über 24 Stunden. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit reinem DMSO in derselben Konzentration ohne Inhibitor untersucht. Weitere Verbindungen wurden nicht getestet, da die Methode eine deutlich geringere Empfindlichkeit besitzt als die beiden anderen photometrischen Verfahren und sich daher für ein Hochdurchsatz-Screening bisher nicht eignet.

Abbildung 34 zeigt die Chromatogramme für eine Umsetzung von HA nach einer Inkubation von 24 Stunden bei Anwesenheit von SO16 und Vcpal. Es zeigte sich zunächst insgesamt eine leichte Verkürzung der Retentionszeiten der HA-Fragmente im Vergleich zum Test ohne Zusatz von DMSO oder Inhibitoren. Ursache sind abschwächende Effekte des DMSO auf die Wechselwirkungen zwischen Säulenmaterial und den HA-Fragmenten mit der Folge einer beschleunigten Elution der Fragmente. Deutlich ist ein Signal von DMSO (Abbildung 34, A) nach ca. 3 Minuten Retentionszeit zu erkennen. Auch der Inhibitor SO16 führte zu einem Messsignal nach ca. 5 Minuten Retentionszeit (Abbildung 34, B), sowie einem schwächeren nach ca. 7 Minuten Retentionszeit (Abbildung 34, C), bei dem es sich möglicherweise um ein Zerfallsprodukt von SO16 handelt. Bezogen auf einen Ansatz mit reinem DMSO reduzierte Vcpal bei einer Konzentration von 5 µM die Bildung von HA-Fragmenten im Größenbereich von HA4 bis HA24 um ca. 67% (Abbildung 35, A). Dabei wurde die Bildung aller Fragmentbereiche von HA4-HA10, HA12-HA18 und HA20-24 in etwa gleich gleich stark unterdrückt. SO16 erreichte bei 50 µM eine Reduktion desselben Bereiches um 73%. Im Unterschied zu Vcpal wurde jedoch die Bildung der kleinsten Fragmente HA4-HA10 mit 80% stärker inhibiert als der Bereich HA12-HA18 mit 69% und HA20-HA24 mit 61% (Abbildung 35, A). Vcpal beeinflusst also offensichtlich die Enzymaktivität in der Weise, dass die Umsetzungsrate des Enzyms für alle Fragmente gesenkt wird. SO16 dagegen scheint die Spaltung von Fragmenten umso stärker zu unterdrücken, je kleiner diese werden.

Bei pH 3,5 zeigte Vcpal bei einer Konzentration von 5 µM eine ähnlich starke Inhibiton wie bei pH 7 (Abbildung 35, B). SO16 hemmte die BTH dagegen schwächer. Für SO16 war der Effekt vergleichbar mit den Ergebnissen für die Untersuchung in beiden photometrischen Testverfahren. Auch dort wurde eine Abschwächung der inhibitorischen Aktivität um den gleichen Faktor festgestellt. Ähnlich wie bei pH 7 war auch im sauren Milieu ein unterschiedliches Verhalten der Inhibitoren gegenüber der Bildung von HA-Fragmenten verschiedener Größe festzustellen. Während Vcpal erneut gleichmäßig die Bildung aller Fragmente verringerte, hatte SO16 nun einen umgekehrten Einfluss. Die Bildung der kleinen Fragmente (HA4 bis HA18) wurde weniger stark behindert als die Bildung der etwas größeren (HA20-HA26). Der Effekt war aber schwächer ausgeprägt als bei pH 7. Diese Beobachtungen könnten aber ein Hinweis auf einen unterschiedlichen Hemmmechanismus beider Substanzen sein.



Abbildung 34: Chromatogramme der Trennungen von HA-Fragmenten nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei pH 7 und einem Zusatz von 5 μ M Vcpal (1) und 50 μ M SO16 (2). Die Proben enthielten eine HA-Konzentration von 20 mg/ml, eine BTH-Aktivität von 200 U in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7, eine NaCl-Konzentration von 75 μ M sowie Vcpal 5 μ M (1) bzw. SO16 50 μ M (2). Trennbedingungen: 20 cm NH₂-Anionenaustauschersäule, Partikelgröße 5 μ M, Säulentemperatur 40 °C, Fließgeschwindigkeit 1 ml/min, Fließmittel 16 - 800 mM NaH₂PO₄-Lösung, linearer Gradient über 60 Minuten, Detektion mittels UV/VIS-Detektor bei 210 nm. (A) DMSO, (B,C) SO16.



Abbildung 35: Hemmung der BTH durch 5 μ M Vcpal und 50 μ M SO16 bei pH 7 (A) und pH 3,5 (B). Die Proben enthielten eine HA-Konzentration von 20 mg/ml, eine BTH-Aktivität von 200 U in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 (A) bzw. Ameisensäure-Puffer pH 3,5 (B), eine NaCI-Konzentration von 75 μ M sowie Vcpal 5 μ M bzw. SO16 50 μ M. Die Berechnung der Inhibition erfolgte durch Trennung der Proben mittels HPLC, Integration der Peakflächen und dem Vergleich mit einer Probe ohne Inhibitor.

7.3 Humane Hyaluronidase 2

7.3.1 Autodisplay der hHyal-2

Nachdem nun die Inhibitortests für Hyaluronidasen vorlagen und ihre Verwendbarkeit für die Suche nach potentieller Inhibitoren mit Hilfe von BTH bestätigt werden konnte, sollten als nächster Schritt die humanen Hyaluronidasen mittels Autodisplay auf der Oberfläche von *E. coli* exprimiert und in den Tests eingesetzt werden.

Vor Beginn der Arbeiten wurde anhand der Proteinstruktur der hHyal-2 zunächst mittels dem Programm SignalP (Emanuelsson *et al.* 2007) die für den Transport über die Zellmembran verantwortliche Signalsequenz am 5'-Ende identifiziert. Da das Autotransporter-System eine eigene, *E. coli*-spezifische Signalsequenz enthält, durfte die entsprechende humane Sequenz nicht mit in das Autotransporter-Konstrukt eingefügt werden. Die humane Signalsequenz wäre von *E. coli* mit niedrigerer Effektivität prozessiert worden. Eine Überprüfung des Codongebrauchs (codon usage) innerhalb der Sequenz von hHyal-2 mittels "gcua", dem "graphical codon usage analyser" (Fuhrmann *et al.* 2004) ergab keine Verwendung seltener Codons, so dass mit keiner Einschränkung der Translation des humanen Gens in *E. coli* zu rechnen war.

Die hHyal-2 enthielt darüber hinaus wie alle humanen Hyaluronidasen eine C-terminale Domäne unbekannter Funktion. Um einen möglichen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzyms zu untersuchen, sollte dieses einmal mit und einmal ohne die C-terminale Domäne auf die Oberfläche von E. coli gebracht werden. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Kristallstruktur einer humanen Hyaluronidase vorlag, wurde der Beginn dieser Domäne durch Vergleich der Aminosäureseguenzen der humanen Hyaluronidasen mit der Bienengift-Hyaluronidase bvHyal ermittelt. BvHyal fehlt die charakteristische Cterminale Sequenz. Das Ende der eigentlichen Hyaluronidase-Sequenz wurde daher für hHyal-2 und ebenso für hHyal-1 auf die letzte Aminosäure festgelegt, die in allen vier Hyaluronidasen identisch war (Abbildung 37). Beim Vergleich mit Literaturdaten (Jedrzejas und Stern 2005; Hofinger et al. 2007b) kamen Zweifel auf, ob die Länge der Cterminalen Domäne zu großzügig gewählt wurde. Für die Klonierung von hPH-20 wurde ihr Beginn daher um vier zusätzliche Aminosäuren C-terminal verschoben. Ein Vergleich mit der Kristallstruktur der hHyal-1 zeigte, dass die auf diese Weise ausgewählten Sequenzen tatsächlich vollständig die C-terminale, als EGF ähnlich ("EGF like") identifizierte Domäne umfassen, wie sie von Chao et al. (2007) vorgeschlagen wurde (Abbildung 37, oberer Pfeil). Sie legten den Bereich durch Aminosäuresequenzvergleich mit dem Heparin-bindenden "EGF-like growth factor" fest. Die vollständigen Aminosäureund DNA-Sequenzen aller Hyaluronidasen sind in Abbildung 59 bis 65 zu sehen.

7 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

							Beginr	n der C-ter	minalen De	omäne
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
	.									
hHyal-1	AAGDPNLPVLPYVQIF	YDT-TNHFL	PLDELEHSLO	ESAAQGAAGV	/LWVSWENTR	TKESCQAIKE	YMDTTLGPFI	LNVTSGALLC	SQALCSGHG	RCVRRT
hHyal-2	HHANHALPVYVFTRPI	YSR-RLTGL	SEMDLISTIC	ESAALGAAGVI	LWGDAGYTI	STETCQYLKE	YLTRLLVPYV	VNVSWATQYC	CSRAQCHGHGI	RCVRRN
hPH-20	PDAKSPLPVFAYTRIV	/FTDQVLKFL	SQDELVYTFG	ETVALGASGI	/IWGTLSIMR	SMKSCLLLDN	YMETILNPYI	INVTLAAKMO	SQVLCQEQG	JCIRKN
bvHyal	MTTSRKK-VLPYYWYF	YQDRRDTDL	SRADLEATLR	KITDLGADGFI	IWGSSDDIN	TKAKCLQFRE	YLNNELGPAV	KRIALNN		
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
	.									
hHyal-1	SHPKALLLLNPASFSI	IQLTPGGGPL	SLRGALSI	EDQAQMAVEFI	CRCYPGWQA	PWCERKS	:M	W		
hHyal-2	PSASTFLHLSTNSFRI	LVPGHAPGEF	QLRPVGELSW	ADIDHLQTHF	RCQCYLGWSG	EQCQWDH	IRQAAGGASEA	WAGSHLTSLI	ALAALAFTW	ΓL
hpH-20	WNSSDYLHLNPDNFAI	QLEKG-GKF	TVRGKPTL	EDLEQFSEKFY	CSCYSTLSC	KEKADVKDTE	AVDVCIADGV	CIDAFLKPPM	IETEEPQIFYN	JASPST
bvHyal	-NANDRLTVDVSVDQV	7								
	510	520								
	.	.								
hHyal-1										
hHyal-2										
hPH-20	LSATMFIVSILFLIIS	SSVASL								
bvHval										

Abbildung 36: Sequenzvergleich der Aminosäuren von hHyal-1, hHyal-2, hPH-20 und bvHyal ab Position 301 mittels ClustalW und Kennzeichnung der C-terminalen Domäne. BvHyal besitzt keine C-terminale Domäne wie die humanen Hyaluronidasen und wurde daher als Vergleich zur Identifizierung herangezogen. Der auf diese Weise festgelegte Beginn der C-terminalen Domäne wurde mit dem unteren Pfeil gekennzeichnet. Der von Chao *et al.* (2007) festgelegte Beginn der C-terminalen Domäne von hHyal-1 ist mit dem oberen Pfeil gekennzeichnet.

Zur Klonierung der hHyal-2 wurde die DNA-Sequenz mit und ohne C-terminaler Domäne mittels PCR und dem Plasmid pRZPDHyal2 als Template amplifiziert, durch Ligation in den Vektor pET-Cyp13 eingefügt und in *E. coli* BL21(DE) (Terpe 2006) transformiert. Die für die PCR benötigten Oligonukleotide AK009, AK010 und AK011 sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die entstandenen Plasmide pAK006 und pAK007 sind in Abbildung 66 dargestellt. Die beiden Autotransporter-Fusionsproteine besitzen ohne Signalpeptid eine Größe von 100,2 kDa (hHyal-2+C: hHyal-2-Autotransporter-Fusionsprotein mit C-terminaler Domäne) bzw. 87 kDa (hHyal-2-C: hHyal-2-Autotransporter-Fusionsprotein ohne C-terminale Domäne).

Nach der Kultivierung der Zellen wurden die Plasmide erneut isoliert und die korrekte Basenlänge des gesamten Plasmids sowie des eingesetzen Inserts mittels Restriktionsendonuklease-Einzelverdau und Doppelverdau mit Xhol, Asp718 sowie Xhol und Asp718 zusammen überprüft. Dabei zeigten die im Gel erhaltenen Fragmente keine Abweichungen der erwarteten Basenlängen. Zusätzlich wurde die Basensequenz der eingesetzten Hyaluronidase analysiert. Dabei zeigten sich keine Abweichungen zur Sequenz, die unter der Nummer U09577 in der GenBank zu finden ist (Benson *et al.* 2008).

Um die Theorie zu überprüfen, dass möglicherweise die auf der Oberfläche der Zellen vorhandenen Lipopolysaccharide (LPS) zu einer Hemmung der Enzymaktivität führten, wurde ein Stamm mit verkürztem LPS ausgewählt und ebenfalls zur Expression der hHyal-2 herangezogen. Dieser Stamm *E. coli* F470 verfügte im Gegensatz zu den bisher verwendeten Stämmen *E. coli* UT5600(DE3) und BL21(DE3) nicht über das aus dem

Bakteriophagen T7 stammende Gen für die T7-Polymerase. Dieses ist aber für die Expression der bisherigen Plasmide pAK006 und pAK007 nötig, da die Autrotransporter-Konstrukte unter der Kontrolle eines T7-Promotors standen. Es mussten daher neue Plasmide konstruiert werden, die das Autotransporter-Konstrukt unter der Kontrolle eines anderen Promotors trugen. Die Wahl für das Rückgrat des neuen Plasmids fiel dabei auf das Plasmid pJM007 (Maurer et al. 1997). Dieses trägt ebenfalls das Autotransporter-Fusionsgen, allerdings mit Choleratoxin B als Passagier und steht nicht unter der Kontrolle des T7-Promotors. Identisch zu den bisher konstruierten Plasmiden befindet sich hinter der DNA-Sequenz des Signalpeptids eine Xhol-Schnittstelle. Diese Schnittstelle, sowie eine BamHI-Schnittstelle, die sich gegen Ende der DNA-Sequenz des β-Fasses befindet, wurden genutzt, um die hHyal-2 inklusive C-terminalem Teil, Linker und dem größten Teil des β-Fasses aus den Plasmiden pAK006 und pAK007 mittels Xhol/BamHI - Endonukleasedoppelverdau herauszuschneiden. Nach einer Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese, bei der die richtige Größe überprüft werden konnte, wurde das Fragment aus dem Gel aufgereinigt und durch Ligation in den auf dieselbe Weise geschnittenen und aufgereinigten Vektor eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde anschließend durch Dialyse aufgereinigt und in E. coli F470 transformiert. Das für die hHyal-2+C entstandene Plasmid pAK013 ist in Abbildung 66 dargestellt. Aufgrund der neuen Konstruktion erfolgte die Proteinexpression nun konstitutiv, d.h. sie musste nicht mehr durch Zugabe von IPTG gestartet werden. Für die hHyal-2 ohne C-terminale Domäne gelang die Ligation und Transformation aus unbekannter Ursache nicht.

7.3.2 Überprüfung der Oberflächenständigkeit

Um den erfolgreichen Oberflächentransport der Hyaluronidase hHyal-2 durch das Autodisplay zu überprüfen, wurden die Außenmembranproteine der Stämme *E. coli* BL21(DE3) pAK006 und *E. coli* BL21(DE3) pAK007 vor und nach einer Behandlung mit Proteinase K isoliert. Ihre Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese ist in Abbildung 37 dargestellt. In den beiden Außenmembranproteinisolaten ohne Proteinverdau sollte jeweils eine Bande in der Größe von ca. 100 kDa (hHyal-2 mit C-terminaler Domäne, "hHyal-2+C") bzw. ca. 87 kDa (hHyal-2 ohne C-terminale Domäne, "hHyal-2-C") zu finden sein. Nach dem Proteinverdau sollten diese Banden nicht mehr sichtbar sein. Tatsächlich bestätigt die SDS-Gelelektrophorese diese Erwartungen (Abbildung 37, Proteine mit Pfeilen markiert). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die hHyal-2 mit und ohne C-terminaler Domäne erfolgreich auf die Außenmembran von *E. coli* transportiert wurde. Die Verwendung des reduzierenden Probenpuffers hatte keinen Einfluss auf die

Auftrennung der Proteine im Gel. Neben den erwarteten Banden finden sich noch weitere typische Außenmembranproteinbanden wie OmpA sowie OmpF und OmpC (Abbildung 37, A und B), die sich natürlicherweise in der Membran von *E. coli* befinden. Letztere wandern aufgrund ähnlicher Größe als gemeinsames Protein durch das Gel. Alle drei werden von der Protease nicht abgebaut, da sie keinen extrazellulären Anteil besitzen. Ein weiteres Protein aus der Außenmembran von *E. coli* BL21(DE3) mit einer Größe von ca. 47 kDa ist in den Spuren 1, 3, 5 und 7 zu sehen.



Abbildung 37: Nachweis der Oberflächenständigkeit von hHyal-2+C und hHyal-2-C auf *E. coli* BL21(DE3). Anfärbung mit Coomassie-Blau, die gesuchten Autotransporter-Fusionsproteine wurden mit Pfeilen markiert. hHyal-2+C: humane Hyaluronidase 2 inkl. Cterminaler Domäne, hHyal-2-C: humane Hyaluronidase 2 ohne C-terminale Domäne; Induktion: Induktion der Proteinexpression mittels IPTG; red. Puffer: Probenpuffer mit DTT; Proteinase K: Behandlung der ganzen Zellen mit Proteinase K; M: Protein-Größenstandard; A: Außenmembranprotein OmpA; B: Außenmembranproteine OmpF und OmpC.

Da bekannt ist, dass ca. 100.000 Außenmembranproteinmoleküle OmpA in der Außenmembran von *E. coli* vorhanden sind (Koebnik *et al.* 2000), konnte die Menge an hHyal-2 geschätzt werden. Die Stärke der Proteinbande von hHyal-2-C kann grob auf ca. die Hälfte der Stärke der OmpA-Bande geschätzt werden, die Proteinbande von hHyal-2+C auf etwa ein Drittel. Zudem ist hHyal-2-C etwa dreimal so groß wie OmpA. Es dürften sich demnach auf *E. coli* BL21(DE3) ca. 1 / (2 x 3) so viele hHyal-2-C-Moleküle befinden wie OmpA, das entspräche ca. 1,7 x 10⁴ Enzymmolekülen. Für hHyal-2+C ergäben sich aufgrund der geringen Größenunterschiede zu hHyal-2-C ca. 1 / (3 x 3) so viele Moleküle wie OmpA, was etwa 1 x 10^4 Enzymmolekülen entspräche.

Eine Überprüfung der Oberlächenständigkeit der hHyal-2 auf *E. coli* F470 sollte analog zum Stamm *E. coli* BL21(DE3) erfolgen. Da *E. coli* F470 ein induzierbarer Promotor fehlte, wurden die Proteine in geringerer Menge gebildet als nach gezielter Induktion der Proteinexpression. Zusätzlich trug der Stamm die Protease OmpT auf seiner Oberfläche. Diese Protease ist für das Abtrennen nach außen gerichteter Proteine verantwortlich und könnte zum Schneiden und Entlassen von Außenmembranproteinen in den Überstand führen. Proteine könnten daher schwerer im SDS-Gel einer Außenmembranproteinfraktion zu erkennen sein. Tatsächlich konnte nur eine sehr schwache Bande im Größenbereich des hHyal-2-Autotransporter-Fusionsproteins gefunden werden (ohne Abbildung). Eine Behandlung mit Protease zum Nachweis der Oberflächenständigkeit konnte daher nicht durchgeführt werden und die Oberflächenständigkeit der hHyal-2 auf *E. coli* F470 kann zur Zeit nicht mit Sicherheit bestätigt werden.

7.3.3 Aktivitätsuntersuchungen bei pH 7

Die Aktivitätsuntersuchungen der hHyal-2-exprimierenden Zellen E. coli BL21(DE3) wurden bei pH 7 zunächst mit dem gleichen Puffer wie die Untersuchungen mit BTH durchgeführt. Als Kontrolle wurde E. coli BL21(DE3) ohne Plasmid sowie E. coli BL21(DE3) pET-Adx04 eingesetzt, ein Stamm, der Adrenodoxin als Autotransporter-Passagier besitzt. Adrenodoxin ist ein Eisen-Schwefel-Cluster enthaltendes Protein, das an der Synthese von Thyroidhormonen beteiligt ist und von dem keine Hyaluronidase-Aktivität bekannt ist. Bei keiner der Zellen zeigte sich eine messbare Aktivität der hHyal-2. Offenbar waren die gewählten Testbedingungen für hHyal-2 nicht optimal oder die Enzymaktivität zu niedrig, um detektiert zu werden. Um die Aktivität der hHyal-2 anzuheben, wurden mehrere Ansätze verfolgt. Zum einen sollten andere Puffer im neutralen pH-Bereich geprüft werden, denen BSA zugesetzt wurde. Als zweite Möglichkeit sollte dann BSA durch NaCl ersetzt werden. Beide Substanzen, BSA und NaCl, wurden zuvor als Aktivatoren der Hyaluronidase-Aktivität beschrieben. Zwar ist die aktivierende Potenz von BSA bei pH 7 aufgrund geringerer positiver Ladungen deutlich unter der bei pH 3,5, doch immer noch messbar. Dies haben Versuche mit steigenden BSA-Konzentrationen von 0 bis 1 g/l als Pufferzusatz im "stains-all" Testverfahren von BTH deutlich gezeigt (Abbildung 39). Bei einer Konzentration von 1 g/l konnte die Aktivität auf 163% gesteigert werden. Diese Menge an BSA wurde daher auch für die folgenden Versuche mit hHyal-2 als Zusatz ausgewählt.


Abbildung 38: Effekt der Zugabe von BSA auf die Aktivität von BTH bei pH 7 im "stains-all" Testverfahren. BTH-Konzentration 100 U/ml in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 mit einem BSA-Gehalt von 0 bis 1 g/l; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser.

Ein dritter Ansatz beruhte auf der Idee, dass die auf der Oberfläche von *E. coli* vorhandenen Zuckerketten der Lipopolysaccharide (LPS) der Glykokalyx einen inhibierenden Einfluss auf die Hyaluronidase ausüben könnten. Es ist bekannt, dass der HA strukturell ähnliche Verbindungen, wie z.B. Heparine oder Dextrane, Inhibitoren von Hyaluronidasen darstellen können (Wolf *et al.* 1984; Udabage *et al.* 2004). Die Zuckerketten der LPS könnten einen ähnlich inhibierenden Effekt ausüben. Um diesen zu minimieren, wurde der Stamm *E. coli* F470 eingesetzt, der Mutationen in verschiedenen Enzymen zur Zuckersysnthese aufweist, die für die Bildung der Polysaccharidkette der LPS wesentlich sind. Somit kann *E. coli* F470 die Lipopolysaccharide nur unvollständig ausbilden (Schmidt *et al.* 1970). Die Zellen sollten damit nicht mehr in der Lage sein, Hyaluronidasen durch ihre eigenen LPS zu hemmen.

Zunächst wurden neben dem Phosphatpuffer pH 7 des "stains-all" Testverfahrens zwei weitere Puffer getestet: der Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 aus dem Morgan-Elson-Testverfahren sowie PBS pH 7. Allen Puffern wurde BSA in einer Konzentration von 2 g/l zugesetzt. Nach dem Mischen mit HA-Lösung ergab sich so eine Zielkonzentration von 1 g/l während des Tests. Da es sich um eine grobe Evaluierung der besten Bedingungen handelte, wurden die Messungen nur als Duplikate durchgeführt.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass der Phosphat-Citrat-Puffer für Messungen nicht geeignet war, da er bei jedem Messpunkt zu einer deutlichen Verringerung der Absorption bei pH 7 führte. Der Effekt trat sowohl bei hHyal-2 produzierenden Stämmen (Abbildung 40) als auch bei den verwendeten Negativkontrollen (Abbildung 39) auf. Für weitere Messungen wurde dieser Puffer daher nicht weiter verwendet. Auch PBS zeigte

einen ähnlich störenden Einfluss, doch war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. Wie erwartet, zeigte sich bei den beiden Negativkontrollen kein Abbau der HA (Abbildung 39, A und B), doch auch bei den zwei Stämmen, die hHyal-2 mit und ohne C-terminale Domäne auf ihrer Oberfläche trugen, zeigte sich erneut keine Aktivität in allen getesteten Puffern nach Zusatz von BSA (Abbildung 40).



Abbildung 39: Testung von *E. coli* BL21(DE3) (A) und *E. coli* BL21(DE3) pET-Adx04 (B) als Negativkontrollen bei pH 7 mit verschiedenen Puffern nach Zugabe von BSA. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von OD_{578 nm} = 10 im jeweils angegebenen Puffer bei pH 7 mit 2 g/l BSA angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; Masser: 0 h, Masser: 24 h, [1]: 48 h Inkubationszeit.

Als nächstes sollte der Zusatz von NaCl untersucht werden. Viele Autoren fanden einen Bereich der optimalen NaCl-Konzentration von 10 mM bis hin zu 100 mM NaCl oder sogar darüber hinaus (Kakegawa *et al.* 1985a; Afify *et al.* 1993; Hofinger *et al.* 2007b). Messungen an BTH im "stains-all" Testverfahren bei pH 7 bestätigten den Effekt bereits sehr geringer Mengen NaCl und zeigten keinen negativen Einfluss bis zu einer Konzentration von 75 mM (Abbildung 41). Ein Plateau wurde ab 5 mM NaCl erreicht. Um einen sicheren Effekt zu erzielen, sollte während der Untersuchungen eine Konzentration

von 10 mM NaCl erreicht werden. Dazu wurde den Zellen vor dem Mischen mit Substratlösung 20 mM NaCl zugefügt. Als Puffer wurde nur Phosphatpuffer pH 7 untersucht, da sowohl PBS als auch Phosphat-Citrat-Puffer pH 7 bereits eine ausreichende Menge NaCl enthielten und keinen Effekt gezeigt hatten. Die Zugabe von NaCl zum Phosphatpuffer blieb ebenso erfolglos.



Abbildung 40: Testung von hHyal-2 mit und ohne C-terminalen Teil exprimiert auf *E. coli* BL21(DE3) bei pH 7 mit verschiedenen Puffern nach Zugabe von BSA. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von OD_{578 nm} = 10 im jeweils angegebenen Puffer bei pH 7 mit 2 g/l BSA angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; **111**: 0 h, **111**: 24 h, **111**: 48 h Inkubationszeit; hHyal-2+C: humane Hyaluronidase 2 mit C-terminalem Teil, hHyal-2-C: humane Hyaluronidase 2 ohne C-terminalen Teil.



Abbildung 41: Effekt der Zugabe von NaCl auf die Aktivität der BTH bei pH 7. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens. BTH-Konzentration 100 U/ml in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 mit einem NaCl-Gehalt von 0 bis 75 mM; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser.

Nun wurde der neue Stamm *E. coli* F470 pAK013 in die Untersuchungen eingeführt. Die Aktivitätsuntersuchungen zeigten zunächst ebenfalls kaum Absorptionsänderung in Phosphatpuffer oder PBS bei pH 7 über einen Zeitraum von 48 Stunden. Nach einer Kombination des Stammes mit NaCl-haltigen Puffern zeigte sich jedoch sowohl in PBS als auch im Phosphatpuffer eine messbare Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass tatsächlich eine Inhibition der Hyaluronidase auf der Oberfläche von *E. coli* durch die LPS stattgefunden hat. Des Weiteren schien die Zugabe von NaCl für die Messung der Aktivität ganzer Zellen günstig zu sein, so dass im Folgenden allen weiteren Messungen mit Zellen NaCl in einer Zielkonzentration von 10 mM zugesetzt wurde.

Da es sich bei den durchgeführten Messungen nur um Doppelbestimmungen handelte, wurden die Aktivitätsuntersuchungen der hHyal-2 auf *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* F470 noch mehrfach wiederholt (Abbildung 42). Dabei wurden die Untersuchungen direkt unter den günstigsten Pufferbedingungen (Phosphatpuffer pH 7 mit 10 mM NaCl) durchgeführt. Es ergaben sich Hinweise auf eine Aktivität der hHyal-2 mit C-terminalem Teil bei pH 7 für den Stamm mit verkürztem LPS. Auffällig war, dass der größte Anteil der Umsetzung an HA bereits innerhalb der ersten 24 Stunden erfolgte. Offenbar wird das Enzym nach einiger Zeit inaktiviert oder es wird eine Art "basale Absorption" erreicht. Dies könnte vermutet werden, da in keinem Fall eine niedrigere Absorption gemessen wurde, obwohl diese deutlich über der im "stains-all" Testverfahren mit BTH festgestellten minimalen Absorption lag. Offensichtlich färben sich Stoffwechselprodukte oder gelöste Proteine der Bakterien mit "stains-all" an, ganz ähnlich wie dies mit DMAB im Morgan-Elson-Testverfahren beobachtet wurde.

Während für die hHyal-2 ohne C-terminalen Teil auf *E. coli* BL21(DE3) auch bei mehrfacher Messung kein Abbau von HA nachgewiesen werden konnte, gab es für die hHyal-2 mit C-terminalem Teil auf *E. coli* BL21(DE3) ebenfalls Hinweise auf Aktivität. Die Umsetzung erfolgte im Gegensatz zum entsprechenden Enzym auf *E. coli* F470 über einen Zeitraum länger als 24 Stunden. Die deutlich höhere Standardabweichung der ersten, sofortigen Messung (0 h) führte jedoch dazu, dass die gemessene Aktivität sich nicht signifikant von der inaktiven hHyal2-C unterscheidet. Da die hHyal-2-C auf *E. coli* BL21(DE3) keine Aktivität aufwies, wurde auf die Testung einer weiteren Negativkontrolle für mögliche Effekte durch *E. coli* BL21(DE3) verzichtet. Als Negativkontrolle für *E. coli* F470 ist die Messung des Stammes mit der hHyal-1+C auf der Oberfläche dargestellt, die bei pH 7 ebenfalls inaktiv ist. Ein Effekt, der auf die Bakterien zurückzuführen ist, kann somit ausgeschlossen werden.



Abbildung 42: Testung von hHyal-2 mit und ohne C-terminalen Teil exprimiert auf *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* F470, sowie hHyal-1 mit C-terminalem Teil auf *E. coli* F470 bei pH 7. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden fünfmal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von $OD_{578 \text{ nm}} = 10$ in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 mit 20 mM NaCl angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; **MM**: 0 h, **MM**: 24 h, **MM**: 48 h Inkubationszeit; hHyal-2+C: humane Hyaluronidase 2 mit C-terminalem Teil, hHyal-2-C: humane Hyaluronidase 2 ohne C-terminalem Teil, hHyal-1+C: humane Hyaluronidase 1 mit C-terminalem Teil.

Die mit den Zellen erreichte Enzymaktivität entsprach bei pH 7 für die hHyal-2 mit Cterminalem Teil einer Volumenaktivität von 400 mU/ml Zellsuspension *E. coli* F470 $OD_{578 nm} = 5$ bei Verwendung von Phosphatpuffer mit NaCl. Für die hHyal-2+C auf *E. coli* BL21(DE3) ergab sich unter gleichen Bedingungen eine Volumenaktivität von 160 mU/ml. Die Aktivitäten wurden nach Vergleich der Absorptionsdifferenzen mit denen durch bekannte Enzymkonzentrationen von BTH bei pH 7 erhaltenen (Abbildung 16) berechnet.

7.3.4 Aktivitätsuntersuchungen bei pH 3,5

Auch die Aktivitätsmessungen im sauren Bereich bei pH 3,5 erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens, da sich das Morgan-Elson Testsystem wie in Kapitel 7.1.3 dargelegt nicht für Messungen von Zellen eignete. Der verwendete Ameisensäure-Puffer enthielt bereits 0,1 M NaCl, so dass ein Zufügen von NaCl analog zur Messung bei pH 7 nicht erforderlich war. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 43 dargestellt.

Grundsätzlich lagen die Absorptionswerte mit 1,1 - 1,4 AE zu Beginn z.T. deutlich unter den bei der Entwicklung des Testsystems erhaltenen Werten um 1,6 AE für BTH bei einer Konzentration von 2 mg/ml HA. Das lag daran, dass sich im Gegensatz zu den Messungen bei der Entwicklung des Testsystems, störende Fremdstoffe wie z.B. Proteine aus lysierten Zellen sowie niedriger pH-Wert gemeinsam negativ auf die Komplexbildung mit "stains-all" und damit auch abschwächend auf die Intensität der Farbentwicklung auswirkten.



Abbildung 43: Testung von hHyal-2 mit und ohne C-terminalen Teil exprimiert auf *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* F470 bei pH 3,5. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden fünfmal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von $OD_{578 nm} = 10$ in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; **Imp**: 0 h, **Imp**: 24 h, **Imp**: 48 h Inkubationszeit; hHyal-2+C: humane Hyaluronidase 2 mit C-terminalem Teil, hHyal-2-C: humane Hyaluronidase 2 ohne C-terminalen Teil.

Trotzdem war ein schwacher Hinweis auf Aktivität der Zellen *E. coli* BL21(DE3) zu erkennen, die hHyal-2 mit C-terminalem Teil auf ihrer Oberfläche trugen. Deutlichere Hinweise gab es auf den Abbau von HA durch dasselbe Enzym auf *E. coli* F470, allerdings erneut ausschließlich für die ersten 24 Stunden Inkubation. Nach weiteren 24 Stunden war nur ein geringer weiterer Abbau feststellbar. Als Negativkontrolle wurde der Stamm *E. coli* F470 eingesetzt, der kein Plasmid trug und keinerlei Absorptionsänderumg über einen Zeitraum von 48 Stunden zeigte.

Die Aktivität der hHyal-2+C exprimiert auf *E. coli* F470 bei pH 3,5 entsprach damit einer Volumenaktivität von 62 mU/ml Zellsuspension $OD_{578 \text{ nm}} = 5$, die der hHyal-2+C auf *E. coli* BL21(DE3) 16 mU/ml Zellsuspension $OD_{578 \text{ nm}} = 5$. Die Aktivitäten wurden durch Vergleich der jeweiligen Absorptionsdifferenzen mit denen einer Umsetzung von HA durch eine bekannte BTH-Konzentration bei pH 3,5 (Abbildung 18) erhalten.

7.3.5 Untersuchungen mit ausgewählten Inhibitoren

Für die Untersuchungen zur Hemmung der humanen Hyaluronidasen im Autodisplay-System wurden einige der inhibitorisch gegen BTH aktivsten Verbindungen ausgewählt. Dies waren das Ascorbinsäurederivat Vcpal sowie die Inhibitoren SO3 und SO16. Da die hHyal-2+C ihre höchste gemessene Aktivität im Stamm *E. coli* F470 bei pH 7 erreichte, wurde dieser pH-Wert für die Untersuchungen ausgewählt. Ein Einsatz der hHyal-2 ohne C-terminaler Domäne machte wenig Sinn, da dieses nicht das native Enzym darstellt und gegen diese Form keine Inhibitoren gesucht werden. Die Ergebnisse des Einsatzes von 50 μ M jedes Inhibitors gegen BTH und hHyal-2+C auf *E. coli* F470 im Vergleich sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Messungen wurden analog der Testung mit BTH durchgeführt, das Enzym jedoch durch die Zellsuspension mit OD_{578 nm} = 10 ersetzt. Vor der Zugabe der "stains-all"-Lösung wurde die Probe durch Zentrifugation von den Zellen befreit. Der Überstand wurde dann nach Zugabe von "stains-all"-Lösung und Wasser bei 650nm vermessen.



Abbildung 44: Enzymaktivität von *E. coli* **F470** hHyal-2+C und BTH nach Zugabe von 50 μM Inhibitor bei pH 7. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden dreimal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von OD_{578 nm} = 10 in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 mit 20 mM NaCl angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 μl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 μl Wasser; ETH: hHyal-2+C auf *E. coli* F470, ETH;

Im Vergleich zur Hemmwirkung gegen BTH ist Vcpal gegen hHyal-2+C weniger stark wirksam. Es erreicht nur eine Hemmung von 82% der hHyal-2+C auf *E. coli* F470 statt von über 95% der BTH. Auch SO3 hemmt hHyal-2+C: Er erreicht eine Enzymhemmung der hHyal-2+C auf *E. coli* F470 von 55% statt einer Hemmung der BTH von 80%. Der Inhibitor SO16 ist dagegen in etwa gleich aktiv, er hemmt die hHyal-2+C zu 65% im Vergleich zur Hemmung der BTH um 68%. Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse ist mit Sicherheit in der unterschiedlichen Aminosäuresequenz der beiden Hyaluronidasen BTH und hHyal-2 zu suchen. Bereits kleine Änderungen können zu Verschiebungen in der Affinität des Inhibitors zum Enzym führen. Das unterstreicht, wie wichtig die Entwicklung von Inhibitoren gezielt gegen humane Hyaluronidasen ist.

Die Hinweise auf Aktivität der hHyal-2 mit C-terminalem Teil auf der Zelloberfläche von *E. coli* F470, die aus den Messungen im "stains-all" Testverfahren bei pH 7 abgeleitet

wurden (Abbildung 42), konnten durch die Enzyminhibition mittels Vcpal, SO3 und SO16 bestätigt werden. Damit ist auch die Expression der hHyal-2 auf die Zelloberfläche von *E. coli* F470 belegt, die zunächst nur für *E. coli* BL21(DE3) gezeigt werden konnte (Abbildung 37).

Insgesamt war die Standardabweichung bei Messungen mit ganzen Zellen deutlich erhöht gegenüber der von Tests mit BTH. Als Ursache müssen Störungen durch Zellbestandteile, Stoffwechselprodukte sowie die zusätzlich korrekt einzustellende optische Dichte genannt werden. Diese Einflussfaktoren entfallen bei Messungen mit aufgereinigtem Enzym. Das Einstellen einer bestimmten Volumenaktivität durch Verdünnen von Hyaluronidaselösung ist zudem deutlich leichter und genauer durchführbar als das Einstellen der optischen Dichte.

7.4 Humanes PH-20

7.4.1 Autodisplay der hPH-20

Auch bei der hPH-20 wurde zunächst anhand der Primärsequenz mit dem Programm SignalP (Emanuelsson *et al.* 2007) die für den Transport über die Zellmembran verantwortliche Signalsequenz am 5'-Ende identifiziert. Ebenso erfolgte eine Überprüfung des Codongebrauchs innerhalb der Sequenz von hPH-20 mittels "gcua" (Fuhrmann *et al.* 2004) und ergab erneut keine Verwendung seltener Codons. Die C-terminale Domäne wurde festgelegt (Abbildung 36) und die DNA-Sequenz mit und ohne C-terminaler Domäne mittels PCR und dem Plasmid p998N2310771 als Template amplifiziert, durch Ligation über die Schnittstellen KpnI und XhoI in den Vektor pET-Cyp13 eingefügt und in *E. coli* UT5600(DE3) und BL21(DE) (Terpe 2006) transformiert. Für die PCR wurden die Oligonukleotide AK004, AK005 und AK006 (Tabelle 11) benötigt. Die entstandenen Plasmide pAK004 und pAK005 sind in Abbildung 67 dargestellt. Die beiden Autotransporter-Fusionsproteine besitzen ohne Signalpeptid eine Größe von 103 kDa (hPH-20-Autotransporter-Fusionsprotein mit C-terminaler Domäne) bzw. 87 kDa (hPH-20-Autotransporter-Fusionsprotein ohne C-terminale Domäne).

Zur Kontrolle wurde die Basenlänge des gesamten Plasmids sowie der DNA-Sequenz von hPH-20 erfolgreich geprüft. Bei der Analyse der Basensequenz zeigte sich jedoch eine Abweichung zur Sequenz, die unter der Nummer BC026163 in der GenBank zu finden ist (Benson *et al.* 2008). Dabei handelte es sich um einen Basenaustausch an der Position 835 in beiden Plasmiden pAK004 und pAK005, bei der ein Cytosin gegen Thymin getauscht ist. Dies führt im gebildeten Protein zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin gegen die neutrale Aminosäure Tryptophan. Basensequenzanalysen

des Ausgangsplasmids p998N2310771 ergaben, dass auch hier die Mutation bereits enthalten ist. Es kann daher nicht gesagt werden, ob es sich bei dem gefundenen Basenaustausch um eine Mutation im erhaltenen Plasmid oder um einen Fehler in der Sequenz BC026163 an Basenpaar 1209 handelt. Auf einen Neuerwerb des Plasmids wurde verzichtet. Der Basenaustausch muss bei der Auswertung der nachfolgenden Experimente berücksichtigt werden, insbesondere bei Aktivitätsuntersuchungen.

Aufgrund der Erfahrungen mit der Aktivität der hHyal-2 in *E. coli* F470 sollte auch die hPH-20 in diesem Stamm auf die Oberfläche gebracht und hinsichtlich einer Aktivität überprüft werden. Dazu wurde der größte Teil des Autotransporter-Konstruktes mit Hilfe der Restriktionsenzyme Xhol und BamHI aus pAK006 und pAK007 herausgeschnitten, in den ebenso behandelten Vektor pJM007 mittels Ligation eingefügt und die erhaltenen Plasmide pAK011 und pAK012 (Abbildung 67) durch Elektroporation in kompetente Zellen *E. coli* F470 eingebracht.

7.4.2 Überprüfung der Oberflächenständigkeit

Die Oberflächenständigkeit der hPH-20 wurde durch Isolierung der Außenmembran von E. coli UT5600(DE3) pAK004 und E. coli UT5600(DE3) pAK005 vor und nach einem Proteaseverdau mit Proteinase Κ Als Kontrolle die überprüft. diente Außenmembranisolation derselben Stämme, deren Proteinexpression aber nicht durch IPTG induziert wurde. Bei erfolgreicher Oberflächenständigkeit sollte nach Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese in den Spuren der Außenmembranproteinisolate ohne Proteinverdau eine Bande in der Hohe von ca. 102 kDa (hPH-20 mit C-terminaler Domäne, "hPH20+C") bzw. 87 kDa (hPH-20 ohne C-terminale Domäne, "hPH-20-C") zu finden sein, in den Spuren der Kontrolle und der Isolierungen mit vorherigem Ganzzell-Proteaseverdau keine bzw. nur sehr schwache Banden im gleichen Größenbereich. Tatsächlich zeigt die Auftrennung der Außenmembranproteinisolate dieses Verhalten (Abbildung 45). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass hPH-20 mit und ohne C-terminaler Domäne erfolgreich auf die Außenmembran von *E. coli* transportiert wurde. Wie zu erwarten war, fanden sich zudem erneut die Banden für die Außenmembranproteine OmpA (Abbildung 45, A) und OmpF und OmpC (Abbildung 45, beide B). In Spur 6 waren zwei Banden um ca. 87 kDa zu erkennen, eine Folge verschiedener Sekundärstrukturen des Proteins, die durch das SDS nicht aufgelöst werden konnten. Im reduzierenden Probenpuffer (Spur 7) gelang jedoch eine vollständige Denaturierung der Probe und es wurde nur eine Bande sichtbar.



Abbildung 45: Nachweis der Oberflächenständigkeit von hPH-20+C und hPH-20-C auf *E. coli* UT5600(DE3). Anfärbung mit Coomassie-Blau, die gesuchten Proteine wurden mit Pfeilen markiert. hPH-20+C: humanes PH-20 inkl. C-terminaler Domäne, hPH-20-C: humanes PH-20 ohne C-terminale Domäne; Induktion: Induktion der Proteinexpression mittels IPTG; red. Puffer: Probenpuffer mit DTT; Proteinase K: Behandlung der ganzen Zellen mit Proteinase K; M: Protein-Größenstandard; A: Außenmembranprotein OmpA; B: Außenmembranproteine OmpF und OmpC.

Obwohl es unwahrscheinlich war, dass die Oberflächenständigkeit unter identischen Bedingungen bei Expression der hPH-20 in *E. coli* BL21(DE3) nicht gegeben sein sollte, wurde dies geprüft. Die Gelelektrophorese der Außenmembranproteinisolate von *E. coli* BL21(DE3) pAK004 und pAK005 ist in Abbildung 46 dargestellt. Zwar war die Menge an hPH-20-C auf der Außenmembran von *E. coli* BL21(DE3) geringer als bei *E. coli* UT5600(DE3), doch war sowohl bei diesem Protein als auch bei hPH-20+C der Verdau durch Proteinase K erfolgreich und damit der Transport der hPH-20 auf die äußere Membran der Zellen nachgewiesen.

Wie erwartet waren auch jetzt die Außenmembranproteine OmpA, OmpF/OmpC zu erkennen, sowie ein weiteres BL21(DE3) assoziiertes Protein von ca. 47 kDa. Wie zuvor für die hHyal-2 kann die Menge an hPH-20 auf der Außenmembran geschätzt werden, da bekannt ist, dass ca. 100.000 Außenmembranproteinmoleküle OmpA auf der Außenmembran von *E. coli* vorhanden sind (Koebnik *et al.* 2000). Die Stärke der Proteinbande kann bei hHyal-2+C auf ca. das Doppelte der OmpA-Bande geschätzt werden, bei hPH-20-C auf ein Drittel. Auf Grund der etwa dreifachen Größe des Proteins hPH-20 im Vergleich zu OmpA, kann eine Anzahl von 2 / 3 so vielen Molekülen hPH-

20+C bzw. 1 / (3 x 3) so vielen Molekülen hPH-20-C auf *E. coli* BL21(DE3) vermutet werden. Dies entspräche ca. $6,7 \times 10^4$ Enzymmolekülen hHyal-2+C sowie ca. 1 x 10^4 Enzymmolekülen hHyal-2-C.



Abbildung 46: Nachweis der Oberflächenständigkeit von hPH-20+C und hPH-20-C auf *E. coli* BL21(DE3). Anfärbung mit Coomassie-Blau, die gesuchten Proteine wurden mit Pfeilen markiert. hPH-20+C: humanes PH-20 inkl. C-terminaler Domäne, hPH-20-C: humanes PH-20 ohne C-terminale Domäne; Induktion: Induktion der Proteinexpression mittels IPTG; red. Puffer: Probenpuffer mit DTT; Proteinase K: Behandlung der ganzen Zellen mit Proteinase K; M: Protein-Größenstandard; A: Außenmembranprotein OmpA; B: Außenmembranproteine OmpF und OmpC.

Wie bereits erwähnt, konnten durch die Anfärbung mit Coomassie-Blau Autotransporter-Fusionsproteine für hHyal-2 in den Aussenmembranprotein-Isolaten des Stammes *E. coli* F470 nur sehr schwach angefärbt werden. Da im Gegensatz zur hHyal-2 für hPH-20 ein spezifischer Antikörper vorlag, wurde ein Western-Blot der Außenmembranproteine nach Auftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Zum Einsatz kam zunächst ein polyklonaler, muriner anti-hPH-20-Antikörper und im Anschluss ein Anti-Maus-IgG-Antikörper, der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt war. Nach Zugabe von ECL Plus-Detektionsreagenz zeigten sich Banden im Bereich des hPH-20-Fusionsproteins (Spuren 2 und 3), die in der verdauten Probe nicht mehr zu sehen war (Spur 4), ebenso wenig im Membranproteinisolat der nicht induzierten Kontrolle in Spur 1 (Abbildung 47). Bei genauer Betrachtung handelte es sich um eine Doppelbande (Spur 3), in reduzierendem Probenpuffer nur um eine Einzelbande (Spur 2). Zusätzlich wurden weitere Proteine unspezifisch angefärbt, dazu gehörten die Außenmembranproteine OmpF und OmpC (Abbildung 47, beide B) sowie ein weiteres Protein mit einer Größe von ca. 55 kDa (Abbildung 47, A).



Abbildung 47: Western-Blot zum Nachweis der Oberflächenständigkeit der hPH-20+C auf E. coli F470. Die gesuchten Proteine wurden mit Pfeilen markiert. Anfärbung hPH-20+C: humanes PH-20 inkl. red. C-terminaler Domäne; Puffer: Probenpuffer mit DTT; Proteinase K: ganzen Behandlung der Zellen mit Proteinase K; M: Protein-Größenstandard; A: unbekanntes Protein; B: Außenmembranprotein OmpA. Inkubation mit polyklonalem murinen anti-hPH-20 Antikörper und anti-Immunglobulin G Antikörper, Maus Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Anfärbung mit ECL Plus Detektionsreagenz.

7.4.3 Aktivitätsuntersuchungen bei pH 7 und pH 3,5

Die Stämme *E. coli* UT5600(DE3) pAK004 und pAK005 sowie *E. coli* BL21(DE3) pAK004 und pAK005 wurden unter den zuvor mit der hHyal-2 als beste ermittelten Bedingungen (Phosphatpuffer mit 20 mM NaCl-Zusatz) auf Hyaluronidaseaktivität untersucht. Dies geschah im "stains-all" Testverfahren bei pH 7 und pH 3,5. Die Ergebnisse für hPH-20 auf *E. coli* BL21(DE3) sind in Abbildung 48 dargestellt. Weder hPH-20 auf *E. coli* UT5600(DE3) noch auf *E. coli* BL21(DE3) zeigten eine Abnahme der Absorption bei pH 7 oder pH 3,5 über 48 Stunden. Wie schon für die hHyal-2 beobachtet, war nur in den auf *E. coli* F470 basierenden Stämmen ein Hinweis auf Aktivität der hPH-20 zu finden. Diese war sowohl bei pH 3,5 als auch bei pH 7 feststellbar (Abbildung 49) und bestätigt Angaben, nach denen hPH-20 ein Enzym mit biphasischem Aktivitätsprofil darstellt, also Aktivitätsmaxima im sauren als auch im neutralen Milieu aufweist (Sabeur *et al.* 1997). Die Hinweise auf eine Aktivität bei pH 7 sind jedoch schwach, da die Absorption nur innerhalb der ersten 24 Stunden abnimmt, nicht jedoch nach weiteren 24 Stunden.



Abbildung 48: Testung von hPH-20 mit und ohne C-terminalen Teil exprimiert auf *E. coli* BL21(DE3) bei pH 3,5 und pH 7. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden fünfmal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von OD_{578 nm} = 10 in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 oder Phosphatpuffer pH 7 mit 20 mM NaCl angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; **Mathematicality**: 0 h, **Mathematicality**: 48 h Inkubationszeit; hPH-20+C: humane Hyaluronidase PH-20 mit C-terminalem Teil, hPH-20-C: humane Hyaluronidase PH-20 ohne C-terminalen Teil.



Abbildung 49: Testung von hPH-20 mit und ohne C-terminalen Teil exprimiert auf *E. coli* F470 bei pH 3,5 und pH 7 sowie *E. coli* F470 ohne Hyaluronidase bei pH 3,5. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden fünfmal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von $OD_{578 \text{ nm}} = 10$ in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 oder Phosphatpuffer pH 7 mit 20 mM NaCl angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; \blacksquare 0 h, \blacksquare 24 h, \blacksquare : 48 h Inkubationszeit; hPH-20+C: humane Hyaluronidase PH-20 mit C-terminalem Teil, hPH-20-C: humane Hyaluronidase PH-20 ohne C-terminalen Teil.

Die Aktivität der hPH-20 mit und ohne C-terminaler Domäne exprimiert auf *E. coli* F470 bei pH 3,5 entsprach einer Volumenaktivität von 28 bzw. 36 mU/ml Zellsuspension

 $OD_{578 \text{ nm}} = 5$. Sollte sich die Aktivität auch bei pH 7 bestätigen, entspräche dies einer Volumenaktivität von 582 bzw. 519 mU/ml Zellsuspension $OD_{578 \text{ nm}} = 5$. Die Aktivitäten wurden jeweils durch Vergleich der Absorptionsdifferenzen mit denen einer Umsetzung von HA durch eine bekannte BTH-Konzentration bei pH 3,5 (Abbildung 18) und pH 7 (Abbildung 16) erhalten.

7.4.4 Untersuchungen mit ausgewählten Inhibitoren

Da eine Aktivität der hPH-20 sowohl im sauren Bereich als auch unter neutralen Bedingen vermutet wurde, sollten ausgewählte Inhibitoren sowohl bei pH 3,5 als auch bei pH 7 getestet werden. Dabei fand nur hPH-20+C exprimiert auf *E. coli* F470 Verwendung, da nur gegen das native Enzym Inhibitoren gesucht werden sollten, nicht jedoch gegen die Variante ohne C-terminalen Teil. Als Inhibitoren wurden einige der in vorherigen Versuchen als aktivste Vertreter identifizierte Verbindungen (Vcpal, SO3 und SO16) ausgewählt.

Bei den Messungen im sauren Bereich (Abbildung 50) zeigte sich leider, dass eine Untersuchung der Inhibitoren nicht möglich war. Ursache war ein starker Absorptionsabfall zu Beginn der Messung bei der Aufnahme des ersten Wertes (0 Stunden). Er überlagerte die Effekte des Abbaus der HA und die dadurch hervorgerufene Abnahme der Absorption über 48 Stunden. Als störendes Element konnte DMSO ausgemacht werden, denn nur bei Fehlen jeder DMSO-Zugabe blieb die Störung aus. Zudem kam es zu einem Anstieg der Standardabweichung von ca. 7% nach Messungen ohne Zusatz auf bis zu 18% nach Zusatz von reinem DMSO oder Inhibitoren. Durch diesen Anstieg war die gemessene Absorptionsabnahme über 48 Stunden nach Zugabe von reinem DMSO und Inhibitoren nicht mehr signifikant voneinander verschieden, eine Auswertung von Effekten der Inhibitoren wird damit unmöglich.

Im neutralen Bereich war die Sensitivität des Verfahrens dagegen höher und eine Messung möglich (Abbildung 51). Vcpal war gegen hPH-20 in etwa gleich gut wirksam wie gegen BTH. Die Wirkung von SO3 und SO16 gegen hPH-20 war dagegen im Vergleich zu BTH deutlich reduziert. Möglicherweise bindet Vcpal in einem stärker konservierten Bereich als die beiden anderen Inhibitoren. Die deutlichen Unterschiede in der Aktivität von SO3 und SO16 unterstreichen die Notwendigkeit, auch bei der Suche nach Inhibitoren gegen hPH-20 Ergebnisse aus Untersuchungen mit BTH vorsichtig zu interpretieren.



Abbildung 50: Entwicklung der Absorption bei pH 3,5 ohne Zusatz oder nach Zusatz von DMSO oder Inhibitoren zu hPH-20+C exprimiert auf *E. coli* F470. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden dreimal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von $OD_{578 \text{ nm}} = 10$ in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; \blacksquare : 50 µM DMSO, \blacklozenge : 5 µM Vcpal, \blacktriangle : 50 µM SO3, \Box : 50 µM SO16, \diamondsuit : ohne Zusätze.



Abbildung 51: Enzymaktivität von *E. coli* **F470** hPH-20 und BTH nach Zugabe von 50 μM Inhibitor bei pH 7. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden dreimal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von OD_{578 nm} = 10 in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7 mit 20 mM NaCl angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 μl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 μl Wasser; **MH-20+C** auf *E. coli* F470, **F470**, **BTH**;

Durch die erfolgreiche Inhibition der hPH-20+C auf *E. coli* F470 bei pH 7 durch Vcpal, SO3 und SO16 konnten die vorsichtigen Hinweise auf ihre Aktivität, die aus Abbildung 49 abgeleitet wurden, bestätigt werden. Deutlich ist bei der Gegenüberstellung der Messergebnisse an aufgereinigtem Enzym (BTH) gegen die Messergebnisse an ganzen Zellen (hPH-20) erneut die höhere Standardabweichung der Messungen mit ganzen Zellen zu erkennen (Abbildung 51).

7.5 Humane Hyaluronidase 1

7.5.1 Autodisplay der hHyal-1

Auch für die hHyal-1 erfolgte vor dem eigentlichen Autodisplay zunächst eine Identifikation der Signalsequenz für den Transport über die Zellmembran mit SignalP (Emanuelsson *et al.* 2007), eine Überprüfung des Codongebrauchs mittels "gcua" (Fuhrmann *et al.* 2004) und eine Festlegung der C-terminalen Domäne (Abbildung 36). Die DNA-Sequenz der hHyal-1 mit und ohne C-terminaler Domäne wurde dann mittels PCR mit Hilfe des Plasmids pCMVSport6H als Template und den Oligonukleotiden

AK004, AK005 und AK006 als Primer (Tabelle 11) amplifiziert und durch Ligation über die Schnittstellen KpnI und XhoI in den Vektor pET-Cyp13 eingefügt. Die Transformation erfolgte sowohI in *E. coli* UT5600(DE3) als auch in *E. coli* BL21(DE) (Terpe 2006). Abbildung 68 zeigt die entstandenen Plasmide pAK002 und pAK003. Die beiden Autotransporter-Fusionsproteine besitzen ohne Signalpeptid eine Größe von 84,8 kDa (hHyal-1-Autotransporter-Fusionsprotein ohne C-terminale Domäne) bzw. 94,5 kDa (hHyal-1-Autotransporter-Fusionsprotein mit C-terminaler Domäne).

Eine Überprüfung der korrekten Basenlängen des Plasmids sowie der eingesetzen Hyaluronidase-Sequenzen ergab ebenso wenig Abweichungen wie die Überprüfung der Basensequenz im Vergleich zur Sequenz von HYAL1, die unter der Nummer BC035695 in der GenBank zu finden ist (Benson *et al.* 2008).

Auch die hHyal-1 sollte in *E. coli* F470 exprimiert werden. Dazu wurde der größte Teil des Autotransporter-Konstruktes über die Schnittstellen Xhol und BamHI in den Vektor pJM007 eingesetzt und durch Elektroporation in kompetente Zellen *E. coli* F470 eingebracht. Die erhaltenen Plasmide pAK009 und pAK010 sind in Abbildung 68 dargestellt.

7.5.2 Überprüfung der Oberflächenständigkeit

Die Oberflächenständigkeit der hHyal-1 wurde durch Isolierung der Außenmembran von E. coli UT5600(DE3) pAK002 und E. coli UT5600(DE3) pAK003 vor und nach einem Proteaseverdau mit Proteinase Κ überprüft. Als Kontrolle diente die Außenmembranisolation derselben Stämme, deren Proteinexpression aber nicht durch IPTG induziert wurde. In den beiden Außenmembranproteinisolaten ohne Proteinverdau sollte jeweils eine Bande in der Größe von ca. 95 kDa (hHyal-1 mit C-terminaler Domäne, "hHyal-1+C") bzw. ca. 85 kDa (hHyal-1 ohne C-terminale Domäne, "hHyal-1-C") zu finden sein, diese sollten in den mittels Proteaseverdau behandelten Proben ebenso wie in den

nicht induzierten Proben fehlen. Tatsächlich bestätigte die SDS-Gelelektrophorese diese Erwartungen (Abbildung 52). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die hHyal-1 mit und ohne C-terminale Domäne erfolgreich auf die Außenmembran von *E. coli* transportiert wurde. Wie zu erwarten war, fanden sich erneut die typischen Außenmembranproteine OmpA sowie OmpF/OmpC (Abbildung 52, A und B).



Abbildung 52: Nachweis der Oberflächenständigkeit von hHyal-1+C und hHyal-1-C auf *E. coli* UT 5600(DE3). Anfärbung mit Coomassie-Blau, die gesuchten Proteine wurden mit Pfeilen markiert. hHyal-1+C: humane Hyaluronidase 1 inkl. C-terminaler Domäne, hHyal-1-C: humane Hyaluronidase 1 ohne C-terminale Domäne; Induktion: Induktion der Proteinexpression mittels IPTG; red. Puffer: Probenpuffer mit DTT; Proteinase K: Behandlung der ganzen Zellen mit Proteinase K; M: Protein-Größenstandard; A: Außenmembranprotein OmpA; B: Außenmembranproteine OmpF und OmpC.

Auch für *E. coli* BL21(DE3) sollte die Oberflächenständigkeit der hHyal-1 untersucht werden. Abbildung 53 zeigt das Ergebnis der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der entsprechenden Außenmembranproteinisolate, die auf die gleiche Weise gewonnen und behandelt wurden wie bei *E. coli* UT5600(DE3). Wie erwartet sind die Proteine für die hHyal-1 mit und ohne C-terminale Domäne zu sehen (Abbildung 53, Spuren 2,3 sowie 6,7) und nach Behandlung der Zellen mit Proteinase K nicht mehr nachweisbar (Spuren 4 und 8). Die Oberflächenständigkeit ist damit erneut gezeigt, auch wenn die Menge an Protein auf der Außenmembran rein optisch geschätzt etwas geringer war als bei *E. coli* UT5600(DE3).

Im Probenpuffer ohne DTT ist für die hHyal-1+C eine weitere Bande knapp unterhalt 85kDa zu erkennen (Spur 3). Möglicherweise handelt es sich hierbei um dasselbe Protein, jedoch mit unterschiedlichen Sekundärstrukturen, die nicht durch SDS aufgelöst werden konnten. Dafür spricht, dass im DTT-haltigen Puffer (Spur 2) die untere Bande fast vollständig verschwunden und die obere um etwa denselben Betrag dicker geworden ist. Wie zuvor für die hHyal-2 und die hPH-20 geschehen, soll auch die Anzahl der Hyaluronidase-Moleküle von hHyal-1 auf *E. coli* BL21(DE3) geschätzt werden. Die Banden für die hHyal-1+C konnten optisch als etwa doppelt so stark wie die der OmpA geschätzt werden, die für hHyal-1-C war etwa gleich stark. Da das Molekulargewicht der hHyal-1 ca. dreimal dem des OmpA entspricht und etwa 100.000 OmpA-Moleküle in der Außenmembran vorkommen (Koebnik *et al.* 2000), ergab dies eine geschätzte Menge von 100.000 x (2 / 3) = 67 x 10^3 Molekülen hHyal-1+C und 100.000 x (1 / 3) = 33 x 10^3 Molekülen hHyal-1-C und E. *coli* BL21(DE3).



Abbildung 53: Nachweis der Oberflächenständigkeit von hHyal-1+C und hHyal-1-C auf *E. coli* BL21(DE3). Anfärbung mit Coomassie-Blau, die gesuchten Proteine wurden mit Pfeilen markiert. hHyal-1+C: humane Hyaluronidase 1 inkl. C-terminaler Domäne, hHyal-1-C: humane Hyaluronidase 1 ohne C-terminale Domäne; Induktion: Induktion der Proteinexpression mittels IPTG; red. Puffer: Probenpuffer mit DTT; Proteinase K: Behandlung der ganzen Zellen mit Proteinase K; M: Protein-Größenstandard; A: Außenmembranprotein OmpA; B: Außenmembranproteine OmpF und OmpC.

Die Oberflächenständigkeit der hHyal-1 auf *E. coli* F470 konnte nicht erfolgreich nachgewiesen werden, da auf den SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresegelen der entsprechenden Außenmembranproteinisolaten vor und nach Verdau der Zellen mit Proteinase K nur sehr schwache Proteinbanden für hHyal-1+C und hHyal-1-C gesehen werden konnten (ohne Abbildung) und keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte.

7.5.3 Aktivitätsuntersuchungen bei pH 7 und pH 3,5

Wie schon zuvor bei den hPH-20 tragenden Stämmen *E. coli* UT5600(DE3) beobachtet, zeigte auch hHyal-1 auf der Oberfläche dieses Stammes keine Aktivität bei pH 7 oder pH 3,5 im "stains-all" Testverfahren. Auch durch *E. coli* BL21(DE3) wurde bei beiden pH-Werten keine HA umgesetzt (Abbildung 54 und 55). Eine Aktivität im neutralen Bereich war allerdings auch nicht erwartet worden, da hHyal-1 eine im Sauren aktive Hyaluronidase darstellt (Hofinger *et al.* 2007b). Ein Hinweis auf Umsetzung von HA konnte jedoch bei pH 3,5 und Verwendung des Stammes *E. coli* F470 gefunden werden (Abbildung 55). Alle Messungen der Aktivität von hHyal-1 erfolgten dreifach.



Abbildung 54: Testung von hHyal-1 mit und ohne C-terminalen Teil exprimiert auf *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* F470 bei pH 7. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden dreimal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von $OD_{578 nm} = 10$ in Phosphatpuffer pH 7 mit 20 mM NaCl angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; \blacksquare 0 h, \blacksquare : 24 h, \blacksquare : 48 h Inkubationszeit; hHyal-1+C: humane Hyaluronidase 1 mit C-terminalem Teil, hHyal-1-C: humane Hyaluronidase 1 ohne C-terminalen Teil.



Abbildung 55: Testung von hHyal-1 mit und ohne C-terminalen Teil exprimiert auf *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* F470 sowie von *E. coli* F470 ohne Hyaluronidase bei pH 3,5. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden dreimal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von $OD_{578 \text{ nm}} = 10$ in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser; **E** 0 h, **E** 24 h, **E** 48 h Inkubationszeit; hHyal-1+C: humane Hyaluronidase 1 mit C-terminalem Teil, hHyal-1-C: humane Hyaluronidase 1 ohne C-terminalen Teil.

Die Hinweise auf Aktivität der hHyal-1 mit und ohne C-terminalen Teil sind jedoch relativ schwach, da nur innerhalb der ersten 24 Stunden eine Umsetzung von HA beobachtet werden konnte, nicht jedoch nach weiteren 24 Stunden. Es wäre möglich, dass das Enzym nach 24 Stunden an Aktivität verliert oder der gemessene Wert eine Art Basalabsorption darstellt, hervorgerufen durch Anfärbung unbekannter Substanzen in der Lösung. BTH erreichte im "stains-all" Testverfahren bei pH 3,5 unter identischen Bedingungen eine Reduktion der Absorption um 1,5 Einheiten in 60 Minuten bei einer Volumenaktivität von 6,25 U/ml (Abbildung 16). Sollte sich der nach 24 Stunden gemessene Absorptionsabfall als Enzymaktivität bestätigen, würde sich für hHyal-1+C exprimiert auf *E. coli* F470 eine Volumenaktivität von 87 mU/ml und für hHyal-1-C eine Volumenaktivität von 70 mU/ml ergeben, jeweils bei einer optischen Dichte der Zellsuspension von OD_{578 nm} = 5. Die Anwesenheit der C-terminalen Domäne tatsächlich in Zusammenhang mit der Bindung an HA oder ihrer Weiterleitung ins aktive Zentrum steht, wie in der Literatur beschrieben (Chao *et al.* 2007).

7.5.4 Untersuchungen mit ausgewählten Inhibitoren

Aufgrund der ausschließlich auf den sauren Bereich beschränkten Hinweise auf Aktivität eignete sich nur eine Messung bei pH 3,5 für eine Untersuchung von Inhibitoren gegen hHyal-1. Dazu wurden erneut die Inhibitoren Vcpal und SO16 in einer Konzentration von 50 µM ausgewählt und die HA-Konzentration zu Beginn, 24 Stunden und 48 Stunden nach dem Reaktionsbeginn jeweils in drei Ansätzen vermessen. Neben dem Vergleich mit reinem DMSO wurden auch entsprechende Messungen mit reiner Zellsuspension ohne Zusätze von DMSO oder Inhibitoren durchgeführt. Nur die Zellen, die hHyal-1+C auf ihrer Oberfläche trugen wurden zu diesen Messungen herangezogen, da es sich dabei um das native Enzym handelt, das durch Inhibitoren gehemmt werden soll. Gegen hHyal-1-C optimierte Inhibitoren machen keinen Sinn, da dieses Enzym in dieser Form kein Target darstellt. Die Entwicklung der HA-Konzentrationen ist als mittlere Absorption bei 650 nm 0, 24 und 48 Stunden nach Reaktionsbeginn in Abbildung 56 dargestellt.



Abbildung 56: Entwicklung der Absorption bei pH 3,5 ohne Zusatz oder nach Zusatz von DMSO oder Inhibitoren zu hHyal-1 exprimiert auf *E. coli* F470. Die Messungen erfolgten mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens und wurden dreimal wiederholt. Die Zellen wurden mit einer optische Dichte von OD_{578 nm} = 10 in Ameisensäure-Puffer pH 3,5 angesetzt; HA-Lösung 2 mg/ml; Messung bei 650 nm nach Zugabe von 112,5 µl "stains-all"-Lösung (112 mg/l) und 62,5 µl Wasser;∎: 50 µM DMSO, ♦: 5 µM Vcpal, ▲: 50 µM SO3, □: 50 µM SO16, ◊: ohne Zusätze.

Bei den Messungen zeigte sich leider, dass eine Untersuchung der Inhibitoren im sauren Bereich wie bei hPH-20 wieder nicht möglich war. Ursache war erneut eine starke Absorptionsverringerung beim ersten Messwert (0 Stunden), die nur bei Beteiligung von DMSO auftrat. Eine Enzymaktivität konnte somit bereits nach alleiniger Zugabe von DMSO nicht mehr beobachtet werden. Obwohl somit Hinweise auf einen Abbau von HA durch hHyal-1 mit und ohne C-terminaler Domäne auf der Oberfläche von *E. coli* F470 vorlagen, konnte dies an dieser Stelle nicht endgültig bestätigt werden.

8 **DISKUSSION**

8.1 Entwicklung von Testverfahren zur Enzymaktivitäts-Messung

8.1.1 Photometrisches Testverfahren mit "stains-all"

Es existieren zahlreiche Nachweisverfahren für HA und seine Fragmente, die bereits für Enzymaktivitätsmessungen benutzt wurden. Dabei zählen photometrische Messungen zu den günstigsten, schnellsten und mit dem geringsten Aufwand durchzuführenden Techniken. Sie sind daher für die Entwicklung von Hochdurchsatzmethoden besonders geeignet. Eine Messmethode, die ursprünglich von Benchetrit et al. (1977) vorgestellt wurde, nutzt dabei die blaue Färbung von langkettiger HA mittels dem blauen Cyanin-Farbstoff "stains-all". Bereits zuvor wurde dieser Farbstoff zur Detektion von hochmolekularer HA in SDS-Polyacrylamidgelen verwendet (Bader et al. 1972). Ihren Namen erhielt der Farbstoff, weil er in der Lage war, DNA, RNA, Proteine und saure Polysaccharide in verschiedenen Farben anzufärben (Dahlberg et al. 1969). Als Nachteil von Messmethoden basierend auf diesem Farbstoff gelten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Störeinflüssen wie der Anwesenheit von Proteinen oder niedriger pH-Werte kleiner 4 (Kay et al. 1964). Ein großer Vorteil der Methode ist jedoch die hohe Spezifität. So gelang es Bader et al. (1972), selbst chemisch eng verwandte Substanzen wie HA, Chondroitin und weitere Polysaccharide mittels "stains-all" eindeutig an ihrer Färbung zu unterscheiden. Zudem zeigt diese Methode eine hohe Sensitivität (Benchetrit et al. 1977; Homer et al. 1993a).

Durch systematische Variation der Pufferkonzentration, dem Volumen an Färbelösung und Wasser sowie der "stains-all"-Konzentration in der Färbelösung wurden die für eine möglichst hohe Sensitivität und Unempfindlichkeit gegenüber Proteinen und niedrigen pH-Werten günstigsten Bedingungen ermittelt. Zusätzlich wurden die von Benchetrit *et al.* (1977) angegebenen Volumina auf die Verwendung von Mikrotiterplatten skaliert. Dies wurde bereits zuvor von Homer *et al.* (1993a) durchgeführt, allerdings wurden die 96 Vertiefungen der verwendeten Mikrotiterplatten mit insgesamt 300 µl sehr hoch befüllt. Bei diesen Mengen können Schüttelbewegungen leicht zu einem Verspritzen der Inhalte in andere, benachbarte Vertiefungen oder auf die Optik des Mikrotiterplattenreaders führen. Die in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Mengen (Tabelle 13) erreichten eine gut doppelt so hohe Sensitivität im Vergleich zu Homer *et al.* (1993a) erreichten eine Zunahme der gemessenen Absorption um 0,4 Einheiten bei einer Verdopplung der HA-Konzentration,

8 DISKUSSION

während mit dem hier vorgestellten Protokoll eine Erhöhung von ca. 1,0 Einheiten erreicht werden konnte (Abbildung 12). Dies ist vor allem auf die Verdopplung der Farbstoffkonzentration zurückzuführen sowie auf den Wechsel der Messwellenlänge zu 650 nm, die deutlich näher am Absorptionsmaximum des "stains-all"-Farbkomplexes bei 654 nm lag als die von Homer *et al.* (1993a) gewählte Wellenlänge von 620 nm. Auch das Wasser, das zur Verschiebung des Maximums in Richtung 650 nm erforderlich war, hatte eine große Bedeutung. Im ursprünglichen Test von Benchetrit *et al.* (1977) fehlte dieser Schritt. Bei den eigenen Untersuchungen konnte jedoch ohne Zugabe von Wasser keine Färbung beobachtet werden. Diese Diskrepanz wurde bereits zuvor von Homer *et al.* (1993a) festgestellt, aber nicht weiter erläutert. Es ist davon auszugehen, dass auch Benchetrit *et al.* in ihrem Testverfahren Wasser hinzufügten, diesen Schritt aber aus unbekannten Gründen nicht dokumentierten.

Durch die Verdopplung der "stains-all"-Konzentration in der Färbelösung konnte zudem die Empfindlichkeit gegenüber Störeinflüssen deutlich vermindert werden und es gelangen Messungen von HA-Konzentrationen bei Anwesenheit von Zellen. Auch konnten zum ersten Mal Bestimmungen von HA mittels "stains-all" bei einem pH-Wert von 3,5 durchgeführt werden. Zwar färbte bereits Fiszer-Szafarz (1984) bei pH 3,5 inkubierte SDS-Polyacrylamidgele mit "stains-all" an, doch wurde das Gel vor der Färbung zweimal 30 Minuten in 50% Formamid gewaschen, so dass das Gel wieder neutralisiert wurde. Green (1975) nutzte "stains-all" zu einer Färbung im sauren Bereich bei pH 4,8, allerdings nicht von Polysacchariden, sondern von Casein. Unter stärker sauren Bedingungen von pH 2,8 beobachtete auch er eine Entfärbung. Edstrom (1969) setzte "stains-all" im pH-Bereich von 3,7 bis 9 unter Verwendung von verschiedenen Natriumacetat- und TRIS/HCI-Puffern ein. Er untersuchte jedoch nicht die Färbung von HA, sondern von Chondroitin.

Die Messung von HA unter sauren Bedingungen ist von großem Interesse, da alle humanen Hyaluronidasen Aktivitätsmaxima im Sauren besitzen und auch physiologisch dort aktiv sind. So entfaltet hHyal-1 seine größte Aktivität in den sauren Lysosomen (Stern 2005). Die Hyaluronidase hPH-20 besitzt ein bimodales Aktivitätsprofil mit Aktivität sowohl im Neutralen als auch im Sauren (Sabeur *et al.* 1997). Auch hHyal-2 soll vornehmlich bei niedrigem pH-Wert aktiv sein (Stern 2005), eine Vermutung, die durch die vorliegenden Messungen bestätigt wurde (Abbildungen 42 und 43). Eine Untersuchung potentieller Inhibitoren sollte daher auch bei diesem pH-Wert durchgeführt werden und nicht, wie häufig geschehen, nur im neutralen pH-Bereich. Die Etablierung eines sensitiven photometrischen Testverfahrens für Messungen bei einem pH-Wert von 3,5 stellt somit

einen großen Fortschritt dar. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da das sehr häufig verwendete Verfahren zur HA-Messung nach Umsetzung mit DMAB (Morgan-Elson Testverfahren) nicht bei Anwesenheit von *E. coli*-Zellen durchgeführt werden kann und daher als Grundlage eines Ganzzell-Testverfahrens nicht ohne Weiteres geeignet ist.

Zusammengefasst zeigte das in dieser Arbeit entwickelte "stains-all" Testverfahren für Mikrotiterplatten eine Linearität im Bereich von 0 bis 2 mg HA/ml sowie bei Hyaluronidase-Aktivitäten von 0 bis 50 U/ml. Im Vergleich zu dem bisher am häufigsten verwendeten photometrischen Testverfahren auf der Basis der Morgan-Elson Reaktion gelang der Hyaluronidase-Aktivitätsnachweis mit einer mehr als achtfach höheren Sensitivität, wie ein Vergleich beider Messmethoden bei pH 7 zeigte (Abbildung 23).

Die korrekte Ermittlung von Reaktionskinetik-Parametern ist aus den Daten, die mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens oder des Morgan-Elson Testverfahrens gewonnen wurden, nicht ohne Weiteres möglich. Insbesondere die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante ist ein besonderes Problem bei Reaktionen von Hyaluronidasen. Da die während des Abbaus von HA entstehenden HA-Fragmente ebenfalls Substrate darstellen, erhöht sich die Gesamtmenge an Substrat ständig, die Reaktion folgt damit keiner einfachen Michaelis-Menten-Kinetik und kann nicht wie andere Enzymreaktionen erster oder pseudo-erster Ordnung ausgewertet werden. Obwohl einige Autoren trotzdem eine Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante vorschlugen (Vercruysse et al. 1995; Astériou et al. 2006), ist dies korrekterweise nur möglich, wenn das kleinstmögliche HA-Fragment eingesetzt wird, das noch durch die Hyaluronidase abgebaut wird (Cramer et al. 1994). Diese kurzkettigen HA6-Fragmente standen für Messungen jedoch nicht zur Verfügung. Ein Vergleich der von Cramer et al. (1994) ermittelten Konstanten zeigt eindrucksvoll den starken Einfluss der Größe der HA-Fragmente auf die berechneten Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max}. Sie ermittelten für das Hexasaccharid HA6 einen K_M-Wert von 1,44 mM bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 28 nmol/min, ohne Kontrolle der Fragmentgröße jedoch einen scheinbaren Wert von 17 mM bei 132 nmol/min. Die Michaelis-Menten-Konstanten beider Messungen unterscheiden sich um eine Zehnerpotenz.

8.1.2 Photometrisches Testverfahren mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)

Neben dem "stains-all" Testverfahren konnte auch das Morgan-Elson Testverfahren erfolgreich auf die Verwendung von Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen skaliert werden und sowohl für Messungen bei pH 7 als auch bei pH 3,5 genutzt werden. Bei der

8 DISKUSSION

Verwendung von Zellen zeigten sich jedoch die Grenzen dieses Testsystems. Durch die Zugabe von DMAB wurde eine oder mehrere nicht identifizierte Verbindungen angefärbt, die zu einer starken Absorption bei 570 nm führten, nahe am Maximum der Färbung von HA-Fragmenten um 590 nm. Über die Struktur der Verbindung kann nur spekuliert werden, da DMAB mit sehr vielen verschiedenen Strukturelementen reagieren kann, wie z.B. primären Aminen, Pyrrolen oder Indolen. Eine Beteiligung der Bestandteile des LB-Mediums (Natriumchlorid, Trypton-Pepton und Hefe-Extrakt) kann jedoch ausgeschlossen werden, da LB-Medium alleine keine Reaktion hervorrief. Da auch frische Zellsuspension im Puffer keine Färbung mit DMAB zeigte, dieselbe Suspension nach einer Inkubation von 24 Stunden jedoch sehr wohl, muss die unbekannte Verbindung durch den Stoffwechsel der Bakterien in die Lösung gelangen. Denkbar wäre auch, dass eine geringe Anzahl an Zellen während des Tests lysiert wurden und auf diese Weise Zellbestandteile in die Lösung gelangten und angefärbt wurden. Ein Zusammenhang mit dem Abbau von HA und der Bildung kurzkettiger Fragmente, die mit DMAB reagierten, konnte in jedem Fall ausgeschlossen werden, denn ob der Zellsuspension HA zugesetzt wurde oder nicht, hatte keinerlei Einfluss auf die Absorptionsspektren. In dieser Arbeit durchgeführte Versuche, die Stoffwechselaktivität durch Zugabe von Natriumfluorid (Holland und Hongslo 1978) oder durch die Entfernung des Sauerstoffs mittels Stickstoff-Begasung auf einfachem Wege zu reduzieren, führten nicht zum Erfolg. Der Test ist daher bisher nicht für Messungen mit Inkubation der HA bei Anwesenheit von Zellen geeignet.

Es war auffällig, dass die im "stains-all" Testverfahren bei gleichem pH-Wert aktive hHyal-2, exprimiert auf *E. coli* F470, im Morgan-Elson Testverfahren nicht aktiv war (Abbildung 24 und 25). Dieser Stamm wurde bei der Prüfung auf Eignung des Morgan-Elson Testverfahrens für Messungen mit Zellen ausgewählt und zeigte kein Maximum bei 585 nm, wie es für kurzkettige HA-Fragmente, die mit DMAB angefärbt wurden, erwartet worden wäre. Für dieses Verhalten gibt es mehrere mögliche Ursachen. Zum einen wäre es möglich, dass entstandene kurzkettige HA-Fragmente von den *E. coli* - Zellen aufgenommen und zur Energiegewinnung herangezogen wurden. Für langkettige HA ist die Aufnahme in eukaryotische Zellen bekannt und wurde dort als Erklärung für das Auffinden von intrazellulärer HA akzeptiert (Cheng *et al.* 1995; Evanko und Wight 1999). Dieses Phänomen ist jedoch für *E. coli* nicht bekannt (Smith und Willett 1968) und noch nie in der Literatur beschrieben worden. Dies stimmt mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen überein, denn in keinem Fall wurde ein Abbau von hochmolekularer HA durch eine Zellsuspension des reinen Bakterienstammes beobachtet. Eine Aufnahme kürzerer Fragmente ist dadurch allerdings nicht ausgeschlossen und könnte erklären, warum eine im "stains-all" Testverfahren beobachtete Aktivität im Morgan-Elson-Testverfahren nicht mehr nachweisbar wäre. Eine andere Möglichkeit erscheint jedoch wahrscheinlicher: Da festgestellt wurde, dass das "stains-all" Testverfahren eine mehr als achtfach höhere Sensitivität als das Morgan-Elson Testverfahren aufweist, könnte dieser Test nicht sensitiv genug sein, um die geringe Menge an entstandenen HA-Fragmenten nachzuweisen. Weitere Untersuchungen sind in diesem Zusammenhang nötig, um Klarheit über die Bildung und das Schicksal der kurzkettigen HA-Fragmente im Morgan-Elson Testverfahren bei Inkubation in Anwesenheit von *E. coli-*Zellen zu erlangen.

8.1.3 Enzymaktivitätsmessung mittels HPLC

Eine Enzymaktivitätsmessung mittels HPLC besitzt den großen Vorteil, dass die bei der Umsetzung von hochmolekularer HA entstehenden länger- und kürzerkettigen HA-Fragmente aufgetrennt werden können. Das Entstehen der kurzkettigen Fragmente kann wie der Abbau längerkettiger Fragmente direkt beobachtet werden kann. Dies ist mit den zuvor vorgestellten photometrischen Verfahren nicht möglich, mit ihnen kann beides nur indirekt über eine Farbreaktion verfolgt werden. Störungen oder Fremdsubstanzen könnten ebenso zu einem Anstieg oder Abfall der Absorption führen, wie dies z.B. für das Morgan-Elson Testverfahren bei der Verwendung von Zellen beobachtet wurde. Es gelang, mittels HPLC sowohl die aus dem Abbau von hochmolekularer HA bei pH 7 und pH 3,5 stammenden Fragmente sichtbar zu machen (Abbildungen 26 und 28), als auch die Wirkung der Inhibitoren Vcpal und SO16 auf BTH zu verfolgen (Abbildungen 34 und 35). Die Richtigkeit und Verwendbarkeit der photometrischen Messverfahren konnte damit bestätigt werden. Diese Überprüfung war der wesentliche Grund für die Einführung einer Trennmethode für HA-Fragmente mittels HPLC.

Den Abbau der hochmolekularen HA direkt zu beobachten ist jedoch auch mit der HPLC nicht möglich, da die extrem viskose hochmolekulare HA nicht gut durch das enge Säulenmaterial eluiert wird. Dies kann zu Druckschwankungen bis hin zur Verstopfung und Ausfall der Säule führen. Es ist daher wichtig, die hochmolekulare HA von den restlichen Fragmenten abzutrennen, bevor diese in das System injiziert werden. Dies wird in der Literatur in den meisten Fällen durch eine Vortrennung auf einer präparativen Säule erreicht, deren Durchfluss einzeln oder gepoolt zur weiteren Analyse genutzt wird. Durch Auswahl der Fraktionen können so gezielt einzelne Bereiche von HA-Fragmenten in die HPLC injiziert werden und zu große Fragmente sowie nicht abgebaute HA abgetrennt werden (Cramer und Bailey 1991; Vercruysse *et al.* 1999; Suzuki *et al.* 2001; Tawada *et al.* 2002; Volpi 2003; Volpi 2007). Dieses Vorgehen ist jedoch sehr zeitaufwendig und mit

8 DISKUSSION

einem hohen Verlust behaftet. Eine weitere Aufgabe der Probenvorbereitung ist das Stoppen der Enzymreaktion. Obwohl dies auch durch Aufreinigung mittels präparativer Säule erreicht wird, erfolgt häufig vorab zusätzlich ein Erhitzen der Probe auf über 60 °C für 10 Minuten und länger. Dabei wird die Hyaluronidase denaturiert und die Umsetzung gestoppt. Ein Problem dabei ist, dass durch die zugeführte Energie hydrolytische Spaltungen der HA gefördert werden, die das Ergebnis verfälschen könnten. Beide Ziele der Probenvorbereitung, Abtrennung zu großer HA-Fragmente sowie nicht abgebauter HA und das Stoppen der Enzymreaktion in der Probe, wurden in dieser Arbeit mit deutlich einfacheren Mitteln und in einem Bruchteil der Zeit erreicht. Dazu wurde die gewünschte Probenmenge durch eine Membran mit definierter Porengröße gepresst. Dies geschah mittels Zentrifugation durch Zentrifugalkonzentratoren der Firma Sartorius VivaScience. Die gewählte Porengröße führte zu einem Größenausschluss aller Partikel ab 10 kDa. Laut Auskunft der Firma kann zwar erst ab dem dreifachen Wert dieser Größenangabe, 30 kDa, eine sichere Unpassierbarkeit garantiert werden, doch wurde kein Fragment größer 7 kDa in den Proben mittels HPLC nachgewiesen. Weder hochmolekulare HA noch BTH waren in der Lage, den Filter zu passieren und es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Enzymreaktion in der Probe zuverlässig gestoppt wurde. Der Verlust an Probe war dabei sehr gering, lediglich 25 - 75 µl verblieben nach vollständiger Zentrifugation von 2 ml Probe als Rest in den Säulchen.

Wie die Untersuchung des Einflusses der Inhibitoren Vcpal und SO16 auf die Aktivität von BTH mittels HPLC gezeigt hat, können interessante Einblicke in die Wirkungsweise von Inhibitoren gewonnen werden, da das Entstehen jedes HA-Fragmente einzeln verfolgt und quantifiziert werden kann. Es konnten erstmals Hinweise darauf geliefert werden, dass Inhibitoren die Bildung verschieden langer HA-Fragmente unterschiedlich stark hemmen können. So verringert Vcpal den Aufbau der Fragmente gleichmäßig, während SO16 bei pH 7 den Aufbau der kleineren Fragmente stärker inhibierte (Abbildung 35).

Ein Einsatz in Verbindung mit den auf *E. coli* exprimierten Hyaluronidasen ist jedoch aufgrund der geringeren Empfindlichkeit, die hinter beiden photometrischen Testverfahren zurück bleibt, nicht möglich. Im Vergleich zur Aktivität der BTH wären Inkubationszeiten von mehreren Wochen nötig, um mit den auf *E. coli* F470 exprimierten Hyaluronidasen hHyal-2, hPH-20 oder hHyal-1 die gleiche Konzentration an messbaren HA-Fragmenten zu erreichen. Sollte es in Zukunft jedoch gelingen, die Aktivität der humanen Hyaluronidasen auf der Oberfläche von *E. coli* zu erhöhen, wäre es möglich, mittels HPLC einen tieferen Einblick in die Funktionsweise der humanen Enzyme sowie potentieller Inhibitoren und ihrer gegenseitigen Wechselwirkungen zu erlangen.

8.2 Autodisplay und Aktivitätsmessungen der humanen Hyaluronidasen

Die Oberflächenexpression der Hyaluronidasen hHyal-2, hHyal-1 und hPH-20 konnte in den Stämmen E. coli UT5600(DE3) und E. coli BL21(DE3) sowohl mit als auch ohne Cterminaler Domäne mittels Proteaseverdau und anschließender Auftrennung der Außenmembranproteine mit einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nachgewiesen werden. Entsprechende Außenmembranproteinisolierungen des Stammes E. coli F470 zeigten nach ihrer Auftrennung und Färbung mit Coomassie-Blau nur sehr schwache Proteinbanden für die Hyaluronidasen (keine Abbildung). Da die Expression in E. coli F470 nicht unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters stand, sondern konstitutiv erfolgte und zudem die Außenmembranprotease OmpT vorhanden war, kam es offenbar zu einer Verringerung der Anzahl an Molekülen der humanen Hyaluronidasen auf der Oberfläche bis unter die Nachweisgrenze von Coomassie-Blau. Die Oberflächenständigkeit auf E. coli F470 konnte daher nur für hPH-20 durch die Behandlung der Zellen mit Proteinase K direkt gezeigt werden, da spezifische Antikörper gegen hPH-20 vorlagen und ein Western-Blot mit deutlich niedrigerer Nachweisgrenze durchgeführt werden konnte (Abbildung 48).

Eine Aktivität der humanen Hyaluronidasen exprimiert auf E. coli UT5600(DE3) oder E. coli BL21(DE3) war nicht zu sehen. Erst nach einem Wechsel des Stammes zu E. coli F470, bei pH 7 zusätzlich kombiniert mit einer Konzentration von 10 mM NaCl im Phosphatpuffer, gab es Hinweise auf Enzymaktivität für alle humanen Hyaluronidasen bei pH 3,5 (Abbildungen 43, 49 und 55) sowie für hHyal-2 und hPH-20 auch bei pH 7 (Abbildungen 42 und 49). Die Hinweise auf Aktivität waren jedoch nicht eindeutig, da eine Absorptionsdifferenz, die das Maß für die Enzymaktivität darstellte, nur für die Messung nach 24 Stunden nachweisbar war. Darüber hinaus gab es keinen weiteren Absorptionsabfall. Eine Ausnahme bildete hPH-20 bei pH 3,5, bei der eine gleichmäßige Aktivität über 48 Stunden gezeigt werden konnte (Abbildung 49). Es gelang aber bei pH 7, durch Zugabe der Inhibitoren Vcpal, SO3 und SO16 die gemessene Absorptionsdifferenz unterschiedlich stark zu reduzieren (Abbildung 44 und 51), so dass dies als Bestätigung für die Aktivität der Enzyme hHyal-2 und hPH-20 gewertet werden muss. Damit ist auch gezeigt, dass diese Enzyme auf der Oberfläche von E. coli exprimiert wurden, denn eine Aufnahme von langkettiger HA in das Zellinnere von E. coli kann ausgeschlossen werden (Smith und Willett 1968). Nur für die auf E. coli F470 exprimierte hHyal-1 konnte keine Messung der Wirkung von Inhibitoren durchgeführt werden, so dass die Aktivität und die erfolgreiche Außenmembranexpression dieser Hyaluronidase zwar vermutet, aber nicht endgültig gezeigt werden konnten. Eine einfache Erklärung für den scheinbar vollständigen Aktivitätsverlust der hPH-20 bei pH 3,5 sowie der hHyal-1 und hHyal-2 bei pH 3,5 und pH 7 könnte in einem Abbau der Außenmembranproteine liegen. Da die *E. coli*-Zellen während der Inkubation in einem Puffer (Phosphatpuffer pH 7 oder Ameisensäure-Puffer pH 3,5) gehalten wurden, kam es mit der Zeit zu einer Verarmung an Stickstoffquellen. Um dies auszugleichen, beginnen *E. coli*-Zellen nach ca. 22 Stunden mit einem Abbau von Außenmembranproteinen zur Stickstoffgewinnung (Jose und von Schwichow, unpublizierte Daten).

Ein Vergleich der Hyaluronidasen mit und ohne C-terminalen Teil zeigte nur geringe Unterschiede in der Aktivität, am stärksten waren diese bei hHyal-1 ausgeprägt (Abbildung 55). Wenn die Hinweise auf Aktivität der hHyal-1 als solche interpretiert werden, führte der Verlust der C-terminalen Domäne zu einem Aktivitätsverlust von ca. 20%. Dies deutet darauf hin, dass der Domäne eine Bedeutung in Bindung oder Weiterleitung der HA ins aktive Zentrum beigemessen werden könnte, wie dies Chao *et al.* (2007) diskutierten. Bei allen anderen Hyaluronidasen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Enzymaktivität mit und ohne C-terminaler Domäne messbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es eine mit der hHyal-1 vergleichbaren Bedeutung der Domäne für hPH-20 und hHyal-2 nicht gibt.

Die starken Aktivitätsunterschiede zwischen den auf E. coli BL21(DE3) und E. coli F470 exprimierten Hyaluronidasen lassen den Schluss zu, dass eine Hemmung durch Lipopolysaccharide (LPS) auf der Oberfläche von E. coli BL21(DE3) vorgelegen haben könnte. Die LPS von Bakterien sind aus drei Abschnitten zusammengesetzt: dem Lipid A, einer Kernregion und einem langen Polysaccharid. Das Lipid A (Abbildung 57, A) besteht aus Fettsäuren, die in der Zellmembran verankert und über Esterbindungen an ein Disaccharid gebunden sind. Als Fettsäuren kommen Capron-, Laurin-, Myristin-, Palmitinoder Stearinsäure vor, das Disaccharid enthält häufig N-Acylglucosaminphosphat (Zahringer et al. 1992). Die Kernregion kann in eine innere (Abbildung 57, B) und eine äußere Region (Abbildung 57, C) unterteilt werden. Die am häufigsten vorkommenden Heptose, Glucose, Zucker sind 2-Keto-3-desoxy-octonat, Galactose und N-Acetylglucosamin. Das O-Polysaccharid (Abbildung 57, D) besteht aus zahlreichen Wiederholungen einer Einheit von 4 – 5 Zuckern, die hauptsächlich Rhamnose, Galactose, Glucose oder Mannose enthalten. Da diese Region das sog. O-Antigen eines Bakteriums darstellt, wird die Polysaccharidkette als O-Polysaccharid bezeichnet. Die LPS sind als Endotoxine bekannt, wobei die fiebererzeugende Wirkung nur durch das Lipid A vermittelt wird. E. coli F470 fehlen die langen O-Polysaccharidketten der LPS, die

Kernregion ist jedoch vorhanden. Eine hemmende Wirkung müsste also durch den langen Polysaccharidteil der LPS hervorgerufen worden sein. Diese Vermutung ist nicht unwahrscheinlich, da viele Oligosaccharide potente Inhibitoren von Hyaluronidasen darstellen. IC₅₀-Werte um 1 µM sind für sulfatierte Vertreter von HA, Heparin, Heparan, Dermatan und Chondroitin dokumentiert (Toida et al. 1999). So erreichte z.B. Heparin einen IC₅₀-Wert von 0,3 µM bei der Hemmung von hHyal-1 (Isoyama et al. 2006). In Bezug auf HA reichte bereits eine Polysaccharidkette von nur 18 sulfatierten Zuckereinheiten für eine Hemmung von hPH-20 mit einem IC₅₀-Wert von 8,5 µM aus, längere Ketten waren noch stärker inhibitorisch aktiv (Suzuki et al. 2001). Diese Länge würde von den Polysacchariden der LPS leicht erreicht und sogar überschritten. Unsulfatierte Polysaccharide, wie sie das LPS enthält, waren jedoch stets deutlich schwächer wirksam. Die Hemmwirkung durch LPS könnte daher auch auf einem anderen Mechanismus beruhen. Es wäre denkbar, dass sich die negativ geladenen LPS und die ebenfalls negativ geladenen HA abstoßen und auf diesem Wege den Zugang zum aktiven Zentrum der Hyaluronidasen versperren. Erst nach dem Wegfall der langen Polysaccharide der LPS würde HA in ausreichend räumlichen Kontakt mit dem Enzym treten können und umgesetzt werden.



Abbildung 57: Schematischer Aufbau der LPS von *E. coli*. Die Art und die Abfolge der Zucker unterscheiden sich je nach Stamm. Zucker des Lipid A (A) sind dunkelrot dargestellt, Zucker der inneren (B) und äußeren Kernregion (C) hellrot, Zucker der O-spezifischen Polysaccharidkette (D) gelb, Phosphatgruppen blau. Geändert nach Madigan und Martinko (2006).

Der Teil der LPS, der dem Aufbau von HA am ähnlichsten ist und von dem daher auf den ersten Blick als erstes eine Hemmung der Hyaluronidase erwartet worden wäre, spielt offensichtlich keine Rolle. Der aus N-Acylglucosamin bestehende Zuckeranteil des Lipid A kommt dem Aufbau der HA aus Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin am nächsten.

Eine Hemmung von Hyaluronidasen durch ein Disaccharid ist jedoch in der Literatur bisher nicht beschrieben worden und zumindest für Lipid A auch unwahrscheinlich, da es in der Außenmembran direkt an der Zelloberfläche vorliegt. Durch den beim Autodisplay verwendeten Linker besitzen die Hyaluronidasen einen gewissen Abstand zur Außenmembran, so dass ein unmittelbarer Kontakt zwischen beiden Molekülen nur während des Transports auf die Zelloberfläche denkbar wäre. Ein möglicher Effekt könnte durch die Verwendung von *E. coli*-Zellen ohne Lipid A untersucht werden, die jedoch bisher nicht bekannt sind.

Neben dem Fehlen der Polysaccharide der LPS könnte auch der Wechsel von einer Expression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters hin zu einer konstitutiven Expression eine Rolle spielen. Auf diese Weise liegen deutlich weniger Hyaluronidase-Moleküle auf der Oberfläche von *E. coli* vor, wie die unzureichende Anfärbung mittels Coomassie-Blau eindeutig gezeigt hat. Es wäre denkbar, dass eine zu hohe Konzentration auf der Zelloberfläche zu einer sterischen Behinderung führt, die den Zugang von HA ins aktive Zentrum blockiert. Bei einer geringeren Expressionsstärke, wie sie bei *E. coli* F470 vorlag, bliebe mehr Platz zwischen den Hyaluronidasen und es würde die paradoxe Situation eintreten, dass eine geringere Enzymkonzentration zu einer höheren Aktivität führt.

Insgesamt bleibt die Aktivität aller drei Enzyme jedoch auch im aktivsten Stamm E. coli F470 hinter Vergleichswerten aus der Literatur zurück, die mit Hyaluronidasen aus eukaryonten Expressionssystemen basierend auf Drosophila melanogaster DS2-Zellen (Hofinger et al. 2007b) gewonnen wurden. Als wesentliche Ursache spielt mit Sicherheit die posttranslationale Glykosylierung der Hyaluronidasen eine Rolle. Dabei wird bei hHyal-1 ein zusätzlicher Rest von 3,5 kDa angefügt (Chao et al. 2007). Wird das Glykosylierungsmuster teilweise entfernt, z.B. durch das Einwirken von N-Glycosidase F, kommt es zu einem starken Abfall der Aktivität (Hofinger et al. 2007b) von über 40% nach einer Inkubationszeit von 4h bei 37 °C. Da E. coli nicht in der Lage ist, Proteine posttranslational zu glykosylieren, muss davon ausgegangen werden, dass die auf der Oberfläche präsentierten Enzymmoleküle nicht ihre volle Aktivität erreichen können. Chao et al. (2007) vermuteten auch einen Einfluss der Glykosylierung auf die korrekte Faltung des Enzyms. In diesem Fall könnte auch eine teilweise falsche Faltung einer vollen Aktivität der hHyal-1 auf E. coli im Wege stehen. Auch wenn es für hPH-20 und hHyal-2 in der Literatur bisher keine entsprechenden Untersuchungen gibt, dürften die für hHyal-1 genannten Effekte in ähnlichem Umfang auch für die anderen Hyaluronidasen gelten. Die

Aktivität der Zellen reicht allerdings zur Testung potentieller Enzyminhibitoren mit dem zuvor beschriebenen "stains-all" Testverfahren aus.

Interessant ist, dass mit Hilfe des "stains-all" Testverfahrens eine Aktivität für hHyal-2 gezeigt werden konnte, denn diese wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In Bezug auf das pH-Optimum konnten einige Autoren eine Hyaluronidase-Aktivität im sauren pH-Bereich bestätigen (Lepperdinger et al. 2001; Chow et al. 2006), andere im neutralen pH-Bereich (Müllegger und Lepperdinger 2002). Einige Autoren fanden nur eine extrem geringe (Vigdorovich et al. 2005) und andere gar keine HA-abbauende Aktivität (Rai et al. 2001). Eine Verunreinigung durch Hyaluronidasen aus dem Expressionssystem, im vorliegenden Fall E. coli, konnte jedoch ausgeschlossen werden, da Kontrollzellen keine Hyaluronidase-Aktivität aufwiesen (Abbildung 49). Auch für hHyal-1 exprimierende E. coli F470 konnte bei pH 7 kein Hinweis auf Aktivität gefunden werden, während hHyal-2 auf E. coli F470 auch im neutralen pH-Bereich aktiv war (Abbildung 42). Eine durch bakterielle Hyaluronidasen aus E. coli verursachte Aktivität wäre in allen Zellen gleich stark nachweisbar gewesen. Eine reine HA-bindende Funktion von hHyal-2, wie sie von Rai et al. (2001) postuliert wurde, ist ebenfalls unwahrscheinlich, da in diesem Fall die Aktivität nicht durch Inhibitoren hätte gehemmt werden können. Eine andere Erklärung wäre dagegen denkbar. Die meisten Autoren gewannen hHyal-2 in intrazellulärer Form. Bei der anschließenden Zelllyse und Aufreinigung könnte es zu Bedingungen kommen, die zu einer Verringerung oder einem kompletten Verlust an Hyaluronidaseaktivität führten. Sehr unwahrscheinlich ist allerdings, dass dies auch zu einer Änderung des pH-Optimums führt. Deshalb kann hier nicht erklärt werden, warum die Angaben über pH-Optima und Aktivität der hHyal-2 so stark zwischen verschiedenen Autoren variieren.

Im Vergleich zu den Messungen mit BTH fällt auf, dass die niedrigsten Absorptionswerte nach maximaler Umsetzung (48 Stunden) deutlich über den niedrigsten Absorptionswerten nach Umsetzung mit BTH liegen. Es kann vermutet werden, dass trotz der Abtrennung der Zellen vor der Färbung mit "stains-all" lösliche Proteine, Stoffwechselprodukte und andere Bestandteile aus der Ganzzellsuspension bis in den Testansatz gelangen und mit "stains-all" reagieren. Eine Erhöhung der Sensitivität des Ganzzell-Testsystems könnte durch Entfernen dieser störenden Verbindungen erreicht werden. Es existieren also noch Verbesserungsmöglichkeiten, mit denen die Sensitivität des Testsystems erhöht werden könnte. Diese umzusetzen sind das Ziel weiterführender Experimente auf diesem Gebiet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expression der Hyaluronidasen auf der Oberfläche von *E. coli* und ihre Anwendung für die Suche nach Inhibitoren

erfolgreich durchgeführt werden konnten. Dieses Vorgehen muss nicht auf Hyaluronidasen beschränkt bleiben. Es ist denkbar, in Zukunft auch andere Enzyme, die Arzneistofftargets für Inhibitoren darstellen und schwierig zu gewinnen sind, auf dieselbe Art und Weise auf *E. coli-*Zellen zu exprimieren und in geeigneten Testverfahren zu untersuchen. Das Autodisplay bietet sich als allgemeine Lösung für Probleme bei Expression und Testung schwer aufzureinigender Enzyme und anderer Proteine an.

8.3 Identifizierung neuer Leitstrukturen von Hyaluronidase-Modulatoren

8.3.1 Hyaluronidase-Inhibitoren

Mehrere Serien von Benzimidazol-, Benzoxazol- und Indol-Derivaten wurden auf ihre Hyaluronidase-hemmenden Aktivitäten untersucht. Insgesamt hemmten alle Inhibitoren die BTH nur schwach und stellen keine besonders aktiven Inhibitoren dar. Der weitaus aktivste Inhibitor war das als Kontrollinhibitor eingesetzte Ascorbinsäurepalmitat mit einem IC_{50} -Wert von 18 µM bei pH 3,5 und 8 µM bei pH 7 (Tabelle 17). Botzki *et al.* (2004) ermittelten für diesen Inhibitor bei pH 7 einen IC₅₀-Wert gegen BTH von 56 µM und lagen damit in einem ähnlichen Größenbereich. Ein Vergleich von IC50-Werten zwischen verschiedenen Testsystemen ist jedoch nicht ohne weiteres möglich, da sie u.a. von der Substratkonzentration abhängig sind. Die Messung des besser vergleichbaren Ki-Wertes, der Dissoziationskonstante des Inhibitors vom Enzym, war aufgrund der bereits dargelegten komplizierten enzymkinetischen Verhältnisse schwierig. Eine Berechnung (Yung Chi und Prusoff 1973) erschien nicht sinnvoll, da wichtige Informationen fehlten, z. B. die Michaelis-Menten-Konstante sowie die Art der Inhibition. Da alle untersuchten Verbindungen relativ hohe IC₅₀-Werte im niedrigen bis mittleren mikromolaren Bereich aufwiesen und daher keine starken Inhibitoren darstellten, wurde auf weitere Ansätze zur Berechnung oder experimentellen Ermittlung der Ki-Werte verzichtet.

Eine Derivatisierung des Vcpal wurde bereits von Spickenreither *et al.* (2006) und Hofinger *et al.* (2007b) durchgeführt. Die aktivsten 6-O-Acyl-Derivate waren Ascorbinsäurestearat mit einem IC₅₀-Wert bei pH 5 von 0,9 μ M gegen Hyaluronatlyase aus *Streptococcus agalactiae* und 39 μ M gegen BTH sowie Ascorbinsäuretridecanoat mit einen IC₅₀-Wert von 50 μ M gegen hHyal-1 (Hofinger *et al.* 2007b). Aufgrund der nur wenigen Anknüpfungspunkte des Moleküls für weitere Substituenten scheint das Spektrum an möglichen Derivatisierungen begrenzt und bereits größtenteils erschöpft. Eine deutlich größere Auswahl an möglichen Derivatisierungspositionen und Seitenketten bietet sich bei den Benzimidazol-, Benzoxazol- und Indol-Derivaten an. Die aktivste Verbindung aus den genannten Gruppen war N-[1-(4-Fluorobenzyl)indol-3-yl]-2-(4fluorophenyl)-acetamid (SO17) mit IC₅₀-Werten von 57 µM bei pH 3,5 bzw. 26 µM bei pH 7. Sie stellt den günstigsten Ausgangspunkt für die Suche nach neuen Leitstrukturen von Inhibitoren humaner Hyaluronidasen dar. Diese Verbindung gehört zu den Indol-3-Acetamiden, deren inhibitorische Aktivität bei ansonsten identischem Substitutionsmuster stets leicht über der Aktivität der Indol-2-Acetamide lag. Aus den durchgeführten Struktur-Wirkungs-Beziehungen kann abgeleitet werden, dass lipophile Substituenten an Position 1 des Indolringes bevorzugt werden. Es könnte daher lohnend sein, neben dem bereits untersuchten Benzylrest größere Ringsysteme wie einen Methylnaphtylrest, isostere Ringe wie einen Methylpyridylrest oder langkettige Alkykreste einzusetzen. Zudem sollte die Substitution mit Fluor nicht nur in Position 4 (para), sondern auch in 3 (meta) und 2 (ortho) untersucht werden. An Position 3 des Indolringes könnte die Kettenlänge durch Austausch des Essigsäureamids gegen ein Propionsäureamid oder Buttersäureamid verlängert werden. Bei der endständigen Fluorophenyl-Gruppe zeigte eine Substitution mit Fluor an Position 2 (ortho) bereits ein Nachlassen der Wirkung, so dass hier nur wenig Spielraum für Veränderungen bleibt. Eine Substitution in Posititon 3 (meta) könnte allerdings geprüft werden. Weiteres Derivatisierungspotential bieten zudem insbesondere die Indol-Positionen 5 und 6, da es auf dieser Seite des Moleküls noch Freiraum für die Ausnutzung zusätzliche Wechselwirkungen mit Aminosäuren aus der Bindungstasche gibt. Eine andere Möglichkeit stellt der Wechsel auf Benzoxazol-Derivate dar.

Beides wurde auch von Rigden *et al.* (2006) getan. Die von ihnen untersuchten Verbindungen kommen den hier vorgestellten Benzimidazol-, Benzoxazol- und Indol-Derivaten am nächsten. Sie testeten u.a. die Verbindungen 1-Decyl-2-(4-sulfamoyloxyphenyl)-1H-indol-6-yl-sulfamat und N-(3-phenylpropionyl)-benzoxazole-2thion (Tabelle 3), jedoch nur auf die Hemmung von Hyaluronatlyasen aus Streptokokken, und erreichten einen IC_{50} -Wert von 11 bzw. 15 μ M. Da eine Testung gegen humane Hyaluronidasen oder BTH nicht erfolgte, konnte kein Vergleich der Hemmdaten vorgenommen werden.

Die bisher stärksten in der Literatur beschriebenen Inhibitoren von BTH sowie humaner Hyaluronidasen sind Polymere, vor allem sulfatierte Polysaccharide und sulfatierte Polystyrole. So wurden in der Gruppe der Polysaccharide für Heparin IC₅₀-Werte von 1,1 µM gegen hPH-20 (Toida *et al.* 1999) bzw. 0,3 µM gegen hHyal-1 erzielt (Isoyama *et al.* 2006). Die niedrigen Werte dürfen nicht darüber hinwegtäuschen, dass für eine Hemmung immer noch deutlich höhere Konzentrationen benötigt werden, als physiologisch im Blut

8 DISKUSSION

vorhanden sind (Mio und Stern 2002). Eine Anwendung als Arzneistoff wäre daher mit starken Nebenwirkungen wie erhöhter Blutungsneigung verknüpft. Unter den Poly-Styrolen erzielte Natrium-Polystyren-4-sulfonat (N-PSS) bei der Hemmung von hHyal-1 IC_{50} -Werte von 8,2 µM bei einer Kettenlänge von 1.400 Einheiten bis zu 9,6 nM bei einer Kettenlänge von 990.000 Einheiten. Sowohl N-PSS als auch Heparin zeichnen sich durch eine fehlende Bioverfügbarkeit aus und kommen für eine Anwendung als oral verfügbarer Arzneistoff nicht in Frage. Die Hemmung von BTH und humanen Hyaluronidasen durch Flavonoide und Triterpene (Hertel *et al.* 2006), Saponine und Sapogenine (Facino *et al.* 1995) oder entzündungshemmende Arzneistoffe wie Indometacin (Szary *et al.* 1975) oder Phenylbutazon (Joyce und Zaneveld 1985) wurde in fast allen Fällen erst im millimolaren Bereich nachgewiesen. In einigen Fällen kamen unterschiedliche Autoren sogar zu gegensätzlichen Ergebnissen und konnten nur eine Hemmung von bakteriellen Hyaluronatlyasen nachweisen, wie dies bei Glycyrrhizin der Fall war (Ozegowski *et al.* 2004).

Die von uns getesteten Inhibitoren sind bezogen auf die Stärke ihrer Enzymhemmung deutlich über den letztgenannten Gruppen von Substanzen einzuordnen. Ihre inhibitorische Stärke ist jedoch weit von der Aktivität der sulfatierten Zucker- und Styrol-Polymere entfernt, doch ist es fraglich ob diese Verbindungen jemals zu verträglichen und bioverfügbaren Arzneistoffen entwickelt werden können. Da es bisher an hochpotenten und bioverfügbaren Inhibitoren humaner Hyaluronidasen mangelt, erscheint die Weiterentwicklung der getesteten Indol-3-Acetamide zu neuen Leitstrukturen sinnvoll.

8.3.2 Hyaluronidase-Aktivatoren

Nicht nur die Suche nach Hyaluronidase-Inhibitoren, sondern auch nach entsprechenden Aktivatoren ist von medizinischem Interesse. Ein Mangel an Hyaluronidase ist bekannt bei Mucopolysaccharidose vom Typ IX (Triggs-Raine *et al.* 1999) sowie eine Ursache der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika und dem Immunsystem. Insbesondere zu Beginn einer Krebserkrankung können sich Tumorzellen durch eine gemeinsame Hülle an HA vor dem Immunsystem schützen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Hyaluronidase zu Zytostatika eine bereits bestehende Resistenz durchbrochen werden konnte (Spruss *et al.* 1995; Baumgartner *et al.* 1998). Bisher bekannte Aktivatoren, zu denen Salze oder Proteine wie BSA gehören, eignen sich nicht als Wirkstoffe. Salze können nicht in großer Menge dem Körper zugeführt werden, ohne den Salzhaushalt zu gefährden und Nebenwirkungen hervorzurufen. BSA oder reine Hyaluronidase sind nicht bioverfügbar und könnten zudem allergische Reaktionen

hervorrufen. Weitere Verbindungen wie Platin-haltige Zytostatika, Psoralene oder Histamin verbieten sich aufgrund toxischer oder starker systemischer Wirkungen.

Bei den Untersuchungen zur Inhibition der BTH durch die Indol-Acetamide MD7 bis MD14 wurde festgestellt, dass diese keine inhibitorische, sondern eine aktivierende Fähigkeit besitzen. Es waren allerdings nur drei Verbindungen wasserlöslich. Der größte Effekt wurde dabei von MD9 (N-(4,6-Dimethylpyridin-2yl)-(1-ethylindol-3-yl)acetamid) ausgelöst. In einer Konzentration von 100 µM führte die Verbindung zu einer Steigerung der BTH-Aktivität auf 134%. Da keine der analog aufgebauten Indol-Carboxamide ähnlich stark aktivierende Eigenschaften aufwies, muss der Effekt in Zusammenhang mit der Acetamid-Struktur stehen.

Die Steigerung der Enzymaktivität beruht offenbar nicht auf Wechselwirkungen zwischen BSA und der Hyaluronidase, sondern auf Komplexbildungen zwischen BSA und HA (Xu *et al.* 2000). Insbesondere bei Substrat-Überschuss bilden sich inaktive Hyal-HA-Komplexe, bei Anwesenheit von BSA konkurrieren jedoch die HA-Moleküle um Bindungsstellen auf der Hyaluronidase und BSA. Es deutet vieles darauf hin, dass BSA-HA-Komplexe stabiler sind und sich die Hyal-HA-Komplexe auflösen bzw. erst gar nicht ausbilden (Deschrevel *et al.* 2008; Lenormand *et al.* 2008).

Es ist jedoch noch ein weiterer Mechanismus denkbar. Die Zuckermoleküle innerhalb der HA besitzen in wässriger Lösung eine gestreckte Struktur, die durch die β-glykosidischen Bindungen der Zucker, durch interne Wasserstoffbrückenbindungen sowie durch Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen entstehen (Abbildung 58). Jede Disaccharideinheit ist dadurch um 180 °C zur vorherigen gedreht (Scott *et al.* 1991).



Abbildung 58: Ausschnitt aus der HA-Kette mit Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der HA-Disaccharide sowie mit umgebenden Wassermolekülen. Die Wasserstoffbrückenbindungen bedingen eine Struktur, in der jedes Disaccharid um 180° zum nächsten gedreht ist. n = 10 - 12500, modifiziert nach Scott und Heatley (1991).

HA besitzt einen pK_S-Wert von 3-4 und liegt unter neutralen physiologischen Bedingungen als Polyanion vor. Die dreidimensionale Struktur mehrerer HA-Ketten in Lösung wird durch Anziehungskräfte von Wasserstoffbrückenbindungen und Abstoßungseffekten
durch elektrische Felder der negativ geladenen Carboxylgruppen bestimmt (Scott und Heatley 1999). Es bildet sich ein dynamisches Netzwerk mit zufällig auf- und abgebauten Tertiärstrukturen aus. Bei niedrigeren pH-Werten und einer damit verbundenen zunehmenden Protonierung der Carboxylgruppen überwiegt die Anziehungskraft zwischen den einzelnen HA-Ketten und die Zusammenlagerung überwiegt. Dies steht in mit Befunden, dass Polyanionen Übereinstimmung langkettige in wässrigen Lösungsmitteln eine Art "Perlenkettenstruktur" annehmen, bei der sich gestreckte Bereiche mit zusammengerollten Bereichen ("Perlen") abwechseln (Limbach und Holm 2003). Die negativen Ladungen der HA verhindern nicht nur Wechselwirkungen zwischen verschiedenen HA-Ketten, sondern sind aufgrund der ausgebildeten Wasserstoffbrücken auch für die Streckung der Kette verantwortlich. Werden sie von positiven Gegenionen abgeschirmt oder protoniert, kann sich die Kette einrollen. Derartige Bereiche akzeptiert die Hyaluronidase nicht als Substrat. Geraten HA-Ketten in Kontakt mit in der Lösung ebenfalls vorhandenen, positiv geladenen Verbindungen wie BSA, könnten entfaltete Bereiche durch Bindung stabilisiert werden. Damit stünden größere Bereiche für den Abbau durch die Hyaluronidase zur Verfügung und die Folge wäre ebenfalls eine erhöhte Aktivität.

In beiden Erklärungsansätzen spielt die Bindung des Aktivators an HA eine entscheidende Rolle. Offenbar geraten von den in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen jedoch nur die Indol-Acetamide bei pH 3,5 in ausreichender Weise mit HA in Wechselwirkung. Es liegt der Verdacht nahe, dass Unterschiede in der Protonierung zwischen Indol-Carboxamiden und Indol-Acetamiden für diesen Effekt verantwortlich sind. Alle Verbindungen tragen drei Stickstoffatome, von denen jedoch nur der Stickstoff im Pyridin mit einem pK_s-Wert von 4 - 5 als Protonierungsstelle in Betracht kommt. Eine Titration der Verbindung MD1 bestätigte diese Vermutung und ergab einen pKs-Wert von 4,4. Die Protonierung ist sehr wahrscheinlich für den Verlust an inhibitorischer Aktivität im Sauren verantwortlich, die zu Abstoßungseffekten mit Aminosäuren in der Bindungstasche führen könnte. Dies erklärt, warum die Indol-Acetamide SO1 bis SO19, denen bei ähnlichem Aufbau der Pyridinring fehlt, in der Lage sind auch bei pH 3,5 die BTH-Aktivität zu hemmen. Eine Substitution der Seitenkette mit basischen Gruppen wie Pyridin ist deshalb allerdings nicht grundsätzlich ungeeignet, sondern scheint nützlich, wenn Inhibitoren mit einem ausschließlichen Wirkprofil im Neutralen gesucht werden.

Die Protonierung des Pyridins erklärt allerdings nicht die aktivierenden Effekte der Indol-Acetamide. Möglicherweise spielt der Stickstoff im Indolring eine Rolle, der bei dieser Gruppe im Gegensatz zu den Indol-Carboxamiden kein Bestandteil eines vinylogen Amids ist. Allerdings dürfte er in keinem Fall protoniert werden, denn aufgrund starker Delokalisierung der Elektronen innerhalb des Ringes ist dies stark erschwert. Eine Titration der Verbindung MD9 in Wasser war wegen sehr schlechter Lösungseigenschaften Eine abschließende nicht möglich. Erklärung für die unterschiedlichen Hyaluronidase-modulierenden Eigenschaften der Indol-Carboxamide und -Acetamide kann daher nicht gegeben werden.

Es muss aber festgehalten werden, dass im Vergleich zu den zu Beginn genannten Verbindungen die in dieser Arbeit getesteten Substanzen nicht proteinogene, niedermolekulare Verbindungen darstellen, die grundsätzlich für die Entwicklung eines Arzneistoffs geeignet wären. Die Verbindung Tranilast, ein im asiatischen Raum häufig verwendeter antiallergischer Arzneistoff, ist ebenfalls als Aktivator von Hyaluronidase beschrieben worden (Kakegawa *et al.* 1985a). Auch sie stellt eine niedermolekulare und zudem vergleichsweise nebenwirkungsarme Substanz dar, doch war im Vergleich zu MD9 eine mehr als 19fach höhere Konzentration nötig, um denselben Effekt zu erzielen. Die hier vorgestellten Verbindungen stellen damit in der Literatur einzigartige Substanzen dar. Sie zählen neben den Salzen zu den aktivsten bisher bekannten niedermolekularen Aktivatoren und können als Grundlage für die Weiterentwicklung zu noch potenteren Hyaluronidase-Aktivatoren dienen.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Aboughalia AH (2006) Elevation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion. Arch Med Res 37:109-116.
- Abramson C, Friedman H (1967) Direct localization and visualization of hyaluronate lyase activity by agar gel electrophoresis. Proc Soc Exp Biol Med 125:256-260.
- Adams ME (1993) An analysis of clinical studies of the use of crosslinked hyaluronan, hylan, in the treatment of osteoarthritis. J Rheumatol Suppl 20:16-18.
- Afify AM, Stern M, Guntenhoner M, Stern R (1993) Purification and characterization of human serum hyaluronidase. Arch Biochem Biophys 305:434-441.
- Alburn HE, Whitley RW (1951) Factors affecting the assay of hyaluronidase. J Biol Chem 192:379-393.
- Anderson RA, Feathergill K, Diao X, Cooper M, Kirkpatrick R, Spear P, Waller DP, Chany C, Doncel GF, Herold B, Zaneveld LJD (2000) Evaluation of poly(styrene-4sulfonate) as a preventive agent for conception and sexually transmitted diseases. J Androl 21:862-875.
- Arming S, Strobl B, Wechselberger C, Kreil G (1997) In vitro mutagenesis of PH-20 hyaluronidase from human sperm. Eur J Biochem 247:810-814.
- Asada M, Sugie M, Inoue M, Nakagomi K, Hongo S, Murata K, Irie S, Takeuchi T, Tomizuka N, Oka S (1997) Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells. Biosci Biotechnol Biochem 61:1030-1032.
- Asayama S, Nogawa M, Takei Y, Akaike T, Maruyama A (1998) Synthesis of novel polyampholyte comb-type copolymers consisting of a poly(L-lysine) backbone and hyaluronic acid side chains for a DNA carrier. Bioconjug Chem 9:476-481.
- Astériou T, Vincent JC, Tranchepain F, Deschrevel B (2006) Inhibition of hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase at high substrate concentration and low ionic strength. Matrix Biol 25:166-174.
- Atmuri V, Martin DC, Hemming R, Gutsol A, Byers S, Sahebjam S, Thliveris JA, Triggs-Raine B (2008) Hyaluronidase 3 (HYAL3) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation. Matrix Biol 27:653-660.
- Bader JP, Ray DA, Steck TL (1972) Electrophoretic determinations of hyaluronate produced by cells in culture. Biochim Biophys Acta Gen Subj 264:73-84.
- Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW (1986) Nomenclature of hyaluronic acid. Biochem J 235:903-903.
- Ballet AJ, Bonner WM, Name JL (1963) The Presence of Hyaluronidase in Various Mammalian Tissues. J Biol Chem 238:3522-3527.
- Banerji S, Ni J, Wang S-X, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG (1999) LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. J Cell Biol 144:789-801.
- Baumgartner G, Gomar-Hössa C, Sakra L, Ulspergera E, Wogritscha C (1998) The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors -Experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. Cancer Lett 131:85-99.
- Baurmash H, Limongelli W (1976) Technique for primary closure of infected wounds of the orofacial region. J Oral Surg 34:526-532.
- Benchetrit LC, Pahuja SL, Gray ED, Edstrom RD (1977) Sensitive Method for Assay of Hyaluronidase Activity. Anal Biochem 79:431-437.

- Benedetti L, Cortivo R, Berti T, Berti A, Pea F, Mazzo M, Moras M, Abatangelo G (1993) Biocompatibility and biodegradation of different hyaluronan derivatives (Hyaff) implanted in rats. Biomaterials 14:1154-1160.
- Benson A, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2008) GenBank. Nucleic Acids Res 36:D25-D30.
- Bertelli G, Dini D, Forno GB, Gozza A, Silvestro S, Venturini M, Rosso R, Pronzato P (1994) Hyaluronidase as an antidote to extravasation of Vinca alkaloids. J Cancer Res Clin Oncol 120:505-506.
- Bertrand P, Courel MN, Maingonnat C, Jardin F, Tilly H, Bastard C (2005) Expression of HYAL2 mRNA, hyaluronan and hyaluronidase in B-cell non-hodgkin lymphoma: Relationship with tumor aggressiveness. Int J Cancer 113:207-212.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7:1513-1523.
- Bisno AL, Brito MO, Collins CM (2003) Molecular basis of group A streptococcal virulence. Lancet Infect Dis 3:191-200.
- Bohn R, Dinnendahl V, Kalbehn DA (1969) Automatische Verfahren zur Bestimmung von sauren Mucopolysacchariden und seine Anwendung in der analytischen Biochemie. Z Anal Chem 247:312-316.
- Bookbinder LH, Hofer A, Haller MF, Zepeda ML, Keller GA, Lim JE, Edgington TS, Shepard HM, Patton JS, Frost GI (2006) A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics. J Controlled Release 114:230-241.
- Bost F, Diarra-Mehrpour M, Martin J-P (1998) Inter-α-trypsin inhibitor proteoglycan family -A group of proteins binding and stabilizing the extracellular matrix. Eur J Biochem 252:339-346.
- Botzki A, Rigden DJ, Braun S, Nukui M, Salmen S, Hoechstetter J, Bernhardt G, Dove S, Jedrzejas MJ, Buschauer A (2004) L-ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor - X-ray structure and molecular modeling of enzymeinhibitor complexes. J Biol Chem 279:45990-45997.
- Botzki A, Salmen S, Bernhardt G, Buschauer A, Dove S (2005) Structure-based design of bacterial hyaluronan lyase inhibitors. QSAR Comb Sci 24:458-469.
- Bourguignon LYW, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E (2004) CD44 interaction with Na+-H+ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. J Biol Chem 279:26991-27007.
- Brunish R, Mozersky SM (1958) The characterization of hyaluronidase isolated from Escherichia freundii. J Biol Cem 231:291-301.
- Camenisch TD, Schroeder JA, Bradley J, Klewer SE, McDonald JA (2002) Heart-valve mesenchyme formation is dependent on hyaluronan-augmented activation of ErbB2-ErbB3 receptors. Nat Med 8:850-855.
- Carter CD, Ho JX (1994) Structure of serum albumin. Adv Protein Chem 45:153-203.
- Chain E, Duthie ES (1939) A mucolytic enzyme in testis extracts. Nature 144:977-978.
- Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O (2007) Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. Biochemistry 46:6911-6920.
- Cheng Q, Yu MC, Reeves AR, Salyers AA (1995) Identification and characterization of a Bacteroides gene, csuF, which encodes an outer membrane protein that is essential for growth on chondroitin sulfate. J Bacteriol 177:3721-3727.

- Cheung WF, Cruz TF, Turley EA (1999) Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM), a hyaladherin that regulates cell responses to growth factors. Biochem Soc Trans 27:135-142.
- Chow G, Knudson CB, Knudson W (2006) Expression and cellular localization of human hyaluronidase-2 in articular chondrocytes and cultured cell lines. Osteoarthritis Cartilage 14:849-858.
- Coulson CJ, Girkin R (1975) A rapid assay method for hyaluronidase. Anal Biochem 65:427-434.
- Cramer JA, 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.
- Cramer JA, Bailey LC, Bailey CA, Miller RT (1994) Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. Biochim Biophys Acta Gen Subj 1200:315-321.
- Cranenburgh RM (2004) An equation for calculating the volumetric ratios required in a ligation reaction. Appl Microbiol Biotechnol 65:200-202.
- Csoka AB, Frost GI, Stern R (2001) The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. Matrix Biol 20:499-508.
- Dahlberg AE, Dingman CW, Peacock AC (1969) Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in agarose-acrylamide composite gels. J Mol Biol 41:139-146,IN21-IN26,147.
- DeAngelis PL (1999) Hyaluronan synthases: Fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. Cell Mol Life Sci 56:670.
- Delmage JM, Powars DR, Jaynes PK, Allerton SE (1986) The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. Ann Clin Lab Sci 16:303-310.
- Delpech B, Bertrand P, Chauzy C (1987) An indirect enzymoimmunological assay for hyaluronidase. J Immunol Methods 104:223-229.
- Deschrevel B, Lenormand H, Tranchepain F, Levasseur N, Astériou T, Vincent J-C (2008) Hyaluronidase activity is modulated by complexing with various polyelectrolytes including hyaluronan. Matrix Biol 27:242-253.
- Di Ferrante N (1956) Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. J Biol Chem 220:303-306.
- Duran-Reynals F (1928) Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. Compt Rend Soc Biol 99:6-7.
- Edstrom RD (1969) A colorimetric method for the determination of mucopolysaccharides and other acidic polymers. Anal Biochem 29:421-432.
- Edstrom RD, Koenst M (1973) Mechanism of spectral changes of a carbocyanine dye with acidic polysaccharides and oligogalacturonides. Arch Biochem Biophys 155:307-314.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat Protoc 2:953-971.
- Entwistle J, Hall CL, Turley EA (1996) HA receptors: Regulators of signalling to the cytoskeleton. J Cell Biochem 61:569-577.
- Europäisches Arzneibuch, Grundwerk 2008, amtliche deutsche Ausgabe (2008) Stuttgart, Dt. Apotheker-Verlag. 2785-2786.
- Evanko SP, Angello JC, Wight TN (1999) Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:1004-1013.

- Evanko SP, Wight TN (1999) Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. J Histochem Cytochem 47:1331-1341.
- Facino RM, Carini M, Stefani R, Aldini G, Saibene L (1995) Anti-elastase and antihyaluronidase activities of saponins and sapogenins from Hedera helix, Aesculus hippocastanum, and Ruscus aculeatus: Factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. Arch Pharm 328:720-724.
- Feinberg RN, Beebe DC (1983) Hyaluronate in vasculogenesis. Science 220:1177-1179.
- Filion MC, Phillips NC (2001) Pro-inflammatory activity of contaminating DNA in hyaluronic acid preparations. J Pharm Pharmacol 53:555-561.
- Fiszer-Szafarz B (1984) Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. Anal Biochem 143:76-81.
- Fiszer-Szafarz B, De Maeyer E (1989) Hyal-1, a locus determining serum hyaluronidase polymorphism, on chromosome 9 in mice. Somat Cell Mol Genet 15:79-83.
- Fraser JRE, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E (1981) Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. Biochem J 200:415-424.
- Frost GI, Csoka T, Stern R (1996) The hyaluronidases: A chemical, biological clinical overview. TIGG 8:419-434.
- Frost GI, Csóka TB, Wong T, Stern R (1997) Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. Biochem Biophys Res Commun 236:10-15.
- Frost GI, Stern R (1997) A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents. Anal Biochem 251:263-269.
- Frost GI (2007) Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): An enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration. Expert Opin Drug Deliv 4:427-440.
- Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M, Hegemann P (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. Plant Mol Biol 55:869-881.
- Furuya T, Yamagata S, Shimoyama Y, Fujihara M, Morishima N, Ohtsuki K (1997) Biochemical characterization of glycyrrhizin as an effective inhibitor for hyaluronidases from bovine testis. Biol Pharm Bull 20:973-977.
- Gacesa P, Savitsky MJ, Dodgson KS, Olavesen AH (1981) A recommended procedure for the estimation of bovine testicular hyaluronidase in the presence of human serum. Anal Biochem 118:76-84.
- Gmachl M, Kreil G (1993) Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. Proc Natl Acad Sci U S A 90:3569-3573.
- Godin DA, Fitzpatrick PC, Scandurro AB, Belafsky PC, Woodworth BA, Amedee RG, Beech DJ, Beckman BS (2000) PH-20: A novel tumor marker for laryngeal cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 126:402-404.
- Gold EW (1982) Purification and properties of hyaluronidase from human liver. Differences from and similarities to the testicular enzyme. Biochem J 205:69-74.
- Gorham SD, Olavesen AH, Dodgson KS (1975) Effect of ionic strength and pH on the properties of purified bovine testicular hyaluronidase. Connect Tissue Res 3:17-25.
- Gotoh S, Onaya J, Abe M, Miyazaki K, Hamai A, Horie K, Tokuyasu K (1993) Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. Ann Rheum Dis 52:817-822.

- Graves MV, Burbank DE, Roth R, Heuser J, DeAngelis PL, Van Etten JL (1999) Hyaluronan synthesis in virus PBCV-1-infected chlorella-like green algae. Virology 257:15-23.
- Green MR (1975) Simultaneous differential staining of nucleic acids, proteins, conjugated proteins and polar lipids by a cationic carbocyanine dye. J Histochem Cytochem 23:411-423.
- Grimshaw J, Kane A, Trocha-Grimshaw J, Douglas A, Chakravarthy U, Archer D (1994) Quantitative analysis of hyaluronan in vitreous humor using capillary electrophoresis. Electrophoresis 15:936-940.
- Gustafson S, Wikstrom T, Juhlin L (1995) Histochemical studies of hyaluronan and the hyaluronan receptor ICAM-1 in psoriasis. Int J Tissue React 17:167-173.
- Hadidian Z, Pirie NW (1948) The effects of serum and of hyaluronc acid derivatives on the action of hyaluronidase. Biochem J 42:266-274.
- Hamai A, Morikawa K, Horie K, Tokuyasu K (1989) Purification and characterization of hyaluronidase from Streptococcus dysgalactiae. Agric Biol Chem 53:2163-2168.
- Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in Escherichia coli K12: Isolation of a constitutive mutant. Mol Gen Genet 182:288-292.
- Harada H, Takahashi M (2007) CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. J Biol Chem 282:5597-5607.
- Harris RC, Chung E, Coffey RJ (2003) EGF receptor ligands. Exp Cell Res 284:2-13.
- Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD, Meese E (1998) Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. Hum Mol Genet 7:1859-1872.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP (1998) The great escape: Structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiol 6:370-378.
- Herd JK, Tschida J, Motycka L (1974) The detection of hyaluronidase on electrophoresis membranes. Anal Biochem 61:133-143.
- Hertel W, Peschel G, Ozegowski JH, Müller 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, 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, Buschauer A (2007b) Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: Insect cells versus Escherichia coli as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. Glycobiology 17:444-453.
- Holland RI, Hongslo JK (1978) Fluoride, fluoride resistance and glycolysis in cultured cells. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 43:240-245.
- Homer KA, Denbow L, Beighton D (1993a) Spectrophotometric Method for the Assay of Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan-Depolymerizing Enzymes. Anal Biochem 214:435-441.
- Homer KA, Denbow L, Whiley RA, Beighton D (1993b) Chondroitin sulfate depolymerase and hyaluronidase activities of viridans streptococci determined by a sensitive spectrophotometric assay. J Clin Microbiol 31:1648-1651.
- Hong Gee L, Cowman MK (1994) An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. Anal Biochem 219:278-287.

- Hotez PJ, S., Narasimhan J, Haggerty L, Milstone V, Bhopale GA, Schad FF, Richards (1992) Hyaluronidase from infective Ancylostoma hookworm larvae and its possible function as a virulence factor in tissue invasion and in cutaneous larva migrans. Infect Immun 60:1018-1023.
- Huang L, Yoneda M, Kimata K (1993) A serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP) is the heavy chain of the inter α -trypsin inhibitor. J Biol Chem 268:26725-26730.
- Humphrey JH (1957) International standard for hyaluronidase. Bull World Health Organ 16:291-294.
- Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG (1996) Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: One activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary Sperm- Zona binding. Biol Reprod 55:80-86.
- Ingham E, Holland KT, Gowland G, Cunliffe WJ (1979) Purification and partial characterization of hyaluronate lyase (EC 4.2.2.1) from Propionibacterium acnes. J Gen Microbiol 115:411-418.
- Isoyama T, Thwaites D, Selzer MG, Carey RI, Barbucci R, Lokeshwar VB (2006) Differential selectivity of hyaluronidase inhibitors toward acidic and basic hyaluronidases. Glycobiology 16:11-21.
- Jedrzejas MJ, Stern R (2005) Structures of Vertebrate Hyaluronidases and Their Unique Enzymatic Mechanism of Hydrolysis. Proteins 61:227–238.
- Jose J, Krämer J, Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the Escherichia coli cell surface via the Iga(β) autotransporter pathway. Gene 178:107-110.
- Jose J, 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 (2006) Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. Appl Microbiol Biotechnol 69:607-14.
- Jose J, Meyer TF (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. Microbiol Mol Biol Rev 71:600-619.
- Joyce CL, Zaneveld LJD (1985) Vaginal contraceptive activity of hyaluronidase and cyclooxygenase (prostaglandin synthetase) inhibitors in the rabbit. Fertil Steril 44:426-428.
- Kajava AV, Steven AC (2006) The turn of the screw: Variations of the abundant βsolenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. J Struct Biol 155:306-315.
- Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T (1985a) Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. Chem Pharm Bull (Tokyo) 33:642-646.
- Kakegawa H, Momoi Y, Matsumoto H, Satoh T (1985b) Activation of hyaluronidase by various inflammatory agents and inhibitory effect of hyaluronidase by antiinflammatory drugs. J Pharmacobiodyn 8:S177.
- Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T (1987) Activation of hyaluronidase by anti-tumor platinum complex and reduction of the side effect by hyaluronidase inhibitors. J Pharmacobiodyn 10:S153.
- Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T (1988) Inhibitory effects of hydrangenol derivatives on the activation of hyaluronidase and their antiallergic activities. Planta Med 54:385-389.

- Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T (1992) Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their anti-allergic actions. Chem Pharm Bull (Tokyo) 40:1439-1442.
- Kallio H, Paloheimo M, Maunuksela EL (2000) Hyaluronidase as an adjuvant in bupivacaine-lidocaine mixture for retrobulbar/peribulbar block. Anesth Analg 91:934-937.
- Kay E, Walwick ER, Gifford CK (1964) Spectral Changes in a Cationic Dye to Interaction with Macromolecules. I. Behavior of Dye Alone in Solution and the Effect of Added Macromolecules J Phys Chem 68:1896-1906.
- Kim MY, Kim CY, 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 Agric 85:633-640.
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1992) Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: Dissection of Neisseria Iga(β)-mediated outer membrane transport. EMBO J 11:2327-2335.
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF (1993) The secretion pathway of IgA protease-type proteins in Gram-negative bacteria. Bioessays 15:799-805.
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: Barrels in a nutshell. Mol Microbiol 37:239-253.
- Kovar JL, Johnson MA, Volcheck WM, Chen J, Simpson MA (2006) Hyaluronidase expression induces prostate tumor metastasis in an orthotopic mouse model. Am J Pathol 169:1415-1426.
- Kuppusamy UR, Khoo HE, Das NP (1990) Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. Biochem Pharmacol 40:397-401.
- Kuppusamy UR, Das NP (1991) Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. Experientia 47:1196-1200.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) ClustalW and ClustalX version 2. Bioinformatics 23:2947-2948.
- Larsen NE, Pollack CT, Reiner K, Leshchiner E, Balazs EA (1993) Hylan gel biomaterial: Dermal and immunologic compatibility. J Biomed Mater Res 27:1129-1134.
- Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer TF (2000) Autodisplay: Functional display of active β-lactamase on the surface of Escherichia coli by the AIDA-I autotransporter. J Bacteriol 182:3726-3733.
- Laugier JP, Shuster S, Rosdy M, Csóka AB, Stern R, Maibach HI (2000) Topical hyaluronidase decreases hyaluronic acid and CD44 in human skin and in reconstituted human epidermis: Evidence that hyaluronidase can permeate the stratum corneum. Br J Dermatol 142:226-233.
- Laurent TC, Fraser JRE (1992) Hyaluronan. FASEB J 6:2397-2404.
- Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR (1996) The structure and function of hyaluronan: An overview. Immunol Cell Biol 74:A1-A7.
- Lenormand H, Deschrevel B, Tranchepain F, Vincent JC (2008) Electrostatic interactions between hyaluronan and proteins at pH 4: how do they modulate hyaluronidase activity. Biopolymers 89:1088-1103.
- Lepperdinger G, Müllegger J, Kreil G (2001) Hyal2 Less active, but more versatile? Matrix Biol 20:509-514.

- Li SI, Taylor KB, Kelly SJ, Jedrzejas MJ (2001) Vitamin C inhibits enzymatic activity of Streptococcus pneumoniae hyaluronate lyase. J Biol Chem 276:15125-15130.
- Liesegang TJ (1990) Viscoelastic substances in ophthalmology. Surv Ophthalmol 34:268-293.
- Limbach HJ, Holm CJ (2003) Single-Chain Properties of Polyelectrolytes in Poor Solvent. J Phys Chem B 107:8041-8055.
- Lin G, Stern R (2001) Plasma hyaluronidase (Hyal-1) promotes tumor cell cycling. Cancer Lett 163:95-101.
- Lindqvist U, Chichibu K, Delpech B, Laurent TC (1992) Seven different assays of hyaluronan compared for clinical utility. Clin Chem 38:127-132.
- Linker A (1966) Bacterial mucopolysaccharidases (mucopolysaccharide lyases). Methods Enzymol 8:650-654.
- Liu DC, Pearlman E, Diaconu E, Guo K, Mori H, Haqqi T, Markowitz S, Willson J, Sy MS (1996) Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 93:7832-7837.
- Liu J, Tian J, Hu Z, Chen X (2004) Binding of isofraxidin to bovine serum albumin. Biopolymers 73:443-450.
- Lokeshwar VB, Young MJ, Goudarzi G, lida N, Yudin AI, Cherr GN, Selzer MG (1999) Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: Its similarity to HYAL1. Cancer Res 59:4464-4470.
- Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minna JD, Block NL, Nadji M, 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, Cerwinka WH, Lokeshwar BL (2005) HYAL1 hyaluronidase: A molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. Cancer Res 65:2243-2250.
- Lokeshwar VB, Estrella V, Lopez L, Kramer M, Gomez P, Soloway MS, Lokeshwar BL (2006) HYAL1-v1, an alternatively spliced variant of HYAL1 hyaluronidase: A negative regulator of bladder cancer. Cancer Res 66:11219-11227.
- Luo Y, Kirker KR, Prestwich GD (2000a) Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: New biomaterials for drug delivery. J Controlled Release 69:169-184.
- Luo Y, Ziebell MR, Prestwich GD (2000b) A hyaluronic acid Taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. Biomacromolecules 1:208-218.
- Madigan MT, Martinko JM (2006) Brock Biology of Microorganisms. 11. Auflage, Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall.
- Madinaveitia J, Quibell TH (1940) Studies on diffusing factors: The action of testicular extracts on the viscosity of vitreous humour preparations Biochem J 34:625-631.
- Maingonnat C, Victor R, Bertrand P, Courel M-N, Maunoury R, Delpech B (1999) Activation and inhibition of human cancer cell hyaluronidase by proteins. Anal Biochem 268:30-34.
- Malavaki CJ, Kanakis I, Theocharis AD, Lamari FN, Karamanos NK (2007) Hyaluronan determination: Biological significance & analytical tools. Curr Pharm Anal 3:117-128.
- Mandal A, Bhattacharyya AK (1995) Sperm hyaluronidase activation by purified predominant and major basic human seminal coagulum proteins. Hum Reprod 10:1745-1750.
- Marhaba R, Zöller M (2004) CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation. J Mol Histol 35:211-231.

- Marković-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Muller U, Schirmer T (2000) Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. Structure 8:1025-1035.
- Martin DC, Atmuri V, Hemming RJ, Farley J, Mort JS, Byers S, Hombach-klonisch S, Triggs-raine BL (2008) A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis. Hum Mol Genet 17:1904-1915.
- Maurer J, J J, T.F. M (1997) Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli. J Bacteriol 179:794-804.
- Maurer J, Jose J, Meyer TF (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. J Bacteriol 181:7014-7020.
- McBride WH (1979) Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytolysis. J Exp Med 149:507-515.
- Meyer K, Palmer J (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. J Biol Chem 107:629-634.
- Meyer K, Chaffee E, Hobby GL, Dawson MH (1941) Hyaluronidases of bacterial and animal origin. J Exptl Med 73:309-326.
- Meyer K, Rapport MM (1951) The inhibition of testicular hyaluronidase by heavy metals. J Biol Chem 188:485-490.
- Meyer K (1971) Hyaluronidases. The Enzymes:307-320.
- Meyer TF, Halter R, Pohlner J (1987) Mechanism of extracellular secretion of an IgA protease by gram-negative host cells. Adv Exp Med Biol 216B:1271-1281.
- Miller BF, Van Slyke DD (1936) A direct microtitration method for blood sugar. J Biol Chem 114:583-595.
- Minino AM, Heron MP, Murphy SL, Kochanek KD (2007) Death: final data for 2004. Natl Vital Stat Rep 55:1-119.
- Mio K, Stern R (2002) Inhibitors of the hyaluronidases. Matrix Biol 21:31-37.
- Misawa S, Kumagai I (1999) Refolding of therapeutic proteins produced in escherichia coli as inclusion bodies. Biopolymers 51:297-307.
- Montesano R, Kumar S, Orci L, Pepper MS (1996) Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro. Lab Invest 75:249-262.
- Monzón ME, Manzanares D, Schmid N, Casalino-Matsuda SM, Forteza RM (2008) Hyaluronidase expression and activity is regulated by pro-inflammatory cytokines in human airway epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 39:289-295.
- Muckenschnabel I, Bernhardt C, Spruss T, Dietl B, 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.
- Müllegger J, Lepperdinger G (2002) Degradation of hyaluronan by a Hyal2-type hyaluronidase affects pattern formation of vitelline vessels during embryogenesis of *Xenopus laevis*. Mech Dev 111:25-35.
- Murai T, Kawashima H (2008) A simple assay for hyaluronidase activity using fluorescence polarization. Biochem Biophys Res Commun 376:620-624.
- Nakamura T, Majima M, Kubo K, Takagaki K, Tamura S, Endo M (1990) Hyaluronidase assay using fluorogenic hyaluronate as a substrate. Anal Biochem 191:21-24.

- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J 1:841-845.
- Noble PW, McKee CM, Cowman M, Shin HS (1996) Hyaluronan fragments activate an NF-κB/I-κBα autoregulatory loop in murine macrophages. J Exp Med 183:2373-2378.
- Noble PW (2002) Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. Matrix Biol 21:25-29.
- Novak U, Stylli SS, Kaye AH, Lepperdinger G (1999) Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. Cancer Res 59:6246-6250.
- O'Connor R, Clynes M, Dowling P, O'Donovan N, O'Driscoll L (2007) Drug resistance in cancer searching for mechanisms, markers and therapeutic agents. Expert Opin Drug Metab Toxicol 3:805-817.
- Ozegowski JH, Hertel W, Müller PJ, Peschel G (2004) Enzyme des Hyaluronsäuremetabolismus. In: Hyaluronsäure und Haut: Trends in clinical and experimental dermatology. Wohlrab W, Neubert R,Wohlrab J. Aachen, Shaker Verlag. 3:55-104.
- Patel S, Turner PR, Stubberfield C, Barry E, Rohlff CR, Stamps A, Tyson K, (...), Page MJ (2002) Hyaluronidase gene profiling and role of hyal-1 overexpression in an orthotopic model of prostate cancer. Int J Cancer 97:416-424.
- Pattanaargson S, Roboz J (1996) Determination of hyaluronidase activity in venoms using capillary electrophoresis. Toxicon 34:1107-1117.
- Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV (2001) A hyaluronidase from Tityus serrulatus scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. Toxicon 39:1495-1504.
- Peters TJ (1985) Serum Albumin. Adv Protein Chem 37:161-245.
- Prehm P (1984) Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. Biochem J 220:597-600.
- Primakoff P, Myles DG (1983) A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal antibodies. Dev Biol 98:417-428.
- Primakoff P, Myles DG (2002) Penetration, adhesion, and fusion in mammalian spermegg interaction. Science 296:2183-2185.
- Rai SK, Duh FM, Vigdorovich V, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI, Miller AD (2001) Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 98:4443-4448.
- Reissig JL, Storminger JL, 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, Angerer Ev, Bernhardt G, Dove S, Buschauer A, Jedrzejas 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.
- Rouse JJ, Whateley TL, Thomas M, Eccleston GM (2007) Controlled drug delivery to the lung: Influence of hyaluronic acid solution conformation on its adsorption to hydrophobic drug particles. Int J Pharm 330:175-182.
- Ruoslahti E, Yamaguchi Y (1991) Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell 64:867-869.

- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Primakoff P, Li M-W, Overstreet JW (1997) The PH-20 protein in human spermatozoa. J Androl 18:151-158.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.
- Salmen S, Hoechstetter J, Käsbauer C, Paper DH, Bernhardt G, Buschauer A (2005) Sulphated oligosaccharides as inhibitors of hyaluronidases from bovine testis, bee venom and Streptococcus agalactiae. Planta Med 71:727-732.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001) Molecular Cloning. A laboratory manual. 3. Ed., Cold Spring Harbor Press
- Schmidt G, Jann B, Jann K (1970) Immunochemistry of R Lipopolysaccharides of Escherichia coli; Studies on R Mutants with an Incomplete Core, Derived from E. coli 08: K27. Eur J Biochem 16:382-392.
- Schmith K, Faber V (1950) The turbidimetric method for determination of hyaluronidase. Scand J Clin Lab Invest 2:292-297.
- Schultheiss E, Paar C, Schwab H, Jose J (2002) Functional esterase surface display by the autotransporter pathway in Escherichia coli. J Mol Catal B Enzym 18:89-97.
- Scott JE, Cummings C, Brass A, 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 networkforming polymer. Biochem J 274:699-705.
- Scott JE, Heatley F (1999) Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a 13C NMR study. Proc Natl Acad Sci 96:4850-4855.
- Sharma Y, Rao CM, Rao SC, Krishna AG, Somasundaram T, Balasubramanian D (1989) Binding-Site Conformation Dictates the Color of the Dye Stains-All - a Study of the Binding of This Dye to the Eye Lens Proteins Crystallins. J Biol Chem 264:20923-20927.
- Shigehara N, Kakegawa H, Miyataka H, Matsumoto H, Isobe A, Satoh T (1991) Activation of hyaluronidase by 8-methoxypsoralen-polyamine photoproducts. Photodermatol Photoimmunol Photomed 8:229-231.
- Simpson MA, Lokeshwar VB (2008) Hyaluronan and hyaluronidase in genitourinary tumors. Front Biosci 13:5664-5680.
- Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney J (1998) Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmic signal transduction pathway resulting in proliferation. Lab Invest 78:987-1003.
- Smith RF, Willett NP (1968) Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. Appl Microbiol 16:1434-1436.
- Soldatova LN, Crameri R, Gmachl M, Kemeny DM, Schmidt M, Weber M, 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, 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, Schiess W (1995) Hyaluronidase significantly enhances the efficacy of regional vinblastine chemotherapy of malignant melanoma. J Cancer Res Clin Oncol 121:193-202.

- Stern M, Stern R (1992) An ELISA-like assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. Matrix 12:397-403.
- Stern R (2005) Hyaluronan metabolism: A major paradox in cancer biology. Pathol Biol 53:372-382.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN (2006) Hyaluronan fragments: An information-rich system. Eur J Cell Biol 85:699-715.
- Stern R, Jedrzejas MJ (2006) Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. Chem Rev 106:818-839.
- Suzuki A, Toyoda H, Toida T, Imanari T (2001) Preparation and inhibitory activity on hyaluronidase of fully O-sulfated hyaluro-oligosaccharides. Glycobiology 11:57-64.
- Szary A, Kowalczyk Bronisz SH, Gieldanowski J (1975) Indomethacin as inhibitor of hyaluronidase. Arch Immunol Ther Exp 23:131-134.
- Takagaki K, Nakamura T, Izumi J, Saitoh H, Endo M, Kojima K, Kato I, Majima M (1994) Characterization of hydrolysis and transglycosylation by testicular hyaluronidase using ion-spray mass spectrometry. Biochemistry 33:6503-6507.
- Tan SW, Johns MR, Greenfield PF (1990) Hyaluronic acid--a versatile biopolymer. Aust J Biotechnol 4:38-43.
- Tawada A, Masa T, Oonuki Y, Watanabe A, Matsuzaki Y, Asari A (2002) Large-scale preparation, purification, and characterization of hyaluronan oligosaccharides from 4-mers to 52-mers. Glycobiology 12:421-426.
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 72:211-222.
- Toida T, Ogita Y, Suzuki A, Toyoda H, Imanari T (1999) Inhibition of hyaluronidase by fully O-sulfonated glycosaminoglycans. Arch Biochem Biophys 370:176-182.
- Toole BP (1997) Hyaluronan in morphogenesis. J Intern Med 242:35-40.
- Toole BP, Wight TN, Tammi MI (2002) Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. J Biol Chem 277:4593-4596.
- Toole BP (2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. Nat Rev Cancer 4:528-539.
- Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA, Natowicz MR (1999) Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. Proc Natl Acad Sci U S A 96:6296-6300.
- Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW (2002) Signaling properties of Hyaluronan rezeptors. J Biol Chem 277:4589-4592.
- Turner RE, Cowman MK (1985) Cationic dye binding by hyaluronate fragments: Dependence on hyaluronate chain length. Arch Biochem Biophys 237:253-260.
- Udabage L, Brownlee GR, Stern R, Brown TJ (2004) Inhibition of hyaluronan degradation by dextran sulphate facilitates characterisation of hyaluronan synthesis: An in vitro and in vivo study. Glycoconj J 20:461-471.
- Vercruysse KP, Lauwers AR, Demeester JM (1995) Kinetic investigation of the action of hyaluronidase on hyaluronan using the Morgan-Elson and neocuproine assays. Biochem J 310:55-59.
- Vercruysse KP, Ziebell MR, Prestwich GD (1999) Control of enzymatic degradation of hyaluronan by divalent cations. Carbohydr Res 318:26-37.

- Vigdorovich V, Strong RK, Miller AD (2005) Expression and characterization of a soluble, active form of the jaagsiekte sheep retrovirus receptor, Hyal2. J Virol 79:79-86.
- Volfova V, Hostomska J, Cerny M, Votypka J, Volf P (2008) Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on Leishmania infection in mice. PLoS Negl Trop Dis 2:e294.
- Volpi N, Maccari F (2002) Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and Stains-All. Electrophoresis 23:4060-4066.
- Volpi N (2003) Milligram-scale preparation and purification of oligosaccharides of defined length possessing the structure of chondroitin from defructosylated capsular polysaccharide K4. Glycobiology 13:635-640.
- Volpi N (2007) Mass spectrometry characterization of Escherichia coli K4 oligosaccharides from 2-mers to more than 20-mers. Rapid Commun Mass Spectrom 21:3459-3466.
- Weigel PH, Hascall VC, Tammi M (1997) Hyaluronan synthases. J Biol Chem 272:13997-14000.
- West DC, Chen H (2002) Is hyaluronan degradation an angiogenic/metastatic switch? Hyaluronan 2:165-172.
- Wolf RA, Glogar D, Chaung LY (1984) Heparin inhibits bovine testicular hyaluronidase activity in myocardium of dogs with coronary artery occlusion. Am J Cardiol 53:941-944.
- Wouters MA, Rigoutsos I, Chu CK, Feng LL, Sparrow DB, Dunwoodie SL (2005) Evolution of distinct EGF domains with specific functions. Protein Sci 14:1091-1103.
- Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, Yoshida K, Uchiyama Y, Asari A (2002) Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. J Biol Chem 277:17308-17314.
- Xu S, Yamanaka J, Sato S, Miyama I, Yonese M (2000) Characteristics of complexes composed of sodium hyaluronate and bovine serum albumin. Chem Pharm Bull (Tokyo) 48:779-783.
- Yerushalmi N, Arad A, Margalit R (1994) Molecular and cellular studies of hyaluronic acidmodified liposomes as bioadhesive carriers for topical drug delivery in wound healing. Arch Biochem Biophys 313:267-273.
- Yoshida M, Sai S, Marumo K, Tanaka T, Itano N, Kimata K, Fujii K (2004) Expression analysis of three isoforms of hyaluronan synthase and hyaluronidase in the synovium of knees in osteoarthritis and rheumatoid arthritis by quantitative realtime reverse transcriptase polymerase chain reaction. Arthritis Res Ther 6:R514-520.
- Yung Chi C, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. Biochem Pharmacol 22:3099-3108.
- Zahringer U, Lindner B, Rietschel ET (1992) Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. Adv Carbohydr Chem Biochem 50:211-276.
- Zhou B, Weigel P (1996) Purification of the rat liver sinusoidal endothelial cell (LEC) hyaluronan receptor. FASEB J 10:A1097.
- Zhou B, Weigel JA, Fauss L, Weigel PH (2000) Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). J Biol Chem 275:37733-37741.

10 ANHANG

10.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AE	Absorptions-Einheit
AIDA	Adhesin involved in diffuse adherence
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BHT	Butyl-hydroxy-toluol
bla	β-Laktamasegen für Ampicillin-Resistenz
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum Düsseldorf
Вр	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
С	Cytosin
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
СТхВ	Choleratoxin B Untereinheit
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
DMAB	Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlichs-Reagenz)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetales Kälberserum
G	Guanin
GAG	Glykosaminoglykan
gcua	graphical codon usage analyser
GIT	Gastrointestinaltrakt
GIcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcUAc	Glucuronsäure
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HA	Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure-Bindeprotein
HEPES	2-[4-(2-Hydroyethyl)-1-piperazinyl]ethanolsulfonsäure
hHyal-1-C	humane Hyaluronidase 1 ohne C-terminale Domäne
hHyal-1+C	humane Hyaluronidase 1 vollständig mit C-terminaler Domäne
hHyal-2-C	humane Hyaluronidase 2 ohne C-terminale Domäne

hHyal-2+C	humane Hyaluronidase 2 vollständig mit C-terminaler Domäne
hPH-20-C	humane Hyaluronidase PH-20 ohne C-terminale Domäne
hPH-20+C	humane Hyaluronidase PH-20 vollständig mit C-terminaler Domäne
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
	(Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
IB	inclusion body (Einschlusskörper)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton (10³ g/mol)
lacl	Gen für Lactose-Repressor
LPS	Lipopolysaccharide
М	molar (mol/l)
MCS	multiple cloning site
N-PSS	Natrium-polystyren-4-sulfonat
OD	optische Dichte
OM	outer membrane (äußere Zellmembran)
Omp	outer membrane protein (Außenmembranprotein)
ori	origin of replication
p.a.	für die Analyse ("pro analysi")
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PH-20	Antigen des "posterior head"-Antikörpers 20
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RZPD	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (Ressourcenzentrum
	Primärdatenbank), heute ImaGenes
SDS	sodiumdodecylsulfate (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOB	Super Optimal Broth
SOC	SOB-Medium mit 20 mM Glucose
SP	Signalpeptid
SPAM1	Sperma-Adhäsions-Molekül 1
т	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBS	tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	TBS mit 0,1% TWEEN 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol

TWEEN	Polysorbat (Polyoxyethylen-sorbitan-monofettsäureester)
Vcpal	Ascorbinsäurepalmitat (Vitamin C-Palmitat)

10.2 Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen

Es folgen alle in dieser Arbeit verwendeten Nukleinsäuresequenzen sowie die zugehörige Aminosäuresequenz. Der für die Expression klonierte Bereich ist jeweils fett dargestellt, die zur C-terminalen Domäne gehörige Sequenz unterstrichen.

1	ggtgcagctg	gggtggaatc	tggccaggcc	ctgcttaggc	ccccatcctg	gggtcaggaa
61	atttggagga	taaggccctt	cagccccaag	gttgtcctcg	accagtcccg	tgccatggca
121	gcccacctgc	ttcccatctg	cgccctcttc	ctgaccttac	tcgatatggc	ccaaggc ttt
181	aggggcccct	tgctacccaa	ccggcccttc	accaccgtct	ggaatgcaaa	cacccagtgg
241	tgcctggaga	ggcacggtgt	ggacgtggat	gtcagtgtct	tcgatgtggt	agccaaccca
301	gggcagacct	tccgcggccc	tgacatgaca	attttctata	gctcccagct	gggcacctac
361	ccctactaca	cgcccactgg	ggagcctgtg	tttggtggtc	tgccccagaa	tgccagcctg
421	attgcccacc	tggcccgcac	attccaggac	atcctggctg	ccatacctgc	tcctgacttc
481	tcagggctgg	cagtcatcga	ctgggaggca	tggcgcccac	gctgggcctt	caactgggac
541	accaaggaca	tttaccggca	gcgctcacgg	gcactggtac	aggcacagca	ccctgattgg
601	ccagctcctc	aggtggaggc	agtagcccag	gaccagttcc	agggagctgc	acgggcctgg
661	atggcaggca	ccctccagct	ggggcgggca	ctgcgtcctc	gcggcctctg	gggcttctat
721	ggcttccctg	actgctacaa	ctatgacttt	ctaagcccca	actacaccgg	ccagtgccca
781	tcaggcatcc	gtgcccaaaa	tgaccagcta	gggtggctgt	ggggccagag	ccgtgccctc
841	tatcccagca	tctacatgcc	cgcagtgctg	gagggcacag	ggaagtcaca	gatgtatgtg
901	caacaccgtg	tggccgaggc	attccgtgtg	gctgtggctg	ctggtgaccc	caatctgccg
961	gtgctgccct	atgtccagat	cttctatgac	acgacaaacc	actttctgcc	cctggatgag
1021	ctogageaca	acctagaga	aaatacaacc	cadddddaa	ctggagtggt	actetagata
IUZI	eeggageaea	geeeggggga	gagegeggee	cayyyyycay	0099490990	geeeegggeg
1021	agctgggaaa	atacaagaac	caaggaatca	tgtcaggcca	tcaaggagta	tatggacact
1021 1081 1141	agctggggaaa acactggggc	atacaagaac ccttcatcct	caaggaatca gaacgtgacc	tgtcaggcca agtggggccc	tcaaggagta ttctctgcag	tatggacact tcaagccctg
1081 1141 1201	agctggggaaa acactggggc tgctccggcc	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt
1021 1081 1141 1201 1261	agctggggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtggtg	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt
1021 1081 1141 1201 1261 1321	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gccctctcac	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtggtg gctgtggagt	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct
1021 1081 1141 1201 1261 1321 1381	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtggtg gctgtggagt agcatgtggt	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt
1021 1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggagt agcatgtggt tctggccagg	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac
1021 1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggagt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc
1021 1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa ctgcacacac	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca atgcatact	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag acagactgga	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggagt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc atagtggcat	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca aaggagttag	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc aaccacagca
1021 1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561 1621	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa ctgcacacac gacaccattc	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca atgcatactt attccatgtc	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag acagactgga catatgcatc	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggagt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc atagtggcat tacttggcaa	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca aaggagttag ggtcatagac	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc aaccacagca aattcctcca
1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561 1621 1681	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa ctgcacacac gacaccattc gagacactga	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca atgcatactt attccatgtc gccagtcttt	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag acagactgga catatgcatc gaactgcagc	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggagt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc atagtggcat tacttggcaa aatcacaaag	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca aaggagttag ggtcatagac gctgacattc	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc aaccacagca aattcctcca actgagtgcc
1021 1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561 1621 1681 1741	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa ctgcacacac gacaccattc gagacactga tactctttgc	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca atgcatactt attccatgtc gccagtcttt caatccccgt	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag acagactgga catatgcatc gaactgcagc gctaagcgtt	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggagt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc atagtggcat tacttggcaa aatcacaaag ttatgtggac	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca aaggagttag ggtcatagac gctgacattc ttattcattc	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc aaccacagca aattcctcca actgagtgcc ctcacaatga
1021 1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561 1621 1681 1741 1801	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa ctgcacacac gacaccattc gagacactga tactctttgc ggctatgagg	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca atgcatactt attccatgtc gccagtcttt caatccccgt aaactgagtc	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag acagactgga catatgcatc gaactgcagc gctaagcgtt actcacattg	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggggt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc atagtggcat tacttggcaa aatcacaaag ttatgtggac agagtaagca	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca aaggagttag ggtcatagac gctgacattc ttattcattc cgttgcccaa	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc aaccacagca aattcctcca actgagtgcc ctcacaatga ggttgcacag
1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561 1681 1741 1801 1861	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa ctgcacacac gagacactga tactctttgc ggctatgagg caagaaaagg	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca atgcatactt attccatgtc gccagtcttt caatccccgt aaactgagtc gagaagttga	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag acagactgga catatgcatc gaactgcagc gctaagcgtt actcacattg gattcaaacc	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggggt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc atagtggcat tacttggcaa aatcacaaag ttatgtggac agagtaagca caggctgtct	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca aaggagttag ggtcatagac gctgacattc ttattcattc cgttgcccaa agctccgggg	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc aaccacagca aattcctcca actgagtgcc ctcacaatga ggttgcacag gtacagccct
1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561 1681 1741 1801 1861 1921	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa ctgcacacac gacaccattc gagacactga tactctttgc ggctatgagg caagaaaagg tgcactccta	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca atgcatactt attccatgtc gccagtcttt caatccccgt aaactgagtc gagaagttga ctgagtttgt	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag acagactgga catatgcatc gaactgcagc gctaagcgtt actcacattg gattcaaacc ggtaaccagc	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggggt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc atagtggcat tacttggcaa aatcacaaag ttatgtggac agagtaagca caggctgtct cctgcacgac	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca aaggagttag ggtcatagac gctgacattc ttattcattc cgttgcccaa agctccgggg ccctgaatct	tatggacact tcaagccctg cctcctctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc aaccacagca aattcctcca actgagtgcc ctcacaatga ggttgcacag gtacagccct gctgagaggc
1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561 1681 1741 1801 1861 1921 1981	agctgggaaa acactggggc tgctccggcc aaccctgcca gcctctcac ggctggcagg gcacatattg agtcatacaa ctgcacacac gacaccattc gagacactga tactctttgc ggctatgagg caagaaaagg tgcactccta accagtccag	atacaagaac ccttcatcct atggccgctg gtttctccat ttgaagatca caccgtggtg agaacctaat gtcatggtca atgcatactt attccatgtc gccagtcttt caatccccgt aaactgagtc gagaagttga ctgagtttgt caataaagc	caaggaatca gaacgtgacc tgtccgccgc ccagctcacg ggcacagatg tgagcggaag gcactctggg cagtaaagag acagactgga catatgcatc gaactgcagc gctaagcgtt actcacattg gattcaaacc ggtaaccagc agtcatgatt	tgtcaggcca agtggggccc accagccacc cctggtgggg gctgtggagt agcatgtggt tctggccagg tacactcagc atagtggcat tacttggcaa aatcacaaag ttatgtggac agagtaagca caggctgtct cctgcacgac tacttaaaaa	tcaaggagta ttctctgcag ccaaagccct ggcccctgag tcaaatgtcg gattggccac gcttcctcaa cactgtcaca aaggagttag ggtcatagac gctgacattc ttattcattc cgttgcccaa agctccgggg ccctgaatct aaaaaaaaaa	tatggacact tcaagccctg cctcctcctt cctgcggggt atgctaccct acactgagtt atacatgcac ggcatattcc aaccacagca aattcctcca actgagtgcc ctcacaatga ggttgcacag gtacagccct gctgagaggc aaaaaaaaaa

Abbildung 59: Nukleinsäuresequenz der humanen Hyaluronidase 1 (hHyal-1, GenBank-Code: BC035695)

Der zur Expression klonierte Bereich ist fett dargestellt, die zur C-terminalen Domäne gerechneten Basen sind unterstrichen.

1	maahllpica	lfltlldmaq	gfrgpllpnr	pfttvwnant	qwclerhgvd	vdvsvfdvva
61	npgqtfrgpd	mtifyssqlg	typyytptge	pvfgglpqna	sliahlartf	qdilaaipap
121	dfsglavidw	eawrprwafn	wdtkdiyrqr	sralvqaqhp	dwpapqveav	aqdqfqgaar
181	awmagtlqlg	ralrprglwg	fygfpdcyny	dflspnytgq	cpsgiraqnd	qlgwlwgqsr
241	alypsiympa	vlegtgksqm	yvqhrvaeaf	rvavaagdpn	lpvlpyvqif	ydttnhflpl
301	delehslges	aaqgaagvvl	wvswentrtk	escqaikeym	dttlgp <u>filn</u>	vtsgallcsq
361	alcsghgrcv	rrtshpkall	llnpasfsiq	ltpgggplsl	rgalsledqa	qmavefkcrc
421	vpgwgapwce	rksmw				

Abbildung 60: Aminosäuresequenz der humanen Hyaluronidase 1 (hHyal-1) mit Signalpeptid Mit Ausnahme des Signalpeptids sind alle Aminosäuren fett dargestellt und die zur C-terminalen Domäne gerechneten Aminosäuren unterstrichen.

1	agcggaggtg	gttagcagca	cctcataagg	tccttcctag	caagggatgc	taatgactag
61	ccaatgctct	aggaagacat	tgagaccagc	caacttcttg	ccttgataac	tactgaagag
121	acattgggtg	gctggatttt	gaaagcagac	ttctggttat	aggtgatgca	acttgaaaaa
181	caatcctgaa	acatgaaaca	agaataataa	tatttaaatg	taacttaatc	attatacctc
241	tttatccatc	aaagtgaatt	cattccattc	cctttcatct	gtgctcatac	tttgcatcag
301	atattgggta	aaccaaagtg	tgtaggaaga	aataaatgtt	ttcatagtca	ttactcttta
361	caatgggagt	gctaaaattc	aagcacatct	ttttcagaag	ctttgttaaa	tcaagtggag
421	tatcccagat	agttttcacc	ttccttctga	ttccatgttg	cttgact ctg	aatttcagag
481	cacctcctgt	tattccaaat	gtgcctttcc	tctgggcctg	gaatgcccca	agtgaatttt
541	gtcttggaaa	atttgatgag	ccactagata	tgagcctctt	ctctttcata	ggaagccccc
601	gaataaacgc	caccgggcaa	ggtgttacaa	tattttatgt	tgatagactt	ggctactatc
661	cttacataga	ttcaatcaca	ggagtaactg	tgaatggagg	aatcccccag	aagatttcct
721	tacaagacca	tctggacaaa	gctaagaaag	acattacatt	ttatatgcca	gtagacaatt
781	tgggaatggc	tgttattgac	tgggaagaat	ggagacccac	ttgggcaaga	aactggaaac
841	ctaaagatgt	ttacaagaat	aggtctattg	aattggttca	gcaacaaaat	gtacaactta
901	gtctcacaga	ggccactgag	aaagcaaaac	aagaatttga	aaaagcaggg	aaggatttcc
961	tggtagagac	tataaaattg	ggaaaattac	ttcggccaaa	tcacttgtgg	ggttattatc
1021	tttttccgga	ttgttacaac	catcactata	agaaacccgg	ttacaatgga	agttgcttca
1081	atgtagaaat	aaaaagaaat	gatgatctca	gctggttgtg	gaatgaaagc	actgctcttt
1141	acccatccat	ttatttgaac	actcagcagt	ctcctgtagc	tgctacactc	tatgtgcgca
1201	atcgagttTg	ggaagccatc	agagtttcca	aaatacctga	tgcaaaaagt	ccacttccgg
1261	tttttgcata	tacccgcata	gtttttactg	atcaagtttt	gaaattcctt	tctcaagatg
1321	aacttgtgta	tacatttggc	gaaactgttg	ctctgggtgc	ttctggaatt	gtaatatggg
1381	gaaccctcag	tataatgcga	agtatgaaat	cttgcttgct	cctagacaat	tacatggaga
1441	ctatactgaa	tccttacata	atcaac <u>gtca</u>	cactagcagc	caaaatgtgt	agccaagtgc
1501	tttgccagga	gcaaggagtg	tgtataagga	aaaactggaa	ttcaagtgac	tatcttcacc
1561	tcaacccaga	taattttgct	attcaacttg	agaaaggtgg	aaagttcaca	gtacgtggaa
1621	aaccgacact	tgaagacctg	gagcaatttt	ctgaaaaatt	ttattgcagc	tgttatagca
1681	ccttgagttg	taaggagaaa	gctgatgtaa	aagacactga	tgctgttgat	gtgtgtattg
1741	ctgatggtgt	ctgtatagat	gcttttctaa	aacctcccat	ggagacagaa	gaacctcaaa
1801	ttttctacaa	tgcttcaccc	tccacactat	ctgccacaat	gttcatttgg	aggctggaag
1861	tctgggatca	aggtattagc	agaattggtt	tc ttctgaga	gtcatgaggg	aaaaatgtgt
1921	ttcaggcctc	ttcccttggc	ttacaggaaa	tgaaaaaacc	atgactatca	tcaccaacat
1981	ccttgggtat	taagtgcagt	cactctccta	gatgctgtgg	ggagaaggca	agttacaaag
2041	atagaccttc	cctcaagata	atcagatttt	catggtatta	tccttaacct	ttttgacatc
2101	atggaggctt	tgggaatctg	atgaagccta	tcaattttct	tccagaagat	atttatataa
2161	gattataaga	aaaattatgt	acacagctta	ttttattgca	ttggatcaaa	atgccattta
2221	taaagaatta	tgccttttcc	atcaatttta	gcatggaaaa	ataatttcag	gcaatatgct
2281	taaaaattgg	gggaagacaa	aagaaatcca	tatcgtgtaa	ataaaataa	attttggttt
2341	tgctcaaaaa	aaaaaaaaaa	a			

Abbildung 61: Nukleinsäuresequenz der humanen Hyaluronidase PH-20 (hPH-20, basierend auf GenBank-Code: BC026163)

Der zur Expression klonierte Bereich ist fett dargestellt, die zur C-terminalen Domäne gerechneten Basen sind unterstrichen. Der im Vergleich zur GenBank-Sequenz BC026163 enthaltene Basenaustausch eines Cytosin gegen ein Thymin an bp1209 ist durch einen Großbuchstaben gekennzeichnet.

1	mgvlkfkhif	frsfvkssgv	sqivftflli	pcclt lnfra	ppvipnvpfl	wawnapsefc
61	lgkfdepldm	slfsfigspr	inatgqgvti	fyvdrlgyyp	yidsitgvtv	nggipqkisl
121	qdhldkakkd	itfympvdnl	gmavidweew	rptwarnwkp	kdvyknrsie	lvqqqnvqls
181	lteatekakq	efekagkdfl	vetiklgkll	rpnhlwgyyl	fpdcynhhyk	kpgyngscfn
241	veikrnddls	wlwnestaly	psiylntqqs	pvaatlyvrn	rvWeairvsk	ipdaksplpv
301	faytrivftd	qvlkflsqde	lvytfgetva	lgasgiviwg	tlsimrsmks	cllldnymet
361	ilnpyiin <u>vt</u>	laakmcsqvl	cqeqgvcirk	nwnssdylhl	npdnfaiqle	kggkftvrgk
421	ptledleqfs	ekfycscyst	lsckekadvk	dtdavdvcia	dgvcidaflk	ppmeteepqi
481	fynaspstls	atmfivwrle	vwdqgisrig	ff		

Abbildung 62: Aminosäuresequenz der humanen Hyaluronidase PH-20 (hPH-20) mit Signalpeptid

Mit Ausnahme des Signalpeptids sind alle Aminosäuren fett dargestellt und die zur C-terminalen Domäne gerechneten Aminosäuren unterstrichen. Der Aminosäureaustausch Arginin gegen Tryptophan an Position 283 im Vergleich zur aus der GenBank-Nukleinsäuresequenz BC026163 für hPH-20 hergeleiteten Aminosäuresequenz ist durch einen Großbuchstaben gekennzeichnet.

1	ggctcacccc	aggtaaggag	ggaggccacc	gacctactgg	gccgacggac	tcccacacag
61	ttcctgagct	ggtgccaggc	aggtgacacc	tcctgcagcc	cccagcatgc	gggcaggccc
121	aggccccacc	gttacattgg	ccctggtgct	ggcggtgtca	tgggcc atgg	agctcaagcc
181	cacagcacca	cccatcttca	ctggccggcc	ctttgtggta	gcgtgggacg	tgcccacaca
241	ggactgtggc	ccacgcctca	aggtgccact	ggacctgaat	gcctttgatg	tgcaggcctc
301	acctaatgag	ggttttgtga	accagaatat	taccatcttc	taccgcgacc	gtctaggcct
361	gtatccacgc	ttcgattctg	ccggaaggtc	tgtgcatggt	ggtgtgccac	agaatgtcag
421	cctttgggca	caccggaaga	tgctgcagaa	acgtgtggag	cactacattc	ggacacagga
481	gtctgcgggg	ctggcggtca	tcgactggga	ggactggcga	cctgtgtggg	tgcgcaactg
541	gcaggacaaa	gatgtgtatc	gccggttatc	acgccagcta	gtggccagtc	gtcaccctga
601	ctggcctcca	gaccgcatag	tcaaacaggc	acaatatgag	tttgagttcg	cagcacagca
661	gttcatgctg	gagacactgc	gttatgtcaa	ggcagtgcgg	ccccggcacc	tctggggctt
721	ctacctcttt	cctgactgct	acaatcatga	ttatgtgcag	aactgggaga	gctacacagg
781	ccgctgccct	gatgttgagg	tggcccgcaa	tgaccagctg	gcctggctgt	gggctgagag
841	cacggccctc	ttcccgtctg	tctacctgga	cgagacactt	gcttcctccc	gccatggccg
901	caactttgtg	agcttccgtg	ttcaggaggc	ccttcgtgtg	gctcgcaccc	accatgccaa
961	ccatgcactc	ccagtctacg	tcttcacacg	acccacctac	agccgcaggc	tcacgggggct
1021	tagtgagatg	gacctcatct	ctaccattgg	cgagagtgcg	gccctgggcg	cagctggtgt
1081	catcctctgg	ggtgacgcgg	ggtacaccac	aagcacggag	acctgccagt	acctcaaaga
1141	ttacctgaca	cggctgctgg	tcccc <u>tacgt</u>	ggtcaatgtg	tcctgggcca	cccaatattg
1201	cagccgggcc	cagtgccatg	gccatgggcg	ctgtgtgcgc	cgcaacccca	gtgccagtac
1261	cttcctgcat	ctcagcacca	acagtttccg	cctagtgcct	ggccatgcac	ctggtgaacc
1321	ccagctgcga	cctgtggggg	agctcagttg	ggccgacatt	gaccacctgc	agacacactt
1381	ccgctgccag	tgctacttgg	gctggagtgg	tgagcaatgc	cagtgggacc	ataggcaggc
1441	agctggaggt	gccagcgagg	cctgggctgg	gtcccacctc	accagtctgc	tggctctggc
1501	agccctggcc	tttacctgga	ccttg taggg	gtctcctgcc	tagctgccta	gcaagctggc
1561	ctctaccaca	agggctctct	taggcatgta	ggaccctgca	gggggtggac	aaactggagt
1621	ctggagtggg	cagagccccc	aggaagccca	ggagggcatc	cataccagct	cgcacccccc
1681	tgttctaagg	gggaggggaa	gtccctggga	ggccccttct	ctccctgcca	gaggggaagg
1741	agggtacagc	tgggctgggg	aggacctgac	cctactccct	tgccctagat	agtttattat
1801	tattattatt	ttggggtctc	ttttgtaaat	taaacataaa	acaattgc	

Abbildung 63: Nukleinsäuresequenz der humanen Hyaluronidase 2 (hHyal-2, GenBank-Code: U09577)

Der zur Expression klonierte Bereich ist fett dargestellt, die zur C-terminalen Domäne gerechneten Basen sind unterstrichen.

1	mragpgptvt	lalvlavawa	melkptappi	ftgrpfvvaw	dvptqdcgpr	lkvpldlnaf
61	dvqaspnegf	vnqnitifyr	drlglyprfd	sagrsvhggv	pqnvslwahr	kmlqkrvehy
121	irtqesagla	vidwedwrpv	wvrnwqdkdv	yrrlsrqlva	srhpdwppdr	ivkqaqyefe
181	faaqqfmlet	lryvkavrpr	hlwgfylfpd	cynhdyvqnw	esytgrcpdv	evarndqlaw
241	lwaestalfp	svyldetlas	srhgrnfvsf	rvqealrvar	thhanhalpv	yvftrptysr
301	rltglsemdl	istigesaal	gaagvilwgd	agyttstetc	qylkdyltrl	lvpyvvnvsw
361	atqycsraqc	hghgrcvrrn	psastflhls	tnsfrlvpgh	apgepqlrpv	gelswadidh
421	lathfreacy	lawsaeacaw	dhrgaaggas	eawagshlts	llalaalaft	wtl

Abbildung 64: Aminosäuresequenz der humanen Hyaluronidase 2 (hHyal-2) mit Signalpeptid Mit Ausnahme des Signalpeptids sind alle Aminosäuren fett dargestellt und die zur C-terminalen Domäne gerechneten Aminosäuren unterstrichen.

1	msrplviteg	mMigvllmla	pinalllgfv	qstpdnnktv	refnvywnvp	tfmchkyglr
61	feevsekygi	lqnwmdkfrg	eeiailydpg	mfpallkdpn	gnvvarnggv	pqlgnltkhl
121	qvfrdhlinq	ipdksfpgvg	vidfeswrpi	frqnwaslqp	ykklsvevvr	rehpfwddqr
181	veqeakrrfe	kygqlfmeet	lkaakrmrpa	anwgyyaypy	cynltpnqps	aqceattmqe
241	ndkmswlfes	edvllpsvyl	rwnltsgerv	glvggrvkea	lriarqmtts	rkkvlpyywy
301	kyqdrrdtdl	sradleatlr	kitdlgadgf	iiwgssddin	tkakclqfre	ylnnelgpav
361	krialnnnan	drltvdvsvd	qv			

Abbildung 65: Aminosäuresequenz der Bienenhyaluronidase (bvHyal) inkl. Signalpeptid (NCBI RefSeq-Code: NP_001011619 XP:392016)

10.3 Plasmidkarten



10.3.1 Humane Hyaluronidase 2 (hHyal-2)

Abbildung 66: Plasmidkarten der Plasmide pAK006, pAK007 und pAK013



10.3.2 Humanes PH-20 (hPH-20)

Abbildung 67: Plasmidkarten der Plasmide pAK004, pAK005, pAK011 und pAK012



Abbildung 68: Plasmidkarten der Plasmide pAK002, pAK003, pAK009 und pAK010

10.4 Publikationen

10.4.1 Originalarbeiten

- Kaessler A, Jose J (2009) Autodisplay of human hyaluronidase hPH-20: a new tool for inhibitor testing. Manuscript in preparation.
- Kaessler A, Duflos M, Jose J (2008) Indole carboxamides inhibit and indol acetamides activate bovine testes hyaluronidase by different mechanisms at distinct pH values. J Enz Inhib Med Chem, 23: 719 - 727.
- Algul O, Kaessler A, Apcin Y, Yilmaz A, Jose J (2008) Comparative studies on conventional and microwave synthesis of some benzimidazole, benzothiazole and indole derivatives and testing on inhibition of hyaluronidase. Molecules, 13:736-748.
- Kaessler A, Algül, Ö, Jose J (2007) A microplate based screening of benzimidazole derivatives on hyaluronidase inhibition at pH 3.5 and pH 7.0. Lett Drug Des Discov, 4: 562-569.
- Olgen S, Kaessler A, Jose J (2007) New potent indole derivatives as hyaluronidase inhibitors. Chem Biol Drug Des, 70: 547-551.

10.4.2 Tagungsbeiträge

- Kaessler A, Olgen S, Duflos M, Jose J (2008) Indole Acetamides increase Hyaluronic Acid
 Digestion at pH 3.5 whereas Indol Carboxamides inhibit the Digestion at pH 7.
 Jahrestagung der DPhG, "Herausforderungen an die Pharmazie im 21. Jahrhundert", 8. 11. Oktober 2008, Bonn, A30.
- Jose J, Kaessler A, Duflos M, Algul O, Olgan S (2008) Autodisplay of Human Tumour Targets and Microplate Inhibitor Testing. New European Partnerships in Drug Discovery, 16th of june, Nantes, France, FC P14.
- Kaessler A, Algül Ö, Jose J (2007) A Microtiter plate assay for screening of potential hyaluronidase inhibititors. Pre-Satellite Meeting of the 3rd Pharmaceutical Science World Congress, Amsterdam, MC-P-011.
- Kaessler A, Jose J (2007) Autodisplay humaner Hyaluronidasen und Entwicklung eines Mikrotiterplattenassays zur Testung von Enzyminhibitoren Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Konferenzband 2007, S. 151.
- Kaessler A, Olgen S, Jose J (2007) Development of novel microtiter plate assays enables highthroughput screening of potential hyaluronidase inhibitors. 16èmes Conférences Européennes du GP2A, Bordeaux, 6 et 7 septembre, 08.
- Olgen S, Kaessler A, Jose J, Varol P, Nebioglu D (2007) New potent indole derivatives as hyaluronidase inhibitors. 3rd International Meeting on Medicinal and Phamaceutical Chemistry, IMPPC-3, 16-21 October, Antalya, Turkey. P-16.

- Algul O, Kaessler A, Jose J (2007) Synthesis of a series of benzimidazole derivatives abd testing on inhibition of hyaluronidase in a microtiter plate assay. 3rd International Meeting on Medicinal and Phamaceutical Chemistry, IMPPC-3, 16-21 October, Antalya, Turkey, P-18.
- Kaessler A and Jose J (2006) Cell surface expression of human hyaluronidases in E. coli using the Autodisplay system. DPhG Doktorandentagung, 6. 8. September 2006, Nürnberg-Heroldsberg, V 1.3.
- Kaessler A and Jose J (2006) Autodisplay of human hyaluronidases Hyal1 and PH20 in Escherichia coli. DPhG Jahrestagung, Marburg, 4.-7. Oktober 2006, P33.