

**Die Sialat-Pyruvat-Lyase aus *Clostridium perfringens* A99: Isolierung
des rekombinanten Enzyms und Untersuchungen zum
Reaktionsmechanismus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Dorothea Krüger

Kiel 2000

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits	14
2.2 Nukleinsäuren.....	17
2.2.1 Plasmide.....	17
2.2.2 Oligonukleotide.....	17
2.2.3 DNA-Längenstandard.....	18
2.3 Bakterien	18
2.3.1 Bakterienstämme	18
2.3.2 Nährmedien.....	19
2.3.3 Kulturbedingungen der Bakterienstämme	20
2.3.3.1 <i>E. coli</i> JM101, <i>E. coli</i> JM109 und <i>E. coli</i> DH5 α	20
2.3.3.2 <i>E. coli</i> XL1BlueMRF'	20
2.3.3.3 <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	20
2.3.3.4 <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	21
2.3.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen.....	21
2.3.5 Lagerung von Bakterien	21
2.4 DNA-Techniken	21
2.4.1 Phenolisierung und Ethanol-fällung von DNA.....	21
2.4.2 Restriktionshydrolyse	22
2.4.3 Phosphatase-Behandlung	22
2.4.4 Agarosegelelektrophorese.....	22
2.4.4.1 Reinigung von DNA über Agarosegelelektrophorese.....	23
2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten	23
2.4.6 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	23
2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA.....	24
2.4.8 DNA-Sequenzierung.....	24
2.4.9 Transformation	25
2.4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.4.11 Mutagenese.....	26
2.4.11.1 Megaprimer-PCR	26
2.4.11.2 Sequentielle PCR.....	28
2.4.12 Klonierung der Sialat-Pyruvat-Lyasegene	28
2.5 Proteinbiochemische Methoden und Sialinsäureanalytik	29
2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	29

2.5.2	Bestimmung der Enzymaktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase (Morgan-Elson-Assay) ..	29
2.5.3	Sialinsäurebestimmung nach der Orcinol-Fe ³⁺ -HCl-Methode.....	30
2.5.4	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
2.5.4.1	SDS-Polyacrylamidgele.....	30
2.5.4.2	Native Polyacrylamidgele	31
2.5.5	Dialyse.....	31
2.5.6	Expression des Sialat-Pyruvat-Lyasegens aus <i>Clostridium perfringens</i> A99 in <i>E. coli</i>	32
2.5.7	Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase	33
2.5.7.1	Zellaufschluß.....	33
2.5.7.2	Metall-Chelat-Affinitätschromatographie	33
2.5.7.3	Anionenaustauschchromatographie.....	34
2.5.7.4	Kationenaustauschchromatographie.....	35
2.5.7.5	Gelfiltration	35
2.5.8	Enzymatische Abspaltung des His-Tags mit Thrombin und Enterokinase	35
2.5.8.1	Enzymatische Hydrolyse von SPL14 mit Thrombin.....	35
2.5.8.2	Enzymatische Hydrolyse von SPL19 mit Enterokinase.....	36
2.5.9	Charakterisierung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen (Wildtyp und Mutanten)	36
2.5.9.1	Bestimmung des Temperaturoptimums	36
2.5.9.2	Bestimmung der Thermostabilität	36
2.5.9.3	Bestimmung des pH-Optimums	37
2.5.9.4	Bestimmung der kinetischen Daten.....	37
2.5.9.5	Einfluß der Salzkonzentration auf die Enzymaktivität.....	39
2.5.9.6	Bestimmung der Substratspezifität mittels fluorimetrischer HPLC	39
2.5.9.6.1	Spaltung von Neu5,9Ac ₂	39
2.5.9.6.2	Spaltung von Neu4,5Ac ₂	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Klonierung und Expression des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von <i>Clostridium perfrin-</i> <i>gens</i> in <i>E. coli</i>	41
3.1.1	Auswahl des Expressionssystems.....	41
3.1.2	Klonierung des Sialat-Pyruvat-Lyasegens in die Expressionsvektoren pET14b und pET19b.....	42
3.1.3	Expressionsversuche	43
3.2	Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen von <i>Clostridium perfringens</i> (SPL14 und SPL19).....	45
3.2.1	Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose	45
3.2.2	weitere Chromatographien	48

3.2.3 Entfernung des His-Tags durch enzymatische Hydrolyse mit Thrombin und Enterokinase	50
3.3 Charakterisierung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von <i>Clostridium perfringens</i>	50
3.3.1 Temperaturoptimum	51
3.3.2 Thermostabilität.....	51
3.3.3 pH-Optimum	52
3.3.4 Substratspezifität.....	53
3.3.5 Kinetische Studien.....	53
3.3.6 Vergleich der Eigenschaften der rekombinanten und der nativen Sialat-Pyruvat-Lyase von <i>Clostridium perfringens</i>	56
3.4 Mutagenese des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von <i>Clostridium perfringens</i>	56
3.4.1 Klonierung und Expression der mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasegene.....	56
3.4.2 Reinigung der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase	57
3.5 Charakterisierung der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase von <i>Clostridium perfringens</i>	57
3.5.1 Mutanten in Lysin 161	57
3.5.2 Mutanten in Tyrosin 133.....	59
3.5.3 Mutanten in Aspartat 187 und Glutamat 188.....	61
3.5.3.1 kinetische Studien	62
3.5.3.2 Spaltung von Neu5,9Ac ₂ durch E188D und E188Q	64
4 Diskussion	66
5 Zusammenfassung.....	84
6 Literaturverzeichnis.....	86
7 Abkürzungen.....	98

1 Einleitung

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens (Veillon und Zuber, 1898) ist ein Gram-positives, unbewegliches, stäbchenförmiges Bakterium aus der Familie der *Bacillaceae* (Cato *et al.*, 1986). Häufig besitzt es eine Kapsel aus Polysacchariden. Seine Energie gewinnt es durch Gärung. Hauptgärprodukte in Gegenwart fermentierbarer Kohlenhydrate sind Essigsäure, Buttersäure und Wasserstoff (H₂). Wachstum findet nur unter anaeroben Bedingungen statt. Unter ungünstigen Wachstumsbedingungen sind die Zellen in der Lage, thermoresistente Endosporen zu bilden. *C. perfringens* ist nahezu ubiquitär verbreitet und kommt z. B. im Boden, in marinen Sedimenten, in Rohmilch und im Intestinaltrakt von Mensch und Tier vor (Hatheway, 1990).

Auf der Basis der Produktion von Toxinen wird die Art *Clostridium perfringens* in fünf Gruppen (A-E) unterteilt. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Stamm *Clostridium perfringens* A99 gehört zur Gruppe A. Alle Stämme dieser Gruppe bilden ein Enterotoxin (das Typ A-Enterotoxin), das eine Form der Lebensmittelvergiftung hervorruft. Werden Lebensmittel verzehrt, die stark mit diesen *C. perfringens*-Stämmen kontaminiert sind, sporulieren die Erreger im Darm und setzen dabei das Enterotoxin frei (Duncan, 1973). Das Enterotoxin bewirkt eine starke Ausscheidung von Ionen und Wasser in das Darmlumen. Bei vielen Tieren ruft das Typ A-Enterotoxin die gleichen Symptome hervor wie beim Menschen und ist vermutlich die Ursache für eine letale Enteritis bei Pferden (Cato *et al.*, 1986).

Alle *C. perfringens* Stämme bilden das sogenannte α -Toxin (Cato *et al.*, 1986). Dabei handelt es sich um eine Phospholipase C, die Lecithin hydrolysiert. Seine letale Wirkung auf Zellen beruht vermutlich darauf, dass die Zellen infolge der Hydrolyse des Membranlecithins lysieren. Bei Infektionen mit α -Toxin-produzierenden Clostridien kommt es daher zu intravaskulären Hämolysen und zu Gewebnekrosen. So ist *C. perfringens* für eine Reihe von Krankheiten bei Mensch und Tier verantwortlich, wie z. B. Bakteriämien, intra-abdominale Abszesse, Peritonitis und Gasbrand (clostridielle Myonekrose) (Cato *et al.*, 1986).

Die clostridielle Myonekrose wird meist durch eine Mischinfektion mehrerer *Clostridium*-Arten hervorgerufen. *Clostridium perfringens*, das in etwa 80 % der Gasbrandinfektionen involviert ist, ist der Haupterreger der clostridiellen Myonekrose. Daneben sind an Gasbrandinfektionen vor allem *Clostridium sordellii* und *Clostridium septicum* sowie in geringem Umfang auch *Clostridium novyi*, *Clostridium histolyticum* und *Clostridium fallax* beteiligt (MacLennan, 1962). Ursprung solcher Infektionen sind meist traumatische Wunden, die mit Schmutz oder Faeces kontaminiert sind, wie sie heutzutage z. B. nach Motorradunfällen auftreten (Roggentin *et al.*, 1993b). Infolge der gestörten Blut- und damit Sauerstoffzufuhr wird das Gewebe anoxisch und die Clostridien können sich rasch vermehren. Die Ausbreitung im Gewebe kann bis zu 10 cm/h betragen (Kozianka *et al.*, 1987). Unbe-

handelt führt eine Gasbrandinfektion innerhalb weniger Tage zum Tod, eine erfolgreiche Therapie mit Antibiotika, Sauerstoffüberdruck sowie durch chirurgische Eingriffe ist jedoch möglich. Das α -Toxin ist die alleinige Ursache der Myonekrose bei einer Gasbrandinfektion (Cato *et al.*, 1986), andere Faktoren wie das κ -Toxin (eine Kollagenase) unterstützen jedoch die Ausbreitung der Bakterien im Gewebe (Hatheway, 1990). Auch Sialidasen werden in großen Mengen von den Clostridien ausgeschieden. Sie fördern den Abbau von Gewebe, indem sie die schützenden Sialinsäuren von Glykoproteinen und Glykolipiden abspalten (Roggentin *et al.*, 1992) und erleichtern dadurch die Ausbreitung der Bakterien im Gewebe (Müller, 1976; Corfield, 1992). Außerdem können die freigesetzten Sialinsäuren von den Clostridien als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Die durch die Sialidase freigesetzten Sialinsäuren werden durch eine Sialinsäure-Permease in die Zellen transportiert, wo sie durch die Sialat-Pyruvat-Lyase gespalten werden (Nees und Schauer, 1974). Für *Bacteroides fragilis* und *Salmonella typhimurium* konnte gezeigt werden, dass Wirtssialinsäuren ein wichtiger Metabolit für das Wachstum sind (Godoy *et al.*, 1993; Corfield, 1992). Da auch *C. perfringens* mit Sialinsäuren als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen kann (Nees und Schauer, 1974), postulierte Corfield (1992), dass die Verfügbarkeit von Sialinsäuren als Nährstoffe für das bakterielle Wachstum auch bei einer Infektion mit *Clostridium perfringens* möglicherweise ein sehr bedeutender Faktor ist.

Sialinsäuren

Unter dem Begriff Sialinsäuren werden alle Derivate der Neuraminsäure zusammengefaßt (Blix *et al.*, 1957). Die Neuraminsäure (5-Amino-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosonsäure) ist ein Aminozucker mit einem Rückgrat aus neun Kohlenstoffatomen, der durch die Carboxylgruppe an C-Atom 2 einen stark sauren pK-Wert von 2,2 erhält und daher unter physiologischen Bedingungen negativ geladen ist. Die unsubstituierte Form ist sehr instabil und kommt in der Natur nicht vor (Schauer, 1982). Allerdings sind inzwischen mehr als 40 natürliche Derivate der Neuraminsäure bekannt (Abb. 1) - eine strukturelle Vielfalt, die für einen Zucker in der Natur einzigartig ist (Schauer und Kamerling, 1997).

Die beiden häufigsten in der Natur vorkommenden Sialinsäuren sind die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), der Vorläufer aller glykosidisch gebundenen Sialinsäuren (Schauer, 1991) und die *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc), die durch Hydroxylierung der Methylgruppe des *N*-Acetylrestes von CMP-Neu5Ac entsteht (Shaw und Schauer, 1988). Die Hydroxylgruppen dieser beiden Sialinsäuren können durch Acetyl-, Lactoyl-, Methyl-, Sulfat- und Phosphatreste in unterschiedlicher Kombination substituiert sein, was zu der großen strukturellen Vielfalt der Sialinsäuren führt (Schauer, 1991). Die Ketodesoxy-nonulosonsäure (Kdn; 3-Desoxy-D-glycero-D-galacto-nonulopyranosonsäure) und ihre Derivate werden ebenfalls zu den Sialinsäuren gezählt (Nadano *et al.*, 1986), obwohl sie nicht die für die Neuraminsäure typische Aminogruppe besitzen.

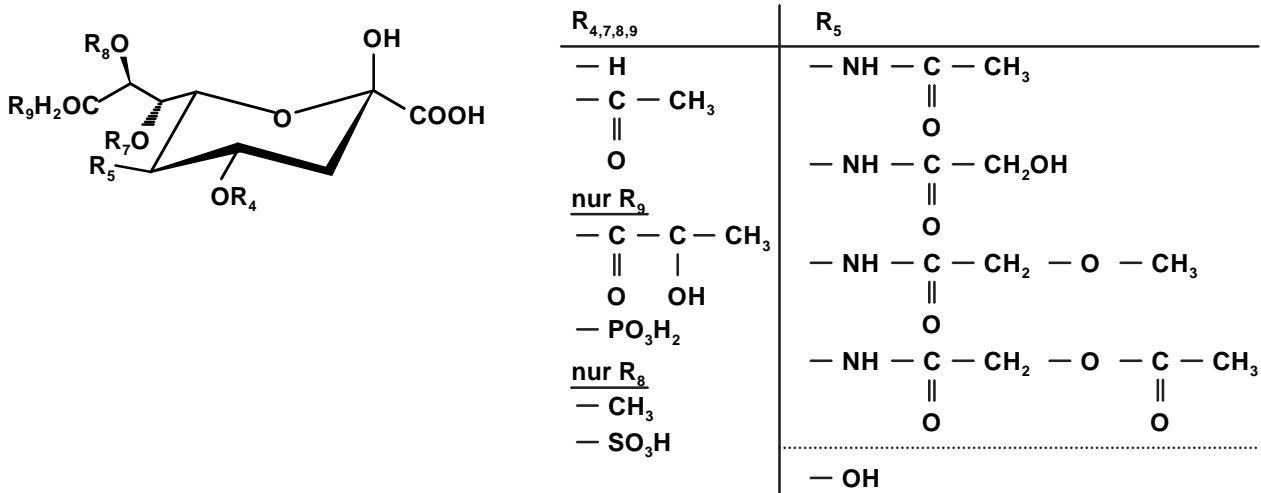


Abb. 1 Struktur natürlicher Sialinsäuren (modifiziert nach Schauer, 1985). Die große strukturelle Vielfalt der Sialinsäuren wird durch die unterschiedliche Kombination der Substituenten ermöglicht.

Während freie Sialinsäuren überwiegend in der β -anomeren Konfiguration vorliegen - Neu5Ac z. B. zu über 90 % (Haverkamp *et al.*, 1982) – liegen sie glykosidisch gebunden meist als α -Anomere vor (Reuter und Schauer, 1988). Dabei sind sie meist α -2,3- oder α -2,6-glykosidisch an Galaktose, *N*-Acetylgalaktosamin oder *N*-Acetylglucosamin oder α -2,8- oder α -2,9-glykosidisch an ein anderes Sialinsäuremolekül gebunden (Schauer und Kamerling, 1997). Eine Ausnahme bilden die CMP-Glykoside der Sialinsäure, in denen die Sialinsäure gebunden in der β -anomeren Konfiguration vorliegt (Haverkamp *et al.*, 1979).

Sialinsäuren kommen vor allem bei den höheren Tieren, den Deuterostomiern, vor. Sie konnten von den *Echinodermata* bis zu den *Vertebrata* bei allen untersuchten Organismen, inklusive dem Menschen nachgewiesen werden (Corfield und Schauer, 1982a). Der größte Teil der Sialinsäuren liegt gebunden als Bestandteil von Oligosacchariden, Polysacchariden und Glykokonjugaten vor (Schauer, 1982). Sialylierte Glykokonjugate kommen vor allem in der äußeren Membran der Zellen vor, sind aber auch wichtige Bestandteile des Serums und von mucosen Schleimen (Traving und Schauer, 1998). Charakteristisch ist die terminale Stellung der Sialinsäuren in den Zuckerketten, die Sialinsäuren können aber auch an internen Verzweigungen sitzen oder Homopolymere bilden, die sogenannten Polysialinsäuren (Schauer und Kamerling, 1997). Während die Deuterostomier als „Erfinder“ des Sialinsäuremetabolismus gelten (Schauer, 1982) und - soweit untersucht - alle Enzyme, die zur Synthese und zum Abbau von Sialinsäuren nötig sind, besitzen, scheinen die Protostomier in der Regel keine Sialinsäuren zu besitzen. Hier konnten Sialinsäuren bisher nur in frühen Larvenstadien von *Drosophila melanogaster* (Roth *et al.*, 1992) und in Zikadenlarven (Dr. Y. Malykh, persönliche Mitteilung) nachgewiesen werden. Da in beiden Fällen nicht untersucht wurde, ob diese Organismen die Enzyme zur Synthese von Sialinsäuren besitzen, ist unklar, ob sie die Sialinsäuren selbst synthetisieren

oder mit der Nahrung aufnehmen, um sie in ihre Glykokonjugate einzubauen. Höhere Pilze, Algen und höhere Pflanzen besitzen keine Sialinsäuren.

Bei Viren und Mikroorganismen kommen Sialinsäuren nur selten vor. Im Gegensatz zu den Bakterien scheinen die Viren, die Sialinsäuren besitzen, wie z. B. das HIV und das Eppstein-Barr-Virus, die Sialinsäuren nicht selbst zu synthetisieren (Schauer, 1982). Sie nutzen die von den Wirtszellen gebildeten Sialinsäuren. Das gleiche scheint für die sehr wenigen pathogenen niederen Pilze und Protozoen zu gelten, die Sialinsäuren besitzen, z. B. *Plasmodium falciparum* und Trypanosomen. *Trypanosoma cruzi* z. B. kann nachweislich keine Sialinsäuren synthetisieren (Schauer *et al.*, 1983). Allerdings besitzen Trypanosomen ein Enzym, die Transsialidase, die Sialinsäuren von Glykokonjugaten des Wirtes auf eigene Glykokonjugate übertragen kann (Schenkman *et al.*, 1991; Engstler *et al.*, 1992). Die Bakterien, die Sialinsäuren besitzen, wie z. B. *E. coli* und *Neisseria meningitidis* können diese selbst synthetisieren. Ihnen gemeinsam ist, dass sie oft höhere Tiere besiedeln und meist pathogen sind (Corfield und Schauer, 1982a). Sialinsäuren findet man bei Bakterien in Kapseln und im Lipopolysaccharid. Die Kapseln können Homopolymere aus α -2,8- oder α -2,9-verknüpften Sialinsäuren sein, wie die Colominsäure einiger *E. coli*-Stämme (Barry, 1959), aber auch Heteropolymere, wie man sie vor allem bei pathogenen Streptococccen findet (Jennings, 1983). Im Lipopolysaccharid wurden Sialinsäuren sowohl in der Kernzone (z. B. bei *Rhodobacter capsulatus*) als auch in der O-spezifischen Seitenkette (z. B. bei *E. coli*) gefunden (Schauer und Kamerling, 1997). Bei Vertretern der *Archaea* wurden bisher keine Sialinsäuren nachgewiesen. Zwar konnten im Genom von *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996) Sequenzen mit hoher Homologie zu Sialinsäure-metabolisierenden Enzymen, wie z. B. zur Sialinsäure-Synthase gefunden werden (Traving und Schauer, 1998), in Kulturen von *Methanococcus jannaschii* ließen sich jedoch weder Sialinsäuren noch Sialinsäure-Synthaseaktivität nachweisen (H. Schmid, persönliche Mitteilung).

Die Funktion der Sialinsäuren ist in erster Linie für die höheren Tieren untersucht worden. Ihre große Bedeutung begründet sich vor allem in ihrer negativen Ladung, in ihrer exponierten Stellung in den Glykokonjugaten und in ihrer großen strukturellen Vielfalt. So sind Sialinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung und ihrer terminalen Stellung an einer Reihe von Anziehungs- und Abstoßungsphänomenen zwischen Zellen und Molekülen, aber auch innerhalb von Molekülen beteiligt (Schauer, 1992). Sie können kationische Substanzen binden und so z. B. ihren Transport oder ihre Aufnahme in die Zellen erleichtern. Durch Spreitungseffekte, bedingt durch die Abstoßung benachbarter Sialinsäurereste in einem Molekül, beeinflussen sie die Konformation und damit die biologische Funktion von Glykokonjugaten. Außerdem schützen die Sialinsäuren Glykoproteine und Zellen vor dem Angriff durch Proteasen und andere Enzyme und damit vor dem Abbau (Reuter *et al.*, 1988). Die sialinsäurehaltigen Schleimhäute des Magen-Darmtraktes bilden nicht nur einen wirksamen Schutz vor den Verdauungsenzymen, sondern schützen die darunterliegenden Gewebe auch vor dem Eindringen pathogener Bakterien (Kelm und Schauer, 1997).

Ihre wichtigste Funktion üben Sialinsäuren vermutlich bei molekularen und zellulären Erkennungsprozessen aus. Dabei haben die Sialinsäuren durchaus gegensätzliche Funktionen. Auf der einen Seite maskieren sie Rezeptoren und verhindern so Interaktionen zwischen Rezeptoren und Liganden (Schauer, 1985). So schützen Sialinsäuren z. B. Serumglykoproteine und Erythrocyten vor Abbau und Phagozytose, indem sie darunterliegende Galaktosereste maskieren. Werden die endständigen Sialinsäuren abgespalten, können die subterminalen Galaktosereste durch Lektine auf Hepatocyten bzw. Phagozyten gebunden werden und es kommt zur Endocytose der Serumproteine bzw. Erythrocyten. Ein weiteres Beispiel ist der Schutz körpereigener Gewebe, aber auch vieler hochsialylierter Tumore vor der Erkennung durch das Immunsystem (Pilatte *et al.*, 1993). Geht die schützende Sialinsäureschicht verloren, kann es zu Autoimmunreaktionen kommen.

Auf der anderen Seite dienen Sialinsäuren aber auch als Erkennungsstellen für körpereigene Zellen und Hormone und spielen so eine wichtige Rolle bei zellulären Interaktionen (Kelm und Schauer, 1997). Bei Entzündungen exprimieren Endothelzellen auf ihrer Oberfläche Selektine, die bestimmte sialylierte Strukturen (z. B. Sialyl-Lewis^X) auf Leukozyten erkennen, so dass diese an die Endothelzellen binden und in das Gewebe eindringen können (Lasky, 1995). Sialoadhäsine (Siglecs) wie das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) binden ebenfalls hochspezifisch an sialylierte Glykane (Kelm *et al.*, 1996; Crocker *et al.*, 1998). Das Myelin-assoziierte Glykoprotein ist im Nervensystem unter anderem an der Myelinisierung und an der Regulation des axonalen Wachstums beteiligt. Sialinsäuren sind jedoch nicht nur bei körpereigenen Erkennungsprozessen wichtig, sondern stellen auch Rezeptoren für einige Bakterien, Viren und Toxine dar. So erfolgt z. B. die Bindung des Tetanus-Toxins an Ganglioside von Nervensynapsen über Sialinsäuren (Schauer *et al.*, 1995). Die Sialinsäure-spezifische Adhäsion über mikrobielle Lektine (Sharon und Lis, 1997) ist oft ein kritischer Schritt bei Infektionskrankheiten, etwa bei der durch einige *E. coli*-Stämme hervorgerufenen Neugeborenen-Meningitis oder bei Infektionen der Magenschleimhaut durch *Helicobacter pylori*.

Modifikationen der Sialinsäuren, insbesondere die O-Acetylierung besitzen eine große Bedeutung bei der Regulation der molekularen und zellulären Erkennung (Schauer, 1991). So binden Influenza C-Viren spezifisch an 9-O-acetylierte Sialinsäuren auf Bronchialepithelien (Herrler *et al.*, 1985), während die O-Acetylierung eine Bindung von Influenza A- und B-Viren verhindert (Higa *et al.*, 1985). Vor allem aber ist die O-Acetylierung von Sialinsäuren sehr wichtig für die Morphogenese und Entwicklung verschiedener Gewebe (Varki *et al.*, 1991). Die große Bedeutung von Sialinsäuremodifikationen für die Funktion und Entwicklung von Zellen und Geweben spiegelt sich auch darin wider, dass das Sialinsäuremuster einer Zelle nicht nur spezie- und gewebespezifisch ist, sondern sich bei der physiologischen Differenzierung auch verändert (Varki, 1992).

Über die Funktion der Sialinsäuren bei Viren und Mikroorganismen ist wenig bekannt. Pathogenen Bakterien und parasitischen Protozoen scheint ein „Sialinsäuremantel“ Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes zu geben, so dass diese besser in die Wirtsor-

ganismen eindringen und sich ausbreiten können (Schenkman *et al.*, 1991; Yamasaki *et al.*, 1993). Jedoch besteht keine direkte Beziehung zwischen dem Besitz von Sialinsäuren und der Pathogenität von Bakterien (Reuter und Gabius, 1996). So besitzen sowohl hochinfektiöse Neisserien und Streptococcen als auch nicht-pathogene *Rhodobacter*-Arten Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche (Jennings, 1983; Krauss *et al.*, 1988). Innerhalb einer Bakterienart scheinen die Sialinsäuren allerdings die Pathogenität zu beeinflussen.

Der Sialinsäurestoffwechsel und die darin involvierten Enzyme sind intensiv erforscht worden (Corfield und Schauer, 1982b; Schauer, 1982). Die Verbreitung der Enzyme des Sialinsäurestoffwechsels bei Mikroorganismen ist sehr unregelmäßig und die Gruppen, die solche Enzyme besitzen, sind phylogenetisch uneinheitlich. Es gibt auch einige Mikroorganismen, wie z. B. *Clostridium perfringens*, die selbst keine Sialinsäuren besitzen, wohl aber Enzyme des Sialinsäureabbaus, wie Sialidasen und Sialat-Pyruvat-Lyasen exprimieren. Da es sich bei den Mikroorganismen, die Enzyme des Sialinsäurestoffwechsels besitzen, um Organismen handelt, die höhere Tiere besiedeln, vermuten Schauer und Kamerling (1997), dass diese die Gene durch horizontalen Gentransfer von den Deuterostomiern erworben haben. Hinweise auf eine Verbreitung über horizontalen Gentransfer gibt es vor allem für die Sialidasen, die Schlüsselenzyme des Sialinsäureabbaus (Hoyer *et al.*, 1992; Roggentin *et al.*, 1993a). Allerdings scheinen auch die Sialat-Pyruvat-Lyasen von Mikroorganismen und höheren Tieren einen gemeinsamen evolutiven Ursprung zu besitzen (Traving und Schauer, 1998).

Sialat-Pyruvat-Lyasen

Sialat-Pyruvat-Lyasen (*N*-Acetylneuraminat-Lyasen; EC. 4.1.3.3) katalysieren die reversible Spaltung freier Sialinsäuren in Pyruvat und das entsprechende *N*-Acylmannosamin (Comb und Roseman, 1960). Sie sind die terminalen Enzyme des Sialinsäurekatabolismus (Schauer *et al.*, 1999). Glykosidisch gebundene Sialinsäuren können nicht gespalten werden. Sie müssen erst von Sialidasen aus den Glykokonjugaten freigesetzt werden.

Sialat-Pyruvat-Lyasen sind – wie die Sialinsäuren – vor allem bei den höheren Tieren zu finden. Sie wurden schon vor rund 40 Jahren in zahlreichen Geweben verschiedener Tiere nachgewiesen (Comb und Roseman, 1960; Brunetti *et al.*, 1962). Die Sialat-Pyruvat-Lyasen spielen bei den höheren Tieren eine wichtige Rolle bei der Regulation des Sialinsäuremetabolismus: Indem sie den Abbau der Sialinsäuren einleiten, verhindern sie ein Wiederverwerten (Recycling) der von Sialidasen aus Glykokonjugaten freigesetzten Sialinsäuren (Traving und Schauer, 1996; Schauer und Kamerling, 1997). Sialat-Pyruvat-Lyasen kommen aber auch in einigen Mikroorganismen vor, die Kommensalen oder Parasiten höherer Tiere sind, wie z. B. die Bakterien *Vibrio cholerae* (Heimer und Meyer, 1956), *C. perfringens* (Popenoe und Drew, 1957) und *E. coli* (Brunetti *et al.*, 1962) oder das Protozoon *Trichomonas vaginalis* (Meysick *et al.*, 1996). Auffällig ist, dass einige dieser Mikroorganismen, z. B. *C. perfringens*, vermutlich selbst gar keine Sialinsäuren besitzen. Die Sialat-Pyruvat-Lyase ermöglicht es diesen Organismen, Sialinsäuren des Wirtes

als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Die durch die Sialidasen abgespaltenen Sialinsäuren werden durch einen Sialinsäuretransporter (eine Permease) in die Zellen transportiert, wo sie von der Sialat-Pyruvat-Lyase gespalten werden (Nees und Schauer, 1974). Die Gene dieser drei Proteine liegen bei *C. perfringens* allerdings nicht, wie von Nees und Schauer (1974) vermutet, in einem Operon (Traving *et al.*, 1997), scheinen aber trotzdem gemeinsam reguliert zu sein. Walters *et al.* (1999) konnten zeigen, dass das Gen für die Sialat-Pyruvat-Lyase bei *C. perfringens* in einem Operon mit dem Gen für die *N*-Acetylmannosamin-6-phosphat-Epimerase liegt, einem Enzym, das für den Abbau des von der Sialat-Pyruvat-Lyase gebildeten *N*-Acetylmannosamins wichtig ist. Möglicherweise spielen die Sialat-Pyruvat-Lyasen auch für die Pathogenität von Bakterien eine Rolle: Untersuchungen zum Vorkommen von Sialidasen und Sialat-Pyruvat-Lyasen bei pathogenen Streptococcen haben ergeben, dass sich nur bei den pathogensten Stämmen Lyaseaktivität nachweisen ließ, während Sialidaseaktivität bei allen vorhanden war (Byers *et al.*, 1996). Beim Auftreten von Darmentzündungen wurde eine erhöhte Lyaseaktivität fäkaler Bakterien nachgewiesen (Corfield *et al.*, 1988).

Bei Mikroorganismen, die selbst Sialinsäuren besitzen und synthetisieren, ist die Sialat-Pyruvat-Lyase vor allem für die Regulation der intrazellulären Sialinsäurekonzentration von Bedeutung (Vimr und Troy, 1985a; 1985b). In *E. coli* gibt es im Gegensatz zu den höheren Tieren keine Feedback-Hemmung der Synthese von Sialinsäuren durch Neu5Ac oder CMP-Neu5Ac, so dass der metabolische Fluß der Sialinsäuren ausschließlich durch die Sialat-Pyruvat-Lyase reguliert wird (Vimr und Troy, 1985a). Das ganze wird noch dadurch verkompliziert, dass *E. coli* auch exogene Sialinsäuren nutzen kann, die über einen Sialinsäuretransporter in die Zellen transportiert werden (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1987). Exogene Sialinsäuren können von *E. coli* als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden, wobei die Sialinsäuren entweder direkt in die Zellwand bzw. Kapsel eingebaut oder durch die Sialat-Pyruvat-Lyase abgebaut werden können (Vimr und Troy, 1985a; 1985b). Die Gene für den Sialinsäuretransporter und für die Sialat-Pyruvat-Lyase liegen bei *E. coli* in einem Operon, das durch Sialinsäuren induziert wird (Vimr und Troy, 1985b; Martinez *et al.*, 1995). Eine Sialidase besitzt *E. coli* nicht. Untersuchungen mit Mutanten von *E. coli*, die Sialat-Pyruvat-Lyase negativ sind, zeigen, dass hohe Sialinsäurekonzentrationen in der Zelle toxisch sind und die Lyase daher auch der Entgiftung dient. In sialinsäurehaltigem Medium können diese Mutanten nicht wachsen, da sie toxische Mengen an Sialinsäuren in den Zellen anreichern.

In einigen *E. coli*-Stämmen dient die Sialat-Pyruvat-Lyase auch der Synthese von Sialinsäuren (Rodríguez-Aparicio *et al.*, 1995; Ferrero *et al.*, 1996). Die Synthese wird durch Ca^{2+} -Ionen und Pyruvat aktiviert, durch Neu5Ac gehemmt. Da das Gleichgewicht der von der Sialat-Pyruvat-Lyase katalysierten Reaktion stark auf Seiten der Spaltung liegt, vermuten die Autoren, dass Neu5Ac dem Gleichgewicht durch Aktivierung zu CMP-Neu5Ac schnell entzogen wird. Normalerweise erfolgt die Synthese von Sialinsäuren bei Bakterien über die *N*-Acetylneuraminat-Synthase aus *N*-Acetylmannosamin und Phosphoenolpyruvat, bei den höheren Tieren über die *N*-Acetylneuraminat-9-phosphat-Synthase aus

N-Acetylmannosamin-6-phosphat und Phosphoenolpyruvat (Corfield und Schauer, 1982b). Die oben beschriebenen *E. coli*-Stämme besitzen allerdings nachweislich keine *N*-Acetylneuraminat-Synthase- und keine *N*-Acetylneuraminat-9-phosphat-Synthaseaktivität.

Im Labor und in der Industrie werden Sialat-Pyruvat-Lyasen ebenfalls für die Synthese von Sialinsäuren und Sialinsäureanaloga genutzt (Wong *et al.*, 1995). Dabei arbeitet man meist bei niedrigen Temperaturen und einem großen Überschuß an preiswertem Pyruvat, um das Gleichgewicht zugunsten der Synthese zu verschieben (Baumann *et al.*, 1989; Uchida *et al.*, 1984). So können Neu5Ac und einige Derivate bereits im industriellen Maßstab synthetisiert werden (Kim *et al.*, 1988; Kragl *et al.*, 1991). Die chemisch-enzymatische Synthese von Sialinsäuren ist einfacher und billiger als die aufwendige Reinigung von Sialinsäuren aus Zellen und Geweben. Die Sialat-Pyruvat-Lyasen können darüber hinaus aber auch für die Synthese künstlicher Sialinsäurederivate verwendet werden, die z. B. für therapeutische Anwendungen in der Medizin eingesetzt werden können (von Itzstein *et al.*, 1993; von Itzstein und Kiefel, 1997).

Im Labor werden Sialat-Pyruvat-Lyasen auch in der Sialinsäure-Analytik eingesetzt (Reuter und Schauer, 1994b; Schauer *et al.*, 1995), etwa um Sialinsäuren im Serum nachzuweisen (Sugahara *et al.*, 1980). Durch Verwendung eines gekoppelten Tests mit Sialidase können jedoch nicht nur freie Sialinsäuren, sondern auch in Glykokonjugaten gebundene Sialinsäuren bestimmt werden (Uchida *et al.*, 1984). In der Chromatographie sialinsäurehaltiger Proben, z. B. mittels fluorimetrischer HPLC (Hara *et al.*, 1985; 1987; 1989), werden ebenfalls Sialat-Pyruvat-Lyasen eingesetzt. Hier können Peaks im Chromatogramm als umsetzbare Sialinsäuren identifiziert werden, wenn sie durch eine Lyasebehandlung der Probe eliminiert werden können.

Die Eigenschaften von Sialat-Pyruvat-Lyasen sind bisher vor allem an den gereinigten Enzymen aus *Clostridium perfringens* (Nees *et al.*, 1976), aus *E. coli* (Uchida *et al.*, 1984, natives Enzym; Aisaka *et al.*, 1991, rekombinantes Enzym) und aus der Schweineniere (Schauer und Wember, 1996; Sommer *et al.*, 1999) untersucht worden. Ein Vergleich zeigt, dass sie sich in ihren Eigenschaften sehr ähneln (Tab. 1).

Die Größe der Sialat-Pyruvat-Lyasen, die durch Gelfiltration bestimmt wurde, beträgt in der Regel etwa 100 kDa. Aufgrund des Laufverhaltens in denaturierenden Gelen wurde lange Zeit vermutet, dass es sich bei den Sialat-Pyruvat-Lyasen um Di- oder Trimere handelt. Die Röntgenstrukturanalyse der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* zeigte jedoch, dass das Enzym ein Tetramer ist (Izard *et al.*, 1994). Izard *et al.* (1994) führen das anomale Migrationsverhalten in der Gelfiltration auf die asymmetrische Struktur zurück. Da Quervernetzungsversuche mit Dimethylpimelimidat zeigten, dass auch das Enzym aus der Schweineniere ein Tetramer ist, kann man annehmen, dass das ein gemeinsames Merkmal aller Sialat-Pyruvat-Lyasen ist (Sommer *et al.*, 1999).

Tab. 1 Eigenschaften der Sialat-Pyruvat-Lyasen aus *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* und aus Schweinenieren (modifiziert nach Traving und Schauer, 1996).

*¹ : Nees *et al.*, 1976

*² : Uchida *et al.*, 1984

*³ : Aisaka *et al.*, 1991

*⁴ : Izard *et al.*, 1994

*⁵ : Schauer und Wember, 1996

*⁶ : Sommer *et al.*, 1999

	<i>Clostridium perfringens</i> * ¹	<i>Escherichia coli</i>	Schweineniere
Größe [kDa]	100	98* ² ; 105* ³	58* ⁵ ; 110* ⁶
Untereinheiten	2	3* ^{2,3} ; 4* ⁴	1* ⁵ ; 4* ⁶
pH-Optimum	7,2	7,7* ² ; 6,5-7,0* ³	7,2* ⁵ ; 7,6-8,0* ⁶
Temperaturoptimum [°C]	nicht bestimmt	75* ² ; 80* ³	75* ⁶
Thermostabilität	+	+* ²	+* ^{5,6}
K _M (Neu5Ac) [mM]	2,8	3,6* ² ; 3,3* ³	3,7* ⁵ ; 1,7* ⁶
Metallionen nötig	-	-* ²	-* ^{5,6}

Die Sialat-Pyruvat-Lyasen besitzen alle sehr ähnliche pH-Optima im neutralen Bereich zwischen pH 7 und pH 8. Auch die Temperaturoptima sind mit 75-80 °C annähernd identisch. Interessant ist die moderate Thermostabilität der Enzyme. In Gegenwart von Pyruvat sind die Sialat-Pyruvat-Lyasen von *C. perfringens* und *E. coli* bis 70 °C bzw. 75 °C stabil, selbst wenn sie für längere Zeit (über eine Stunde) auf diese Temperatur erhitzt werden (Kolisis *et al.*, 1980; Uchida *et al.*, 1984). Dabei scheint das Pyruvat eine schützende Wirkung auf das katalytische Zentrum des Enzyms auszuüben, da die Enzyme in Abwesenheit von Pyruvat nur bis etwa 50 °C bzw. 60 °C stabil sind.

Die kinetischen Eigenschaften der Sialat-Pyruvat-Lyasen sind ebenfalls sehr ähnlich. Für Neu5Ac als Substrat liegen die recht hohen K_M-Werte zwischen 1,7 mM und 3,7 mM.

Die Sialat-Pyruvat-Lyasen, insbesondere das Enzym aus *C. perfringens*, wurden eingehend auf ihre Substratspezifität, aber auch auf die Spaltung künstlicher Sialinsäurederivate hin untersucht (Faillard *et al.*, 1969; Schauer *et al.*, 1971; Suttajit *et al.*, 1971; Shukla und Schauer, 1986; Schauer *et al.*, 1987; Groß und Brossmer, 1988; Zbiral *et al.*, 1992). Am besten umgesetzt wird Neu5Ac, das in der Natur wohl häufigste Substrat der Sialat-Pyruvat-Lyasen. Aber auch Neu5Gc wird von allen Sialat-Pyruvat-Lyasen umgesetzt, wenn auch schlechter als Neu5Ac. Die Umsatzrate von Neu5Gc im Vergleich zu Neu5Ac liegt für das Enzym aus *C. perfringens* bei etwa 70 % (Shukla und Schauer, 1986). Insgesamt scheinen Modifikationen an der Aminogruppe an C₅ nur einen relativ geringen Einfluß auf die Spaltungsgeschwindigkeit auszuüben (Faillard *et al.*, 1969; Schauer *et al.*, 1971). Modifikationen an der Glycerinseitenkette der *N*-Acetylneuraminsäure haben sehr unterschiedliche Auswirkungen. Während Veränderungen an C₉ relativ gut toleriert werden, führen Modifikationen an C₇, vor allem aber an C₈ meist zu einer stark verminderten Spaltung, wenn nicht zu einem Verlust der Spaltbarkeit (Suttajit *et al.*, 1971; Schauer *et al.*, 1987; Zbiral *et al.*, 1992). Die Hydroxylgruppen an C₇ und C₈ scheinen dabei vor allem

für die Substratbindung wichtig zu sein. Modifikationen an C₄ werden nicht toleriert. Die entsprechenden Substrate sind nicht spaltbar, teilweise aber gute Inhibitoren der Sialat-Pyruvat-Lyase (Zbiral *et al.*, 1992; Groß und Brossmer, 1988). Wie später ausführlich erläutert wird, spielt die Hydroxylgruppe an C₄ eine wichtige Rolle bei der Katalyse. Die Carboxylgruppe und eine freie Hydroxylgruppe an C₂ sind essentiell sowohl für die Bindung als auch für die Spaltbarkeit der Substrate (Schauer *et al.*, 1987; Schauer und Kammerling, 1997). So können, wie bereits erwähnt, nur freie Sialinsäuren umgesetzt werden.

Die Sialat-Pyruvat-Lyasen gehören zu den Klasse I-Aldolasen. Das bedeutet, dass es während der Katalyse zur Bildung einer Schiff'schen Base zwischen dem Substrat und einem Lysinrest des Enzyms kommt, um das Substrat zu aktivieren. Im Unterschied dazu sind für die Bindung und Aktivierung des Substrates durch Klasse II-Aldolasen bivalente Metallionen nötig (Rutter *et al.*, 1968). Die Bildung einer Schiff'schen Base konnte durch die Hemmung der Enzymaktivität durch Reduktion mit Borhydrid in Gegenwart von Pyruvat und Neu5Ac mehrfach nachgewiesen werden (u. a. Barnett *et al.*, 1971; Schauer und Wember, 1971; Aisaka *et al.*, 1991) und wurde durch Röntgenstrukturuntersuchungen der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* bestätigt (Lawrence *et al.*, 1997). Chelatoren, wie z. B. EDTA, hemmen die Enzymaktivität dagegen nicht (u. a. Barnett *et al.*, 1971; Nees *et al.*, 1976; Uchida *et al.*, 1984).

Zum Reaktionsmechanismus der Sialat-Pyruvat-Lyasen gibt es verschiedene Theorien. Basierend auf Inhibitionsstudien postulierten Nees *et al.* (1976), dass es während der Enzymkatalyse zunächst zur Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen der Ketogruppe der offenkettigen *N*-Acetylneuraminsäure und einem Lysinrest des Enzyms kommt. Dann wird die Hydroxylgruppe an C₄ des Substrates deprotoniert, wobei ein Histidinrest des Enzyms als Protonenakzeptor fungiert. Nach Spaltung der Bindung zwischen C₃ und C₄ kommt es zur Freisetzung des Mannosamins. Das Proton wird dann vom Histidinrest wieder abgegeben und auf das Carbanion des gebundenen Pyruvats übertragen. Durch Hydrolyse der Schiff'schen Base wird das Pyruvat schließlich freigesetzt. Für die Beteiligung eines Histidinrestes in der Enzymkatalyse sprechen vor allem die pH-abhängige Hemmung des Enzyms durch Photooxidation in Gegenwart von Bengalrosa und die Inaktivierung des Enzyms durch Diazotieren (Schauer und Wember, 1971; Nees *et al.*, 1976). Beide Reagenzien reagieren auch mit Tyrosinresten, die Form der pH-Abhängigkeit der Photooxidation spricht allerdings eher für einen Histidinrest. Eine Reihe von Inhibitionsstudien sprechen auch für die Beteiligung eines Cysteinrestes in der Katalyse (Barnett *et al.*, 1971; Schauer und Wember, 1971; DeVries und Binkley, 1972; Kolisis, 1985). So stellte Kolisis (1985) die Theorie auf, dass ein Cysteinrest im aktiven Zentrum als reversibler Protonenakzeptor fungiert. Das wäre allerdings sehr ungewöhnlich, da Cysteinreste zwar wirksame Nucleophile sind, in der Regel aber nicht als Protonenakzeptor fungieren. Röntgenstrukturuntersuchungen der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* haben gezeigt, dass sich im aktiven Zentrum weder ein Cystein- noch ein Histidinrest befinden, wohl aber ein Tyrosinrest, der möglicherweise als Protonenakzeptor fungiert (Lawrence *et al.*, 1997). Ob dieser Tyrosinrest als reversibler Protonenakzeptor dient oder die Carboxylgruppe des

Substrates, wie von Smith *et al.* (1999) postuliert, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass nur das α -Anomer der *N*-Acetylneuraminsäure umgesetzt wird (Deijl und Vliegthart, 1983; Baumann *et al.*, 1989; Schauer und Wember, 1996). Das β -Anomer muß erst durch Mutarotation in die α -Form umgewandelt werden. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Reaktion des offenkettigen Substrates mit dem Enzym. Zbiral *et al.* (1992) und Schauer und Kamerling (1997) postulierten daher, dass die Reaktion damit startet, dass zunächst die Hydroxylgruppe an C₄ deprotoniert wird und es dann erst zur Ausbildung der Schiff'schen Base kommt. Eine andere Möglichkeit ist, dass zwar das α -Anomer der *N*-Acetylneuraminsäure gebunden wird, sich dann aber der Ring öffnet, so dass sich die Schiff'sche Base ausbilden kann (Baumann *et al.*, 1989).

Motivation

Gegenstand dieser Arbeit ist die Sialat-Pyruvat-Lyase aus *Clostridium perfringens*. Zum einen sollte das Enzym rekombinant exprimiert, gereinigt und charakterisiert werden, zum anderen sollte durch zielgerichtete Mutagenese versucht werden, Einblicke in die Funktion bestimmter Aminosäurereste des Enzyms zu bekommen.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Sequenz des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von *Clostridium perfringens* bereits bekannt (Traving *et al.*, 1997). Das Gen sollte in einen Expressionsvektor kloniert werden, um das Protein rekombinant herstellen zu können. Zum einen sollten größere Mengen der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* für eine Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse gereinigt werden, die von Herrn Dr. G. Taylor (St. Andrews, Großbritannien) durchgeführt werden. Bisher sind nur die Röntgenstrukturdaten der Sialat-Pyruvat-Lyase aus *E. coli* (Izard *et al.*, 1994; Lawrence *et al.*, 1997) veröffentlicht. Da jedoch gerade das native Enzym aus *C. perfringens* besonders gut charakterisiert ist, wäre es interessant, auch dessen Struktur zu bestimmen. Durch einen Vergleich der Röntgenstrukturen beider Enzyme könnte außerdem geprüft werden, ob sich die Strukturen möglicherweise unterscheiden, zumal *E. coli* ein Gram-negatives und *C. perfringens* ein Gram-positives Bakterium ist, und ob sich Unterschiede in den Eigenschaften der beiden Enzyme, z. B. in der Substratspezifität, auch in der Struktur widerspiegeln. Zum anderen sollten die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* und später auch einige Mutanten-Enzyme für NMR-Studien gereinigt werden, die von Herrn Dr. H.-C. Siebert (München) durchgeführt werden. Diese Untersuchungen können einerseits Einblicke in die Struktur des Enzyms unter nativen Bedingungen geben, andererseits erlauben sie aber auch, Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Substrat zu untersuchen, da das Protein bei den Untersuchungen in wässriger Lösung und nicht als Kristall vorliegt. Voraussetzung für die Interpretation der Daten ist allerdings eine genaue Charakterisierung des Enzyms. Die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* sollte aber auch charakterisiert werden, um ihre Eigenschaften mit denen des nativen Enzyms zu vergleichen. Natives (Uchida *et al.*, 1984) und rekombinantes (Aisaka *et al.*, 1991) Enzym aus *E. coli* unterscheiden sich nämlich etwas in ihren Eigenschaften (siehe auch Tab. 1). Darüber

hinaus stellt die Charakterisierung des rekombinanten Enzyms aber auch die Grundlage für die Interpretation der Daten von den Mutanten des Enzyms dar, die in dieser Arbeit hergestellt und charakterisiert werden sollten (s. u.). Es handelt sich bei diesen Mutanten-Enzymen ebenfalls um rekombinante Proteine. Durch den Vergleich der Eigenschaften der Mutanten-Enzyme mit den Eigenschaften des rekombinanten Wildtyp-Enzyms sollte sichergestellt werden, dass Unterschiede nicht durch die rekombinante Expression und unterschiedliche Reinigung bedingt sind, sondern durch die Mutation selbst. Grundlage für die Auswahl der Aminosäurereste, die mutiert werden sollten, war die Röntgenstruktur der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* (Abb. 2).

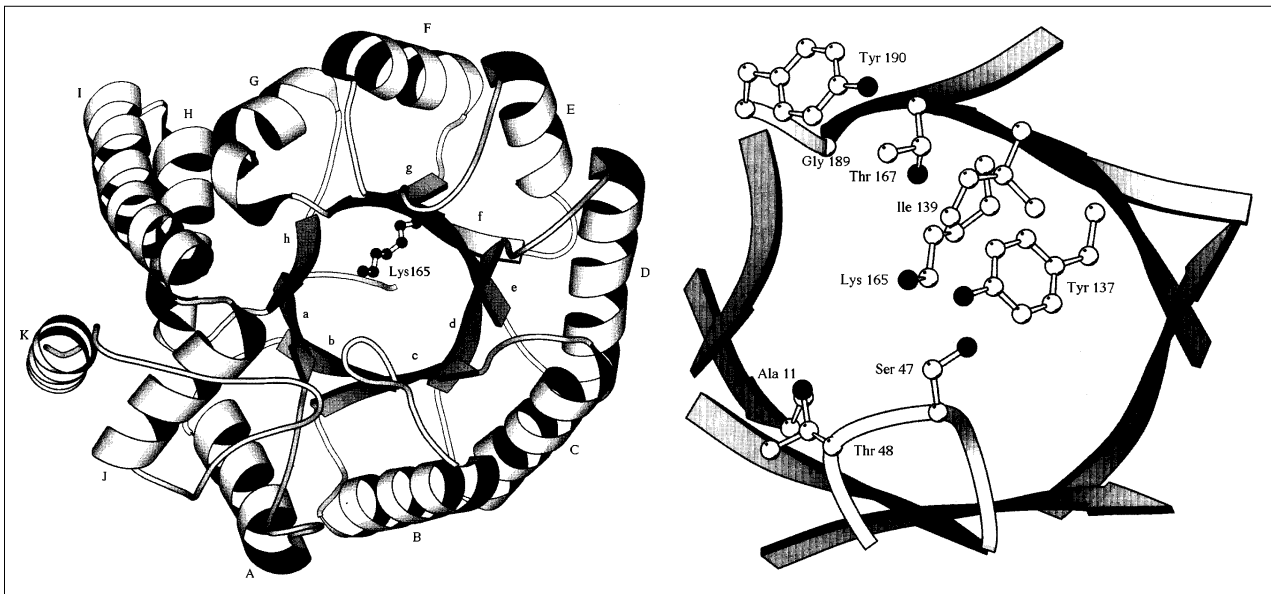


Abb. 2 Struktur der Sialat-Pyruvat-Lyase aus *E. coli* (nach Izard *et al.*, 1994). Die linke Abbildung zeigt die Struktur eines Monomers des Homotetramers, die rechte die Anordnung der Aminosäurereste im aktiven Zentrum.

Lawrence *et al.* (1997) konnten zeigen, dass Lysin 165 der Aminosäuresequenz von *E. coli* (Ohta *et al.*, 1985) eine Schiff'sche Base mit dem Substrat ausbildet. Die Funktion von Tyrosin 137 ist dagegen unklar. Die Autoren vermuten, dass es entweder bei der Stabilisierung des gebundenen Substrates und/oder bei der Stabilisierung der Seitenkette von Lysin 165 eine Rolle spielt oder an den Protonentransferprozessen während der Ausbildung der Schiff'schen Base und der Substratspaltung beteiligt ist. Die entsprechenden Aminosäurereste der clostridiellen Sialat-Pyruvat-Lyase, Lysin 161 und Tyrosin 133, konnten durch ein Alignment der bis dahin bekannten Proteinsequenzen der Sialat-Pyruvat-Lyasen von *E. coli* (Ohta *et al.*, 1985), *C. perfringens* (Traving *et al.*, 1997), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) und *Trichomonas vaginalis* (Meysick *et al.*, 1996) identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten sie durch zielgerichtete Mutagenese gegen verschiedene Aminosäuren ausgetauscht werden. Außerdem sollten Aspartat 187 und Glutamat 188 der clostridiellen Sialat-Pyruvat-Lyase ausgetauscht werden. Beide Reste sind ebenfalls in allen bekannten Sialat-Pyruvat-Lyasesequenzen konserviert. Die entsprechenden Aminosäurereste der Sialat-Pyruvat-Lyase aus *E. coli*, Aspartat 191 und

Glutamat 192, liegen im aktiven Zentrum des Enzyms und sind vermutlich an der Substratbindung beteiligt (Lawrence *et al.*, 1997). Durch die Charakterisierung der Mutanten soll die Funktion dieser vier Aminosäurereste im clostridiellen Enzym näher untersucht und so möglicherweise ein tieferer Einblick in den Reaktionsmechanismus der Sialat-Pyruvat-Lyase gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Substanz	Bezugsquelle
ABIPRISM™ BigDye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer Cetus, Norwalk (USA)
ABIPRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer Cetus, Norwalk (USA)
Agar	Fluka Chemie, Buchs (Schweiz)
Agarose	Gibco BRL, Gaithersburg (USA) und Eurogentec, Seraing (Belgien)
Ampicillin	Serva, Heidelberg und Boehringer Ingelheim, Heidelberg
APS	Sigma, St. Louis (USA)
Bio-Rad Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Bis-Tris	Biomol, Hamburg
Borsäure	Sigma, St. Louis (USA)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	Boehringer, Mannheim und NEB, Schwalbach
Chloramphenicol	Sigma, St. Louis (USA)
Chloroform	Riedel-de Haën, Seelze
DEAE NA-45-Papier	Schleicher und Schüll, Dassel
DMB (1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
DNA-Oligonukleotide	Eurogentec, Seraing (Belgien)
dNTPs	Boehringer, Mannheim und Eurogentec, Seraing (Belgien)
DTT	Boehringer, Mannheim
EDTA	Serva, Heidelberg
Enterokinase	Boehringer, Mannheim und Novagen, Madison (USA)
Essigsäure	Riedel-de Haën, Seelze
Ethanol (reinst)	Serva, Heidelberg und Applichem, Darmstadt

Substanz	Bezugsquelle
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll Typ 400	Serva, Heidelberg
α -D-Glucose	Serva, Heidelberg
Glycin	Biomol, Hamburg
Harnstoff	BASF, Ludwigshafen
Hefeextrakt	Fluka Chemie, Buchs (Schweiz) und Applichem, Darmstadt
Imidazol	Sigma, St. Louis (USA) und Merck, Darmstadt
IPTG	Applichem, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	Boehringer, Mannheim
λ -DNA	Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
Lysozym	Serva, Heidelberg
Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis (USA)
MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure)	Sigma, St. Louis (USA)
Mono S	Pharmacia, Freiburg
N-Acetylmannosamin (ManNAc)	Sigma, St. Louis (USA)
N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac)	Snow Brand, Tokio (Japan)
NADH	Boehringer, Mannheim
NAP-Säulen	Pharmacia, Freiburg
Natriumcarbonat, wasserfrei	Serva, Heidelberg
Natriumpyruvat	Boehringer, Mannheim
Ni-NTA Agarose	QIAGEN, Chatsworth (USA)
Phenol (Rotiphenol)	Roth, Karlsruhe
Poros HQ	PerSeptive Biosystems, Darmstadt
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Chatsworth (USA)
QIAquick Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Chatsworth (USA)
QIAquick Spin PCR Purification Kit	QIAGEN, Chatsworth (USA)
Restriktionsendonukleasen:	
<i>Bam</i> HI	Gibco BRL, Gaithersburg (USA) und NEB, Schwalbach
<i>Eco</i> RI	Boehringer, Mannheim

Substanz	Bezugsquelle
<i>Hind</i> III	Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
<i>Nde</i> I	NEB, Schwalbach
RNase, pankreatische	Boehringer, Mannheim
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Standards für Gelelektrophoresen:	
100 bp Leiter	MBI Fermentas, Wilna (Litauen) und Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
Smart Ladder	Eurogentec, Seraing (Belgien)
10 kDa Leiter	Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
Superose 12	Pharmacia, Freiburg
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison (USA) und Gibco BRL, Gaithersburg (USA)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Appligene, Heidelberg und Eurogentec, Seraing (Belgien)
TEMED	Sigma, St. Louis (USA)
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
Tetramethylammoniumhydroxid	Fluka Chemie, Buchs (Schweiz)
Thrombin	Novagen, Madison (USA) und Sigma, St. Louis (USA)
Tris	Biomol, Hamburg und ICN Biomedicals, Aurora (USA)
Trypton	Difco, Detroit (USA)
Tryptonwasser	Serva, Heidelberg
Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Madison (USA)
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Neu5,9Ac₂ und Neu4,5Ac₂ wurden von Herrn Marzog El Madani aus Rindersubmandibulardrüsen gereinigt. Die Reinheit von Neu5,9Ac₂ betrug 94 %, die von Neu4,5Ac₂ 75 %. Das für die fluorimetrische HPLC als Standard eingesetzte derivatisierte BSM (gereinigte Sialinsäuren von hydrolysiertem Rindersubmandibulardrüsenmucin) wurde von Herrn Dr. Guido Kohla zur Verfügung gestellt.

Die übrigen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

Plasmid	Größe	Eigenschaften	Bezugsquelle
pET14b	4671 bp	Amp ^r ; T7-Expressionsvektor	Novagen, Madison (USA)
pET19b	5717 bp	Amp ^r ; T7-Expressionsvektor	Novagen, Madison (USA)
pLysS	4886 bp	Cm ^r	Novagen, Madison (USA)

2.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen. Die Sequenzen aller in der PCR (2.4.10), Mutagenese (2.4.11) und Sequenzierung (2.4.8) eingesetzten Oligonukleotide sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2 Sequenzen der für PCR, Mutagenese und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide. In den für die zielgerichtete Mutagenese eingesetzten Oligonukleotiden sind die für die Mutagenese ausgetauschten Basen fett und kursiv markiert.

SPL-F	5' – CGT TAA GCA TAT GAA AGG TAT TTA TTC – 3'
SPL-R	5' – CGG GAT CCT TAG AAA TAT TTT TTA TTA ATT – 3'
T7-Terminatorprimer	5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3'
T7-Promotorprimer	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3'
CT2	5' – ACG AAG CAA AAG GAC AAG – 3'
CT2-R	5' – GAT GTT ACC AGC TAC AGT – 3'
CT3	5' – CTT GTC CTT TTG CTT CGT CC – 3'
CT4-R	5' – GCT CTA TTG ACA TAT TTA CTC C – 3'
CT5-R	5' – GAT TTG TCT TGC TCT AAC ACC G – 3'
pET19-F-Primer	5' – CAT ATA GAC GAC GAC GAC AAG C – 3'
SPL-K,R-F	5' – AGA TTC ACA GCA GCA GAC TTC TAC – 3'
SPL-K,R-R	5' – CTG CTG CTG TGA AT C TAA CAC CG – 3'
SPL-K,Q-F	5' – CAA TTC ACA GCA GCA GAC TTC TAC – 3'
SPL-K,Q-R	5' – CTG CTG CTG TGA ATT GAA CAC CG – 3'
SPL-K,A-F	5' – GCA TTC ACA GCA GCA GAC TTC TAC – 3'
SPL-K,A-R	5' – CTG CTG CTG TGA AT G CAA CAC CG – 3'
SPL-Y,F	5' – GAG AAA ATT ATA AGT TTA TTG TCA ACA G – 3'
SPL-Y,H	5' – GAG TGA ATT ATA AGT TTA TTG TCA ACA G – 3'
SPL-Y,W	5' – GAC CAA ATT ATA AGT TTA TTG TCA AC – 3'
SPL-Y,C	5' – GAG CAA ATT ATA AGT TTA TTG TCA ACA G – 3'

SPL-D,E-F	5' – GAG GAA ATG ATG TTA CCA GCT ACA G – 3'
SPL-D,E-R	5' – GGT AAC ATC ATT TCC TCA AAT CCA GC – 3'
SPL-D,N-F	5' – AAT GAA ATG ATG TTA CCA GCT ACA G – 3'
SPL-D,N-R	5' – GGT AAC ATC ATT TCA TTA AAT CCA GC – 3'
SPL-E,D-F	5' – GAT GAT ATG ATG TTA CCA GCT ACA G – 3'
SPL-E,D-R	5' – GGT AAC ATC ATA TCA TCA AAT CCA GC – 3'
SPL-E,Q-F	5' – GAT CAA ATG ATG TTA CCA GCT ACA G – 3'
SPL-E,Q-R	5' – GGT AAC ATC ATT TGA TCA AAT CCA GC – 3'
SPL-DE,AA-F	5' – GCC GCA ATG ATG TTA CCA GCT – 3'
SPL-DE,AA-R	5' – GGT AAC ATC ATT GCG GCA AAT CCA GC – 3'

Um die Hybridisierungstemperatur von Oligonukleotidprimern für die PCR (2.4.10) und die Mutagenese (2.4.11) zu bestimmen, wurde der Schmelzpunkt T_M nach folgender, von Suggs *et al.* (1981) beschriebenen Formel abgeschätzt:

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (\text{Summe der A} + \text{Summe der T}) + 4 \times (\text{Summe der G} + \text{Summe der C}).$$

Dabei wurden für die Berechnung jeweils nur die Nukleotide berücksichtigt, die komplementär zur Matrizen-DNA waren.

2.2.3 DNA-Längenstandard

Als DNA-Längenstandard zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten in der Agarosegelelektrophorese diente zum einen λ -DNA, die mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* hydrolysiert wurde. Zum anderen wurden verschiedene, käuflich zu erwerbende DNA-Standards verwendet.

2.3 Bakterien

2.3.1 Bakterienstämme

Clostridium perfringens A99

zur Verfügung gestellt von Dr. R. Hobrecht (Untersuchungsinstitut I der Bundeswehr, Kronshagen), isoliert aus einer menschlichen Gasbrandinfektion

Escherichia coli

BL21(DE3) $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) (Novagen, Madison, USA)

DH5 α $F^- \Phi80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 phoA hsdR17(r_K^- m_K^+) supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$ (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

Escherichia coli

- JM101 *supE thi-1 Δ(lac-proAB) (F' traD36 proAB lac^qZΔM15)* (Stratagene, La Jolla, USA)
- JM109 *e14⁻(mcrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) (F' traD36 proAB lac^qZΔM15)* (Stratagene, La Jolla, USA)
- XL1BlueMRF' *Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 end A1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]* (Stratagene, La Jolla, USA)

Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) wurde für die Expressionsversuche verwendet, die übrigen *E. coli*-Stämme für die Lagerung von Plasmiden.

2.3.2 Nährmedien

Luria-Broth (LB₀)

Trypton	10 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	5 g	(teilweise auch 10 g)
ad 1000 ml mit H ₂ O _{bidest.}		

pH 7,5 mit NaOH vor dem Autoklavieren eingestellt
(anstelle von Trypton und NaCl wurde teilweise 15 g Tryptonwasser eingewogen, was 10 g Trypton und 5 g NaCl entspricht)

LB₀-Agar

Dem Medium wurden vor dem Autoklavieren 1,8 % Agar zugefügt.

Antibiotika-Zusätze für LB-Medium und LB-Agar

Ampicillin	50,0 µg/ml (für die Expression 100,0 µg/ml)
Chloramphenicol	34,0 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml

Die Antibiotika wurden sterilfiltriert und dem LB₀-Medium nach dem Autoklavieren - bei Agar direkt vor dem Gießen, wenn dieser auf etwa 55-60 °C abgekühlt war - zugefügt.

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 %
Trypton	2,0 %
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM
Glucose	20,0 mM

Die Glucose wurde sterilfiltriert und dem erkalteten Medium erst nach dem Autoklavieren zugefügt.

2.3.3 Kulturbedingungen der Bakterienstämme

2.3.3.1 *E. coli* JM101, *E. coli* JM109 und *E. coli* DH5 α

Die Zellen von *E. coli* JM101 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), *E. coli* JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) und *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) wurden, solange sie kein Plasmid enthielten, auf LB₀-Medium kultiviert. Nach Transformation mit den verschiedenen Plasmiden wurden die Zellen auf LB-Medium mit Ampicillin kultiviert.

Für die Plasmidisolierung (2.4.7) wurden 4 ml LB-Medium mit Ampicillin mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

2.3.3.2 *E. coli* XL1BlueMRF'

Die Zellen von *E. coli* XL1BlueMRF' (Jerpseth *et al.*, 1992) wurden, solange sie kein Plasmid enthielten, auf LB-Medium mit Tetracyclin kultiviert. Nach Transformation mit den verschiedenen Plasmiden wurden die Zellen auf LB-Medium mit Tetracyclin und Ampicillin kultiviert.

Für die Plasmidisolierung (2.4.7) wurden 4 ml LB-Medium mit Tetracyclin und Ampicillin mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

2.3.3.3 *E. coli* BL21(DE3)

E. coli BL21(DE3) (Studier *et al.*, 1990) wächst ohne Plasmid auf LB₀-Medium, nach der Transformation mit den Plasmiden auf LB-Medium mit Ampicillin.

Für die Expression (2.5.6) wurden 20 ml LB-Medium mit Ampicillin mit einer Einzelkolonie von einer Transformantenplatte angeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden ca. 5 ml der Kultur in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 l frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 37 °C auf dem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 gezogen. Dann erfolgte die Induktion der Expression mit IPTG (2.5.6).

2.3.3.4 *E. coli* BL21(DE3) pLysS

E. coli BL21(DE3) pLysS (Moffatt und Studier, 1987) wurde auf LB-Medium mit Chloramphenicol kultiviert. Nach der Transformation mit den verschiedenen Plasmiden wurde dem Medium zusätzlich Ampicillin zugefügt.

Die Anzucht der transformierten Zellen für die Expression erfolgte entsprechend der von transformierten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, nur dass das Medium zusätzlich Chloramphenicol enthielt.

2.3.4 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen der *E. coli*-Stämme JM101, JM109, DH5 α , XL1BlueMRF', BL21(DE3) und BL21(DE3) pLysS erfolgte in Anlehnung an das Protokoll im Bacterial electro-transformation and pulse controller instruction manual (Bio-Rad, Hercules, USA).

1 l LB-Medium (bei *E. coli* BL21(DE3) pLysS mit Chloramphenicol) wurde 2 %ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,7 (die Zellen sollten sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden) inkubiert. Dann wurde die Kultur für 15-30 min auf Eis gelagert. Während der gesamten weiteren Behandlung der Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zellen nie über 0 °C erwärmt wurden. Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert (Beckman Zentrifuge J2-HS, Rotor JA10, 10 min, 6000 rpm, 0 °C) und der Kulturüberstand dekantiert. Die Zellen wurden auf Eis in 1 l eiskaltem sterilem H₂O_{bidest.} resuspendiert und dann abzentrifugiert (Beckman Zentrifuge J2-HS, Rotor JA10, 10 min, 6000 rpm, 0 °C). Dieser Vorgang wurde wiederholt. Dann wurden die Zellen auf Eis in 1 l eiskaltem sterilem Glycerin (10 %ig) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Abschliessend wurden die Zellen in 4 ml eiskaltem sterilem Glycerin (10 %ig) resuspendiert und in 50 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

2.3.5 Lagerung von Bakterien

Von allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämmen und hergestellten Bakterienklonen wurden Glycerinkulturen hergestellt und bei -80 °C gelagert. Dazu wurden 20 ml LB-Medium (ggf. mit Antibiotika) mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 1,0 inkubiert. Dann wurden von der Kultur dreimal 900 μ l mit je 100 μ l sterilem Glycerin in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und diese bei -80 °C eingefroren.

2.4 DNA-Techniken

2.4.1 Phenolisierung und Ethanolfällung von DNA

DNA-Lösungen wurden zur Beseitigung von Proteinen (z. B. nach Restriktionshydrolysen) nach Sambrook *et al.* (1989) mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

(25/24/1; v/v/v) versetzt, auf einem Schüttler gemischt und 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1; v/v) extrahiert und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde dann wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt, bevor die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 2,5-3 Volumen 96 %igem Ethanol gefällt und 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Dann wurde das DNA-Pellet in einem Vacuum-Concentrator (Bachhofer, Reutlingen) getrocknet und in TE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) oder H₂O_{bidest.} gelöst.

2.4.2 Restriktionshydrolyse

Für Restriktionshydrolysen (Sambrook *et al.*, 1989) wurden bei Plasmid-DNA 1-2 U Enzym/μg DNA, bei PCR-Produkten etwa 5 U Enzym/μg DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer bei 37 °C für 2-14 h. Die Hydrolyse der DNA wurde, soweit möglich, auf Agarosegelen (2.4.4) überprüft.

2.4.3 Phosphatase-Behandlung

Um die Religation von nur mit einem Restriktionsenzym hydrolysierten Plasmid-DNAs zu verhindern, wurden diese vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Sambrook *et al.*, 1989). Die Plasmid-DNA wurde mit etwa 0,5 U alkalischer Phosphatase/μg DNA in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer bei 37 °C für 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 1/40 Volumen 0,2 M EDTA pH 8,0 wurde die Reaktion gestoppt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 75 °C wurde die DNA durch Phenolisierung und Ethanol-fällung (2.4.1) gereinigt.

2.4.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen 0,7 und 1 %igen Agarosegelen. Dazu wurden 1 bzw. 1,5 g Agarose in 135 ml H₂O_{bidest.} durch Aufkochen gelöst. Nach Zugabe von 15 ml 10 x TBE (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) und 15 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde die Gellösung auf 60 °C abgekühlt und in eine Gießvorrichtung gegossen. Für analytische Gele wurde ein Kamm mit 14 Zähnen (max. 20 μl/Tasche), für präparative Gele ein Kamm mit 7 Zähnen (max. 50 μl/Tasche) verwendet. Mini-Agarosegele mit einem Volumen von 20 ml bzw. 50 ml wurden entsprechend hergestellt. Es wurde ein Kamm mit 7 bzw. 11 Zähnen (max. 10 μl/Tasche) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6 x Auftragspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen-cyanol, 30 % Ficoll Typ 400) versetzt und zusammen mit einem Standard (2.2.3) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (Gibco BRL, Gaithersburg, USA; Pharmacia, Freiburg) mit konstant 100 V bei Raumtemperatur in 1 x TBE (8,9 mM Tris, 8,9 mM Borsäure, 0,2 mM EDTA). Die Analyse der Gele erfolgte auf einem UV-Schirm (366 nm). Zur Dokumentation wurden die Gele auf dem

UV-Schirm abphotografiert (Polaroid CAMAG Reprostar-Kamera auf Polaroid 667 Film; Blende 5,6 oder 8 mit einem UV-Filter, 2-6 s Belichtungszeit).

2.4.4.1 Reinigung von DNA über Agarosegelelektrophorese

Die Reinigung von DNA-Fragmenten erfolgte über präparative Agarosegelelektrophorese und anschließende Papierelution der DNA-Banden aus dem Gel. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNAs auf einem 0,7 %igen präparativen Agarosegel wurde das Gel auf einem UV-Schirm direkt vor der Bande (in Laufrichtung) mit einem Skalpell eingeschnitten. Dann wurde entsprechend der Bandengröße ein Stück DEAE NA-45-Papier, das zuvor für 10 min in einer 10 mM EDTA-Lösung pH 7,6 und dann für 5 min in 0,5 M NaOH eingeweicht und anschließend nach mehrmaligem Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ bei 4 °C in $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ gelagert wurde, eingeschoben. Das Gel wurde zurück in die Elektrophoresekammer gelegt und die Gelelektrophorese fortgesetzt, bis die DNA-Bande nicht mehr im Gel, sondern im Papier sichtbar war (Kontrolle unter UV-Licht). Dann wurde die Membran entnommen und unter UV-Licht wurden die fluoreszierenden Bandenbereiche ausgeschnitten. Diese wurden dann in kleine Streifen geschnitten, die in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Um Schädigungen der DNA durch die UV-Strahlung zu minimieren, wurde bei allen Schritten darauf geachtet, die Zeit, die die DNA der UV-Strahlung ausgesetzt ist, möglichst kurz zu halten. Es wurden nun 500 µl Hochsalzlösung (1 M NaCl, 0,1 M EDTA, 20 mM Tris, pH 8,0) zupipettiert. Nach 30-60 minütiger Inkubation bei 70 °C unter leichtem Schütteln wurde die Lösung in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, durch 30 minütiges Zentrifugieren sedimentiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Dann wurde das DNA-Pellet in einem Vacuum-Concentrator (Bachhofer, Reutlingen) getrocknet und in 10 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) oder $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ gelöst. Alternativ zur Papierelution wurde die DNA-Bande auch mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach der Anleitung des Herstellers direkt aus dem Gel eluiert.

2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al.*, 1989) erfolgte meist in einem Volumen von 20 µl. Der Ligationsansatz enthielt neben den zu ligierenden DNA-Fragmenten 1 U T4-DNA-Ligase und 2 µl 10 x Ligasepuffer. Der Ansatz wurde bei 16 °C mindestens 3 h und längstens über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde er für die Transformation zunächst mit Ethanol gefällt (2.4.1) und die getrocknete DNA in 10 µl $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ resuspendiert.

2.4.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Fragmenten für Ligationen wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.4.4) bestimmt. Dazu wurde die DNA unbekannter Konzentration neben DNA

bekannter Konzentration ähnlicher Größe aufgetragen. Die Konzentration wurde durch visuellen Vergleich der Bandenstärke abgeschätzt.

Die Konzentration von Plasmid-DNA für die Sequenzierung, von genomischer DNA und von Oligonukleotiden wurde photometrisch (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Hitachi, Tokio, Japan) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Es gilt folgende Beziehung: Eine Absorption von 1,0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Doppelstrang-DNA) bzw. 37 µg/ml (Einzelstrang-DNA) (Sambrook *et al.*, 1989). Durch zusätzliche Messung der Absorption bei 230 nm und 280 nm wurde der Reinheitsgrad der DNA bestimmt. Eine DNA-Lösung galt als rein, wenn folgende Beziehung erfüllt war (Marmur, 1961):

$$A_{260 \text{ nm}} : A_{230 \text{ nm}} : A_{280 \text{ nm}} = 1,0 \geq 0,45 \geq 0,515$$

Bei 260 nm absorbieren vor allem Nukleinsäuren, während bei 230 nm auch eine Absorption durch Polysaccharide erfolgt. Bei 280 nm absorbieren Proteine, die aber auch bei 260 nm und 230 nm absorbieren.

2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte modifiziert nach der Methode von Birnboim und Doly (1979). Von einer Übernachtskultur wurden 1,5-3 ml in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (1 min; 4 °C). Das Zellpellet wurde in 100 µl eiskalter GTE-Lösung (50 mM Glucose, 25 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0; z. T. mit 1 mg/ml Lysozym versetzt) resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 200 µl frisch angesetzte NaOH/SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % SDS) zugefügt, gemischt und die Ansätze für 5 min in ein Eisbad gestellt. Nach Zugabe von 150 µl eiskalter 5 M Kaliumacetat-Lösung pH 5-5,2 wurden die Ansätze kurz auf einem Schüttler gemischt und erneut 5 min auf Eis inkubiert bevor sie abzentrifugiert (5 min; 4 °C) und die Überstände in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurden. Nach Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1; v/v/v) wurden die Ansätze kurz auf einem Schüttler gemischt und zentrifugiert (5 min; 4 °C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden mit zwei Volumen 96 %igem Ethanol (Raumtemperatur) und durch anschließende Zentrifugation (15 min; 4 °C) gefällt. Der Niederschlag wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol (Raumtemperatur) gewaschen und in einem Vacuum-Concentrator (Bachhofer, Reutlingen) getrocknet. Der trockene Niederschlag wurde in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) mit pankreatischer RNase (10 µg/ml) resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

Alternativ wurde Plasmid-DNA auch mit dem QIAquick Spin Miniprep Kit oder dem Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System nach Anleitung der Hersteller isoliert.

2.4.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch Cycle-Sequenzierung (Innis *et al.*, 1988; Murray, 1989). Dabei wurden wie bei der Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977)

die Kettenabbrüche durch den Einbau von Didesoxynukleotiden erzeugt, jedoch wurden analog zur PCR-Technik zyklische Wiederholungen von DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und eigentlicher Sequenzierreaktion durchgeführt. Durch die Verwendung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden war es möglich, die vier Sequenzierreaktionen in einem Ansatz durchzuführen. Die fluoreszenzmarkierten Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABIPRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit oder mit dem ABIPRISM™ BigDye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll. Die Analyse der Sequenzierungsprodukte erfolgte auf dem ABIPRISM™ 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA).

2.4.9 Transformation

Es wurden sowohl Ligationsansätze als auch präparierte Plasmid-DNAs in verschiedene *E. coli* Stämme transformiert. Die DNA wurde zunächst zum Entsalzen mit Ethanol gefällt (2.4.1) und in H₂O_{bidest.} gelöst. Die Transformation der elektrokompenten *E. coli* Zellen (2.3.4) erfolgte mittels Elektroporation im Gene Pulser® Transfection Apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA) nach Anleitung des Herstellers bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF. Direkt nach der Elektroporation wurde 1 ml SOC-Medium (2.3.2) zu den Zellen gegeben und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert, um den Zellen zu ermöglichen, die DNA aufzunehmen und sich zu regenerieren. Dann wurden 100 µl jedes Transformationsansatzes auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988) ist eine Methode, um DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Sie wurde in dieser Arbeit für die Amplifikation des Sialat-Pyruvat-Lyasegens aus *C. perfringens* eingesetzt. Dazu wurden zunächst von der Sequenz des Sialat-Pyruvat-Lyasegens (Traving *et al.*, 1997) Oligonukleotid-Primer abgeleitet. Diese Oligonukleotid-Primer, SPL-F und SPL R (Tab. 2), wurden so konstruiert, dass sie neben den Sequenzen, die komplementär zu den Enden des Sialat-Pyruvat-Lyasegens sind, am 5'-Ende noch jeweils eine nicht-komplementäre Sequenz besitzen, die so in die PCR-Produkte an den Enden je eine Restriktionsschnittstelle (für *NdeI* bzw. *BamHI*) einführt, über die dann die Klonierung in die Expressionsvektoren erfolgte (2.4.12).

Für die PCR wurde ein 50 µl Reaktionsansatz bestehend aus 0,5 µg chromosomaler DNA von *Clostridium perfringens*, je 25 pmol der Oligonukleotid-Primer SPL-F und SPL-R, 40 nmol dNTPs, 2 mM MgCl₂ und 5 µl 10 x Reaktionspuffer hergestellt und mit 30 µl Öl überschichtet. Die PCR wurde im Landgraf Thermocycler (Landgraf, Braunschweig) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach einem initialen Denaturierungsschritt von

95 °C für 3 min wurde dem Reaktionsansatz 1 U *Taq*-DNA-Polymerase zugefügt. Es folgten 30 PCR-Zyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 40 s), Primerhybridisierung (40 °C, 1 min) und DNA-Elongation (72 °C, 3 min). Anschließend wurde das PCR-Produkt durch Agarosegelelektrophorese (2.4.4) analysiert.

2.4.11 Mutagenese

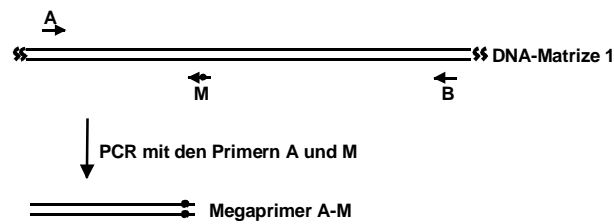
Die zielgerichtete Mutagenese des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von *Clostridium perfringens* erfolgte zum einen mittels Megaprimer-PCR (Mutanten in Tyrosin 133), zum anderen mittels sequenzieller PCR (alle übrigen Mutanten).

2.4.11.1 Megaprimer-PCR

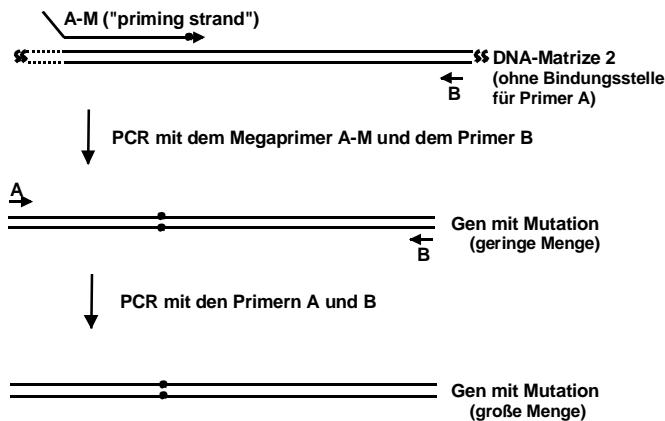
In der Megaprimer-PCR (Kammann *et al.*, 1989) wurde in einem ersten Schritt eine PCR mit dem vektorseitigen T7-Promotorprimer und einem internen Primer (Tab. 2), der die Mutation trägt, durchgeführt. Als DNA-Matrize diente pSPL.19 (2.4.12). Das PCR-Produkt diente in einer zweiten PCR als sogenannter Megaprimer, so dass mit dem Primer SPL-R (2.4.10) zusammen das gesamte Gen amplifiziert werden konnte, das jedoch die über den Megaprimer eingeführte Mutation trägt. Da die Ausbeute bei dieser Methode sehr gering ist, wurde sie nach Baretino *et al.* (1994) modifiziert. Dazu wurden in der zweiten PCR pSPL.14 (2.4.12) statt pSPL.19 als DNA-Matrize und zusätzlich der pET19-F-Primer eingesetzt, der spezifisch an die Sequenz von pSPL.19 zwischen T7-Promotorprimer und Start des Sialat-Pyruvat-Lyasegens bindet und somit an die komplementäre Sequenz des Megaprimer, jedoch nicht an pSPL.14. So konnten in der zweiten PCR die kleinen Mengen an mutiertem Sialat-Pyruvat-Lyasegen, die mittels Megaprimer und SPL-R gebildet wurden, gleichzeitig mittels des pET19-F-Primers und des Primers SPL-R spezifisch hochamplifiziert werden. Zum besseren Verständnis ist das Prinzip der Megaprimer-PCR in Abb. 3 noch einmal schematisch dargestellt.

Megaprimer-PCR

PCR I

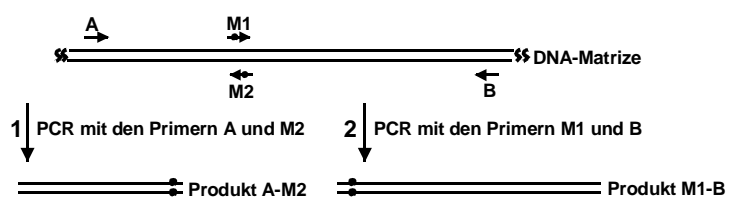


PCR II



Sequentielle PCR

PCR I : 2 getrennte Ansätze (1 und 2)



PCR II

mit den Produkten A-M2 und M1-B sowie den Primern A und B, ohne weitere DNA-Matrize

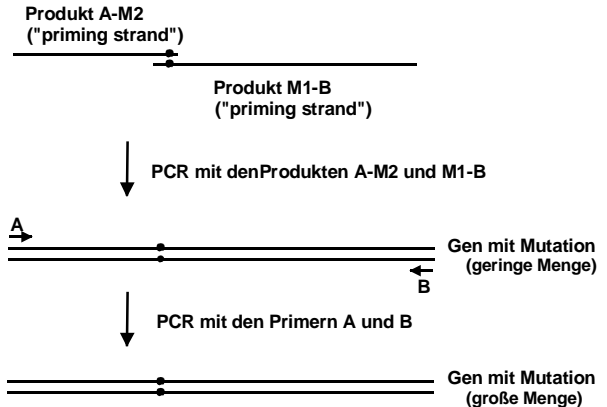


Abb. 3 Prinzip der Mutagenese mittels Megaprimer-PCR (2.4.11.1) und sequentieller PCR (2.4.11.2). Die Oligonukleotid-Primer A und B binden an den Enden des Gens bzw. an die das Gen flankierende Vektorsequenz. Die Mutagenese-Primer M bzw. M1 und M2 tragen die gewünschte Mutation (●).

In der ersten PCR enthielt der 50 µl-Reaktionsansatz 0,7 ng pSPL.19, 25 pmol T7-Promotorprimer, 25 pmol Mutageneseprimer (SPL-Y,F, SPL-Y,H, SPL-Y,W bzw. SPL-Y,C; Tab. 2), 40 nmol dNTPs, 2 mM MgCl₂ und 5 µl 10 x Reaktionspuffer. Die PCR wurde im Gene Amp PCR System 2400 oder Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 95 °C für 5 min wurde dem Reaktionsansatz 1 U *Taq*-DNA-Polymerase zugefügt. Es folgten 25 PCR-Zyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 1 min), Primerhybridisierung (45 °C oder 50 °C, 1 min) und DNA-Elongation (72 °C, 1 min). Das PCR-Produkt wurde über Agarosegelelektrophorese gereinigt (2.4.4.1) und dann in der zweiten PCR als „Megaprimer“ eingesetzt. Der Reaktionsansatz dieser PCR bestand aus 0,9 ng pSPL.14, 5 µl des gereinigten Produktes aus der ersten PCR („Megaprimer“), 25 pmol Primer SPL-R, 25 pmol pET19-F-Primer, 40 nmol dNTPs, 2 mM MgCl₂ und 5 µl 10 x Reaktionspuffer. Die PCR wurde im Gene Amp PCR System 2400 oder Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 95 °C für 5 min wurde dem Reaktionsansatz 1 U *Taq*-DNA-Polymerase zugefügt. Es folgten zunächst 10 PCR-Zyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 30 s), Primerhybridisierung (60 °C, 1 min) und DNA-Elongation (72 °C, 90 s) mit einem „touch down“ von 1 °C pro Zyklus in der Primerhybridi-

sierungstemperatur; dann schlossen sich 20 weitere Zyklen bei einer konstanten Primerhybridisierungstemperatur von 50 °C an. Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit gereinigt.

2.4.11.2 Sequentielle PCR

Bei der sequentiellen PCR (Cormack, 1997) benötigt man im Unterschied zur Megaprimer-PCR zwei Primer, die die Mutation tragen (einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer) und sich in ihrer Sequenz mindestens etwa 10 Basen überschneiden. In einer ersten PCR wird in zwei getrennten Ansätzen zunächst das Gen vom Anfang bis zur Mutation und von der Mutation bis zum Ende amplifiziert. In einer zweiten PCR werden die beiden Produkte aus der ersten PCR vereinigt, hybridisieren im überlappenden Bereich und werden durch die *Taq*-DNA-Polymerase zu den Enden hin verlängert. Mittels der flankierenden Primer, die am Anfang bzw. Ende des Gens binden, wird das so entstandene mutierte Gen amplifiziert. Auch das Prinzip der sequentiellen PCR ist zum besseren Verständnis in Abb. 3 noch einmal schematisch dargestellt.

Für die erste PCR wurden zwei getrennte Reaktionsansätze (50 µl) hergestellt. Sie enthielten 0,9 ng pSPL.14 (2.4.12), 25 pmol SPL-F (wenn ein reverser Mutageneseprimer (SPL-K,R-R, SPL-K,Q-R, SPL-K,A-R, SPL-D,E-R, SPL-D,N-R, SPL-E,D-R, SPL-E,Q-R, SPL-DE,AA-R; Tab. 2) benutzt wurde) bzw. SPL-R (wenn ein „forward“ Mutageneseprimer (SPL-K,R-F, SPL-K,Q-F, SPL-K,A-F, SPL-D,E-F, SPL-D,N-F, SPL-E,D-F, SPL-E,Q-F, SPL-DE,AA-F; Tab. 2) benutzt wurde), 25 pmol Mutageneseprimer, 40 nmol dNTPs, 2 mM MgCl₂, 5 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (zugegeben nach einem initialen Denaturierungsschritt von 95 °C für 5 min). Das Protokoll für die PCR entspricht dem Protokoll für die erste Megaprimer-PCR (2.4.11.1). Die Produkte beider PCR-Reaktionen wurden über Agarosegelelektrophorese gereinigt (2.4.4.1). Für die zweite PCR wurde ein 50 µl-Reaktionsansatz bestehend aus 1 µl von jedem der beiden gereinigten Produkte der ersten PCR, 25 pmol SPL-F, 25 pmol SPL-R, 40 nmol dNTPs, 2 mM MgCl₂, 5 µl 10 x Reaktionspuffer und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (zugegeben nach einem initialen Denaturierungsschritt von 95 °C für 5 min) hergestellt. Das Protokoll für die PCR entspricht dem Protokoll für die zweite Megaprimer-PCR (2.4.11.1). Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit gereinigt.

2.4.12 Klonierung der Sialat-Pyruvat-Lyasegene

Das Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *Clostridium perfringens* A99 sollte in die Expressionsvektoren pET14b und pET19b kloniert werden, um das Protein rekombinant in *E. coli* herzustellen. Dafür wurde das Sialat-Pyruvat-Lyasegen zunächst aus genomischer DNA von *C. perfringens* amplifiziert (2.4.10). Das gebildete PCR-Produkt von 885 bp wurde gereinigt (2.4.4.1). Für die Klonierung in die Expressionsvektoren pET14b und pET19b wurden das gereinigte PCR-Produkt und die Vektor-DNAs mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Bam*HI hydrolysiert (2.4.2) und erneut über Agarosegelelektrophorese gereinigt (2.4.4.1). Nach einer Phosphatase-Behandlung der Vektor-DNAs (2.4.3) wurde das PCR-Produkt

mit den Vektor-DNAs ligiert (2.4.5). Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* JM101 transformiert (2.4.9). Von je sechs Transformanten wurde Plasmid-DNA präpariert (2.4.7). Durch eine Restriktionshydrolyse mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Bam*HI wurde überprüft, ob die präparierten Plasmide ein Insert enthielten. In diesen wurde dann der Einbau und die Sequenz des Sialat-Pyruvat-Lyasegens durch Sequenzierung (2.4.8) mit den Oligonukleotid-Primern T7-Promotorprimer, CT2, CT3, T7-Terminatorprimer, CT5R, CT4R und CT2R (Tab. 2) überprüft. Die Plasmide wurden als pSPL.14 (Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens* in pET14b) und pSPL.19 (Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens* in pET19b) bezeichnet.

Die Klonierung der mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasegene (2.4.11) in pET14b erfolgte wie für das Wildtyp-Gen beschrieben. Die Ligationsansätze wurden jedoch nicht in *E. coli* JM101, sondern in *E. coli* JM109, DH5 α oder XL1BlueMRF' transformiert. Die Plasmide wurden, je nach eingeführter Mutation, mit mSPL-K,R.14, mSPL-K,Q.14, mSPL-K,A.14, mSPL-Y,F.14, mSPL-Y,H.14, mSPL-Y,W.14, mSPL-Y,C.14, mSPL-D,E.14, mSPL-D,N.14, mSPL-E,D.14, mSPL-E,Q.14 bzw. mSPL-DE,AA.14 bezeichnet.

2.5 Proteinbiochemische Methoden und Sialinsäureanalytik

2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay nach Bradford (1976). 200 μ l Bio-Rad Protein Assay-Farbstoffkonzentrat wurden mit 800 μ l Wasser und 10 μ l Probe vermischt. War das Probenvolumen größer, wurde die Wassermenge entsprechend reduziert. Die Proben wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 595 nm. Als Standard wurde in dem Test BSA in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

2.5.2 Bestimmung der Enzymaktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase (Morgan-Elson-Assay)

Die Aktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase wurde im Morgan-Elson-Assay (Reissig *et al.*, 1955) modifiziert nach Brunetti *et al.* (1962) bestimmt. Dabei wird das in der Katalyse freigesetzte ManNAc colorimetrisch quantifiziert. Zunächst wird vom ManNAc unter alkalischen Bedingungen bei Hitze in Gegenwart von Borat die Acetyl-Gruppe abgespalten. Das entstandene Zwischenprodukt reagiert mit pDMAB zu einem Farbstoff.

20 μ l der zu testenden Proteinlösung wurden mit 20 μ l 250 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,2 und 5 μ l 0,1 M Neu5Ac versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Substrat und Ansätze ohne Enzym/Proteinlösung. Durch fünfminütiges Erhitzen auf 96 °C wurde das Enzym inaktiviert. Die Proben wurden dann auf Eis gestellt. Dann wurden 50 μ l H₂O_{bidest.} und 5 μ l 0,8 M Kaliumtetraboratpuffer pH 9,14 zupipettiert, kurz auf einem Schüttler gemischt, abzentrifugiert und 12 min bei 96 °C inkubiert. Zu den auf Eis gestellten Proben wurde dann 1 ml pDMAB-Lösung (direkt vor Gebrauch mit Eisessig verdünnt aus der 10 x Stammlösung: 10 g pDMAB, 12,5 ml 37 %ige Salz-

säure, 87,5 ml Eisessig) zugefügt und gemischt. Dann wurden die Proben für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 585 nm in einem Hitachi U-2000 Spectrophotometer (Hitachi, Tokio, Japan). Als Standard diente ManNAc in verschiedenen Konzentrationen, das wie die Proben behandelt wurde.

2.5.3 Sialinsäurebestimmung nach der Orcinol-Fe³⁺-HCl-Methode

Die Bestimmung der Konzentration von Sialinsäurelösungen erfolgte colorimetrisch mittels der Orcinol-Fe³⁺-HCl-Methode (Böhm *et al.*, 1954; Reuter und Schauer, 1994a).

Für die Standardkurve wurden jeweils in dreifacher Ausführung 0 µg, 2 µg, 4 µg, 8 µg bzw. 10 µg Neu5Ac aus einer Stammlösung pipettiert und mit H₂O_{bidest.} auf 100 µl aufgefüllt. Von der Probe (die ggf. zuvor in H₂O_{bidest.} verdünnt wurde) wurden ebenfalls in dreifacher Ausführung je 1 µl, 3 µl und 5 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit H₂O_{bidest.} auf 100 µl aufgefüllt. Dann wurde in jedes Reaktionsgefäß 100 µl Orcinol-Reagenz (81,4 ml 37 %ige HCl, 0,2 g Orcinol, 2 ml 1 %ige, wäßrige FeCl₃-Lösung, *ad* 100 ml mit H₂O_{bidest.}) zugefügt. Die Ansätze wurden auf einem Schüttler gemischt, für 15 min bei 96 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe von je 700 µl Amylalkohol wurden die Ansätze sehr intensiv auf einem Schüttler gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Ansätze 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Die Auswertung erfolgte, indem die Extinktion der oberen, organischen Phase, die den gebildeten blau-violetten Farbstoff enthielt, bei 572 nm gegen Amylalkohol gemessen wurde.

2.5.4 Polyacrylamidgelelektrophorese

2.5.4.1 SDS-Polyacrylamidgele

Proteine wurden in 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden folgendermaßen gegossen: Zunächst wurde die Trenngellösung (3 ml Rotiphorese Gel 30, 1,95 ml 4 x Tris/SDS pH 8,8 (1,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 8,8 eingestellt mit HCl), 2,4 ml H₂O_{bidest.}, 25 µl 10 %iges APS, 3,5 µl TEMED) mit Hilfe einer Pipette zwischen zwei vertikal angeordnete Glasplatten, die unten und an den Seiten mit einem Gummi abgedichtet waren, bis etwa 2 cm unter den oberen Rand gegossen. Dann wurde das Trenngel mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das Butanol entfernt, die Geloberkante mit H₂O_{bidest.} gespült und dann vorsichtig das Wasser mit Filterpapier entfernt. Das Sammelgel (375 µl Rotiphorese Gel 30, 650 µl 4 x Tris/SDS pH 6,8 (0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8 eingestellt mit HCl), 1,175 ml H₂O_{bidest.}, 7,5 µl 10 %iges APS, 2,5 µl TEMED) wurde nun direkt auf das Trenngel gegossen. Es wurde dann ein Kamm mit 10 Taschen (max. 25 µl/Tasche) oben eingesteckt bis das Sammelgel vollständig auspolymerisiert war.

Die zu analysierenden Proben wurden mit 5 x Auftragspuffer (5 %SDS, 250 mM DTT, 250 mM Tris/HCl pH 6,8, 50 % Glycerin, 0,5 % Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und sofort aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur in 1 x Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 38,4 mM Glycin, 0,1 % SDS) zunächst bei konstant 15 mA (bei zwei parallel-laufenden Gelen 30 mA), als die Proben vollständig ins Sammelgel eingelaufen waren weiter mit konstant 30 mA (bzw. 60 mA) in Minigel-Twin-Elektrophoresegeräten (Biometra, Göttingen).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Blue modifiziert nach Meyer und Lamberts (1965) gefärbt: Dazu wurde es direkt nach der Elektrophorese in 10 %iger Essigsäure 30 min leicht geschüttelt und dann 1 h bis über Nacht mit der Färbelösung (10 % Essigsäure, 30 % Ethanol, 0,15 % Coomassie Blue R250) gefärbt. Dann wurde das Gel mit Entfärber (10 % Essigsäure, 30 % Ethanol) solange entfärbt, bis der Hintergrund farblos wurde. Die Proteinbanden blieben deutlich blau gefärbt.

Teilweise erfolgte auch direkt oder nach einer vorherigen Coomassie Blue-Färbung eine Silberfärbung (Heukeshoven und Dernick, 1988) der SDS-Gele: Das Gel wurde zunächst in Fixierlösung (10 % Essigsäure, 30 % Ethanol) 30 min bis über Nacht leicht geschüttelt. Dabei wurde zwischendurch einmal die Fixierlösung ausgewechselt. Anschließend wurde das Gel für 0,5 bis 2 h in Färbelösung I (30 % Ethanol, 0,4 M NaAc, 0,2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,5 % Glutaraldehyd, pH 6,0) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 bis 30 min mit $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ erfolgte eine Inkubation für 15 min bis zu 1 h in Färbelösung II (0,1 % AgNO_3 , 0,02 % Formaldehyd). Nach zweimaligem kurzem Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ wurde Entwickler (2,5 % Na_2CO_3 , 0,01 % Formaldehyd) zugegeben. Es wurde auf Sicht entwickelt. Wenn sich der Entwickler braun färbte, wurde er ausgewechselt. Durch Zugabe von Stopplösung (50 mM EDTA) wurde die Farbentwicklung abgestoppt. Nach ca. 15 min wurde das Gel in $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ gewaschen.

Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte durch Einscannen.

2.5.4.2 Native Polyacrylamidgele

Proteine wurden auch unter nativen, also nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dazu wurden die gleichen Puffer und Lösungen verwendet wie für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.5.4.1), nur dass diese kein SDS enthielten und der Auftragspuffer auch kein DTT. Native Polyacrylamidgele wurden analog den SDS-Polyacrylamidgelen hergestellt und behandelt, die Proben wurden allerdings vor dem Auftrag nicht erhitzt.

2.5.5 Dialyse

Die für die Dialyse verwendeten Dialyseschläuche (Visking Dialysis tubing 20/32, Ø 16 mm; Serva, Heidelberg) wurden vor Gebrauch zunächst 10 min in 1 mM EDTA pH 8,0 gekocht, kurz in $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ gespült, dann 10 min in 2 %iger Na_2CO_3 -Lösung gekocht, wiederum kurz in $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ gespült und anschließend 10 min in $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ gekocht. Sie wurden dann entweder sofort verwendet oder in $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$ mit 0,02 % Azid bei 4 °C gelagert.

Nachdem der Dialyseschlauch am unteren Ende durch einen Knoten verschlossen worden war, wurde die zu dialysierende Proteinlösung in den Dialyseschlauch überführt. Dann wurde der Dialyseschlauch etwa 1 cm über dem Flüssigkeitsspiegel durch einen Knoten auch nach oben abgedichtet. Der Dialyseschlauch wurde in ein Gefäß mit dem Puffer, gegen den die Proteinlösung dialysiert werden sollte, gehängt, so dass der Pufferpiegel oberhalb des oberen Knotens war – die Proteinlösung im Dialyseschlauch also vollständig von Flüssigkeit umgeben war. Das Puffervolumen betrug etwa das 200-1000 fache der zu dialysierenden Proteinlösung. Die Dialyse erfolgt bei 4 °C über Nacht unter schwachem Rühren. Dann wurde der Puffer gegen frischen ausgetauscht und die Dialyse für 8-24 h fortgesetzt.

Die Umpufferung von Proteinlösungen erfolgte auch über NAP-Säulen, nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll.

2.5.6 Expression des Sialat-Pyruvat-Lyasegens aus *Clostridium perfringens* A99 in *E. coli*

Die Expression des Sialat-Pyruvat-Lyasegens aus *Clostridium perfringens* erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) pLysS. *E. coli* BL21(DE3) besitzt, unter Kontrolle des lacUV5-Promotors, das Gen für die T7-RNA-Polymerase. In den Expressionsvektoren pET14b und pET19b stehen klonierte Gene unter der Kontrolle der T7-Transkription (Studier und Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990). Durch Zugabe von IPTG kann die Expression der klonierten Gene induziert werden. In beiden Vektoren wird das klonierte Gen als Fusionsprotein mit einem sogenannten His-Tag exprimiert.

Die in der Sequenzierung überprüften Plasmide pSPL.14 und pSPL.19 (2.4.12) wurden in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformiert. Je ein Transformant wurde nach zweimaligem Reinigungsausstrich für die Expression eingesetzt. Als Negativkontrollen für die Expression wurden Transformanten von *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) pLysS verwendet, die die Plasmide pET14b bzw. pET19b (ohne Insert) enthielten.

Um die optimalen Bedingungen für die Expression auszutesten, wurden je 20 ml LB-Medium mit Ampicillin bzw. mit Ampicillin und Chloramphenicol (2.3.3.3; 2.3.3.4) mit einer Einzelkolonie von einer Transformantenplatte angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6, 0,7 bzw. 0,8 inkubiert. Dann wurde als Kontrolle (nicht induzierte Zellen) 1 ml der Kultur abgenommen, abzentrifugiert und bei -20 °C eingefroren. Die restliche Kultur wurde mit 1 mM IPTG induziert und bei 37 °C weiterinkubiert. Nach 1 h, 2 h und 3 h wurde wie vor der Induktion je 1 ml Kultur abgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet bei -20 °C tiefgefroren. Die Zellpellets wurden in 100 µl Zellaufschlußpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8,0) lysiert und erneut zentrifugiert. Die Überstände, die neben löslichen Proteinen auch Proteine enthielten, die aus Zelleinschlußkörpern und Membranen freigesetzt wurden, wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen (2.5.4.1) analysiert.

Die Expression des Sialat-Pyruvat-Lyasegens im präparativen Maßstab erfolgte ausschließlich in *E. coli* BL21(DE3). Dafür wurden die Zellen wie unter 2.3.3.3 beschrieben in 1 l LB-Medium mit Ampicillin angezogen. Nach der Induktion mit 1 mM IPTG für 3 h wurden die Zellen abzentrifugiert (Beckman Zentrifuge J2-HS, Rotor JA10, 8.000 rpm, 10 min, 4 °C), die Zellpellets in insgesamt 15 ml Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,8) resuspendiert und bei –20 °C über Nacht eingefroren. Die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase wird im folgenden mit SPL14 bzw. SPL19 bezeichnet, je nachdem, ob sie der Expression von *E. coli* BL21(DE3) pSPL.14 oder pSPL.19 entstammt.

Die Expression der mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasegene in *E. coli* BL21(DE3) erfolgte entsprechend der Expression des Wildtypgens. Die mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasen wurden mit Y133F, Y133H, Y133W, Y133C, K161R, K161Q, K161A, D187E, D187N, E188D, E188Q, DE187,188AA (Aminosäure, die ausgetauscht wurde – Position der ausgetauschten Aminosäure – Aminosäure, gegen die ausgetauscht wurde) bezeichnet.

2.5.7 Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase

Die Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen aus *Clostridium perfringens* (SPL14 und SPL19; 2.5.6) wurde zunächst für den Wildtyp optimiert. Die Reinigung der Mutanten erfolgte nach den für SPL14 optimierten Bedingungen.

2.5.7.1 Zellaufschluß

Die über Nacht bei –20 °C in Puffer tiefgefrorenen Zellen (2.5.6) wurden in ca. 4 °C kaltem Wasser schonend aufgetaut. Das Zelllysat wurde dann durch je zweimaliges Passieren einer stumpfen Kanüle mit 0,84 mm, 0,60 mm und 0,41 mm Durchmesser (Standard Luer Nadeln aus Edelstahl; Hamilton, Darmstadt) homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (Beckman L-7 Ultrazentrifuge, Rotor Ti 70, 40.000 rpm, 1 h, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthält, wurde direkt nach der Zentrifugation auf die Ni-NTA-Agarose-Säule (2.5.7.2) aufgetragen.

2.5.7.2 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie

Da das Sialat-Pyruvat-Lyasegen als Fusionsprotein mit einem His-Tag exprimiert wurde, der im Fall von SPL14 aus 6 Histidinresten, im Fall von SPL19 aus 9 Histidinresten besteht, wurde als erster Schritt der Reinigung eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose durchgeführt (Hochuli *et al.*, 1987; Janknecht *et al.*, 1991). Hierzu wurde eine FPLC-Anlage der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet.

Der Überstand aus 2.5.7.1 wurde mit einer Flußrate von ca. 8 ml/h auf eine 2 ml-Ni-NTA-Agarosesäule aufgetragen, die zuvor mit drei Säulenvolumen Auftragspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,8) äquilibriert worden war. Bei einer Flußrate von 40-60 ml/h wurde die Säule dann zunächst mit dem Auftragspuffer und anschließend mit Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin, pH 6,0 bzw. pH 6,8) jeweils solange gespült, bis die Basislinie des Schreibers wieder konstant war.

Für die Elution der gebundenen Sialat-Pyruvat-Lyase (ebenfalls bei einer Flußrate von 40-60 ml/h) wurden verschiedene Imidazol-Gradienten in den beiden Waschpuffern (pH 6,0 bzw. pH 6,8) getestet. Begonnen wurde jeweils mit einem linearen Gradienten (20 ml, 0-1 M Imidazol in Waschpuffer; Fraktionsgröße 0,5 ml). Die Fraktionen wurden auf Sialat-Pyruvat-Lyaseaktivität hin geprüft (2.5.2). Jeweils 10 µl der aktiven Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.5.4.1), um die Reinheit der Fraktionen zu überprüfen.

Für die Reinigung von SPL19 wurden dann noch ein flacherer Gradient (20 ml, 200-600 mM Imidazol) in Waschpuffer pH 6,0 getestet, sowie ein Stufengradient von 20 ml 350 mM Imidazol (Waschschritt) und 20 ml 600 mM Imidazol (Elutionsschritt; Fraktionsgröße 0,5 ml) in Waschpuffer pH 6,0. Die Fraktionen wurden wiederum auf Sialat-Pyruvat-Lyaseaktivität getestet (2.5.2) und die Reinheit gelelektrophoretisch bestimmt (2.5.4.1). Die aktivsten Fraktionen des 600 mM-Elutionsschritts wurden gepoolt und für die weitere Reinigung (2.5.7.4; 2.5.7.5) sowie im Enterokinaseverdau (2.5.8.2) verwendet.

Für die Reinigung von SPL14 wurden ebenfalls noch weitere lineare Imidazol-Gradienten (20 ml, 0-300 mM Imidazol) in Waschpuffer pH 6,0 und Waschpuffer pH 6,8 getestet. Außerdem wurde eine Säule mit nur 1 ml Säulenvolumen verwendet. Die „letztliche“ Reinigung von SPL14, wie auch die Reinigung der mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasen, erfolgte mittels eines Stufengradienten von 20 ml 100 mM Imidazol (Waschschritt) und 20 ml 200 mM Imidazol (Elutionsschritt; Fraktionsgröße 0,5 ml) in Waschpuffer pH 6,8. Auch hier wurden die Fraktionen wiederum auf Sialat-Pyruvat-Lyaseaktivität getestet (2.5.2) und die Reinheit gelelektrophoretisch bestimmt (2.5.4.1). Die aktivsten Fraktionen des 200 mM-Elutionsschritts wurden gepoolt und für die Charakterisierung des Enzyms (2.5.9) sowie im Thrombinverdau (2.5.8.1) verwendet. Für die weiteren Chromatographieverfahren (2.5.7.3; 2.5.7.4; 2.5.7.5) wurden die über einen linearen Gradienten (0-300 mM Imidazol) gereinigten Proteinfractionen verwendet.

2.5.7.3 Anionenaustauschchromatographie

Zur weiteren Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 wurde an der BioCAD™ Perfusion Chromatography Workstation (PerSeptive Biosystems, Darmstadt) eine Anionenaustauschchromatographie an Poros HQ durchgeführt. Die bereits mittels Metall-Chelat-Affinitätshromatographie an Ni-NTA-Agarose vorgereinigte SPL14 (2.5.7.2) wurde zunächst über NAP-Säulen umgepuffert in 50 mM Bis-Tris pH 6,5 bzw. 50 mM Tris pH 7,5 (2.5.5). Die umgepufferte Proteinlösung wurde auf eine 1 ml-Poros HQ-Säule, die im gleichen Puffer äquilibriert war, aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit fünf Säulenvolumina 50 mM Bis-Tris pH 6,5 bzw. 50 mM Tris pH 7,5 wurden die gebundenen Proteine über einen linearen Salzgradienten (20 Säulenvolumina, 0-500 mM NaCl, Fraktionsgröße 1 ml, Flußrate 5 ml/min) eluiert. Die Fraktionen wurden im Aktivitätstest getestet (2.5.2) und ihre Reinheit gelelektrophoretisch überprüft (2.5.4.1).

2.5.7.4 Kationenaustauschchromatographie

Für die Kationenaustauschchromatographie an Mono S wurde die bereits mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose vorgereinigte SPL14 bzw. SPL19 (2.5.7.2) gegen 50 mM MES pH 6,0 dialysiert (2.5.5). Das Dialysat wurde auf eine in dem Puffer äquilibrierte 1 ml-Mono S-Säule mit einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschen mit fünf Säulenvolumina 50 mM MES pH 6,0 wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten (20 ml, 200-400 mM NaCl, Fraktionsgröße 0,5 ml, Flußrate 0,25 ml/min) eluiert. Die Fraktionen wurden im Aktivitätstest getestet (2.5.2) und ihre Reinheit gelelektrophoretisch überprüft (2.5.4.1).

Für die Chromatographie wurde eine HPLC-Anlage der Firmen Merck-Hitachi (Merck, Darmstadt; Hitachi, Tokio, Japan) eingesetzt. Sie wurde wie eine FPLC-Anlage gehandhabt.

2.5.7.5 Gelfiltration

Für die Gelfiltrationschromatographie wurde die bereits mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose vorgereinigte SPL14 bzw. SPL19 (2.5.7.2) gegen einen Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7,8) dialysiert (2.5.5). Das Dialysat wurde mit Centricon-10-Concentratoren (Millipore, Bedford, USA) etwa fünffach aufkonzentriert. 200 µl des Konzentrats wurden auf eine Superose 12-Säule, die zuvor im gleichen Puffer äquilibriert worden war, aufgetragen. Der Lauf wurde mit einer Flußrate von 0,25 ml/min und einer Fraktionsgröße von 0,25 ml durchgeführt. Die Fraktionen wurden im Aktivitätstest getestet (2.5.2) und ihre Reinheit gelelektrophoretisch überprüft (2.5.4.1).

2.5.8 Enzymatische Abspaltung des His-Tags mit Thrombin und Enterokinase

Die Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens*, die im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellt wurde, wurde als Fusionsprotein mit einem His-Tag exprimiert. Zwischen dem His-Tag und dem Startmethionin der Sialat-Pyruvat-Lyase befindet sich bei SPL14 die Sequenz einer Thrombinschnittstelle, bei SPL19 die Sequenz einer Enterokinaseschnittstelle. Mit Hilfe von Thrombin bzw. Enterokinase sollte sich, soweit die jeweilige Schnittstelle im Protein zugänglich ist, der His-Tag also nachträglich wieder entfernen lassen.

2.5.8.1 Enzymatische Hydrolyse von SPL14 mit Thrombin

Die mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigte Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 (2.5.7.2) wurde gegen folgende Puffer dialysiert (2.5.5): (1) 50 mM Tris/HCl pH 8,0; (2) 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 8,0; (3) 50 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,0 und (4) 50 mM NH₄HCO₃, 1 mM EDTA, pH 8,0. Die Dialysate wurden mit Centriplus-10-Concentratoren (Millipore, Bedford, USA) bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 1-3 mg/ml aufkonzentriert. Für die enzymatische Hydrolyse wurde den Dialysaten dann

zwischen 1 und 50 U Thrombin/mg Protein zugefügt. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur und 37 °C für 1-24 h inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch Auftrennung der Proteine auf einem 12 %igen SDS-Gel (2.5.4.1) überprüft.

2.5.8.2 Enzymatische Hydrolyse von SPL19 mit Enterokinase

Die mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigte Sialat-Pyruvat-Lyase SPL19 (2.5.7.2) wurde gegen folgende Puffer dialysiert (2.5.5), in denen die Hydrolyse mit Enterokinase getestet wurde: (1) 50 mM Tris/HCl pH 7,0; (2) 50 mM Tris/HCl pH 7,5; (3) 50 mM Tris/HCl pH 8,0; (4) 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4 und (5) 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,4. Für die enzymatische Hydrolyse wurde den dialysierten Proteinfraktionen zwischen 0,1 und 1 U Enterokinase/ μ g Protein (Enterokinase von Novagen, Madison, USA) zugefügt bzw. ein Enzym:Protein-Verhältnis von 1:200 bis 1:10 (Enterokinase von Boehringer, Mannheim) eingestellt. Die Reaktionsansätze wurden bei 21 °C und 37 °C für 1-24 h inkubiert. Die Hydrolyse wurde durch Auftrennung der Proteine auf einem 12 %igen SDS-Gel (2.5.4.1) überprüft.

2.5.9 Charakterisierung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen (Wildtyp und Mutanten)

Für die Charakterisierung der Sialat-Pyruvat-Lyasen (Wildtyp und Mutanten) wurden die über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine (2.5.7.2) verwendet. Für die Charakterisierung des Wildtyps wurde ausschließlich die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 verwendet; SPL19 wurde nicht weiter charakterisiert.

2.5.9.1 Bestimmung des Temperaturoptimums

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums der Sialat-Pyruvat-Lyase wurden je drei Ansätze bestehend aus 75 μ l 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 und 10 μ l 0,1 M Neu5Ac auf 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C bzw. 90 °C in einem Landgraf Thermocycler (Landgraf, Braunschweig) für 10 min vortemperiert. Durch Zugabe von 5 μ l Lyase (10 μ g/ml) wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Ansätze wurden für 10 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Durch Erhitzen der Ansätze auf 95 °C für 5 min wurde die Reaktion abgestoppt. Dann wurden die Ansätze auf Eis gestellt. 45 μ l jedes Ansatzes wurden in je ein Reaktionsgefäß pipettiert. Das während der Enzymkatalyse gebildete ManNAc wurde colorimetrisch, wie unter 2.5.2 beschrieben, quantifiziert.

2.5.9.2 Bestimmung der Thermostabilität

Die Thermostabilität der Sialat-Pyruvat-Lyase wurde sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von 80 mM Pyruvat bestimmt. Die Sialat-Pyruvat-Lyase wurde in 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 auf eine Konzentration von 20 μ g/ml verdünnt. Je Ansatz wurden 90 μ l der verdünnten Lyase in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Hälfte der Ansätze wurden zusätzlich 10 μ l 800 mM Natriumpyruvat zugegeben. Jeweils drei Ansätze

ohne Pyruvat und drei Ansätze mit Pyruvat wurden in einen Landgraf Thermocycler (Landgraf, Braunschweig) gestellt und für 10 min bei 30 °C, 40 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C bzw. 90 °C inkubiert. Dann wurden die Ansätze auf Eis gestellt. Zu den Ansätzen ohne Pyruvat wurde jetzt ebenfalls 10 µl 800 mM Natriumpyruvat pipettiert, um die Meßwerte besser vergleichen zu können, da Pyruvat als eines der Katalyseprodukte die Spaltung von Neu5Ac hemmt. Alle Ansätze wurden 1:20 in 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 verdünnt. Die Aktivität der hitzebehandelten Lyase wurde im Morgan-Elson-Assay, wie unter 2.5.2 beschrieben, bestimmt.

2.5.9.3 Bestimmung des pH-Optimums

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte in einem Drei-Puffer-Mix mit konstanter Ionenstärke (100 mM MES, 200 mM Triethanolamin, 100 mM Essigsäure, gewünschten pH eingestellt mit HCl bzw. Tetramethylammoniumhydroxid) (Ellis und Morrison, 1982). Dadurch wurden Änderungen der Enzymaktivität, die nicht durch den pH-Wechsel, sondern durch einen Einfluß der Ionenstärke des Puffers oder durch andere Einflüsse eines Pufferwechsels bedingt sind, vermieden.

Die Sialat-Pyruvat-Lyase (3,2 mg/ml) wurde zunächst jeweils 1:300 und 1:1000 in dem Drei-Puffer-Mix mit unterschiedlichem pH-Wert (pH 6,0; pH 6,5; pH 7,0; pH 7,2; pH 7,4; pH 7,6; pH 7,8; pH 8,0; pH 8,5; pH 9,0 bzw. pH 10,0) verdünnt. Je pH-Wert und je Verdünnungsstufe wurden drei Ansätze bestehend aus 45 µl verdünnter Sialat-Pyruvat-Lyase und 5 µl 0,1 M Neu5Ac pipettiert. Die Ansätze mit 1:300 verdünnter Lyase wurden 10 min, die mit 1:1000 verdünnter Lyase 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch fünfminütiges Erhitzen auf 96 °C wurde das Enzym inaktiviert. Die Proben wurden dann auf Eis gestellt. Das in der Katalyse gebildete Pyruvat wurde photometrisch quantifiziert (Prinzip erläutert unter 2.5.9.4). Dafür wurden 890 µl 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 75 µl 2 mM NADH und 10 µl LDH (1 U/µl) gemischt und ca. 5 min auf 37 °C temperiert. Die Extinktion der Lösung bei 339 nm wurde photometrisch (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Hitachi, Tokio, Japan) bestimmt und dann zügig 25 µl Reaktionsansatz zupipettiert. Nach ca. 5 min, wenn die Extinktion wieder konstant war, wurde die Extinktion erneut gemessen. Aus der Abnahme der Extinktion konnten die gebildete Pyruvat-Menge und damit die Enzymaktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase berechnet werden. Als Standards dienten Natriumpyruvat-Lösungen bekannter Konzentration.

2.5.9.4 Bestimmung der kinetischen Daten

Für die Bestimmung der kinetischen Daten der Wildtyp-Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens* wie auch der Mutanten wurde ein gekoppelter optischer Test mit Lactat-Dehydrogenase (LDH) und NADH verwendet (Comb und Roseman, 1960). Das bei der Spaltung von Neu5Ac durch die Sialat-Pyruvat-Lyase freigesetzte Pyruvat wird dabei durch die Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert, wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Die Abnahme von NADH über die Zeit kann durch Messung der Extinktion bei 339 nm bestimmt werden. Aus der Abnahme der Extinktion pro Zeiteinheit ($\Delta E/\Delta t$) kann die En-

zymaktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase direkt berechnet werden. Dabei gilt: Pro Molekül Neu5Ac, das durch die Lyase gespaltenen wird, wird ein Molekül Pyruvat gebildet und damit ein Molekül NADH durch die LDH reduziert. Damit ergibt sich folgende Formel für die Berechnung der Enzymaktivität:

$$\text{Aktivität [U/ml]} = \frac{\Delta E \cdot V_G \cdot 1000}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot d \cdot V_P}$$

ΔE : gemessene lineare Extinktionsänderung

Δt : Meßzeitraum in min

$\epsilon_{339 \text{ nm}}$: molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 339 nm ($6,22 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

d : Schichtdicke der Küvette in cm

V_G : Gesamtvolumen des Ansatzes in ml

V_P : Volumen der in den Ansatz gegebenen Lyaseprobe in ml

Dividiert man diesen Wert durch die Konzentration der Lyaseprobe, so ergibt sich der Wert für die spezifische Aktivität. Aus den ermittelten Daten für die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei den verschiedenen Neu5Ac-Konzentrationen können mit Hilfe des Computerprogramms Enzfitter (Version 1.05, Elsevier-BIOSOFT, Cambridge, Großbritannien) die Werte für K_M und V_{\max} ermittelt werden.

Die Bestimmung der kinetischen Daten für den Wildtyp erfolgte sowohl in 250 mM als auch in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2. Die Ansätze bestehend aus 880- μl Kaliumphosphatpuffer ($x = \text{Volumen der Neu5Ac-Lösung}$), 100 μl 2 mM NADH, 10 μl LDH (1 U/ μl)¹ und 10 μl Lyase (36 $\mu\text{g/ml}$) wurden jeweils ca. 10 min auf 37 °C vortemperiert und dann in ein auf 37 °C temperiertes Hitachi U-2000 Spectrophotometer (Hitachi, Tokio, Japan) gestellt. Dann wurde die ebenfalls auf 37 °C vortemperierte Neu5Ac-Lösung zupipettiert, mit einem Rührspatel zügig umgerührt und die Messung der Extinktion bei 339 nm sofort gestartet. Über einen Zeitraum von 10 min wurde die Extinktion alle 20 s protokolliert. Die Messung (Dreifach-Bestimmung) erfolgte für Neu5Ac-Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 10 mM. Als Kontrollen (zur Bestimmung des Schleichs) dienten Ansätze, denen entweder keine LDH, keine Lyase oder keine Neu5Ac zugefügt wurde.

Die Bestimmung der kinetischen Daten für die Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase erfolgte dem Wildtyp-Enzym entsprechend, jedoch nur in 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2. Dabei wurden, je nach K_M -Wert der Mutante, Neu5Ac-Konzentrationen von 0,1 mM bis 150 mM Neu5Ac eingesetzt. Je nach Aktivität der Mutante wurden z.T. deutlich höhere Enzymmengen pro Testansatz eingesetzt.

¹ Vor Beginn der eigentlichen Messungen wurde die Lactat-Dehydrogenase bei verschiedenen Neu5Ac-Konzentrationen und verschiedenen Sialat-Pyruvat-Lyase-Konzentrationen austitriert. Anschließend wurde bei der gewählten Lactat-Dehydrogenase-Konzentration, bei verschiedenen Neu5Ac-Konzentrationen der Meßbereich austitriert, in dem die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit der eingesetzten Sialat-Pyruvat-Lyase direkt proportional ist. Dadurch sollte sicher gestellt werden, dass unter keinen für die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Daten verwendeten Bedingungen die Lactat-Dehydrogenase-Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist.

2.5.9.5 Einfluß der Salzkonzentration auf die Enzymaktivität

Um den Einfluß von Salz auf die Enzymaktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase zu bestimmen, wurde ebenfalls der gekoppelte optische Test mit LDH und NADH verwendet (2.5.9.4). Die 1 ml-Ansätze enthielten 10 µl LDH (1 U/µl), 20 µl Lyase (36 µg/ml) sowie 100 µl 2 mM NADH in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 mit 0 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM bzw. 500 mM KCl. Die Enzymaktivität bei den unterschiedlichen Salzkonzentrationen wurde jeweils bei 1 mM und 3 mM Neu5Ac, also bei einer geringen Substratkonzentration und beim ungefähren K_M , wie unter 2.5.9.4 beschrieben bestimmt.

2.5.9.6 Bestimmung der Substratspezifität mittels fluorimetrischer HPLC

Die Spaltung von 9-O-acetylierter Sialinsäure (Neu5,9Ac₂) und 4-O-acetylierter Sialinsäure (Neu4,5Ac₂) durch die Sialat-Pyruvat-Lyase wurde mit Hilfe der von Hara *et al.* (1989) beschriebenen Methode zur Untersuchung von Sialinsäuren mittels fluorimetrischer HPLC untersucht. Dabei wurden α -Ketosäuren, also auch Sialinsäuren und Pyruvat, zunächst durch Derivatisierung mit DMB fluoreszenzmarkiert. Die Derivate wurden anschließend mittels HPLC an Reversed Phase aufgetrennt und anhand der Retentionszeiten identifiziert. Als Standard diente derivatisiertes BSM (gereinigte Sialinsäuren von hydrolysiertem Rindersubmandibulardrüsenmucin).

2.5.9.6.1 Spaltung von Neu5,9Ac₂

Mittels fluorimetrischer HPLC wurde die Spaltung von Neu5,9Ac₂ durch die Wildtyp-Sialat-Pyruvat-Lyase sowie die Mutanten E188D und E188Q bestimmt. Zum Vergleich wurde auch die Spaltung von Neu5Ac untersucht.

Die Enzymreaktion fand in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 in einem Reaktionsvolumen von 20 µl statt. Dabei wurden jeweils 0,8 µg Lyase (SPL14, E118D bzw. E188Q) pro Ansatz eingesetzt. Die Lyase wurde im Phosphatpuffer zunächst für 2 min in einem Landgraf Thermocycler (Landgraf, Braunschweig) auf 37 °C vortemperiert. Dann wurde die ebenfalls auf 37 °C vortemperierte Neu5,9Ac₂- bzw. Neu5Ac-Lösung (3 mM Endkonzentration) zugefügt. Nach jeweils 1 min und 5 min wurden 2 µl des Ansatzes abgenommen und die Enzymreaktion durch Tieffrieren in Flüssigstickstoff abgestoppt. Die Ansätze wurden dann mit 20 µl 2 M Essigsäure und 49 µl DMB-Reagenz (15,62 mg DMB, 523 µl Mercaptoethanol, 48 µl 39 %ige NaHSO₃-Lösung, *ad* 10 ml mit H₂O_{bidest.}) gemischt und 1 h bei 56 °C unter Lichtabschluß inkubiert. Dann wurden die Ansätze 4 min zentrifugiert und die Überstände bei -20 °C eingefroren. Für die HPLC wurden jeweils 10 µl des tiefgefrorenen Ansatzes mit 190 µl Wasser gemischt. Davon wurden dann 25 µl mittels HPLC an Reversed Phase (LiChrospher 100 RP-18, 250 x 4 mm, 5 µm Partikeldurchmesser; Merck, Darmstadt) aufgetrennt (45 min, Flußrate 1 ml/min) und analysiert. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Acetonitril/Methanol/Wasser (9/7/84; v/v/v). Für die HPLC wurde eine Anlage der Firmen Merck-Hitachi (Merck, Darmstadt; Hitachi, Tokio, Japan) verwendet. Die Detektion erfolgte bei einer Anregungswellenlänge

von 373 nm und einer Emissionswellenlänge von 448 nm. Aus dem Verhältnis der Peakflächen wurde die Abnahme der Sialinsäuremenge und die Zunahme der Pyruvatmenge bestimmt. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Enzym.

2.5.9.6.2 Spaltung von Neu4,5Ac₂

Mittels fluorimetrischer HPLC wurde auch die Spaltung von Neu4,5Ac₂ durch die Wildtyp-Sialat-Pyruvat-Lyase untersucht.

Drei 10 µl-Ansätze mit je 1 µg Neu4,5Ac₂ und 5 µg Lyase (SPL14) in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 wurden für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Enzymreaktion durch Tieffrieren in Ethanol/Trockeneis abgestoppt. Als Kontrolle dienten drei Ansätze ohne Enzym, die genauso behandelt wurden. Die Ansätze wurden lyophilisiert und anschließend wie unter 2.5.9.6.1 beschrieben derivatisiert und an der HPLC analysiert. Es wurden jeweils 5 µl der Proben unverdünnt auf die HPLC aufgetragen.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Expression des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von *Clostridium perfringens* in *E. coli*

Das Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens* sollte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert werden, um das Protein rekombinant in *E. coli* herstellen zu können. Die meisten Enzyme, so auch die Sialat-Pyruvat-Lyase, kommen in Zellen nur in sehr geringer Konzentration vor und sind daher schwer in großen Mengen aufzureinigen. Die rekombinante Expression ermöglicht es, das Protein in großen Mengen herzustellen und aufzureinigen. Dadurch ist es auch leichter, ausreichende Mengen für eine Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse, aber auch für eine umfassende Charakterisierung des Enzyms zu reinigen.

3.1.1 Auswahl des Expressionssystems

Als Expressionsvektoren wurden pET14b und pET19b (Abb. 4) ausgewählt, zwei Vektoren des T7-Expressionssystems, (Studier und Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990).

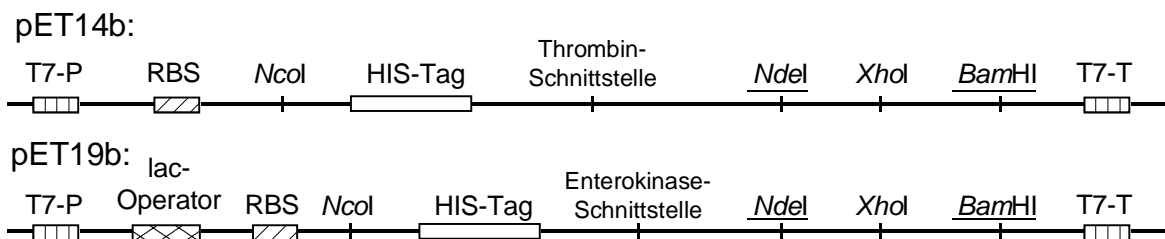


Abb. 4 Schematische Darstellung der Klonierungsstelle der Expressionsvektoren pET14b und pET19b. Das Sialat-Pyruvat-Lyasegen wurde über die *NdeI*- und die *BamHI*-Schnittstelle gerichtet in die Vektoren kloniert. Die Expression erfolgt mittels T7-Polymerase, die den T7-Promotor (T7-P) spezifisch erkennt. Die Transkription stoppt am T7-Terminator (T7-T). Die Ribosomenbindestelle (RBS) des *E. coli*-Phagen T7 ermöglicht eine effektive Translation.

Die T7-RNA-Polymerase erkennt hoch spezifisch den T7-Promotor. Wird die Bildung der T7-RNA-Polymerase in den Wirtszellen induziert, so wird das klonierte Gen, das unter Kontrolle des sehr starken T7-Promotors steht, in großen Mengen transkribiert und das Protein damit exprimiert. Der Anteil des exprimierten Proteins kann bis zu 50 % der Gesamtproteinmenge der Zellen ausmachen. Solange keine T7-RNA-Polymerase vorhanden ist, wird das klonierte Gen nicht exprimiert, da die *E. coli*-RNA-Polymerase den T7-Promotor nicht erkennt.

Die Plasmide wurden zur stabilen Lagerung in *E. coli* JM101, *E. coli* JM109, *E. coli* DH5 α oder *E. coli* XL1BlueMRF' transformiert. Diese Zellstämme besitzen kein Gen für die T7-

RNA-Polymerase. Für die Expressionsversuche wurden die Plasmide in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformiert. Beide besitzen das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter lacUV5-Kontrolle. Durch Zugabe von IPTG wird die Bildung der T7-RNA-Polymerase und damit die Expression des klonierten Gens induziert. Aber auch ohne Induktion wird, wenn auch in sehr geringen Mengen, T7-RNA-Polymerase gebildet und damit das klonierte Gen schwach exprimiert. Dieses ist meistens unbedeutend, kann aber, wenn das Protein toxisch auf die Zellen wirkt, zu Plasmidstabilitätsproblemen führen und somit eine spätere Expression in quantitativem Maßstab gefährden. In diesem Fall gewährleistet das Vorhandensein des Plasmids pLysS in den Zellen eine deutlich erhöhte Plasmidstabilität. Die Zellen mit diesem Plasmid bilden in geringen Mengen Lysozym, das die Mengen T7-RNA-Polymerase, die vor der Induktion durch IPTG auftreten, hemmt, so dass vor der Induktion mit IPTG kein rekombinantes Genprodukt gebildet wird (Moffatt und Studier, 1987).

Die Klonierung des Sialat-Pyruvat-Lyasegens in die Expressionsvektoren pET 14b und pET19b sollte am 5'-Ende des Gens über die *Nde*I-Schnittstelle erfolgen, so dass das Gen gleich im richtigen Leserahmen kloniert ist. In beiden Vektoren wird das klonierte Gen als Fusionsprotein mit einem sogenannten His-Tag exprimiert. Dieser Fusionsanteil mit sechs bzw. neun Histidinresten erlaubt die Reinigung des Proteins über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Diese sehr spezifische Methode sollte auch gewährleisten, die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* von der von *E. coli* selbst exprimierten Sialat-Pyruvat-Lyase abzutrennen. Durch die im Fusionsprotein vorhandene Sequenz einer Thrombin- bzw. Enterokinaseschnittstelle sollte sich, soweit die jeweilige Schnittstelle im Protein zugänglich ist, der His-Tag nachträglich wieder entfernen lassen.

3.1.2 Klonierung des Sialat-Pyruvat-Lyasegens in die Expressionsvektoren pET14b und pET19b

Zunächst wurde das Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens* für die Klonierung mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert (2.4.10). Die dafür verwendeten Primer SPL-F und SPL-R wurden so konstruiert, dass sie neben den Sequenzen, die homolog zu den Enden des Sialat-Pyruvat-Lyasegens sind, am 5'-Ende noch jeweils eine Restriktionsschnittstelle für die spätere Klonierung in die Expressionsvektoren pET14b und pET19b besitzen (Abb. 5).

```

                Nde I
SPL-F: CGTTAAGCATATGAAAGGTATTTATTC
                ATGAAAGGTATTTATTCAGCATTATTAGTTTCA...
Genanfäng  -----
                TACTTTCCATAAATAAGTCGTAATAATCAAAGT...
                M K G I Y S A L L V S ...

...AAAGCTAAGGAAATTAATAAAAAATATTTCTAA
                ----- Genende
...TTTCGATTCCTTTAATTATTTTTTATAAAGATT
                TTAATTATTTTTTATAAAGATTCCTAGGGC : SPL-R
...K A K E I N K K Y F * BamHI

```

Abb. 5 Randbereiche des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von *C. perfringens* mit Sequenzen der Primer SPL-F und SPL-R, die für die Amplifikation des Gens zur Klonierung in die Expressionsvektoren pET14b und pET19b eingesetzt wurden. Die Restriktionsschnittstellen, über die das Sialat-Pyruvat-Lyasegen kloniert wurde, sind in den Primersequenzen fett hinterlegt.

Die erhaltene *Nde* I-Schnittstelle am Anfang des Gens, die das Startcodon des Sialat-Pyruvat-Lyasegens *in vivo* mit einbezieht, gewährleistet, dass das Gen im richtigen Leserahmen für die spätere Expression kloniert wird. Das mittels PCR mit den Primern SPL-F und SPL-R amplifizierte Sialat-Pyruvat-Lyasegen wurde nach Restriktionshydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Bam*HI in die Expressionsvektoren pET14b und pET19b ligiert und in *E. coli* JM101 transformiert. Um den Einbau des Sialat-Pyruvat-Lyasegens in die Expressionsvektoren zu überprüfen und um zu kontrollieren, dass in der PCR keine Mutationen in das Gen eingeführt worden sind, wurden aus je sechs Transformanten die Plasmide präpariert und sequenziert. Von je einem Klon, dessen Plasmid das Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens* richtig eingebaut und ohne Mutation enthielt, wurde eine Glycerinkultur hergestellt. Die Plasmide der beiden Klone wurden mit pSPL14 (pET14b mit Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens*) und pSPL19 (pET19b mit Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens*) bezeichnet.

3.1.3 Expressionsversuche

Für die Expression wurden die Plasmide pSPL14 und pSPL19 (3.1.2) in *E. coli* BL21(DE3) und in *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformiert, da in diesen Zellen die Bildung der T7-RNA-Polymerase und damit die Expression des klonierten Gens durch IPTG induziert werden kann (3.1.1). Die entstandenen Klone wurden als *E. coli* BL21(DE3) pSPL14 und *E. coli* BL21(DE3) pLysS pSPL14 sowie *E. coli* BL21(DE3) pSPL19 und *E. coli* BL21(DE3) pLysS pSPL19 bezeichnet. Als Negativkontrollen für die Expression wurden auch die Plasmide ohne Insert - pET14b und pET19b - in *E. coli* BL21(DE3) und in *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformiert. Von allen Klonen wurden Glycerinkulturen hergestellt.

Zunächst wurden unterschiedliche Bedingungen für die Expression der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* getestet (2.5.6). So wurde sowohl die Zelldichte

(OD_{600}) zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG als auch die anschließende Inkubationsdauer bis zur Zellernte variiert. Um die Expression unter den jeweiligen Bedingungen auswerten zu können, wurden die Proteine der Zellen vor und zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion mit IPTG auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert (Abb. 6).

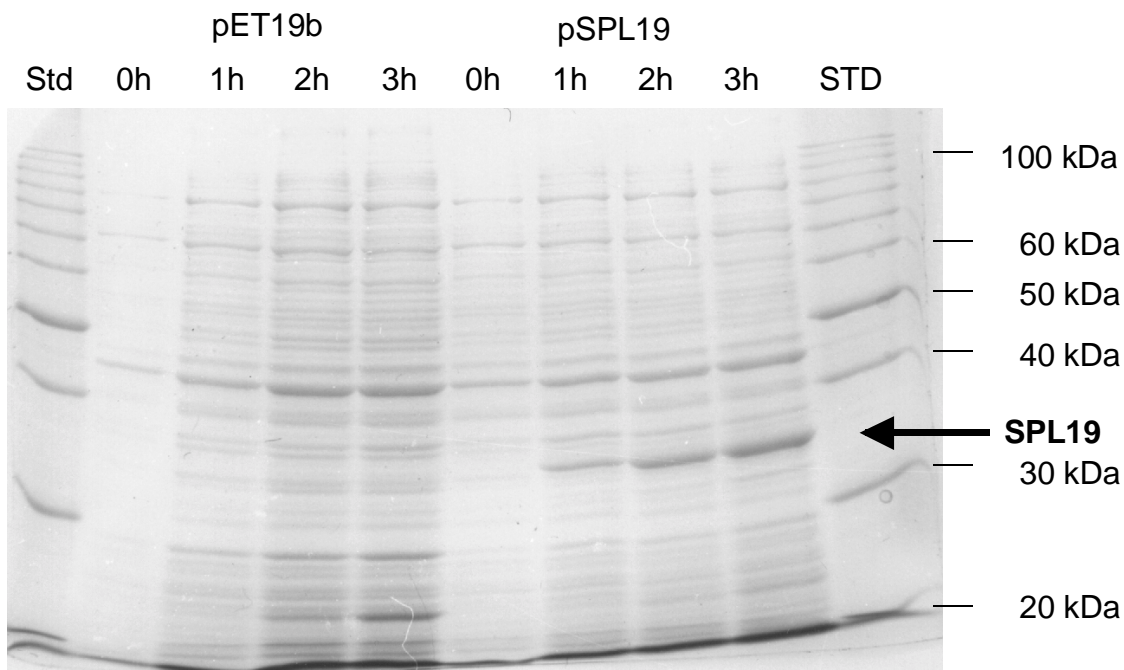


Abb. 6 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie-gefärbt) zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus der Expression mit den Klonen *E. coli* BL21(DE3) pSPL19 und *E. coli* BL21(DE3) pET19b. Die Induktion der Zellen mit 1 mM IPTG erfolgte bei einer OD_{600} von 0,7.

verwendete Klone:

pET19b : *E. coli* BL21(DE3) pET19b (Negativkontrolle)

pSPL19 : *E. coli* BL21(DE3) pSPL19

aufgetragene Proteinlösungen:

0 : gesamte Zellproteine vor der Induktion der Expression mit IPTG

1, 2, 3 : gesamte Zellproteine 1 h, 2 h bzw. 3 h nach der Induktion mit IPTG

Std : Standard (10 kDa Leiter)

Die Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* ließ sich in *E. coli* unter allen getesteten Bedingungen sehr gut exprimieren. Die Analyse der Zellproteine auf den Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen zeigte eine deutlich sichtbare Bande bei etwa 35 kDa, der erwarteten Größe der rekombinanten Lyasen mit His-Tag, die in den Negativkontrollen nicht vorhanden war. Die Lyase-Bande war bereits eine Stunde nach Induktion der Expression gut sichtbar. Durch längere Inkubation ließ sich die Ausbeute allerdings noch weiter steigern: Die Lyase-Bande nach zwei Stunden Induktion war auf dem SDS-Polyacrylamidgel deutlich stärker als die nach einer Stunde. Am stärksten war sie nach drei Stunden, wobei jedoch der Unterschied zum Zwei-Stunden-Wert nicht mehr so groß war. Es machte kaum einen Unterschied, ob die Expression in *E. coli* BL21(DE3) mit oder ohne

pLysS stattfand. In beiden Fällen war die Ausbeute an rekombinantem Protein ähnlich. Die optische Dichte (OD_{600}), bei der die Zellen induziert worden waren, hatte ebenfalls wenig Einfluß auf die Expression. Allerdings war die Gesamtproteinausbeute und damit auch die Menge an rekombinantem Enzym bei den Ansätzen am höchsten, bei denen die Zellen bei einer OD_{600} von 0,8 (der höchsten getesteten OD_{600}) induziert wurden.

Die Ergebnisse der Testexpressionen dienten als Grundlage für die Expression der Sialat-Pyruvat-Lyase im präparativen Maßstab. Dafür wurden die beiden Klone *E. coli* BL21(DE3) pSPL14 und *E. coli* BL21(DE3) pSPL19 verwendet. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} von 0,8 mit IPTG induziert, für drei Stunden weiterinkubiert und dann geerntet.

Da sich der Fusionsanteil der beiden rekombinanten Proteine unterscheidet, wurden diese – entsprechend den Plasmiden, in die das Sialat-Pyruvat-Lyasegen kloniert war – zur Unterscheidung mit SPL14 und SPL19 bezeichnet.

3.2 Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen von *Clostridium perfringens* (SPL14 und SPL19)

3.2.1 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose

Da die Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* rekombinant als Fusionsprotein mit einem His-Tag exprimiert wurde (3.1.1), wurde als erster Schritt für die Reinigung eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose durchgeführt (2.5.7.2). Aus Vorversuchen war bekannt, dass die rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen SPL14 und SPL19 erst bei höheren Imidazolkonzentrationen eluieren. Daher wurde bereits für den Zellaufschluß ein Puffer mit 20 mM Imidazol verwendet. Die Elution von SPL19 von der Nickel-Säule erfolgte mit einem Stufengradienten von 350 mM und 600 mM Imidazol bei pH 6,0 (Daten nicht gezeigt).

Die Elution von SPL14 von der Nickel-Säule erfolgte mit einem Stufengradienten von 100 mM und 200 mM Imidazol bei pH 6,8. 10 µl der verschiedenen Fraktionen wurden auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 7). Außerdem wurden die Aktivität und die Proteinkonzentration von Zellaufschluß und Eluat bestimmt und daraus die Ausbeute und die Anreicherung der Sialat-Pyruvat-Lyase errechnet (Tab. 3).

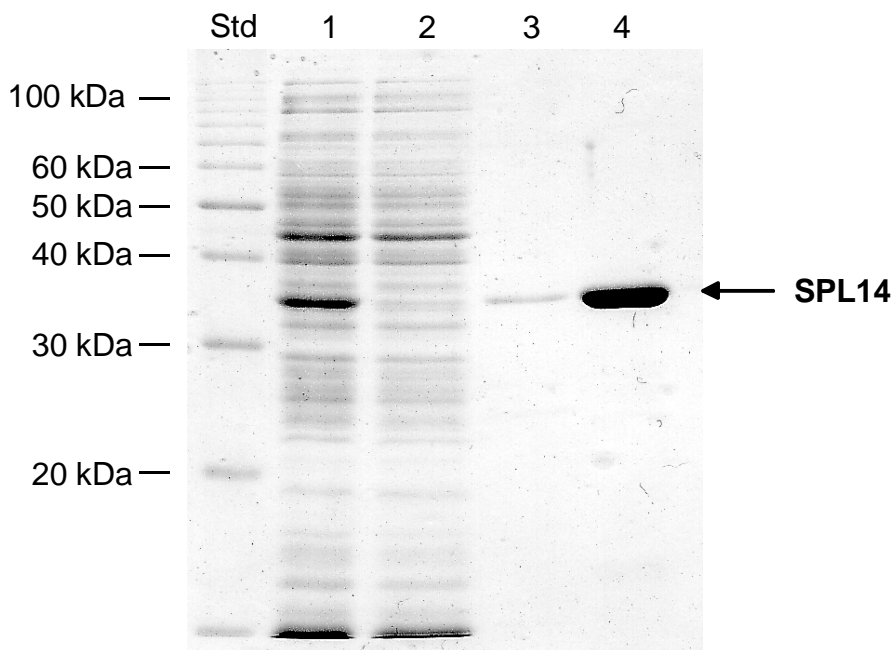


Abb. 7 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) zur gelelektrophoretischen Auftrennung der verschiedenen Proteinfractionen nach Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose.

- 1 : Zellaufschluß (Auftrag)
- 2 : Durchlauf
- 3 : Wasch (100 mM Imidazol in Waschpuffer pH 6,8)
- 4 : Eluat (200 mM Imidazol in Waschpuffer pH 6,8)
- Std : Standard (10 kDa Leiter)

Tab. 3 Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 aus 500 ml Bakterienkultur über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Die Aktivität der Lyase wurde im Morgan-Elson-Assay (2.5.2) bestimmt.

Fraktion	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	spezif. Aktivität [U/mg Protein]	Anreicherung
Zellaufschluß	156,6	100	2,53	1
Eluat Nickel-Säule	115,8	74	22,17	8,76

Auf diese Weise ließen sich aus 1 l induzierter BL21(DE3) pSPL14-Kultur ca. 10 mg rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase reinigen.

Um die Reinheit der SPL14 nach der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie abschätzen zu können, wurden ca. 0,5 µg SPL14-Präparation auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 8). Nach Silberfärbung ist nur eine einzige Bande zu erkennen.

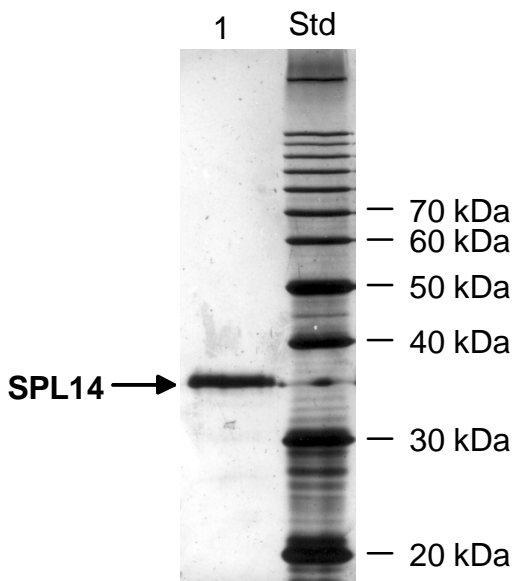


Abb. 8 Silbergefärbtes 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Aufreinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose. Es wurden ca. 0,5 µg SPL14 aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Std : Standard (10 kDa Leiter)
1 : SPL14

Außerdem wurde die gereinigte rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 auf einem 8 %igen und einem 10 %igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt, um die Homogenität des Enzyms unter nativen Bedingungen abschätzen zu können (Abb. 9). Auch hier ist nach Silberfärbung nur eine distinkte Bande zu erkennen.

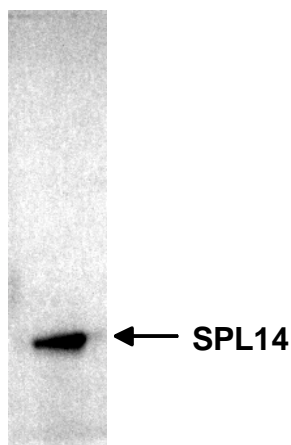


Abb. 9 8 %iges natives Polyacrylamidgel (silbergefärbt) mit der über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigten rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens*.

Da die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* bereits durch Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose bis annähernd zur Homogenität gereinigt

werden konnte (Abb. 8 und Abb. 9), wurde das Enzym für die Versuche zur Abspaltung des His-Tags mittels Thrombin bzw. Enterokinase (3.2.3) sowie für die Charakterisierung des Enzyms (3.3) nicht weiter gereinigt. Trennt man jedoch sehr große Mengen des Enzyms auf einem SDS-Polyacrylamidgel auf, so sind nach intensiver Silberfärbung einige schwächere Proteinbanden im Bereich zwischen 20 und 30 kDa sichtbar (siehe Bahn 1 und 3, Abb. 10). Diese ließen sich zwar durch Verwendung einer kleineren Säule und durch Optimierung der Bedingungen der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose in ihrer Menge verringern (für die unter 3.2.2 beschriebenen Chromatographien waren Proteinfraktionen verwendet worden, die über einen linearen Imidazolgradienten von der Säule eluiert worden waren), jedoch nicht vollständig abtrennen.

3.2.2 weitere Chromatographien

Es wurde versucht, die Proteinbanden im Bereich zwischen 20 und 30 kDa (siehe Bahn 1 und 3, Abb. 10) für die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse vollständig von der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase abzutrennen.

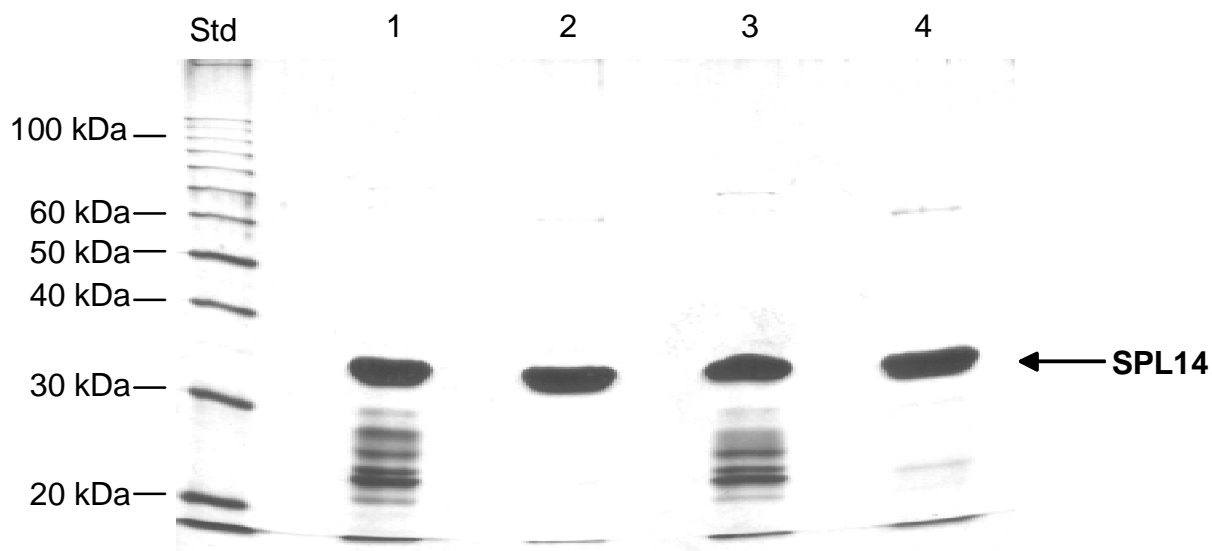


Abb. 10 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Aufreinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 über eine Anionenaustauschchromatographie an Poros HQ. Die Elution erfolgte über einen linearen Salzgradienten von 0-500 mM NaCl in 50 mM Bis-Tris pH 6,5 bzw. 50 mM Tris pH 7,5. Es wurden jeweils ca. 5 µg Protein pro Bahn aufgetragen.

- 1 : Auftrag (Chromatographie in 50 mM Bis-Tris pH 6,5)
- 2 : Fraktion 38 (Chromatographie in 50 mM Bis-Tris pH 6,5)
- 3 : Auftrag (Chromatographie in 50 mM Tris pH 7,5)
- 4 : Fraktion 39 (Chromatographie in 50 mM Tris pH 7,5)
- Std : Standard (10 kDa Leiter)

Die über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigte Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 wurde über NAP-Säulen in 50 mM Bis-Tris pH 6,5 bzw. 50 mM Tris pH 7,5 umgepuffert und dann auf eine Poros HQ-Säule (starker Anionenaustauscher) aufgetragen (2.5.7.3).

Die Elution erfolgte über einen linearen Salzgradienten von 0-500 mM NaCl in dem Bis-Tris- bzw. Tris-Puffer. 10 µl der verschiedenen Fraktionen wurden auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 10 zeigt ein silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, auf dem jeweils ca. 5 µg Protein vor und nach der Chromatographie an Poros HQ aufgetragen wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich, insbesondere bei der Chromatographie in Bis-Tris-Puffer, die kontaminierenden Proteinbanden zwischen 20 und 30 kDa gut abtrennen ließen. Allerdings zeigte sich im Aktivitätstest, dass die spezifische Aktivität deutlich geringer war als nach der Nickel-Säule (Tab. 4).

Tab. 4 Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 aus 500 ml Bakterienkultur über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose und anschließende Anionenaustauschchromatographie an PorosHQ. Die Aktivität der Lyase wurde im Morgan-Elson-Assay (2.5.2) bestimmt.

Fraktion	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	spezif. Aktivität [U/mg Protein]	Anreicherung
Zellaufschluß	156,6	100	2,53	1
Eluat Nickel-Säule	115,8	74	22,17	8,76
Eluat HQ	52,1	33	11,36	-

Wie sich herausstellte, war das nicht durch die Chromatographie selbst bedingt, sondern durch die Umpufferung des Eluats der Nickel-Säule in den Bis-Tris- bzw. Tris-Puffer. Schon nach der Umpufferung über NAP-Säulen betrug die spezifische Aktivität nur noch etwa 12 U/mg. Erfolgte die Umpufferung durch Dialyse, waren die Verluste in der spezifischen Aktivität ähnlich. Wurden die Proteinfractionen anschließend wieder in Phosphat-Puffer „zurückdialysiert“, hatte dies keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität. Die Aktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase ließ sich dadurch nicht wieder steigern.

Es wurden noch weitere Verfahren zur Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase getestet, aber weder durch Kationenaustauschchromatographie an Mono S (2.5.7.4) noch durch Gelfiltration an Superose 12 (2.5.7.5) ließen sich die rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen SPL14 und SPL19 weiter aufreinigen (Daten nicht gezeigt). Obwohl die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase nativ vermutlich als Tetramer vorliegt und daher schon sehr früh von der Gelfiltrationssäule eluierte, war eine Abtrennung der zumindest unter denaturierenden Bedingungen mit 20-30 kDa relativ kleinen kontaminierenden Proteine nicht möglich.

3.2.3 Entfernung des His-Tags durch enzymatische Hydrolyse mit Thrombin und Enterokinase

Beide rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen von *C. perfringens*, SPL14 und SPL19, sind Fusionsproteine mit einem His-Tag (3.1.1). Um diesen nach der Reinigung zu entfernen, wurden die Fusionsproteine mit Thrombin (SPL14) bzw. Enterokinase (SPL19) inkubiert. Sowohl die enzymatische Hydrolyse mit Thrombin, als auch die enzymatische Hydrolyse mit Enterokinase wurden unter verschiedenen Bedingungen getestet: unterschiedliche Pufferbedingungen, unterschiedlich lange Inkubationszeiten, unterschiedliche Enzymmengen, unterschiedliche Reaktionstemperaturen (2.5.8). Unter allen getesteten Bedingungen ließ sich jedoch weder von SPL14 noch von SPL19 der His-Tag entfernen (Daten nicht gezeigt).

3.3 Charakterisierung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens*

Die native, aus *C. perfringens* selbst gereinigte Sialat-Pyruvat-Lyase ist bereits eingehend charakterisiert worden (Nees *et al.*, 1976; Shukla und Schauer, 1986; Zbiral *et al.*, 1992). Um zu zeigen, dass die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 eine geeignete Enzymquelle für weitere biochemische Untersuchungen ist, sollte diese ebenfalls charakterisiert und ihre Eigenschaften mit denen des nativen Enzyms verglichen werden. Die Charakterisierung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase sollte außerdem als Grundlage für die Charakterisierung der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase dienen.

Die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase SPL19 wurde nicht charakterisiert.

Die über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigte Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 wurde über NAP-Säulen in 50 mM Bis-Tris pH 6,5 bzw. 50 mM Tris pH 7,5 umgepuffert und dann auf eine Poros HQ-Säule (starker Anionenaustauscher) aufgetragen (2.5.7.3). Die Elution erfolgte über einen linearen Salzgradienten von 0-500 mM NaCl in dem Bis-Tris- bzw. Tris-Puffer. 10 µl der verschiedenen Fraktionen wurden auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 10 zeigt ein silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel, auf dem jeweils ca. 5 µg Protein vor und nach der Chromatographie an Poros HQ aufgetragen wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich, insbesondere bei der Chromatographie in Bis-Tris-Puffer, die kontaminierenden Proteinbanden zwischen 20 und 30 kDa gut abtrennen ließen.

3.3.1 Temperaturoptimum

Die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* erfolgte bei pH 7,2 in 250 mM Kaliumphosphatpuffer mit Neu5Ac als Substrat (2.5.9.1). Dabei wurden die Ansätze zunächst auf die jeweilige Temperatur erwärmt, bevor durch Zugabe des Enzyms die Reaktion gestartet wurde. Dadurch sollte verhindert werden, dass die Sialat-Pyruvat-Lyase bereits während des Erwärmens der Ansätze auf die eigentliche Reaktionstemperatur aktiv ist, was vor allem bei den Messungen bei höheren Temperaturen zu einer Verfälschung der Ergebnisse hätte führen können.

Abb. 11 zeigt die Temperaturkurve der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens*. Daraus ergibt sich ein Temperaturoptimum von 65-70 °C.

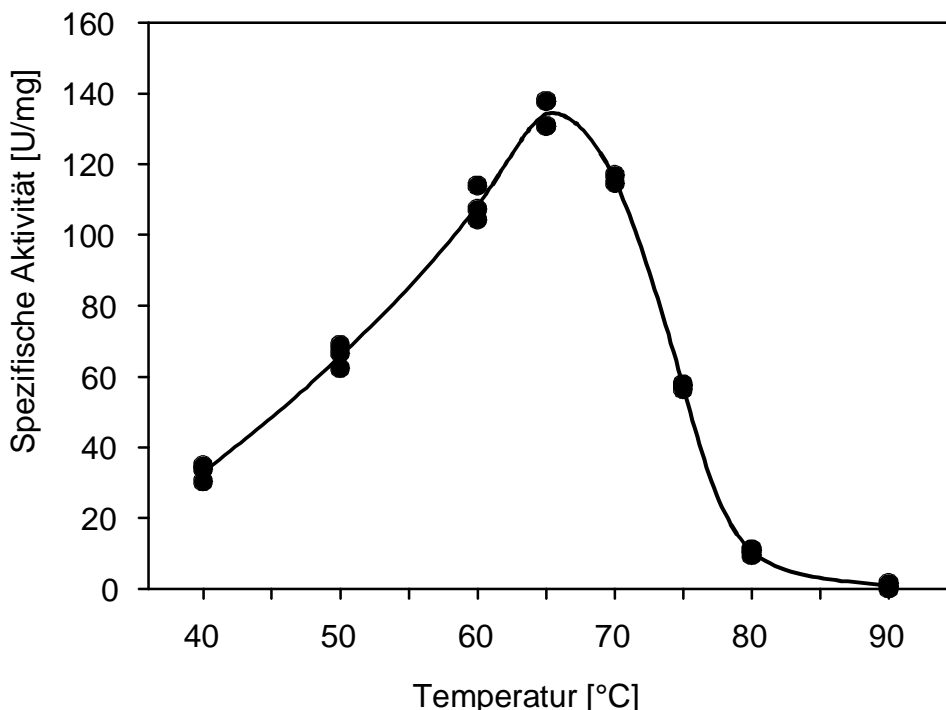


Abb. 11 Temperaturabhängigkeit der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens*.

3.3.2 Thermostabilität

Die Thermostabilität der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* wurde in Gegenwart und in Abwesenheit von 80 mM Pyruvat bestimmt. Das Enzym wurde jeweils mit und ohne Pyruvat für 15 min bei den verschiedenen Temperaturen inkubiert. Dann wurde die Enzymaktivität im Morgan-Elson-Assay unter Standardbedingungen (37 °C; pH 7,2; Neu5Ac als Substrat) bestimmt (2.5.9.2). Dafür wurde den Ansätzen ohne Pyruvat die Substanz nachträglich zugefügt, um die Meßwerte besser vergleichen zu können, da Pyruvat als eines der Katalyseprodukte die Spaltung von Neu5Ac hemmt.

Wurde die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase ohne Pyruvat erhitzt, war sie bis etwa 50 °C stabil (Abb. 12). Die Inkubation bei Temperaturen über 70 °C führte allerdings schon zu einem fast vollständigen Verlust der Enzymaktivität. In Gegenwart von Pyruvat war das Enzym dagegen bis 70 °C stabil. Selbst nach 15 min Inkubation bei 75 °C war noch die Hälfte der Enzymaktivität nachweisbar.

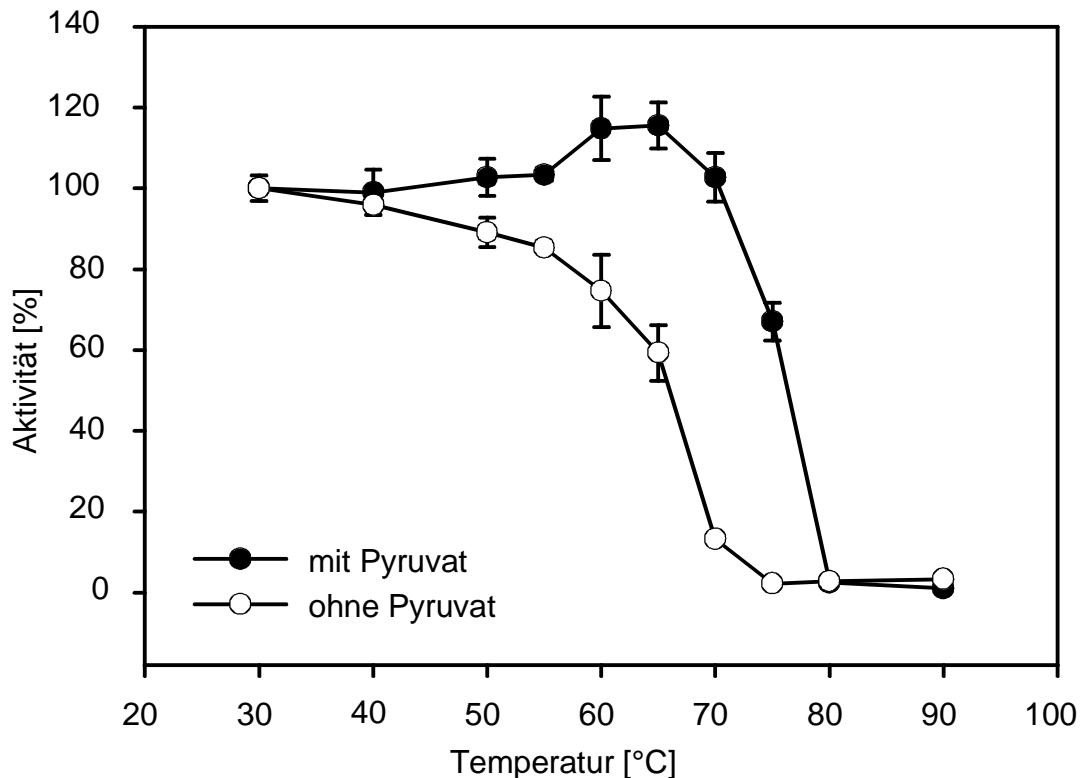


Abb. 12 Thermostabilität der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Gegenwart (●) und in Abwesenheit (○) von 80 mM Pyruvat.

3.3.3 pH-Optimum

Für die Bestimmung des pH-Optimums der Sialat-Pyruvat-Lyase wurde ein Drei-Puffer-Mix mit konstanter Ionenstärke über den gesamten getesteten pH-Bereich verwendet. So sollten Einflüsse, die durch eine Veränderung der Ionenstärke oder durch einen Pufferwechsel bedingt sind, ausgeschlossen werden. Die Ansätze wurden für 10 bzw. 30 min bei 37 °C mit Neu5Ac inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung abgestoppt und das während der Katalyse gebildete Pyruvat quantifiziert (2.5.9.3). Die optimale Enzymaktivität lag, unabhängig von der Reaktionsdauer, in einem pH-Bereich von pH 7,2-7,8 mit einem Maximum bei pH 7,6 (Abb. 13).

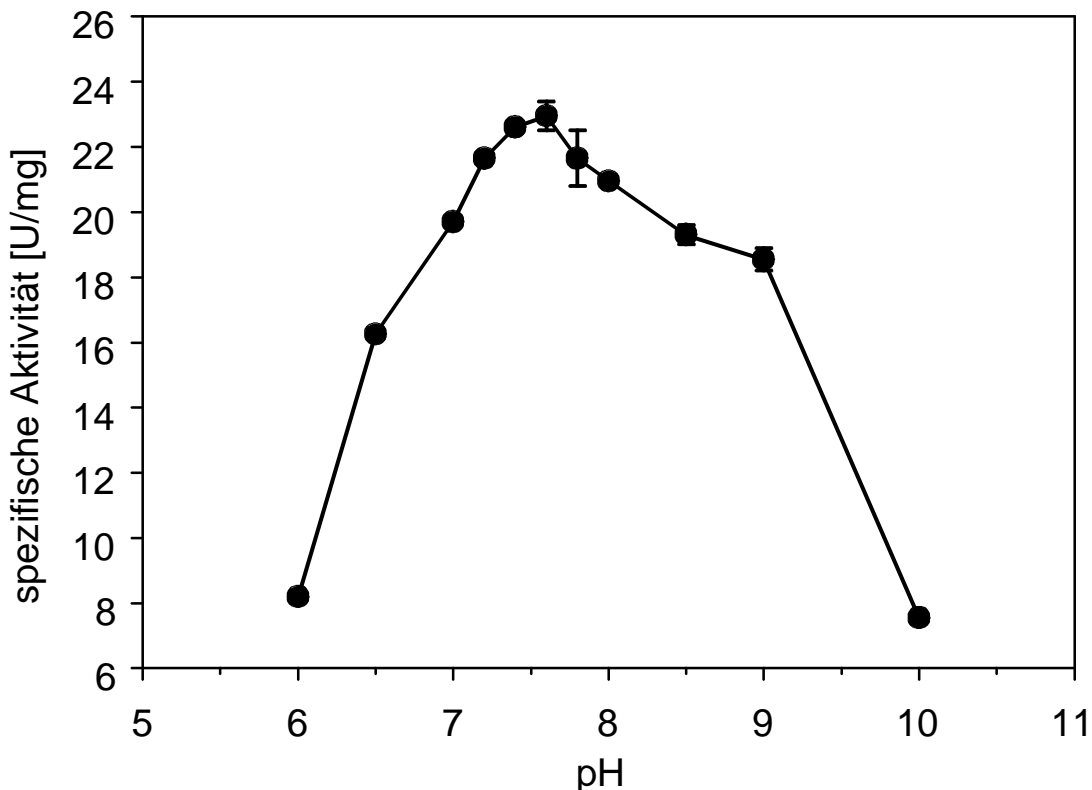


Abb. 13 pH-Abhängigkeit der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens*. Die Enzymreaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C.

3.3.4 Substratspezifität

Mittels fluorimetrischer HPLC wurde die Spaltung von Neu5Ac, Neu5,9Ac₂ und Neu4,5Ac₂ untersucht (2.5.9.6).

Neu5Ac und Neu5,9Ac₂ wurden beide durch die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase gespalten. Allerdings war Neu5Ac ein deutlich besseres Substrat für das Enzym. Die Umsatzrate von Neu5,9Ac₂ im Vergleich zu Neu5Ac betrug zu Beginn der Reaktion, also bei einer Substratkonzentration von 3 mM, etwa 83 %. Mit sinkender Substratkonzentration nahm die Umsatzrate von Neu5,9Ac₂ im Vergleich zu Neu5Ac weiter ab. Nach 5 min lag sie nur noch bei 54 %.

Neu4,5Ac₂ wird nicht durch die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase gespalten.

3.3.5 Kinetische Studien

Für die Bestimmung der kinetischen Daten wurde die spezifische Aktivität der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt. Nach der Theorie von Michaelis und Menten (1913) nimmt die Enzymaktivität bei konstanter Enzymmenge mit steigender Substratkonzentration zunächst (annähernd) linear zu. Mit weiter steigender Substratkonzentration kommt es jedoch zu einer Sättigung, bis schließlich die Maximalgeschwindigkeit (V_{\max}) erreicht ist. Es gilt:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Michaelis-Menten Gleichung})$$

V : Geschwindigkeit der Reaktion

V_{\max} : Maximalgeschwindigkeit der Reaktion

$[S]$: Substratkonzentration

K_M : Michaelis-Konstante

Die Michaelis-Konstante (K_M) ist die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit. Sie ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat.

Die Messungen für die Bestimmung der kinetischen Daten der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* wurden bei 37 °C mit Neu5Ac als Substrat durchgeführt (2.5.9.4). Sie erfolgten sowohl in 50 mM als auch in 250 mM Kaliumphosphatpuffer. In Abb. 14 ist die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase von der Neu5Ac-Konzentration in 250 mM Kaliumphosphatpuffer graphisch dargestellt. Die Ergebnisse der Berechnungen von K_M und V_{\max} nach Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung, die mit Hilfe des Computerprogramms Enzfitter durchgeführt wurden, sind in Tab. 5 aufgeführt.

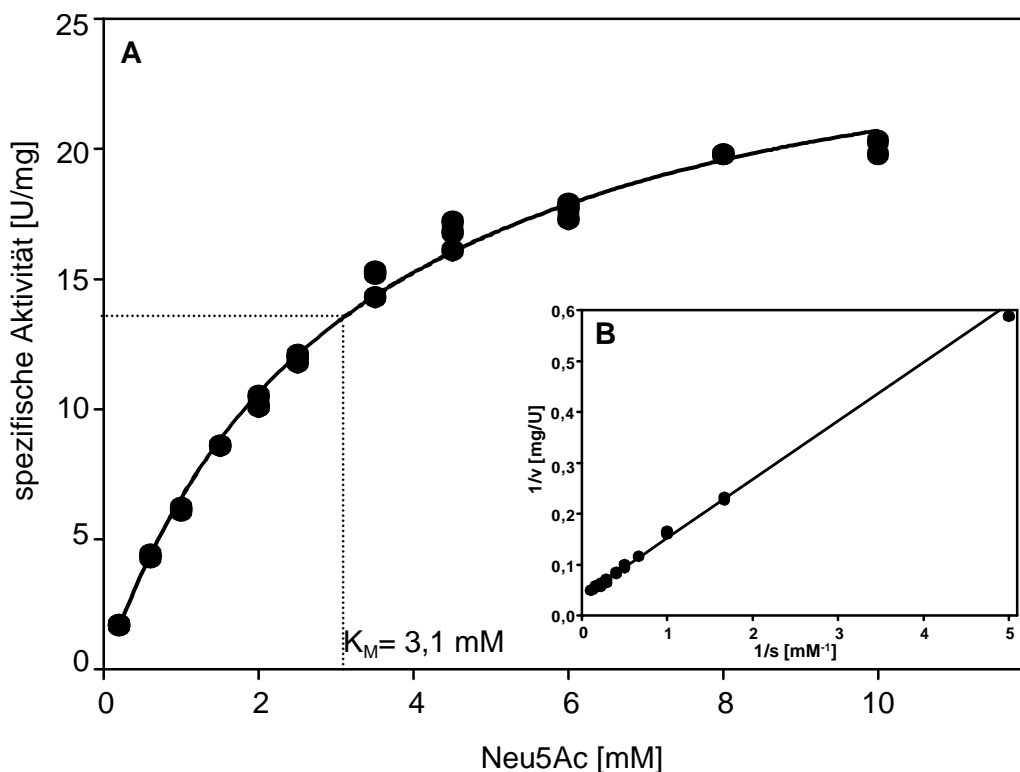


Abb. 14 Aktivität der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Abhängigkeit von der Konzentration an Neu5Ac in 250 mM Kaliumphosphatpuffer. Aus den Meßwerten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Enzfitter die Werte für K_M und V_{\max} berechnet (Tab. 5).

A : Sättigungskurve nach Michaelis-Menten

B : Lineweaver-Burk-Plot

Tab. 5 Kinetische Daten der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* für Neu5Ac als Substrat. Es wurden je zwei unabhängige Messungen in 50 und 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 durchgeführt.

Molarität des Kaliumphosphatpuffers	K_M -Wert (Neu5Ac) [mM]	V_{max} [U/mg]
50 mM	$2,17 \pm 0,17$	$21,12 \pm 0,60$
	$2,04 \pm 0,09$	$22,60 \pm 0,35$
250 mM	$3,13 \pm 0,16$	$27,20 \pm 0,58$
	$3,25 \pm 0,19$	$27,72 \pm 0,68$

Interessanterweise nehmen die Werte von K_M und V_{max} bei zunehmender Phosphatkonzentration beide zu. Dahingegen scheint sich eine erhöhte Salzkonzentration negativ auf die Enzymaktivität auszuwirken (Abb. 15). Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Salzkonzentration wurde bei zwei verschiedenen Neu5Ac-Konzentrationen bestimmt (2.5.9.5). In beiden Fällen zeigt sich eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität bei erhöhten Salzkonzentrationen.

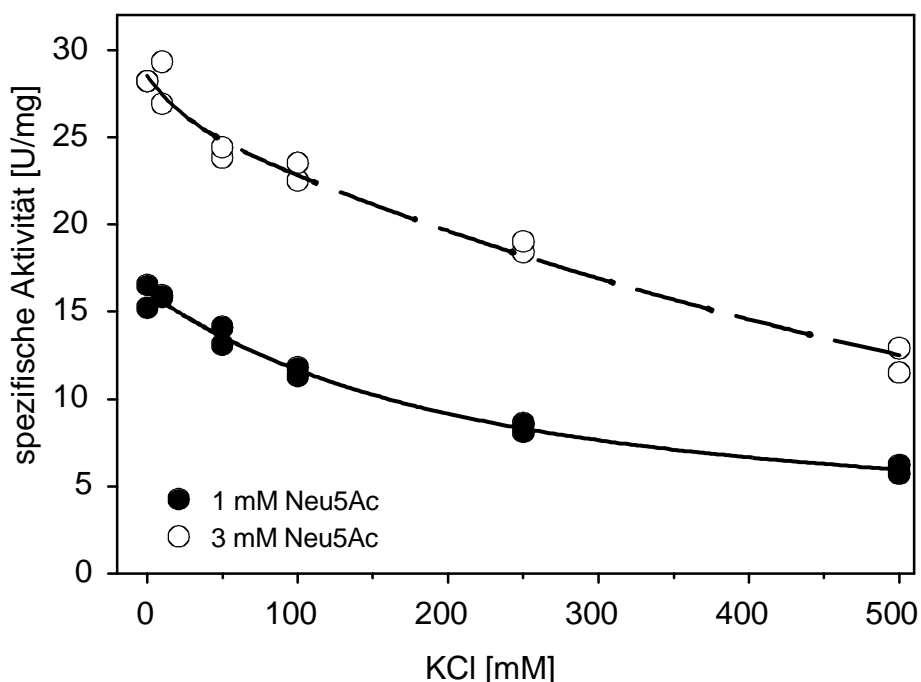


Abb. 15 Einfluß der Salzkonzentration auf die Aktivität der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens*.

3.3.6 Vergleich der Eigenschaften der rekombinanten und der nativen Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens*

Die Eigenschaften der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* wurden mit den Eigenschaften, die für das native Enzym beschrieben wurden, verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Tab. 6 Vergleich der Eigenschaften der rekombinanten und der nativen Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens*.

*¹ : Kolisis *et al.*, 1980

*³ : Shukla und Schauer, 1986

*² : Nees *et al.*, 1976

*⁴ : Zbiral *et al.*, 1992

	natives Enzym	rekombinantes Enzym
Temperaturoptimum	nicht bestimmt	65-70 °C
Thermostabilität	+ * ¹	+
pH-Optimum	7,2 * ²	7,6
Spaltung von Neu4,5Ac₂	- * ³	-
spezifische Aktivität	10 U/mg * ²	27 U/mg
K_M (Neu5Ac)	2,8 mM * ²	3,2 mM
Einfluß von Salz auf die Enzymaktivität	+ * ^{2,4}	+

3.4 Mutagenese des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von *Clostridium perfringens*

Durch die zielgerichtete Mutagenese eines Gens ist es möglich, Proteine herzustellen, in denen Aminosäuren spezifisch ausgetauscht wurden. Die Charakterisierung dieser gezielt veränderten Proteine erlaubt dann einen Einblick in die mögliche Funktion dieser Aminosäurereste im nativen Enzym.

In der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* sollte die Funktion der Aminosäurereste Lysin 161, Tyrosin 133, Aspartat 187 und Glutamat 188 mittels zielgerichteter Mutagenese untersucht werden (s. Einleitung).

3.4.1 Klonierung und Expression der mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasegene

Die zielgerichtete Mutagenese des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von *C. perfringens* erfolgte mittels Megaprimer-PCR (Mutanten in Tyrosin 133) bzw. mittels sequentieller PCR (alle übrigen Mutanten) (2.4.11). Nach Restriktionshydrolyse mit den Endonukleasen *NdeI* und *BamHI* wurden die mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasegene, wie zuvor das Wildtyp-Gen (3.1.2), in den Expressionsvektor pET14b ligiert und in *E. coli* JM101, *E. coli* JM109, *E. coli* DH5 α oder *E. coli* XL1BlueMRF' transformiert. Zur Überprüfung wurden aus je sechs Transformanten die Plasmide präpariert und sequenziert. Von je einem Klon, dessen Plasmid das mutierte Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens* richtig eingebaut

und ohne weitere (ungewollte) Mutation enthielt, wurde eine Glycerinkultur hergestellt. Die Plasmide wurden, je nach eingeführter Mutation, mit mSPL-K,R.14, mSPL-K,Q.14, mSPL-K,A.14, mSPL-Y,F.14, mSPL-Y,H.14, mSPL-Y,W.14, mSPL-Y,C.14, mSPL-D,E.14, mSPL-D,N.14, mSPL-E,D.14, mSPL-E,Q.14 bzw. mSPL-DE,AA.14 bezeichnet.

Für die Expression wurden die Plasmide in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Auch von diesen Klonen wurden Glycerinkulturen angelegt. Die Expression erfolgte nach den für *E. coli* BL21(DE3) pSPL14 optimierten Bedingungen (3.1.3).

3.4.2 Reinigung der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase

Die mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasen von *C. perfringens* wurden über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose gereinigt. Dabei wurde das für die Wildtyp-Lyase SPL14 optimierte Protokoll verwendet (3.2.1). Die Reinheit der Enzyme wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung in einem 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel und anschließende Silberfärbung überprüft (Daten nicht gezeigt). Sie entsprach der Reinheit der Wildtyp-Lyase. Auch die Proteinausbeuten für die gereinigten mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasen entsprachen der für SPL14 erreichten Ausbeute von ca. 10 mg Protein aus 1 l induzierter Kultur.

3.5 Charakterisierung der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens*

Die kinetischen Eigenschaften der mutierten Sialat-Pyruvat-Lyasen von *C. perfringens* sollten bestimmt werden und mit denen der Wildtyp-Lyase verglichen werden, um Einblicke in die möglichen Funktionen der ausgetauschten Aminosäurereste zu erlangen.

3.5.1 Mutanten in Lysin 161

Während der Katalyse durch die Sialat-Pyruvat-Lyase wird eine Schiff'sche Base zwischen einem Lysinrest des Enzyms und dem Substrat ausgebildet. Für das Enzym von *E. coli* konnte durch Röntgenstrukturanalysen gezeigt werden, dass dort Lysin 165 diese Funktion erfüllt (Lawrence *et al.*, 1997). Der in einem Alignment von Sialat-Pyruvat-Lyasen an entsprechender Position liegende Lysinrest im clostridiellen Enzym, Lysin 161, wurde gegen Arginin (K161R), Glutamin (K161Q) und Alanin (K161A) ausgetauscht.

Die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Daten der Mutante K161R wurden in 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 bei 37 °C mit Neu5Ac als Substrat durchgeführt (2.5.9.4). Um Einflüsse, die durch die Enzympräparation bedingt sind, auszuschließen, wurden zwei Messungen mit zwei verschiedenen Enzympräparationen und jeweils neu angesetzten Substrat-Lösungen durchgeführt. In Abb. 16 ist die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Mutante K161R von der Neu5Ac-Konzentration dargestellt.

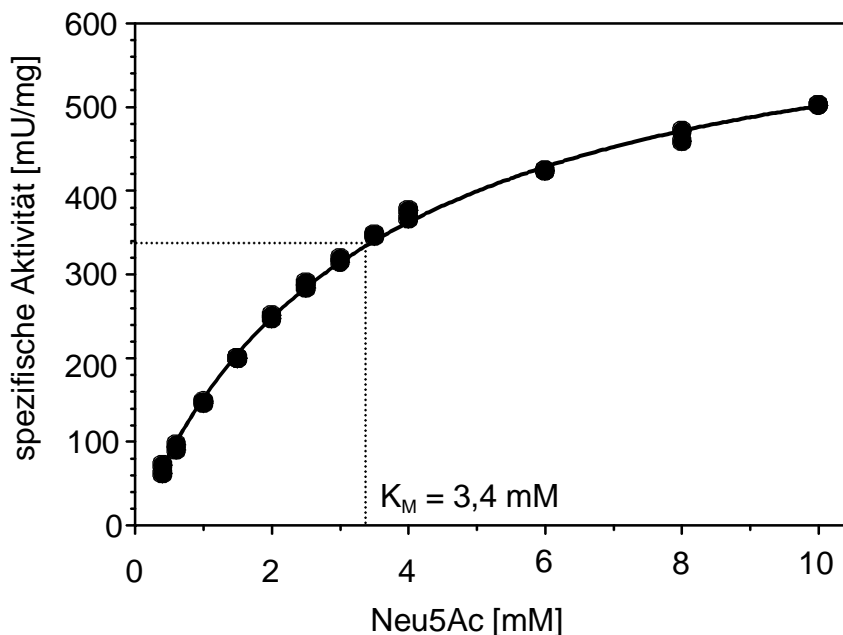


Abb. 16 Aktivität der Mutante K161R in Abhängigkeit von der Neu5Ac-Konzentration.

Die Ergebnisse der Berechnungen von K_M und V_{max} nach Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung, die mit Hilfe des Computerprogramms Enzfitter durchgeführt wurden, sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7 Kinetische Daten der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Lysin 161.

Enzym	K_M -Wert (Neu5Ac) [mM]	V_{max} [mU/mg]
K161R	$3,42 \pm 0,09$	$672,90 \pm 8,05$
	$3,60 \pm 0,13$	$927,53 \pm 15,67$
K161Q	Aktivität bei 10 mM Neu5Ac: ca. 0,5 mU/mg	
K161A	keine Aktivität nachweisbar	

Die Mutante K161Q besitzt nur eine sehr geringe katalytische Aktivität. Im Morgan-Elson-Assay (2.5.2) konnte bei einer Substratkonzentration von 10 mM Neu5Ac eine Enzymaktivität von etwa 0,5 mU/mg nachgewiesen werden (Tab. 7). Eine Messung zur Bestimmung der kinetischen Daten im gekoppelten optischen Test mit Lactat-Dehydrogenase und NADH, wie sie für das Wildtypenzym und die Mutante K161R durchgeführt wurde, war aufgrund der sehr geringen Aktivität der Mutante nicht möglich.

Die Mutante K161A ist inaktiv. Selbst bei sehr hohen Enzymkonzentrationen im Testansatz (bis zu 30 mg/ml!) war keine Aktivität nachweisbar.

Vergleicht man die kinetischen Daten der Mutante K161R mit denen des Wildtyp-Enzyms (Tab. 8), so wird deutlich, dass die Aktivität der Mutante sehr stark vermindert ist. Sie liegt

nur noch bei etwa 3 % der Aktivität des Wildtyps. Dagegen ist der K_M -Wert kaum beeinflusst. Mit 3,5 mM liegt er nur unwesentlich höher als der für den Wildtyp mit 3,2 mM bestimmte Wert. Die Aktivität der Mutante K161Q beträgt nur noch ca. 0,002 % der Aktivität des Wildtyps oder anders ausgedrückt ein 55.000stel.

Tab. 8 Kinetische Daten der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Lysin 161 im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

Enzym	K_M -Wert [mM]	V_{max} [mU/mg]	Aktivität im Vergleich zum Wildtyp
Wildtyp	3,2	27.500	
K161R	3,5	800	3 %
K161Q	-	ca. 0,5	ca. 0,002 %
K161A	keine Aktivität nachweisbar		-

3.5.2 Mutanten in Tyrosin 133

Tyrosin 137 der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* liegt nach den Röntgenstrukturuntersuchungen im aktiven Zentrum des Enzyms, seine Funktion konnte bisher jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Es wird diskutiert, dass dieser Rest möglicherweise die Schiff'sche Base stabilisiert oder eine Rolle bei den Protonentransferprozessen während der Katalyse spielt (Lawrence *et al.*, 1997). Um die Funktion des entsprechenden Tyrosinrestes im clostridiellen Enzym, Tyrosin 133, aufklären zu können, wurde dieser gegen die ebenfalls aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Y133F) und Tryptophan (Y133W), sowie gegen Histidin (Y133H) und Cystein (Y133C) ausgetauscht.

Die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Daten der Mutanten Y133F, Y133H, Y133W und Y133C wurden in 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 bei 37 °C mit Neu5Ac als Substrat durchgeführt (2.5.9.4). Wie bereits bei der Mutante K161R wurden auch hier für jede Mutante zwei unabhängige Messungen durchgeführt. In Abb. 17 ist die Abhängigkeit der Aktivität der Mutanten von der Neu5Ac-Konzentration graphisch dargestellt. Außerdem wurden die Meßwerte mit Hilfe des Computerprogramms Enzfitter an die Michaelis-Menten-Gleichung angepaßt, um so die Werte für K_M und V_{max} zu ermitteln (Tab. 9).

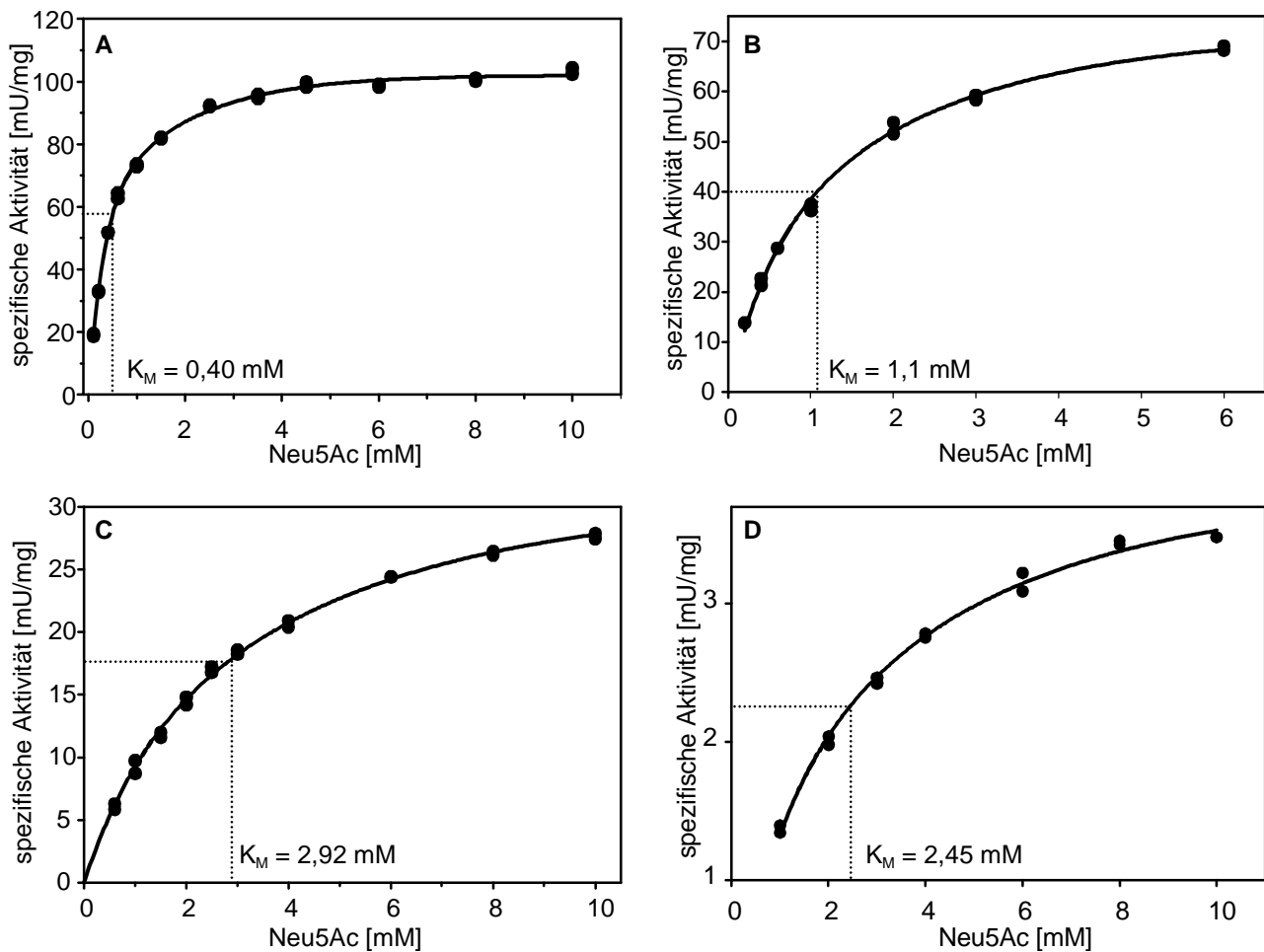


Abb. 17 Aktivität der Mutanten Y133F (A), Y133H (B), Y133W (C) und Y133C (D) in Abhängigkeit von der Neu5Ac-Konzentration.

Tab. 9 Kinetische Daten der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Tyrosin 133.

Enzym	K_M -Wert (Neu5Ac) [mM]	V_{max} [mU/mg]
Y133F	$0,44 \pm 0,01$	$107,16 \pm 0,47$
	$0,40 \pm 0,02$	$113,51 \pm 1,15$
Y133H	$1,10 \pm 0,04$	$80,88 \pm 1,12$
	$0,97 \pm 0,02$	$79,09 \pm 0,60$
Y133W	$2,85 \pm 0,10$	$36,07 \pm 0,55$
	$2,92 \pm 0,08$	$35,94 \pm 0,39$
Y133C	$2,45 \pm 0,23$	$4,54 \pm 0,16$
	$2,24 \pm 0,09$	$4,31 \pm 0,06$

Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (Tab. 10) weisen die Mutanten in Tyrosin 133 alle eine deutlich verminderte Aktivität auf. Die höchste Aktivität weist mit etwa 110 mU/mg die

Mutante Y133F auf, was jedoch nur noch etwa 0,4 % der Aktivität des Wildtyp-Enzyms entspricht. Mit 4,4 mU/mg (0,02 %) besitzt die Mutante Y133C die geringste Aktivität. Auffallend ist, dass die K_M -Werte der Mutanten Y133F und Y133H mit 0,4 mM bzw. 1,0 mM Neu5Ac deutlich niedriger sind als beim Wildtyp-Enzym. Bei der Mutante Y133F liegt er mit 0,4 mM sogar um etwa eine Zehnerpotenz unter dem des Wildtyps. Dagegen liegen die K_M -Werte der Mutanten Y133W und Y133C mit 2,9 mM bzw. 2,3 mM Neu5Ac nur wenig unter dem K_M -Wert des Wildtyps.

Tab. 10 Kinetische Daten der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Tyrosin 133 im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

Enzym	K_M -Wert [mM]	V_{max} [mU/mg]	Aktivität im Vergleich zum Wildtyp
Wildtyp	3,2	27.500	
Y133F	0,4	110	0,4 %
Y133H	1,0	80	0,3 %
Y133W	2,9	36	0,1 %
Y133C	2,3	4,4	0,02 %

Für die beiden Mutanten Y133H und Y133W wurde auch die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität untersucht (2.5.9.3). In beiden Fällen unterschied sie sich nicht von der des Wildtyp-Enzyms (Daten nicht gezeigt).

3.5.3 Mutanten in Aspartat 187 und Glutamat 188

Aspartat 191 und Glutamat 192 der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* liegen ebenfalls im aktiven Zentrum des Enzyms und sind vermutlich an der Bindung der Glycerinseitenkette des Substrates beteiligt (Lawrence *et al.*, 1997). Sie sind in allen bekannten Sialat-Pyruvat-Lyasesequenzen konserviert; die entsprechenden Reste im clostridiellen Enzym sind Aspartat 187 und Glutamat 188. Aspartat 187 wurde gegen Glutamat (D187E) und Asparagin (D187N) ausgetauscht, Glutamat 188 gegen Aspartat (E188D) und Glutamin (E188Q). Außerdem wurde eine Doppelmutante hergestellt, in der beide Aminosäurereste gegen Alanin (DE187,188AA) ausgetauscht wurden.

3.5.3.1 kinetische Studien

Die Messungen zur Bestimmung der kinetischen Daten der Mutanten D187E, D187N, E188D und E188Q wurden in 250 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 bei 37 °C mit Neu5Ac als Substrat durchgeführt (2.5.9.4). In Abb. 18 ist die Abhängigkeit der Aktivität der Mutanten von der Neu5Ac-Konzentration graphisch dargestellt.

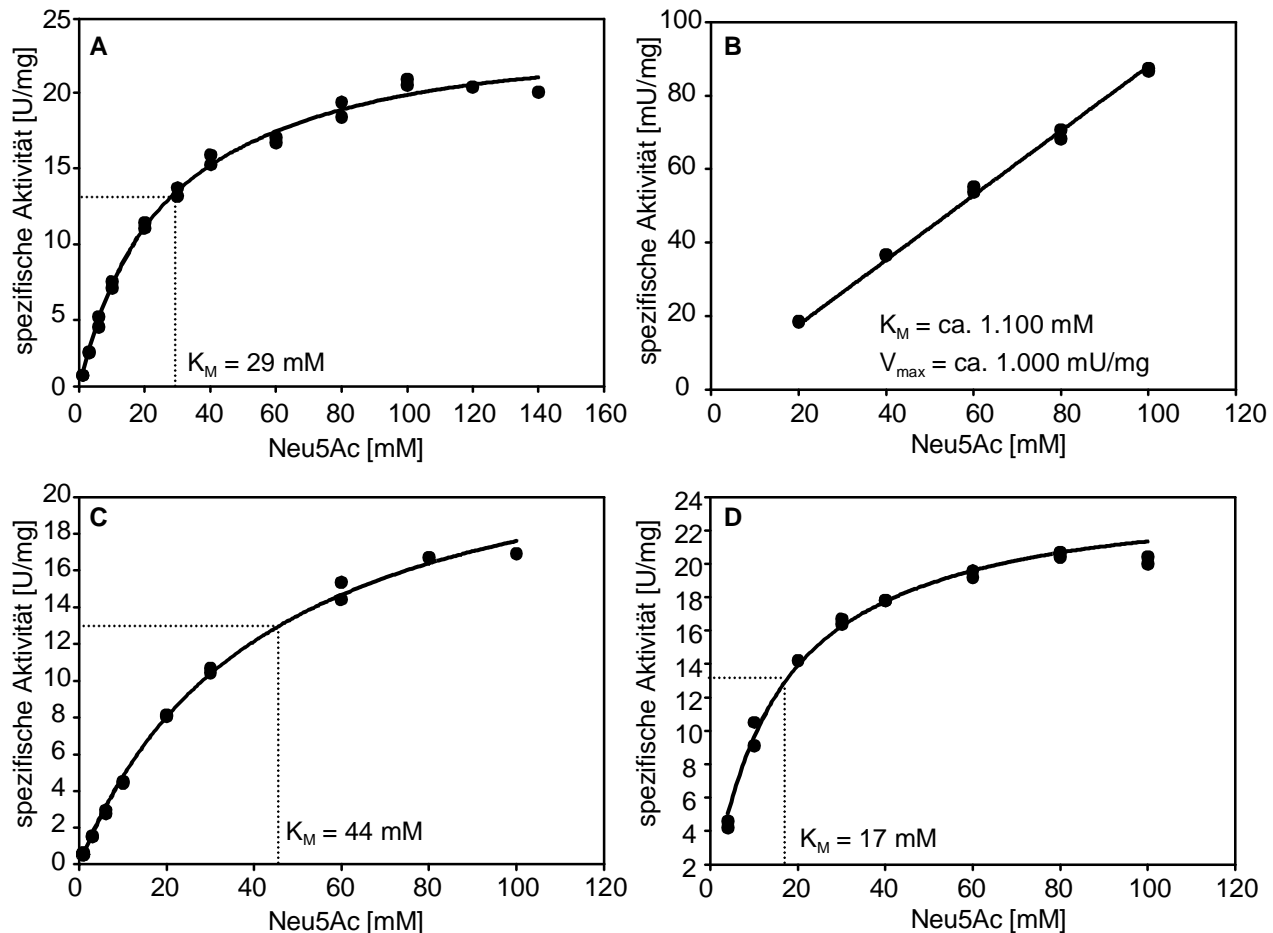


Abb. 18 Aktivität der Mutante D187E (A), D187N (B), E188D (C) und E188Q (D) in Abhängigkeit von der Neu5Ac-Konzentration.

Die Ergebnisse der Berechnungen von K_M und V_{max} nach Anpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung, die mit Hilfe des Computerprogramms Enzfitter durchgeführt wurden, sind in Tab. 11 aufgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich bei der Berechnung der kinetischen Daten der Mutante D187N nur um eine sehr grobe Näherung handelt. Wie in der graphischen Darstellung der Meßwerte der Mutante D187N deutlich zu erkennen ist, liegen alle Meßwerte auf einer Geraden, also in einem Bereich, wo die Enzymaktivität noch proportional zur Substratkonzentration ist (Abb. 18B). Für die Genauigkeit der Berechnung wäre es jedoch nötig, auch Messungen im Bereich der Substratsättigung des Enzyms durchzuführen. Genaue Messungen der Enzymaktivität bei Neu5Ac-Konzentrationen über 100 mM waren jedoch aus methodischen Gründen nicht möglich. Bei 100 mM Neu5Ac besitzt die Mutante D187N eine Enzymaktivität von ca. 87 mU/mg.

Tab. 11 Kinetische Daten der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Aspartat 187 und Glutamat 188.

Enzym	K_M -Wert (Neu5Ac) [mM]	V_{max} [U/mg]
D187E	$26,4 \pm 1,4$	$25,04 \pm 0,46$
	$31,8 \pm 1,9$	$26,41 \pm 0,60$
D187N	(1.100 ± 200)	$(1,04 \pm 0,21)$
	Aktivität bei 100 mM Neu5Ac: ca. 87 mU/mg	
E188D	$45,6 \pm 4,6$	$23,36 \pm 1,09$
	$42,7 \pm 2,5$	$25,11 \pm 0,69$
E188Q	$18,5 \pm 1,3$	$28,54 \pm 0,59$
	$15,6 \pm 1,0$	$24,68 \pm 0,48$
DE187,188AA	Aktivität bei 10 mM Neu5Ac: ca. 1,7 mU/mg	
	Aktivität bei 100 mM Neu5Ac: ca. 2,3 mU/mg	

Die Doppelmutante DE187,188AA besitzt nur eine sehr geringe katalytische Aktivität. Selbst bei 100 mM Neu5Ac beträgt die Enzymaktivität der Mutante DE187,188AA nur 2,3 mU/mg, also etwa 0,007 % bzw. ein 12.000stel der Enzymaktivität des Wildtyps (Tab. 11 und Tab. 12). Eine Messung zur Bestimmung der kinetischen Daten im gekoppelten optischen Test mit Lactat-Dehydrogenase und NADH war aufgrund der sehr geringen Aktivität der Mutante nicht möglich.

Vergleicht man die kinetischen Eigenschaften der Mutanten D187E, E188D und E188Q mit denen des Wildtyps (Tab. 12), so wird deutlich, dass V_{max} kaum beeinflusst ist. Die Aktivität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp liegt zwischen 88 % und 97 %. Dagegen ist der K_M -Wert für Neu5Ac in den drei Mutanten deutlich erhöht. Bei E188Q ist er etwa fünffach, bei D187E etwa zehnfach und bei E188D etwa 15fach höher als beim Wildtyp.

Tab. 12 Kinetische Daten der Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Aspartat 187 und Glutamat 188 im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

Enzym	K_M -Wert [mM]	V_{max} [U/mg]	Aktivität im Vergleich zum Wildtyp
Wildtyp	3,2	27,5	
D187E	29	25,7	93 %
D187N	ca. 1.100	ca. 1	ca. 4 %
E188D	44	24,2	88 %
E188Q	17	26,6	97 %
DE187,188AA	-	ca. 0,002	ca. 0,007 %

Der berechnete K_M -Wert der Mutante D187N liegt bei etwa 1.100 mM Neu5Ac, also über 1 M! Der Fehler in der Berechnung ist zwar sehr hoch, da Messungen der Enzymaktivität nur bis 100 mM Neu5Ac möglich waren, also bei Substratkonzentrationen, die deutlich unter dem errechneten K_M -Wert liegen. Trotzdem wird deutlich, dass bei dieser Mutante der K_M -Wert besonders stark beeinflusst ist.

3.5.3.2 Spaltung von Neu5,9Ac₂ durch E188D und E188Q

Nach neueren Untersuchungen scheint die Carboxylgruppe von Glutamat 192 der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* mit der Hydroxylgruppe an C₉ der Sialinsäure eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden (Ooi, 1999). Da durch die Mutation des entsprechenden Glutamatrestes im clostridiellen Enzym möglicherweise die Substratspezifität bezüglich C₉ der Sialinsäure verändert wurde, sollte exemplarisch die Spaltung von 9-O-acetylierter Sialinsäure (Neu5,9Ac₂) durch die beiden Mutanten E188D und E188Q untersucht werden.

Die Spaltung von Neu5,9Ac₂ durch die Mutanten E188D und E188Q wurde mittels fluorimetrischer HPLC untersucht (2.5.9.6.1). Beide Mutanten spalten Neu5,9Ac₂ annähernd genauso gut wie Neu5Ac (Abb. 19), im Unterschied zum Wildtyp-Enzym, bei dem die Umsatzrate von Neu5,9Ac₂ im Vergleich zu Neu5Ac deutlich erniedrigt ist (3.3.4). Von den drei Enzymen spaltet die Mutante E188Q Neu5,9Ac₂ am besten (Abb. 20). Die Umsatzrate von Neu5,9Ac₂ durch die Mutante E188Q im Vergleich zum Wildtyp-Enzym liegt bei etwa 120-130 %. Dagegen spaltet die Mutante E188D Neu5,9Ac₂ etwa ebenso gut wie das Wildtyp-Enzym.

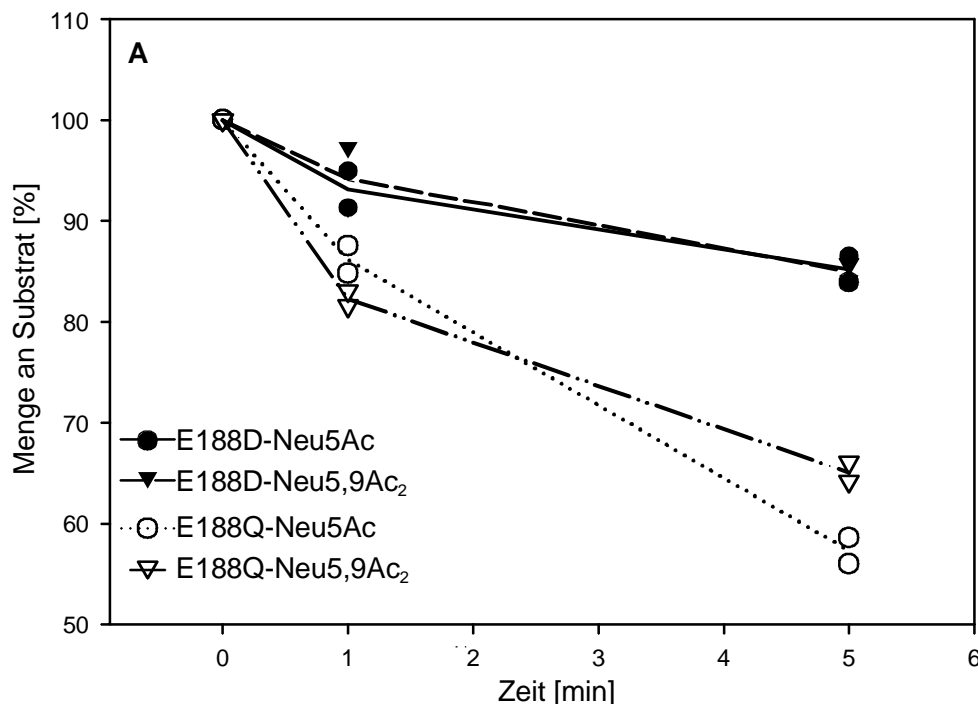


Abb. 19 Vergleich der Spaltung von Neu5,9Ac₂ durch die Mutanten E188D und E188Q.

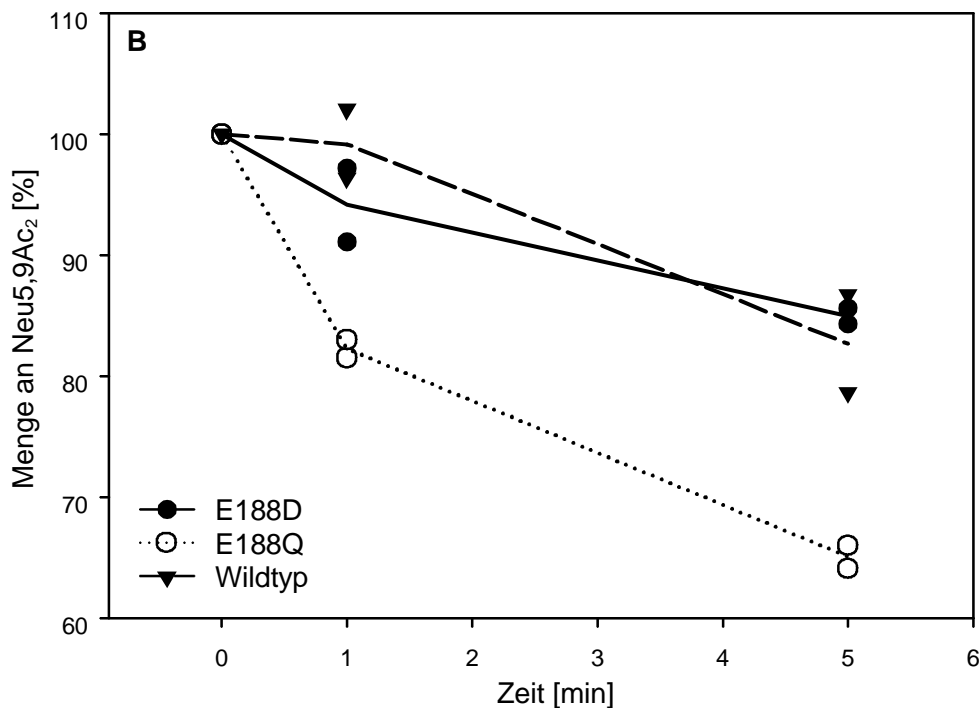


Abb. 20 Spaltung von Neu5,9Ac₂ durch die Mutanten E188D und E188Q im Vergleich zum Wildtyp.

4 Diskussion

Obwohl die Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens* von allen Sialat-Pyruvat-Lyasen das am besten untersuchte Enzym ist und auch in der Sialinsäureanalytik und für chemoenzymatische Synthesen sehr häufig eingesetzt wird (siehe Einleitung), ist dieses Enzym bisher nicht rekombinant im größeren Maßstab hergestellt worden. Die rekombinante Expression ist bisher nur für die Sialat-Pyruvat-Lyasen aus *E. coli* (Aisaka und Uwajima, 1986; Aisaka *et al.*, 1991; Lilley *et al.*, 1992) und *Haemophilus influenzae* (Lilley *et al.*, 1998) beschrieben worden. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* rekombinant zu exprimieren und das Enzym in großen Mengen zu reinigen. Dabei sollten unter anderem auch ausreichende Mengen für eine Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse hergestellt werden. Außerdem sollte die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* charakterisiert werden, um ihre Eigenschaften mit denen des nativen, aus Zellen von *C. perfringens* gereinigten Enzyms vergleichen zu können.

Um die Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens* rekombinant herzustellen, wurde das Sialat-Pyruvat-Lyasegen aus genomischer DNA von *C. perfringens* amplifiziert und in die Expressionsvektoren pET14b und pET19b ligiert. Die Plasmide mit dem Sialat-Pyruvat-Lyasegen von *C. perfringens* als Insert, pSPL14 und pSPL19, wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und erfolgreich exprimiert. In beiden Fällen wurde die Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* als Fusionsprotein mit einem His-Tag exprimiert (SPL14 und SPL19). Das sollte auf der einen Seite gewährleisten, die rekombinante clostridielle Sialat-Pyruvat-Lyase von „endogenen“ Proteinen, vor allem von der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* abtrennen zu können. Die Verunreinigung eines rekombinanten Proteins mit „endogenen“ Proteinen von *E. coli* wurde z. B. bei der Reinigung der rekombinanten kleinen Sialidase von *C. perfringens* beobachtet (Roggentin *et al.*, 1995), das Problem konnte aber durch die Expression als Fusionsprotein mit einem His-Tag behoben werden (Kruse, 1996). Auf der anderen Seite ermöglicht der His-Tag aber auch eine relativ einfache und effiziente Reinigung des rekombinanten Proteins über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Janknecht *et al.*, 1991; Crowe *et al.*, 1994).

Die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase lag als lösliches Protein im Cytoplasma vor, die Bildung von Einschlußkörpern, sogenannten Inclusion-Bodies, wurde nicht beobachtet. Daher befand sich das rekombinante Enzym nach Aufschluß der Zellen durch Einfrieren und Auftauen und anschließende Ultrazentrifugation auch im Zellüberstand. Die Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase aus dem löslichen Überstand erfolgte dann über eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose. Die besseren Reinigungserfolge wurden mit SPL14 erreicht, obwohl der His-Tag nur sechs Histidinreste umfasst, während der His-Tag von SPL19 aus neun Histidinresten besteht. Daher wurde vor allem mit SPL14 weitergearbeitet. Es gelang die Reinigung von SPL14 so zu optimieren, dass es möglich war, das Enzym in einem Schritt zu reinigen, mit einer Ausbeute von etwa 75 %.

Aus 1 l induzierter BL21(DE3) pSPL14-Kultur, also aus wenigen Gramm feuchter Zellmasse, war es dabei möglich, etwa 10 mg reines Protein zu gewinnen. Zum Vergleich: Für die Reinigung der „nativen“ Sialat-Pyruvat-Lyase aus Zellen von *C. perfringens* waren insgesamt fünf Reinigungsschritte nötig. Die Ausbeute betrug dabei etwa 25 %, wobei 1 kg feuchte Zellmasse von *C. perfringens*-Zellen benötigt wurde, um etwa 12 mg der Sialat-Pyruvat-Lyase zu reinigen (Nees *et al.*, 1976). Der Vergleich zeigt eindrucksvoll und anschaulich die Vorteile der rekombinanten Expression.

Durch Auftrennung der über die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose gereinigten rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase SPL14 auf einem SDS-Polyacrylamidgel konnte gezeigt werden, dass das Protein durch diese Ein-Schritt-Reinigung bereits weitestgehend gereinigt werden konnte. Trennt man ca. 0,5 µg auf einem SDS-Polyacrylamidgel auf, so ist nach Silberfärbung nur eine einzige Bande bei etwa 35 kDa zu erkennen. Auch auf einem nativen Polyacrylamidgel ist nur eine einzige, sehr distinkte Bande nach Silberfärbung sichtbar. Das bekräftigt zum einen die Reinheit der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* und spricht, zusammen mit den Daten aus der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dafür, daß sie gut von der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* abgetrennt werden konnte. Zum anderen ist es aber auch ein Beleg für die strukturelle Homogenität des Enzyms. Das wiederum spricht für die hohe Qualität der gereinigten Sialat-Pyruvat-Lyase (einheitliche Proteinfaltung und Konformation; keine partielle Oxidation von Cysteinresten etc.) und damit für die sehr schonende Reinigung des Enzyms (Lorber und Giegé, 1992). So konnte z. B. auf eine Ammoniumsulfat-Fällung, die die Struktur des Proteins sehr strapaziert und bei der Reinigung des nativen Enzyms eingesetzt wurde (Nees *et al.*, 1976), verzichtet werden. Eine strukturell sehr homogene Enzympräparation ist neben der Reinheit Voraussetzung für eine optimale Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse (Lorber und Giegé, 1992; Ficner, 1998). Und auch für die Charakterisierung des Enzyms ist es wünschenswert, dass es bei der Reinigung möglichst wenig in seiner Struktur und in seiner Aktivität beeinträchtigt ist.

Wurden relativ große Mengen (ca. 5 µg) der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, so sind nach intensiver Silberfärbung einige schwache Banden kontaminierender Proteine, vor allem im Bereich zwischen 20 und 30 kDa sichtbar. Durch Optimierung der Metall-Chelat-Chromatographie ließen sich diese zwar in ihrer Intensität verringern, jedoch nicht vollständig abtrennen. Es wurde versucht, diese Proteine durch weitere Chromatographien abzutrennen, weil sie möglicherweise die Kristallisation des Enzyms stören könnten. Durch Anionenaustauschchromatographie an Poros HQ ließen sich die kontaminierenden Proteine zwar abtrennen, jedoch sank dabei die spezifische Aktivität der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase auf etwa die Hälfte ab. Dieser Aktivitätsverlust trat bereits beim Pufferwechsel auf, war also nicht durch die Chromatographie selbst oder durch die Abtrennung eines Faktors bedingt. Auch die Wahl des Umpufferungsverfahrens hatte kaum Einfluß auf die Aktivitätsverluste. Sowohl die Dialyse als auch die Umpufferung mit Hilfe von NAP-Säulen wurden außerdem auch an anderen Stellen der Arbeit eingesetzt, führten dort aber nicht zu nennenswerten Aktivi-

tätsverlusten. Da sich die Aktivität der Sialat-Pyruvat-Lyase durch erneutes Umpuffern in einen Phosphatpuffer nicht rekonstituieren ließ, wurde das Enzym vermutlich irreversibel geschädigt. Es ist also gut möglich, dass der Aktivitätsverlust auf eine geringere Stabilität des Enzyms in Bis-Tris- und Tris-Puffer zurückzuführen ist. Der pH-Wert der Puffer spielt dabei vermutlich keine Rolle: Mit pH 6,5 (Bis-Tris-Puffer) und pH 7,5 (Tris-Puffer) liegen die pH-Werte beider Puffer im Bereich der in dieser Arbeit auch zur Lagerung der Enzyme verwendeten Phosphatpuffer, deren pH-Werte zwischen pH 6,0 und pH 7,2 lagen. Auch nach zwei-monatiger Lagerung bei 4 °C traten dort keine nennenswerten Aktivitätsverluste auf.

Die weitere Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie an Mono S brachte keinen Erfolg. Und auch durch Gelfiltration an Superose 12 ließen sich die kontaminierenden Proteine nicht abtrennen, obwohl sie mit einer Größe von 20-30 kDa zumindest unter denaturierenden Bedingungen deutlich kleiner sind als die Sialat-Pyruvat-Lyase, die unter nativen Bedingungen nach Gelfiltration etwa 100 kDa groß ist. Entweder bilden die kontaminierenden Proteine ebenfalls Oligomere, oder sie sind unter nativen Bedingungen durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Sialat-Pyruvat-Lyase assoziiert. Letzteres scheint ein weit verbreitetes Problem bei der Reinigung von Proteinen mit His-Tag zu sein (Hochuli *et al.*, 1987; Hengen, 1995). Auf eine weitere Reinigung des Proteins durch eine Hitzefällung, wie sie von Kolisis *et al.* (1980) für die Reinigung der Sialat-Pyruvat-Lyasen vorgeschlagen wurde, wurde bewußt verzichtet, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Faltung des Proteins dadurch doch beeinflusst wird, vor allem, wenn man bedenkt, dass eine Inaktivierung des Enzyms durch Hitze nur durch Zugabe von Substrat (Pyruvat) verhindert werden kann. Da die Sialat-Pyruvat-Lyase auch schon nach der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie weitgehend rein ist und, wie bereits erwähnt, für eine gute Röntgenstrukturanalyse nicht nur die Reinheit, sondern vor allem auch die strukturelle Homogenität der Enzympräparation wichtig ist, wurde auf die weitere Reinigung des Enzyms verzichtet. Der Arbeitsgruppe von Dr. G. Taylor ist es inzwischen gelungen, die so über die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigte rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* zu kristallisieren.

Die Expressionsvektoren pET14b und pET19b, die für die Klonierung des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von *C. perfringens* verwendet wurden, sind so konstruiert, dass sich im rekombinant exprimierten Protein zwischen dem N-terminalen His-Tag und der eigentlichen Sialat-Pyruvat-Lyasesequenz die Erkennungssequenz und Schnittstelle für eine Protease (Thrombin bzw. Enterokinase) befindet. Nach der erfolgreichen Reinigung der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyasen wurde daher versucht, den His-Tag durch enzymatische Hydrolyse mit Thrombin (SPL14) bzw. Enterokinase (SPL19) zu entfernen. Neben den Reaktionsbedingungen, die von den Firmen, von denen die Proteasen bezogen wurden, empfohlen worden waren, wurden auch verschiedene andere, in der Literatur veröffentlichte Bedingungen getestet (u. a. LaVallie und McCoy, 1997; Chang, 1985, Ratajczak *et al.*, 1995). Unter allen getesteten Bedingungen ließen sich die His-Tags jedoch weder von SPL14 noch von SPL19 entfernen. Es ist daher zu vermuten, dass die Schnittstellen für

die Proteasen unter nativen Bedingungen nicht zugänglich sind. Auf eine enzymatische Hydrolyse unter denaturierenden Bedingungen wurde verzichtet. Zum einen ist die anschließend notwendige Renaturierung des Proteins nie 100 %ig, so dass die Struktur des renaturierten Proteins meist sehr inhomogen ist und auch die Aktivität nicht vollständig wiederhergestellt werden kann (Dr. L. Shaw, persönliche Mitteilung). Zum anderen hat der His-Tag selbst meist keinen Einfluß auf die Tertiärstruktur und Funktion der Proteine (Döbeli *et al.*, 1990; QIAGEN, 1997), stört also nicht. So scheint der His-Tag auch bei der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase die Funktion des Enzyms nicht zu beeinflussen, wie die Charakterisierung des Enzyms zeigte. Die spezifische Aktivität der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase lag mit 27 U/mg sogar etwa dreifach höher als die spezifische Aktivität des nativen Enzyms aus *C. perfringens*.

Der Vergleich der Eigenschaften der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase mit denen des nativen, aus *C. perfringens* gereinigten Enzyms zeigt, dass beide Enzyme in ihren Eigenschaften gut übereinstimmen, sich in einigen Punkten aber auch unterscheiden (Tab. 6, Ergebnisse). So liegt das pH-Optimum des rekombinanten Enzyms mit pH 7,6 über dem für das native Enzym bestimmten Wert von pH 7,2 (Nees *et al.*, 1976). Allerdings liegt das unter Umständen auch an den unterschiedlichen Testbedingungen in beiden Studien. Für das native Enzym wurden zum einen keine Messungen zwischen pH 7,2 und pH 8,0 durchgeführt, das pH-Optimum kann also auch zwischen pH 7,2 und pH 8,0 liegen. Zum anderen wurde für die Messungen bei pH 7,2 ein anderes Puffersystem (Phosphatpuffer) verwendet als bei pH 8,0 (Tris-Borat-Puffer). Damit wurde jedoch nicht nur der pH des Puffers geändert, sondern auch die Art und die Ionenstärke des Puffers. Verschiedene Untersuchungen mit der Sialat-Pyruvat-Lyase aus *E. coli* haben jedoch gezeigt, daß die Enzymaktivität in verschiedenen Puffern bei gleichem pH-Wert z. T. sehr unterschiedlich ist (Uchida *et al.*, 1984) und auch von der Ionenstärke des Puffers abhängt (Ferrero *et al.*, 1996). Und auch Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Enzymaktivität von der Ionenstärke des Puffers beeinflusst wird. Daher wurde zur Bestimmung des pH-Optimums der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* hier über den gesamten gemessenen pH-Bereich das gleiche Puffersystem, ein Drei-Puffer-Mix mit konstanter Ionenstärke, verwendet (Ellis und Morrison, 1982). Diese Untersuchung ist damit bisher die einzige, bei der das pH-Optimum unabhängig von der Ionenstärke des Puffers bestimmt wurde. Im Unterschied zu den meisten anderen veröffentlichten Untersuchungen zum pH-Optimum der Sialat-Pyruvat-Lyasen erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität außerdem nicht durch Nachweis des bei der Spaltung gebildeten Mannosamins, sondern durch Nachweis des gebildeten Pyruvats. Zunächst wurde auch im Rahmen dieser Arbeit versucht, das pH-Optimum mit Hilfe des Morgan-Elson Assays (Nachweis des Mannosamins) zu bestimmen. Nach Reissig *et al.* (1955) ist die Farbentwicklung im Morgan-Elson-Assay jedoch pH-abhängig, mit einem Optimum bei pH 9,0. Daher wurden zunächst Vorversuche mit Mannosamin-Lösungen unterschiedlicher pH-Werte durchgeführt. Wie diese jedoch zeigten, ist die Farbentwicklung bei gleicher Mannosamin-Konzentration in einem Puffer mit niedrigem pH-Wert geringer als im gleichen

Puffer mit hohem pH-Wert (Daten nicht gezeigt); der Boratpuffer, der im Morgan-Elson-Assay vor dem Nachweis zugefügt wird, um einen alkalischen pH-Wert einzustellen, scheint die pH-Unterschiede der Ausgangslösungen nicht ausgleichen zu können. Man müsste also, wenn man das pH-Optimum mit Hilfe des Morgan-Elson-Assays bestimmen wollte, eigentlich für jeden pH-Wert eine Standardkurve mit unterschiedlichen Mannosamin-Konzentrationen aufnehmen. Vorversuche zur Bestimmung des pH-Optimums durch Nachweis des gebildeten Pyruvats mit Hilfe von Lactat-Dehydrogenase und NADH haben gezeigt, daß der pH-Wert des Reaktionsansatzes, in dem die Lyasereaktion stattfindet, keinen Einfluß auf die Messung hat. Möglicherweise lassen sich durch die Probleme bei der Bestimmung des pH-Optimums mit Hilfe des Morgan-Elson-Assays auch die Unterschiede im pH-Optimum der nativen und der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* erklären. Uchida *et al.* (1984) haben für das native Enzym aus *E. coli* mittels Morgan-Elson-Assay ein pH-Optimum von 7,8 bestimmt, während Aisaka *et al.* (1991), die das gebildete Pyruvat nachgewiesen haben, für das rekombinante Enzym aus *E. coli* ein pH-Optimum von 6,5-7,0 ermittelt haben.

Das Temperaturoptimum der nativen Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* ist nicht bestimmt worden. Mit 65-70 °C liegt das Temperaturoptimum des rekombinanten Enzyms allerdings nur knapp unter den für die Sialat-Pyruvat-Lyasen aus *E. coli* und aus Schweineniere bestimmten Werten von 75-80 °C (Uchida *et al.*, 1984; Aisaka *et al.*, 1991; Sommer *et al.*, 1999). Aufgrund des relativ hohen Temperaturoptimums der bisher nur aus mesophilen Organismen isolierten Sialat-Pyruvat-Lyasen spekulierte Dr. D. Grimmecke, dass der Mechanismus der Lyasereaktion möglicherweise sehr alt sei (Schauer *et al.*, 1999). Allerdings wird andererseits vermutet, dass die höheren Tiere, vermutlich die *Echinodermata*, die Erfinder der Sialinsäuren und der Enzyme des Sialinsäurestoffwechsels sind und die Mikroorganismen die Gene dieser Enzyme, also auch die Sialat-Pyruvat-Lyasegene, von den höheren Tieren durch horizontalen Gentransfer erworben haben (Schauer und Kamerling, 1997). Das würde jedoch dafür sprechen, dass die Sialat-Pyruvat-Lyasen evolutiv relativ junge Enzyme sind.

Interessanterweise sind die Sialat-Pyruvat-Lyasen alle (moderat) thermostabil, insbesondere in Gegenwart von Pyruvat. Wie das native Enzym kann auch die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* in Gegenwart von 80 mM Pyruvat ohne Aktivitätsverlust auf 70 °C erhitzt werden. Worauf die Thermostabilität der Sialat-Pyruvat-Lyasen beruht, ist unbekannt. Dr. G. Taylor (persönliche Mitteilung) meinte, dass die tetramere Struktur dabei eine Rolle spielen könnte, da viele thermostabile Enzyme Tetramere bilden. Shima *et al.* (1998) konnten z. B. zeigen, daß die Formyltransferase von *Methanopyrus kandleri* als Tetramer thermostabiler ist, als wenn sie als Mono- oder Dimer vorliegt. Für die Thermostabilität von Proteinen sind darüberhinaus vor allem Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zwischen den Untereinheiten von großer Bedeutung (Vogt *et al.*, 1997; Ermler *et al.*, 1997). Durch zielgerichtete Mutagenese von Aminosäureresten, die an solchen Salzbrücken beteiligt sind, konnten verschiedene Autoren zeigen, wie wichtig diese Salzbrücken für die Thermostabilität sind (Kawamura *et al.*, 1997; Merz *et*

al., 1999). Ob und wieviele solcher Salzbrücken zwischen den Untereinheiten der Sialat-Pyruvat-Lyasen bestehen, ist bisher nicht untersucht worden. Die Röntgenstruktur ist bisher nur vom Enzym aus *E. coli* bekannt (Izard *et al.*, 1994), in der Veröffentlichung wird jedoch nicht auf Wechselwirkungen und Bindungen zwischen den Untereinheiten eingegangen.

Die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase stimmen sehr gut mit den kinetischen Eigenschaften des nativen Enzyms, aber auch anderer Sialat-Pyruvat-Lyasen überein. Der K_M -Wert für Neu5Ac lag mit 3,2 mM etwa genauso hoch wie der von Nees *et al.* (1976) bestimmte K_M -Wert des nativen Enzyms von 2,8 mM. Mit etwa 1,7-3,7 mM liegen die K_M -Werte aller untersuchten Sialat-Pyruvat-Lyasen für Neu5Ac, dem wichtigsten Substrat der Enzyme in der Natur, relativ hoch und vermutlich deutlich über der Konzentration von Neu5Ac in Zellen. Das ist allerdings nicht ungewöhnlich und für eine Reihe von Enzymen z. B. der Glykolyse beobachtet worden (Fersht, 1985). Es ist energetisch auch günstiger, wenn das Substrat nur schwach gebunden wird, dafür aber ein Übergangsstadium (transition state) fester.

Mit 27 U/mg war die spezifische Aktivität des rekombinanten Enzyms etwa dreimal höher als die des nativen Enzyms mit 10 U/mg. Da die spezifische Aktivität eines Enzyms oftmals von der Enzympräparation abhängt, ist das ein weiterer Beleg für die schonende Reinigung und die hohe Qualität der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase. Interessanterweise nehmen sowohl der K_M -Wert als auch V_{max} mit steigender Phosphatkonzentration zu. Während die Werte für K_M und V_{max} in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei 2,1 mM und 22 U/mg lagen, stiegen sie in 250 mM Kaliumphosphatpuffer auf 3,2 mM und 27 U/mg an. Auf einen ähnlichen Effekt bei der nativen Sialat-Pyruvat-Lyase kann zumindest im Bezug auf den K_M -Wert aus zwei verschiedenen Studien geschlossen werden, in denen Kaliumphosphatpuffer unterschiedlicher Molarität verwendet wurden (Nees *et al.*, 1976; Zbiral *et al.*, 1992). Zbiral *et al.* (1992) bestimmten einen K_M -Wert von 1,9 mM für Neu5Ac in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, Nees *et al.* (1976) einen von 2,8 mM in 100 mM Kaliumphosphatpuffer. Worauf der Effekt genau beruht, ist unklar, da Chloridionen einen gegenteiligen Effekt auszuüben scheinen: Mit steigender Kaliumchloridkonzentration sinkt die Enzymaktivität. Möglicherweise hemmen hohe Salzkonzentrationen die Enzymaktivität, während Phosphationen oder eine steigende Ionenstärke des Puffers einen positiven Effekt auf die Sialat-Pyruvat-Lyase ausüben.

Ist die Hydroxylgruppe an C₄ der Sialinsäure acetyliert (Neu4,5Ac₂), so kann die Sialinsäure nicht mehr durch die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* gespalten werden, wie durch Analyse mit Hilfe der fluorimetrischen HPLC gezeigt werden konnte. Für die native clostridielle Sialat-Pyruvat-Lyase und auch für das Enzym aus Schweineniere ist zwar gezeigt worden, dass Neu4,5Ac₂ wenn auch sehr schwach, umgesetzt wird (Sommer, 1998; Schauer *et al.*, 1971), allerdings wurde in beiden Fällen das während der Katalyse gebildete Pyruvat nachgewiesen, ohne dass unterschieden werden konnte, ob das Pyruvat wirklich aus der Spaltung von Neu4,5Ac₂ hervorgegangen ist oder aus der Spaltung von Neu5Ac, das möglicherweise während der Inkubation durch nicht-

enzymatische Hydrolyse aus Neu4,5Ac₂ gebildet worden ist. Erfolgte die Analyse (wie für das rekombinante Enzym), indem mittels fluorimetrischer HPLC überprüft wurde, ob die Menge an Neu4,5Ac₂ im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Enzym abnahm, konnte keine Spaltung von Neu4,5Ac₂ nachgewiesen werden (Shukla und Schauer, 1986). Das Ergebnis, dass Neu4,5Ac₂ nicht durch die Sialat-Pyruvat-Lyase gespalten werden kann, deckt sich auch mit der postulierten Rolle der Hydroxylgruppe an C₄ während der Katalyse (Abb. 21).

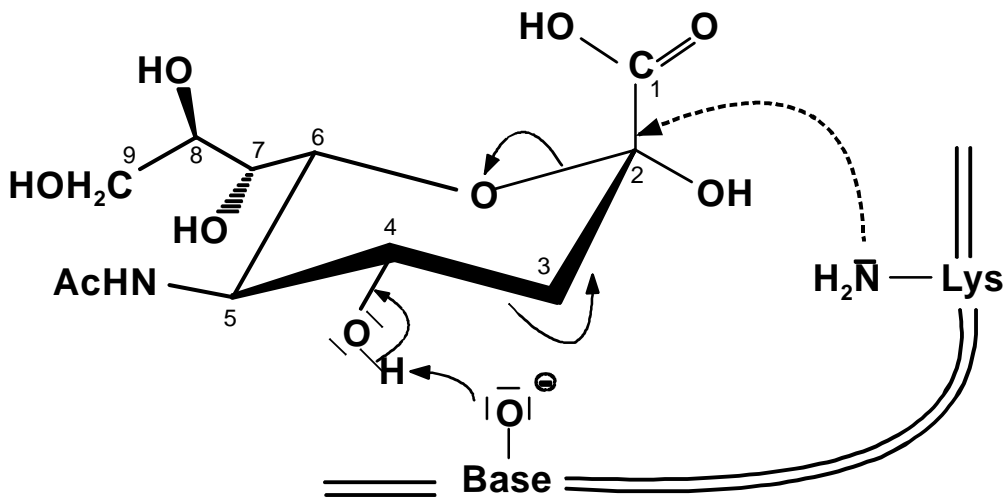


Abb. 21 Reaktionsmechanismus der Sialat-Pyruvat-Lyase. Während der Katalyse kommt es zur Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen einem Lysinrest des Enzyms und dem Substrat. Nach Deprotonierung der Hydroxylgruppe an C₄ kommt es zur Spaltung der Bindung zwischen C₃ und C₄.

Danach wird das Substrat zunächst durch Bildung einer Schiff'schen Base mit einem Lysinrest des Enzyms aktiviert. Nach Deprotonierung der Hydroxylgruppe an C₄ kommt es dann zur Spaltung der Bindung zwischen C₃ und C₄. Demnach wäre eine freie Hydroxylgruppe an C₄ der Sialinsäure also Voraussetzung für die Spaltbarkeit des Substrates. Die große Bedeutung der Hydroxylgruppe an C₄ der Sialinsäure wird auch dadurch unterstrichen, dass alle bisher untersuchten Sialinsäuren, die an C₄ modifiziert waren, keine Substrate der Sialat-Pyruvat-Lyase sind. So kann weder 4-deoxy-Neu5Ac noch 4-oxo-Neu5Ac von der Sialat-Pyruvat-Lyase gespalten werden (Hagedorn und Brossmer, 1986; Schauer *et al.*, 1987; Groß und Brossmer, 1988). Selbst 4-*epi*-Neu5Ac, das sich von Neu5Ac nur dadurch unterscheidet, dass die Hydroxylgruppe an C₄ in axialer statt in äquatorialer Stellung vorliegt, wird durch das Enzym nicht umgesetzt (Groß *et al.*, 1988; Schauer *et al.*, 1987).

Während inzwischen bereits die Primärstrukturen mehrerer Sialat-Pyruvat-Lyasen - aus verschiedenen Mikroorganismen und seit kurzem auch aus der Schweineniere (Bruse, 2000) - aufgeklärt werden konnten, ist die Tertiärstruktur bisher nur für die Sialat-Pyruvat-Lyase aus *E. coli* bekannt (Izard *et al.*, 1994). Das Enzym besteht aus vier gleichen Un-

tereinheiten, ist also ein Homotetramer. Die Untereinheiten weisen eine sogenannte α,β -Tunnelstruktur, bestehend aus je acht alternierenden β -Faltblättern und α -Helices, mit einer carboxyterminalen Erweiterung, bestehend aus drei zusätzlichen α -Helices, auf (Abb. 2, Einleitung).

Abb. 22 zeigt ein Modell der Tertiärstruktur der Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens*. Es wurde von Dr. H.-C. Siebert durch sogenanntes „Homology Modelling“ (Peitsch, 1996; Guex *et al.*, 1999) anhand der Primärstruktur der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens*, der Strukturdaten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* und anhand von Daten, die durch NMR-spektroskopische Untersuchungen der in dieser Arbeit gereinigten rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* gewonnen wurden, erstellt. Obwohl die Aminosäuresequenzen der Sialat-Pyruvat-Lyasen von *E. coli* und *C. perfringens* nur eine Homologie von etwa 38 % aufweisen (Traving *et al.*, 1997), scheinen die Tertiärstrukturen beider Proteine sehr ähnlich zu sein. Das „Homology Modelling“ kann zwar die Röntgenstrukturanalyse nicht ersetzen, gibt aber Hinweise auf die Tertiärstruktur der Proteine. Oftmals stimmen die Ergebnisse beider Methoden sehr gut überein (Dr. H.-C. Siebert, persönliche Mitteilung).

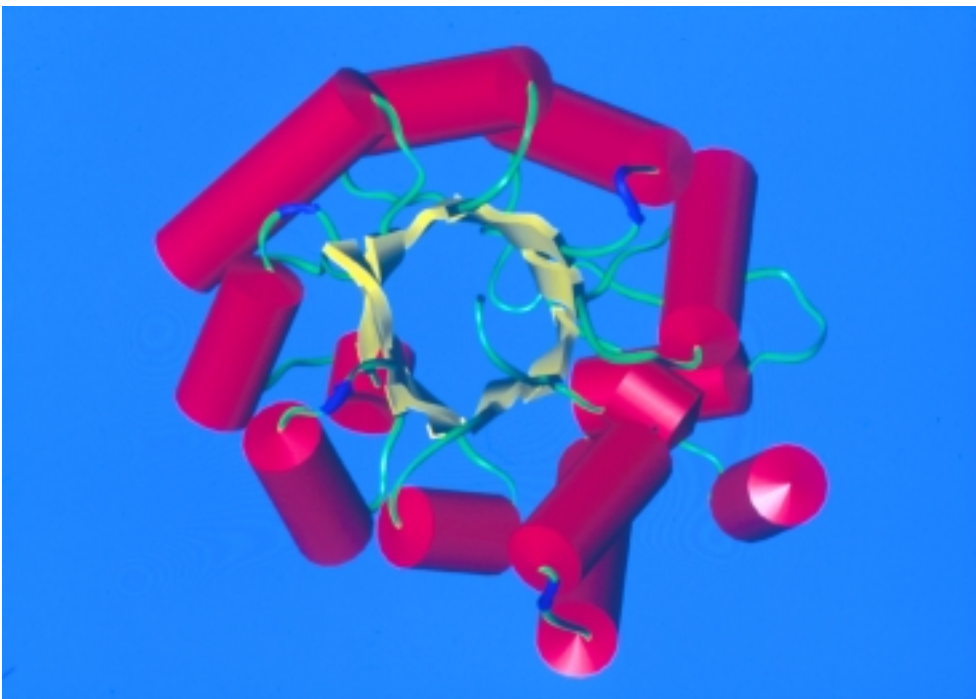


Abb. 22 Modell der Tertiärstruktur der Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens* (Dr. H.-C. Siebert, persönliche Mitteilung).

Inzwischen sind eine Reihe von Enzymen bekannt, die sehr ähnliche Primär- und Tertiärstrukturen wie die Sialat-Pyruvat-Lyasen aufweisen. Sie bilden eine neue Sub-Familie, die „*N*-Acetylneuraminat-Lyase-Sub-Familie“ der $(\alpha,\beta)_8$ -Familie (Lawrence *et al.*, 1997). Ne-

ben der Sialat-Pyruvat-Lyase (*N*-Acetylneuraminat-Lyase) gehören zu dieser Subfamilie die Dihydrodipicolinat-Synthase, die *trans*-*O*-hydroxybenzylidenpyruvat-Hydratase-Aldolase, die D-4-deoxy-5-oxoglucarat-Dehydratase und vermutlich das MosA-Protein. Die Mitglieder (Enzyme) dieser Sub-Familie weisen nicht nur eine große strukturelle Ähnlichkeit auf, sondern scheinen auch funktionell verwandt zu sein. Während der Katalyse bilden sie vermutlich alle eine Schiff'sche Base mit dem Substrat aus, um es zu aktivieren.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden durch zielgerichtete Mutagenese des Sialat-Pyruvat-Lyasegens von *C. perfringens* spezielle Aminosäuren (Lysin 161, Tyrosin 133, Asparat 187 und Glutamat 188) des Enzyms ausgetauscht. Durch die Charakterisierung der „Mutanten-Enzyme“ sollte die Funktion der Aminosäurereste und ihre Bedeutung für die enzymatische Katalyse näher bestimmt werden. Die Aminosäuren, gegen die diese vier Aminosäurereste ausgetauscht wurden, wurden dabei so gewählt, dass sie sich in ihrer Funktionalität, Größe und/oder Ladung von der ausgetauschten Aminosäure unterscheiden.

Die zielgerichtete Mutagenese erlaubt es, die strukturelle und funktionelle Bedeutung spezieller Aminosäurereste in Enzymen besser zu verstehen (Rath und Fletterick, 1987). Bei der Interpretation der Daten ist allerdings immer zu berücksichtigen, dass die Mutation auch das Gesamtprotein beeinflussen könnte, also dass Veränderungen in den Eigenschaften auch durch eine veränderte Struktur, z. B. eine fehlerhafte Faltung des mutierten Enzyms, bedingt sein könnten. Dieses kann letztlich nur durch eine Untersuchung der Struktur der Proteine, die die Mutation tragen, ausgeschlossen werden. Allerdings können auch durch die Auswahl verschiedener Mutanten, die sich in unterschiedlichen Punkten von der ausgetauschten Aminosäure unterscheiden, solche Fehlinterpretationen oftmals vermieden werden, zumal wenn die Funktion des ausgetauschten Aminosäurerestes nicht gänzlich unbekannt ist. Von den vier in dieser Arbeit ausgetauschten Aminosäureresten ist aufgrund der Röntgenstruktur der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* und des Alignments der bekannten Sialat-Pyruvat-Lyasesequenzen sehr zu vermuten, dass sie in Analogie zu den entsprechenden Aminosäureresten von *E. coli* im aktiven Zentrum des clostridiellen Enzyms liegen. Auf die anhand der Röntgenstrukturuntersuchungen postulierte Funktion der Aminosäurereste in der Katalyse bzw. bei der Substratbindung (Lawrence *et al.*, 1997) wird bei der Besprechung der Mutanten eingegangen. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Röntgenstrukturanalyse zwar etwas über die Lage eines Aminosäurerestes, etwa im aktiven Zentrum, aussagen und auch über Bindungen (kovalente Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen dem Enzym und dem Substrat Aufschluß geben kann, es sich allerdings bei der Röntgenstruktur um eine statische Aufnahme handelt. Sie gibt also wenig Aufschluß über die Funktionalität eines Aminosäurerestes während der Katalyse, etwa bei Elektronen- oder Protonentransferprozessen. Die zielgerichtete Mutagenese und die Röntgenstrukturanalyse sind also sich ergänzende Methoden, die ver-

schiedene Aspekte der Enzymkatalyse erhellen können. Besonders früher wurden auch immer wieder Untersuchungen mit Reagenzien durchgeführt, die bestimmte Aminosäuren chemisch modifizieren. Sie haben den Vorteil, dass sie auch eingesetzt werden können, wenn die Gensequenz des untersuchten Enzyms nicht bekannt ist. Allerdings sind die Studien mit Aminosäuren-modifizierenden Reagenzien oftmals sehr unspezifisch, da nicht nur der gewünschte Rest, z. B. im aktiven Zentrum, sondern auch andere gleiche Reste im Protein modifiziert werden, und führen zu falschen Interpretationen. So konnte z. B. die aufgrund von Studien mit chemisch-modifizierenden Reagenzien postulierte Funktion bestimmter Aminosäurereste der β -Untereinheit der Tryptophan-Synthase von *Salmonella typhimurium* durch zielgerichtete Mutagenese des Enzyms widerlegt werden (Miles *et al.*, 1989), wobei die Daten aus der Mutagenese durch die zuvor veröffentlichte Röntgenstruktur des Enzyms unterstützt wurden. Allerdings liefern Studien mit Aminosäuren-modifizierenden Reagenzien oftmals erste Hinweise auf an der Enzymkatalyse beteiligte Aminosäurereste und geben damit erste Einblicke in den Reaktionsmechanismus. Um allerdings Fehlinterpretationen zu vermeiden, sollten die Untersuchungen durch spezifischere und damit genauere Methoden wie die zielgerichtete Mutagenese und die Röntgenstrukturanalyse ergänzt werden.

Lysin 161: Durch Inhibition der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* nach Zugabe von Pyruvat und anschließender Reduktion mit Borhydrid konnten bereits Schauer und Wember (1971) zeigen, dass ein Lysinrest des Enzyms eine Schiff'sche Base mit dem Substrat ausbildet. Durch die Röntgenstrukturanalyse der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* in Gegenwart von Substrat konnte dort Lysin 165 als der Lysinrest identifiziert werden, der die Schiff'sche Base ausbildet (Lawrence *et al.*, 1997). Dieser Lysinrest scheint nach einem Alignment aller bekannten Sialat-Pyruvat-Lyase-Sequenzen konserviert zu sein. Um zu überprüfen, ob Lysin 161 wirklich der entsprechende Lysinrest im clostridiellen Enzym ist und diese Funktion ausübt, wurde die Aminosäure gegen Arginin, Glutamin und Alanin ausgetauscht. Die Guanidiniumgruppe der Seitenkette von Arginin und die Amidgruppe der Seitenkette von Glutamin besitzen beide eine „NH₂-Gruppe“. Daher sollten beide zumindest theoretisch in der Lage sein, eine Schiff'sche Base auszubilden, allerdings deutlich schlechter als die Aminogruppe der Seitenkette von Lysin. Die Seitenkette des Alanins besitzt keine Aminogruppe, kann also keine Schiff'sche Base ausbilden. Daher sollte die Mutation von Lysin 161 zu einem inaktiven Enzym führen, wenn dieser Lysinrest während der Enzymkatalyse die Schiff'sche Base mit dem Substrat ausbildet.

Wie die Charakterisierung der Mutanten-Enzyme zeigte (3.5.1), führt bereits der Austausch von Lysin 161 gegen Arginin zu einem dramatischen Absinken der Enzymaktivität. Im Vergleich zum Wildtyp beträgt die Aktivität der Mutante nur noch etwa 3 %. Der Austausch von Lysin 161 gegen Glutamin führt zu einem noch stärkeren Verlust an Enzymaktivität. Sie beträgt nur noch etwa ein 55.000stel der Aktivität des Wildtyps. Das Enzym ist also nahezu inaktiv. Der Austausch von Lysin 161 gegen Alanin bewirkt schließlich einen vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Selbst bei sehr hohen Enzym- und Substratkonzentrationen ist keine Aktivität mehr nachweisbar.

Der K_M -Wert der Mutante K161R (Austausch von Lysin 161 gegen Arginin) für Neu5Ac liegt mit 3,5 mM nur unwesentlich über dem K_M -Wert des Wildtyps (3,2 mM). Die Substratbindung ist also kaum beeinflusst. Aufgrund der geringen Aktivität der Mutante K161Q (Austausch gegen Glutamin) ließ sich der K_M -Wert dieses Enzyms nicht bestimmen, es ist aber zu vermuten, dass er nicht wesentlich vom K_M -Wert des Wildtypenzym abweicht. Die Ergebnisse mit den drei Mutanten decken sich nämlich sehr gut mit der postulierten Funktion von Lysin 161, dass dieser Lysinrest des clostridiellen Enzyms während der Katalyse die Schiff'sche Base mit dem Substrat ausbildet. Die Mutante K161R ist zwar noch in der Lage, Neu5Ac zu spalten, also auch eine Schiff'sche Base mit dem Substrat auszubilden, allerdings sehr viel schlechter als das Wildtypenzym. Für die Beteiligung von Lysin 161 an der Enzymkatalyse selbst spricht auch, dass der K_M -Wert der Mutante kaum beeinflusst ist, die geringere Aktivität also nicht auf eine verschlechterte Substratbindung zurückzuführen ist. Die nochmals verminderte Enzymaktivität bei Austausch von Lysin 161 gegen Glutamin und schließlich der Verlust der Enzymaktivität bei Austausch gegen Alanin bekräftigen, dass die Funktion von Lysin 161 bei der Enzymkatalyse die Bildung der Schiff'schen Base mit dem Substrat ist.

Tyrosin 133: Die Hydroxylgruppe an C₄ der *N*-Acetylneuraminsäure wird während der Katalyse durch die Sialat-Pyruvat-Lyase deprotoniert (Abb. 21). Lange Zeit wurde vermutet, dass dabei ein Histidinrest des Enzyms als reversibler Protonenakzeptor fungiert (Nees *et al.*, 1976; Schauer und Kamerling, 1997). Allerdings ist nach den Daten aus der Röntgenstrukturanalyse des Enzyms aus *E. coli* kein Histidinrest im aktiven Zentrum zu finden (Izard *et al.*, 1994; Lawrence *et al.*, 1997). Auch ist kein Histidinrest in allen Sialat-Pyruvat-Lyasesequenzen konserviert (Traving *et al.*, 1997). Im aktiven Zentrum der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* findet sich jedoch an geeigneter Stelle ein Tyrosinrest, der in allen Sialat-Pyruvat-Lyasesequenzen konserviert ist. Im clostridiellen Enzym entspricht ihm Tyrosin 133. Lawrence *et al.* (1997) diskutierten für diesen Tyrosinrest drei mögliche Funktionen: (1) Beteiligung an den Protonentransferprozessen während der Katalyse; (2) Stabilisierung des gebundenen Substrates durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur Carboxylgruppe des Substrates; (3) Stabilisierung der Seitenkette des Lysinrestes, der die Schiff'sche Base mit dem Substrat ausbildet, durch den aromatischen Ring. Um die Rolle von Tyrosin 133 aufklären zu können, wurde dieser Tyrosinrest durch zielgerichtete Mutagenese gegen Phenylalanin, Tryptophan, Histidin und Cystein ausgetauscht. Phenylalanin und Tryptophan sind wie Tyrosin aromatische Aminosäuren. Die Seitenkette des Phenylalanins ist der des Tyrosins besonders ähnlich; der einzige Unterschied besteht darin, dass Phenylalanin keine Hydroxylgruppe am Benzolring besitzt, somit also nicht als (reversibler) Protonenakzeptor fungieren kann. Der Imidazolring des Histidins kann dagegen Protonen reversibel binden, besitzt aber auch freie Elektronen, die bei der Stabilisierung der Seitenkette des Lysinrestes eine Rolle spielen könnten. Die Seitenkette des Cysteins dagegen besitzt keine freien Elektronen.

Wie die Charakterisierung der Mutanten in Tyrosin 133 zeigte (3.5.2), besitzen alle vier Mutanten-Enzyme eine deutlich verminderte Aktivität. Sie liegt zwischen 0,02 % bei

Y133C (Austausch von Tyrosin133 gegen Cystein) und 0,4 % der Aktivität des Wildtyp-Enzyms bei Y133F (Austausch gegen Phenylalanin). Die Aktivitätseinbußen sind damit größer als beim Mutantenzym K161R, bei dem der für die Katalyse wichtige Lysinrest, der die Schiff'sche Base mit dem Substrat ausbildet, gegen Arginin ausgetauscht wurde, was für die große Bedeutung von Tyrosin 133 für die Enzymkatalyse spricht. Das wird unterstützt durch Untersuchungen des Wildtyp-Enzyms und der Mutanten-Enzyme Y133F und Y133W mittels NMR, die zeigen, dass die Struktur dieser Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym nicht verändert ist (Dr. H.-C. Siebert, persönliche Mitteilung). Die Aktivitätsverluste der Mutanten in Tyrosin 133 begründen sich also in dem spezifischen Austausch und nicht etwa in einer fehlerhaften Faltung des Enzyms.

Was sagen nun die Ergebnisse mit den Mutanten-Enzymen über die Funktion von Tyrosin während der Enzymkatalyse aus? Da keines der vier Mutanten-Enzyme inaktiv ist, fungiert Tyrosin 133 eindeutig nicht als der reversible Protonenakzeptor, der während der Katalyse das Proton von der Hydroxylgruppe an C₄ übernimmt. Dann hätte nämlich zumindest die Mutation zu Phenylalanin zu einem inaktiven Enzym führen müssen, da die Seitenkette des Phenylalanins keine polare Gruppe besitzt, die das Proton der Hydroxylgruppe vorübergehend binden könnte. Da die Deprotonierung der Hydroxylgruppe jedoch Voraussetzung für die Spaltung des Substrates ist, muß eine andere Gruppe als der Tyrosinrest diese Funktion übernehmen. In Ermangelung einer Alternative meinten Smith *et al.* (1999), dass möglicherweise die Carboxylgruppe der *N*-Acetylneuraminsäure an den Protonentransferprozessen während der Katalyse beteiligt ist. Diese Vermutung wird sich allerdings nur schwer überprüfen lassen, da die Carboxylgruppe bereits für die Bindung des Substrates an das Enzym essentiell ist (Schauer und Kamerling, 1997). Daher können Sialinsäuren, deren Carboxylgruppe modifiziert ist, nicht gespalten werden.

Die Funktion von Tyrosin 133 während der Katalyse liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in der Stabilisierung der Seitenkette des Lysins und/oder der Stabilisierung des gebundenen Substrates. Für die Stabilisierung der Seitenkette ist nach den Untersuchungen zur Röntgenstruktur der *E. coli*-Lyase vermutlich der aromatische Ring des Tyrosins von Bedeutung. Die Mutation von Tyrosin zu Phenylalanin führt zwar zu einem deutlichen Verlust an Enzymaktivität, obwohl die Seitenketten beider Aminosäuren sehr ähnlich sind. Allerdings ist die Hydroxylgruppe des Tyrosins möglicherweise für die richtige Ausrichtung der Seitenkette und damit des aromatischen Rings sehr wichtig. Der aromatische Ring des Phenylalanins (und auch des Tryptophans) wäre dann vermutlich nicht optimal zur Seitenkette des Lysins orientiert. Immerhin ist die „Phenylalanin-Mutante“ die aktivste der vier untersuchten Mutanten-Enzyme in Tyrosin 133. Das Mutanten-Enzym, bei dem Tyrosin 133 gegen Cystein ausgetauscht ist, dessen Seitenkette keine freien Elektronen besitzt, die stabilisierend auf die Seitenkette des Lysins wirken könnten, ist dagegen das inaktivste Enzym. Seine Aktivität liegt bei etwa 0,02 % der Aktivität des Wildtyps bzw. bei etwa 4 % der Aktivität der Mutante Y133F.

Für die Stabilisierung des Substrates wäre vor allem die Hydroxylgruppe des Tyrosins wichtig, die vermutlich eine Wasserstoffbrückenbindung zur Carboxylgruppe des Sub-

strates ausbildet (Lawrence *et al.*, 1997). Diese Stabilisierung ist u. U. sehr wichtig, wenn nämlich die Carboxylgruppe, wie von Smith *et al.* (1999) postuliert, wirklich als reversibler Protonenakzeptor während der Katalyse fungiert. Von den Aminosäureresten, gegen die Tyrosin ausgetauscht wurde, ist vermutlich keiner in der Lage, diese Funktion zu übernehmen. Am ehesten könnte noch die Sulfhydrylgruppe des Cysteins eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden, allerdings ist diese Mutante gerade die inaktivste, während der Austausch gegen Phenylalanin, dessen Seitenkette definitiv keine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden kann, den geringsten Einfluß auf die Enzymaktivität hat. Daher wäre die Stabilisierung des Substrates bzw. der Carboxylgruppe des Substrates vermutlich nicht die einzige Funktion von Tyrosin 133. Es ist aber möglich, dass Tyrosin 133 beide Funktionen übernimmt, die Stabilisierung der Carboxylgruppe und die Stabilisierung der Seitenkette des Lysins. Beide Funktionen sind sicherlich nicht essentiell für die Enzymkatalyse, so dass die Mutation von Tyrosin 133 deshalb nicht zu einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität führen würde. Jedoch können beide Funktionen sehr wichtig für eine optimale Enzymkatalyse sein. Das würde erklären, dass zwar alle vier Austausche von Tyrosin 133 zu starken Aktivitätsverlusten führten, aber keines der Mutanten-Enzyme inaktiv ist.

Interessanterweise liegen die K_M -Werte der Mutanten in Tyrosin 133 unter dem K_M -Wert des Wildtyp-Enzyms, vor allem bei Y133F und Y133H. Bei der Mutante Y133H ist der K_M -Wert mit 1,0 mM etwa um den Faktor drei geringer als beim Wildtyp-Enzym (3,2 mM), bei der Mutante Y133F mit 0,4 mM sogar um etwa eine Zehnerpotenz. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Mutagenese eines Tyrosinrestes der humanen Aldolase A (Fructose-1,6-bisphosphat:Glycerinaldehyd-3-phosphat-Lyase) beobachtet (Takahashi *et al.*, 1989): Durch Austausch dieses Tyrosinrestes gegen Serin sank sowohl die spezifische Aktivität des Enzyms als auch der K_M -Wert für das Substrat Fructose-1,6-bisphosphat. Die Autoren schlossen daraus auf eine wichtige Funktion des Tyrosinrestes während der Enzymkatalyse, allerdings wurde nur die eine Mutante untersucht und die Mutation schien auch einen Einfluß auf die Konformation des Enzyms zu haben. Das war bei den Mutanten der Sialat-Pyruvat-Lyase, wie berichtet, nicht der Fall.

Die Frage ist, was sich aus dem erniedrigten K_M -Wert für die Funktion des Tyrosinrestes ableiten läßt. Eine Möglichkeit ist, dass die Mutation dazu führt, dass die Affinität des Enzyms zum Substrat steigt. Der Tyrosinrest hätte somit also auch die Funktion, den K_M -Wert für Neu5Ac hoch zu halten, was sterisch auch vorstellbar wäre. Andererseits ist es auch möglich, dass die Substratbindung gar nicht beeinflusst ist, sondern der K_M -Wert nur deshalb verändert ist, weil die Reaktionsgeschwindigkeit stark beeinflusst ist. Der K_M -Wert ist nämlich streng genommen nur dann ein direktes Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat, wenn ein Equilibrium zwischen dem freien Enzym und dem Enzym im Enzym-Substrat-Komplex vorliegt, d. h. wenn die Rate der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes aus Enzym und Substrat gleich der Rate des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes in Enzym und Substrat ist (Engel, 1977). Dann nämlich entspricht der K_M -Wert der Dissoziationskonstanten: $K_M = k_2/k_1$. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die Geschwindigkeit

keit, mit der der Enzym-Substrat-Komplex in Enzym und Produkt zerfällt, sehr viel langsamer ist als die Geschwindigkeit mit der der Enzym-Substrat-Komplex wieder in freies Enzym und Substrat zerfällt, ersteres also vernachlässigt werden kann. Oftmals liegt jedoch kein Equilibrium vor sondern nur ein „steady-state“, d. h. die Rate der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes aus Enzym und Substrat entspricht der Rate des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes in beide Richtungen, also in Enzym und Substrat und in Enzym und Produkt. Dann geht auch die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes in Enzym und Produkt (k_3) mit in die Berechnung des K_M -Wertes ein. Es gilt: $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$. Da Tyrosin 133 für die Enzymkatalyse von großer Bedeutung ist und die Mutation des Aminosäurerestes dazu führt, dass die Aktivität des Enzyms stark vermindert ist, führt das auch dazu, dass eine oder mehrere der Geschwindigkeitskonstanten (k_1 , k_2 und k_3) beeinflusst sind, sich darüber also auch der K_M -Wert verändert.

Aspartat 187 und Glutamat 188: Anhand der Röntgenstrukturuntersuchungen der Sialat-Pyruvat-Lyase von *E. coli* in Gegenwart von Hydroxypyruvat vermuteten Lawrence *et al.* (1997), dass das Substrat vermutlich in einem „Tunnel“ des Enzyms gebunden wird, der sich von Lysin 165 bis Aspartat 191 und Glutamat 192 erstreckt. Neuere Röntgenstrukturdaten mit Sialinsäureanaloga haben dies bestätigt und ergeben, dass die Carboxylgruppen von Aspartat 191 und Glutamat 192 vermutlich Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxylgruppen an C₈ und C₉ der Sialinsäure ausbilden (Smith *et al.*, 1999; Ooi, 1999). Da beide Aminosäurereste in allen bekannten Sialat-Pyruvat-Lyasesequenzen konserviert sind, wurden die entsprechenden Aminosäurereste, Aspartat 187 und Glutamat 188, durch zielgerichtete Mutagenese ausgetauscht. Aspartat 187 wurde gegen Glutamat und Asparagin ausgetauscht. Glutamat ist wie Aspartat eine saure Aminosäure mit einer endständigen Carboxylgruppe. Beide Aminosäuren unterscheiden sich nur in ihrer Größe: Die Seitenkette des Glutamats besitzt eine CH₂-Gruppe mehr, ist also etwas länger. Asparagin, das Amid des Aspartats, unterscheidet sich vom Aspartat nur dadurch, daß die Carboxylgruppe durch eine Amidgruppe ersetzt ist. Dadurch ist die Aminosäure unter physiologischen Bedingungen nicht mehr negativ geladen. Glutamat 188 wurde entsprechend gegen Aspartat und Glutamin ausgetauscht. Außerdem wurde eine Doppelmutante hergestellt, in der beide Aminosäurereste gegen Alanin ausgetauscht wurden.

Die kinetischen Untersuchungen der Mutanten zeigen (3.5.3.1), dass die Mutationen vor allem den K_M -Wert der Enzyme für Neu5Ac beeinflussen, während zumindest bei den Mutanten D187E (Austausch von Aspartat 187 gegen Glutamat), E188D (Austausch von Glutamat 188 gegen Aspartat) und E188Q (Austausch gegen Glutamin) der Wert für V_{max} kaum beeinflusst ist. Die Aktivität dieser Mutanten-Enzyme bei Substratsättigung beträgt etwa 90-100 % der Aktivität des Wildtyp-Enzyms. Die K_M -Werte der drei Mutanten sind dagegen etwa fünf- bis 15fach höher als beim Wildtyp-Enzym. Zu einem dramatischen Anstieg des K_M -Wertes führt die Mutation von Aspartat 187 zu Asparagin: Der K_M -Wert der Mutante liegt bei über 1 M(!), also etwa 350 mal höher als der K_M -Wert des Wildtyp-Enzyms. Zwar ist der Fehler in der Berechnung des K_M -Wertes für diese Mutante relativ groß, da Messungen der Enzymaktivität nur bis etwa 100 mM Neu5Ac möglich waren,

also bei Substratkonzentrationen, die deutlich unter dem berechneten K_M -Wert liegen, trotzdem wird deutlich, wie groß der Einfluß der Mutation auf das Enzym ist. Auch der Wert der spezifischen Aktivität bei Substratsättigung scheint nach den Berechnungen stark beeinflusst zu sein: Die spezifische Aktivität des Mutanten-Enzyms liegt bei etwa 4 % der Aktivität des Wildtyp-Enzyms. Die Doppelmutante (DE187,188AA) ist nahezu inaktiv, zumindest bei meßbaren Substratkonzentrationen. Aufgrund der geringen Enzymaktivität selbst bei einer Neu5Ac-Konzentration von 100 mM war eine Berechnung der Werte für K_M und V_{max} nicht möglich. Bei 100 mM Neu5Ac betrug die Enzymaktivität nur etwa 0,007 % der Aktivität des Wildtyps.

Die Ergebnisse der Mutanten in Aspartat 187 und Glutamat 188 deuten sehr stark darauf hin, dass beide Aminosäurereste, Aspartat 187 und Glutamat 188, an der Substratbindung beteiligt sind. Die Mutation dieser Reste führt zu einem deutlichen Anstieg der K_M -Werte, während zumindest bei drei der Mutanten der Wert für V_{max} kaum beeinflusst ist. Das spricht dafür, dass die beiden Aminosäurereste aller Wahrscheinlichkeit nach nicht an der Enzymkatalyse selbst beteiligt sind. Der deutliche Anstieg der K_M -Werte ist also auf eine deutlich verringerte Affinität des Enzyms zum Substrat zurückzuführen. Bei der Mutante D187N scheint die Substratbindung derart gestört zu sein, dass das Substrat kaum noch vom Enzym gebunden werden kann. Das scheint auch die Katalyse selbst zu beeinflussen, so dass auch die Aktivität des Enzyms in Mitleidenschaft gezogen wird. Der Austausch beider Aminosäurereste gegen Alanin führt vermutlich zu einem noch stärkeren Verlust der Substratbindung durch das Enzym, so dass das Enzym nahezu inaktiv ist.

Aus den kinetischen Untersuchungen der Mutanten-Enzyme lassen sich auch Rückschlüsse auf die Bedeutung von Aspartat 187 und Glutamat 188 für die Substratbindung schließen. Bei Glutamat 188 führen beide untersuchten Austausche zu ähnlichen Veränderungen des K_M -Wertes und der Enzymaktivität. Die Größe und die Ladung des Aminosäurerestes scheinen für die Substratbindung annähernd gleich wichtig zu sein, wobei beide Veränderungen relativ gut toleriert werden. Dagegen führen die beiden Mutationen in Aspartat 187 zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Während der Austausch gegen Glutamat ähnlich gut toleriert wird wie die Austausche in Glutamat 188, führt der Austausch von Aspartat 187 gegen Asparagin zu einem dramatischen Verlust an Substratbindung. Die Ladung dieses Aminosäurerestes und damit die Fähigkeit, eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe an C₈ der *N*-Acetylneuraminsäure ausbilden zu können, scheint also essentiell für die Substratbindung zu sein. Dieses Ergebnis deckt sich gut mit den Untersuchungen der nativen Sialat-Pyruvat-Lyase mit modifizierten Sialinsäuren, nach denen Modifikationen der Sialinsäure an C₉ sehr viel besser toleriert werden als Modifikationen an C₈ (Schauer *et al.*, 1987; Zbiral *et al.*, 1992). Diese Fakten zeigen aber auch, dass einerseits Veränderungen des Substrates die Affinität des Enzyms zum Substrat verändern, andererseits aber auch Veränderungen des Enzyms. Von daher wäre es interessant zu prüfen, ob möglicherweise durch zielgerichtete Mutagenese die Substratspezifität der Sialat-Pyruvat-Lyase so verändert werden könnte, dass es möglich

ist, auch modifizierte Sialinsäuren zu spalten bzw. chemisch zu synthetisieren, die vom Wildtyp-Enzym nur sehr schlecht oder gar nicht umgesetzt werden. Um diese Möglichkeit auszuloten, wurde exemplarisch die Spaltung von Neu5,9Ac₂ durch die Mutanten E188D und E188Q im Vergleich zum Wildtyp-Enzym untersucht (3.5.3.2). Dafür wurden die Umsätze von Neu5Ac und Neu5,9Ac₂ durch die Enzyme mit Hilfe der fluorimetrischen HPLC bestimmt (für kinetische Messungen stand leider nicht genügend Neu5,9Ac₂ zur Verfügung). Das Wildtyp-Enzym kann Neu5,9Ac₂ nicht so gut umsetzen wie Neu5Ac. Die gemessene Umsatzrate von Neu5,9Ac₂ im Vergleich zu Neu5Ac lag unter den getesteten Bedingungen bei einer Inkubationszeit von 5 min bei etwa 54 %. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass dieser Wert vermutlich von der Substratkonzentration abhängt und damit auch von der Inkubationsdauer. Denn aufgrund der Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse von *E. coli* und der Ergebnisse mit den Mutanten-Enzymen ist zu vermuten, dass der geringere Umsatz von Neu5,9Ac₂ durch die Sialat-Pyruvat-Lyase dadurch bedingt ist, dass der K_M-Wert für dieses Substrat höher ist. So ist es auch zu erklären, dass die Umsatzrate bei nur 1 min Inkubationszeiten noch bei 83 % lag und nach 5 min dann bei etwa 54 %. Die Mutanten-Enzyme E188D und E188Q spalten beide Neu5,9Ac₂ annähernd genauso gut wie Neu5Ac. Allerdings spalten beide Mutanten-Enzyme Neu5Ac schlechter als das Wildtyp-Enzym; der K_M-Wert beider Enzyme für Neu5Ac liegt deutlich über dem K_M-Wert des Wildtyp-Enzyms. Interessant ist nun, wie die Umsatzraten der beiden Mutanten-Enzyme für Neu5,9Ac₂ im Vergleich zum Wildtyp-Enzym sind. Hier zeigt sich, dass die Mutante E188D Neu5,9Ac₂ etwa genauso gut spaltet wie das Wildtyp-Enzym. Die Bindung von Neu5,9Ac₂ ist also nicht mehr wie bei Neu5Ac schlechter, aber sie ist auch nicht besser als beim Wildtyp-Enzym. Anders ist es bei der Mutante E188Q: Diese spaltet Neu5,9Ac₂ deutlich besser als das Wildtyp-Enzym. Die Umsatzrate von Neu5,9Ac₂ im Vergleich zum Wildtyp-Enzym liegt bei etwa 120-130 %. Durch die zielgerichtete Mutagenese ist es also gelungen, die Sialat-Pyruvat-Lyase so zu verändern, dass sie jetzt eine modifizierte Sialinsäure, nämlich Neu5,9Ac₂, besser spaltet.

Zusammenfassend lassen sich aus den Daten, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, und solchen, die bereits aus der Literatur bekannt sind, folgende Rückschlüsse für den Reaktionsmechanismus der Sialat-Pyruvat-Lyasen und die Bedeutung der Aminosäurereste Lysin 161, Tyrosin 133, Aspartat 187 und Glutamat 188 der clostridiellen Sialat-Pyruvat-Lyase ziehen (Abb. 23): Die Sialat-Pyruvat-Lyase bindet das α -Anomer der *N*-Acetylneuraminsäure (A). An dieser Bindung sind im clostridiellen Enzym Aspartat 187 und Glutamat 188 beteiligt, vermutlich indem sie Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxylgruppen an C₈ und C₉ des Substrates ausbilden. Dann öffnet sich der Ring der *N*-Acetylneuraminsäure (B) und es kann sich die Schiff'sche Base zwischen der Keto-Gruppe der offenkettigen *N*-Acetylneuraminsäure und der ϵ -Aminogruppe von Lysin 161 des Enzyms ausbilden (C-F). Dann wird die Hydroxylgruppe an C₄ der *N*-Acetylneuraminsäure deprotoniert (F). Welche Gruppe des Enzyms oder des Substrates als Protonenakzeptor fungiert, ist unklar. Möglicherweise ist es die Carboxylgruppe des Substrates. Es ist aber nicht Tyrosin 133 und vermutlich auch weder ein Histidin- noch

ein Cysteinrest des Enzyms. Infolge der Deprotonierung des Substrates kommt es zur Umlagerung von Elektronen und schließlich zur Spaltung der Bindung zwischen C₃ und C₄ der *N*-Acetylneuraminsäure (F+G). Dadurch wird *N*-Acetylmannosamin freigesetzt. Das Proton wird auf das nach wie vor gebundene Carbanion des Pyruvats übertragen (G) und es kommt zur Hydrolyse der Schiff'schen Base und zur Freisetzung des Pyruvats (H+I). Tyrosin 133 der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* spielt während der Enzymkatalyse eine wichtige Rolle. Vermutlich ist es sowohl an der Stabilisierung des Substrates als auch an der Stabilisierung der Seitenkette von Lysin 161 beteiligt.

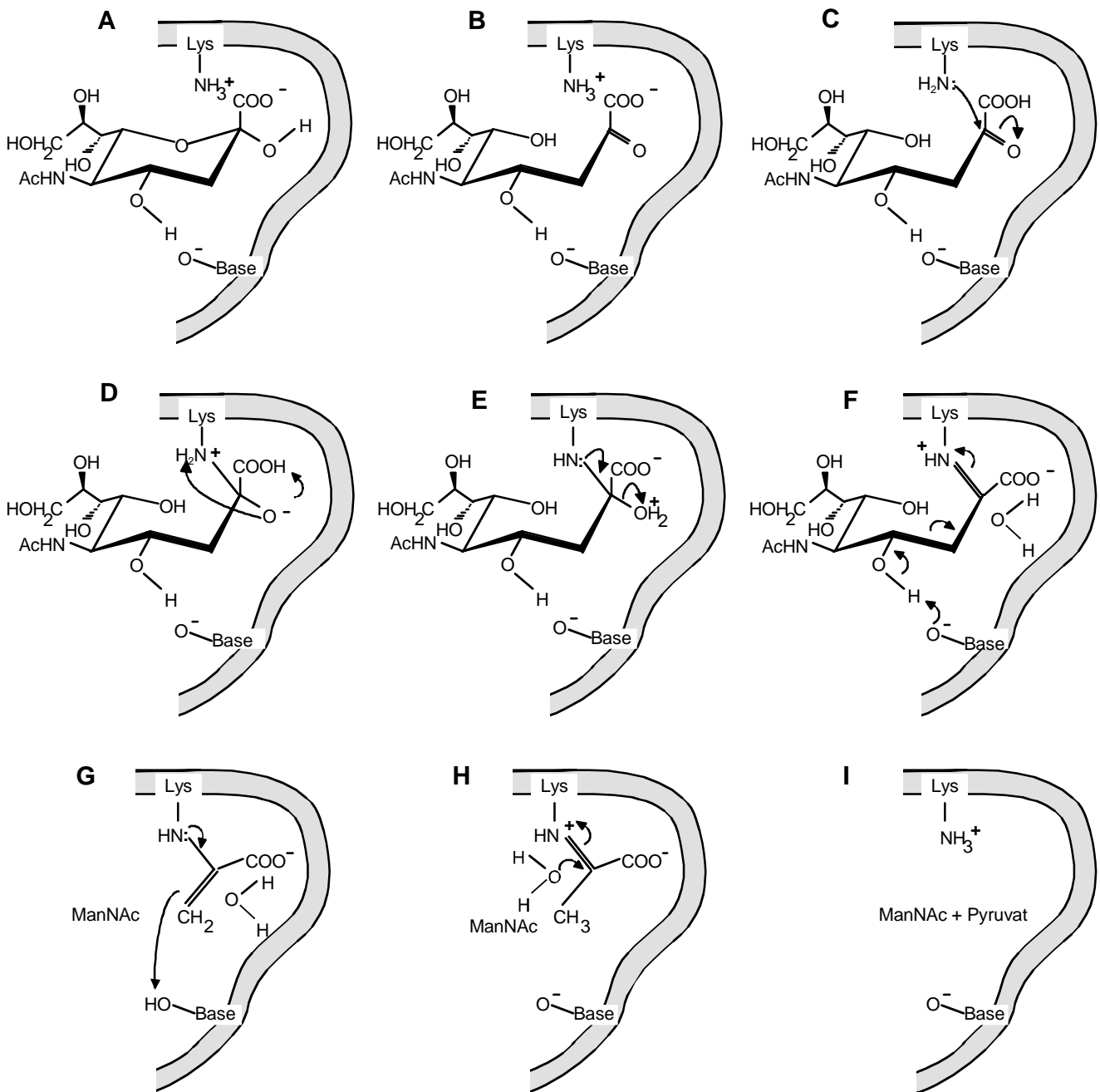


Abb. 23 Postulierter Ablauf der Reaktion bei der Spaltung von Neu5Ac durch die Sialat-Pyruvat-Lyase.

Ausblick

Zwei interessante Aspekte ergeben sich aus dieser Arbeit für die Zukunft:

Ein Ziel ist die Aufklärung der Röntgenstruktur der Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens*. Die ersten Schritte dahin sind mit der Reinigung des Enzyms und der Kristallisation bereits gemacht worden. Die Röntgenstruktur ermöglicht weitere Einblicke in das Enzym und seine Funktionsweise. Möglicherweise läßt sich dann auch klären, welche Gruppe während der Katalyse als reversibler Protonenakzeptor fungiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nicht, wie vorher vermutet wurde, Tyrosin 133 ist. Es bleibt jedoch zu prüfen, ob die Carboxylgruppe des Substrates, wie von Smith *et al.* (1999) postuliert, oder eine andere Gruppe diese Funktion ausübt.

Die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse können durch molekular-dynamische Untersuchungen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie ergänzt werden. Durch einen Vergleich der strukturellen Daten der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* mit denen des Enzyms von *E. coli* könnte aufgeklärt werden, in welcher Weise sich Unterschiede in den Eigenschaften beider Enzyme in der Struktur widerspiegeln. Darüber hinaus sollte es aber auch möglich sein, mehr über die Verwandtschaft der beiden und weiterer Sialat-Pyruvat-Lyasen zu erfahren, ergänzend zu den Daten, die aus dem Vergleich der Primärstrukturen der Sialat-Pyruvat-Lyasen bereits gewonnen wurden.

Wie bereits bei der Besprechung der Mutanten-Enzyme, bei denen Aspartat 187 und Glutamat 188 ausgetauscht worden waren, angedeutet wurde, wäre es auch interessant zu prüfen, wie sich durch zielgerichtete Mutagenese die Substratspezifität der Sialat-Pyruvat-Lyase gezielt verändern läßt. Das wäre vor allem im Hinblick auf die chemische Synthese von modifizierten Sialinsäuren und Sialinsäureanaloga interessant. Solche Sialinsäureanaloga sind nicht nur für die Wissenschaft von Interesse, wo sie zur Untersuchung verschiedener Enzyme des Sialinsäurestoffwechsels eingesetzt werden könnten, sondern können auch für die medizinische Anwendung bedeutend sein, z. B. als anti-mikrobielle und anti-virale Agentien. Um die Mutagenese der Sialat-Pyruvat-Lyase für diese Anwendung gezielt durchführen zu können, ist es jedoch sinnvoll, zunächst die genaue dreidimensionale Struktur der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* aufzuklären, um zu sehen, welche Aminosäuren wie mit dem Substrat interagieren. Außerdem könnten dann auch modifizierte Sialinsäuren in die Struktur hineinmodelliert werden, um besser entscheiden zu können, welche Aminosäureaustausche sinnvoll sein könnten.

5 Zusammenfassung

Die Sialat-Pyruvat-Lyase von *Clostridium perfringens* wurde in *E. coli* als Fusionsprotein mit einem sogenannten His-Tag überexprimiert und über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose in einem Schritt in großen Mengen gereinigt. Das rekombinante Protein war dann nicht nur weitestgehend rein, sondern wies auch eine hohe strukturelle Homogenität auf. So konnte es auch von Dr. G. Taylor kristallisiert werden. Durch Anionenaustausch-Chromatographie an Poros HQ war eine weitere Reinigung des rekombinanten Enzyms möglich. Allerdings bewirkte der dafür nötige Pufferwechsel irreversible Einbußen in der Aktivität des Enzyms, so dass dann doch auf diesen Schritt verzichtet wurde. Durch Kationenaustausch-Chromatographie an Mono S und durch Gelfiltration an Superose 12 war keine weitere Aufreinigung des Enzyms möglich. Stattdessen wurde die Reinigung über die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie weiter optimiert. Aus 1 l Bakterienkultur wurden mit Hilfe der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie ca. 10 mg reines Protein gewonnen. Der His-Tag ließ sich unter nativen Bedingungen nicht durch enzymatische Hydrolyse entfernen.

Die rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens* besitzt ein pH-Optimum von 7,6 und ein Temperaturoptimum von 65-70 °C. In Gegenwart von Pyruvat ist das Enzym moderat thermostabil bis etwa 70 °C. Das Enzym besitzt in 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 7,2 eine spezifische Aktivität von 22 U/mg und einen K_M -Wert für Neu5Ac von 2,1 mM. Beide Werte erhöhen sich in 250 mM Kaliumphosphatpuffer auf dann 27 U/mg und 3,2 mM. Steigende Salzkonzentrationen hemmen dagegen die Enzymaktivität. Insgesamt stimmen die Eigenschaften der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase sehr gut mit denen des nativen Enzyms aus *C. perfringens* überein. Mit dem rekombinanten Enzym steht somit eine sehr gute Enzymquelle für weitere Studien zur Verfügung.

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden vier Aminosäurereste der Sialat-Pyruvat-Lyase von *C. perfringens*, Lysin 161, Tyrosin 133, Aspartat 187 und Glutamat 188, ausgetauscht. Die Mutanten-Enzyme wurden ebenfalls über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt und charakterisiert, um Rückschlüsse auf die Funktion der ausgetauschten Aminosäurereste ziehen zu können. Lysin 161 bildet während der Katalyse die Schiff'sche Base mit dem Substrat aus. Der Austausch gegen Arginin und gegen Glutamin bewirkte dramatische Einbußen in der Enzymaktivität, der Austausch gegen Alanin führte zum völligen Verlust der Aktivität. Tyrosin 133 hat ebenfalls große Bedeutung für die Enzymkatalyse. Der Austausch gegen Phenylalanin, Histidin, Tryptophan und Cystein führte zu sehr starken Einbußen in der Enzymaktivität. Die genaue Funktion von Tyrosin 133 ist unklar. Vermutlich stabilisiert dieser Tyrosinrest die Seitenkette von Lysin 161 und/oder das gebundene Substrat und ermöglicht dadurch eine optimale Katalyse. Tyrosin 133 fungiert nicht, wie vorher vermutet worden war, als reversibler Protonenakzeptor während der Enzymkatalyse. Welche Gruppe stattdessen diese Funktion ausübt, ist unklar. Möglicher-

weise ist die Carboxylgruppe des Substrates in die Protonentransferprozesse während der Aldolspaltung involviert. Aspartat 187 und Glutamat 188 sind an der Bindung des Substrates im aktiven Zentrum beteiligt. Vermutlich bilden sie Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxylgruppen an C₈ und C₉ der *N*-Acetylneuraminsäure aus. Mutationen dieser Aminosäurereste zu Glutamat und Asparagin bzw. Aspartat und Glutamin führten zu einem deutlich Anstieg des K_M-Wertes für Neu5Ac. Die größten Auswirkungen hatte dabei der Austausch von Aspartat 187 gegen Asparagin. Dieses Mutanten-Enzym war kaum noch in der Lage, Neu5Ac zu binden: Der K_M-Wert lag über 1 M! Entsprechend war die Doppelmutante, in der beide Aminosäurereste gegen Alanin ausgetauscht worden waren, nahezu inaktiv.

Die Mutagenese von Glutamat 188 führte zu einer Veränderung in der Substratspezifität. Das Mutanten-Enzym E188Q (Austausch gegen Glutamin) spaltete Neu5,9Ac₂ besser als das Wildtyp-Enzym.

Diese Arbeit ist ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise der Sialat-Pyruvat-Lyasen. Anhand der Ergebnisse aus den Mutagenesestudien wurde das Modell zum Reaktionsmechanismus der Sialat-Pyruvat-Lyasen modifiziert.

6 Literaturverzeichnis

- Aisaka, K. und Uwajima, T. (1986). Cloning and constitutive expression of the *N*-acetylneuraminase gene of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 562-565.
- Aisaka, K., Igarashi, A., Yamaguchi, K. und Uwajima, T. (1991). Purification, crystallization and characterization of *N*-acetylneuraminase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 276, 541-546.
- Baretino, D., Feigenbutz, M., Valcarcel, R. und Stunnenberg, H. G. (1994). Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucl. Acids Res.* 22, 541-542.
- Barnett, J. E., Corina, D. L. und Rasool, G. (1971). Studies on *N*-acetylneuraminic acid aldolase. *Biochem. J.* 125, 275-284.
- Barry, G.T. (1959). Detection of sialic acid in various *Escherichia coli* strains and in other species of bacteria. *Nature* 183, 117-118.
- Baumann, W., Freidenreich, J., Weisshaar, G., Brossmer, R. und Friebolin, H. (1989). Spaltung und Synthese von Sialinsäuren mit Aldolase. ¹H-NMR-Untersuchungen zur Stereochemie, zur Kinetik und zum Mechanismus. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 370, 141-149.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blix, F. G., Gottschalk, A. und Klenk, E. (1957). Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* 179, 1088
- Böhm, P., Dauber, S. und Baumeister, L. (1954). Über Neuraminsäure, ihr Vorkommen und ihre Bestimmung im Serum. *Klin. Wochenschr.* 32, 289-292.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brunetti, P., Jourdian, G. W. und Roseman, S. (1962). The sialic acids: III. Distribution and properties of animal *N*-acetylneuraminic aldolase. *J. Biol. Chem.* 237, 2447-2453.
- Bruse, P. (2000). Klonierung und Sequenzierung der Acetylneuraminat-Pyruvat-Lyase aus der Schweineleiere. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., Fitzgerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. M. und Venter, J. C. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.

- Byers, H. L., Homer, K. A. und Beighton, D. (1996). Utilization of sialic acid by viridans streptococci. *J. Dent. Res.* **75**, 1564-1571.
- Cato, E. P., George, W. L. und Finegold, S. M. (1986). Genus *Clostridium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe und J. G. Holt, eds. (Baltimore, USA: Williams & Wilkins), pp. 1141-1200.
- Chang, J. Y. (1985). Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur. J. Biochem.* **151**, 217-224.
- Comb, D. G. und Roseman, S. (1960). The Sialic acids. I. The structure and enzymatic synthesis of *N*-acetylneuraminic acid. *J. Biol. Chem.* **235**, 2529-2537.
- Corfield, A. P. und Schauer, R. (1982a). Occurrence of sialic acids. In *Sialic acids: Chemistry, metabolism and function*. R. Schauer, ed. (Wien, NY: Springer-Verlag), pp. 5-50.
- Corfield, A. P. und Schauer, R. (1982b). Metabolism of sialic acids. In *Sialic acids: Chemistry, metabolism and function*. R. Schauer, ed. (Wien, NY: Springer-Verlag), pp. 195-261.
- Corfield, A. P., Williams, A. J., Clamp, J. R., Wagner, S. A. und Mountford, R. A. (1988). Degradation by bacterial enzymes of colonic mucus from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease: the role of sialic acid metabolism and the detection of a novel *O*-acetylsialic acid esterase. *Clin. Sci.* **74**, 71-78.
- Corfield, T. (1992). Bacterial sialidases - roles in pathogenicity and nutrition. *Glycobiology* **2**, 509-521.
- Cormack, B. (1997). Introduction of a point mutation by sequential PCR. In *Current Protocols in Molecular Biology*. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl, eds. (Boston, USA: John Wiley & Sons), pp. 8.5.7-8.5.9.
- Crocker, P. R., Clark, E. A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J. H., Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J., Schnaar, R. L., Sgroi, D. C., Stamenkovic, K., Schauer, R., Schachner, M., van den Berg, T. K., van der Merwe, P. A., Watt, S. M. und Varki, A. (1998). Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* **8**, v.
- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D. und Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol. Biol.* **31**, 371-387.
- Deijl, C. M. und Vliegthart, J. F. (1983). Configuration of substrate and products of *N*-acetylneuraminic acid pyruvate-lyase from *Clostridium perfringens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 668-674.
- DeVries, G. H. und Binkley, S. B. (1972). *N*-acetylneuraminic acid aldolase of *Clostridium perfringens*: purification, properties and mechanism of action. *Arch. Biochem. Biophys.* **151**, 234-242.

- Döbeli, H., Trzeciak, A., Gillessen, D., Matile, H., Srivastava, I. K., Perrin, L. H., Jakob, P. E. und Certa, U. (1990). Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant *Plasmodium falciparum* aldolase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**, 259-268.
- Duncan, C. L. (1973). Time of enterotoxin formation und release during sporulation of *Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.* **113**, 932-936.
- Ellis, K. J. und Morrison, J. F. (1982). Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* **87**, 405-426.
- Engel, P.C. (1977). One-substrate kinetics. *In* Enzyme kinetics: The steady state approach. J. M. Ashworth, ed. (New York: John Wiley & Sons), pp. 14-25.
- Engstler, M., Reuter, G. und Schauer, R. (1992). Purification and characterization of a novel sialidase found in procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**, 21-30.
- Ermler, U., Merckel, M., Thauer, R. und Shima, S. (1997). Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability. *Structure* **5**, 635-646.
- Faillard, H., Ferreira do Amaral, C. und Blohm, M. (1969). Untersuchungen zur enzymatischen Spezifität der Neuraminidase und *N*-Acylneuraminat-Lyase in Bezug auf die *N*-Substitution. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **350**, 798-802.
- Ferrero, M. A., Reglero, A., Fernandez-Lopez, M., Ordas, R. und Rodriguez-Aparicio, L. B. (1996). *N*-acetyl-D-neuraminic acid lyase generates the sialic acid for colominic acid biosynthesis in *Escherichia coli* K1. *Biochem. J.* **317**, 157-165.
- Fersht, A. (1985). Enzyme-substrate complementarity and the use of binding energy in catalysis. *In* Enzyme, structure and mechanism. A. Fersht, ed. (New York: W. H. Freeman & company), pp. 311-346.
- Ficner, R. (1998). Röntgenstrukturanalyse. *In* Bioanalytik. F. Lottspeich und H. Zorbas, eds. (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH), pp. 451-463.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M., McKenney, K., Sutton, G., Fitzhugh, W., Fields, C., Gocayne, J. D., Scott, J. L., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelly, J. M., Weidman, J. F., Phillips, C. A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M. D., Utterback, T. R., Hanna, M. C., Nguyen, D. T., Saudek, D. M., Brandon, R. C., Fine, L. D., Fritchman, J. L., Fuhrmann, J. L., Geoghagen, N. S. M., Gnehm, C. L., McDonald, L. A., Small, K. V., Fraser, C. M., Smith, H. O. und Venter, J. C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496-512.

- Godoy, V. G., Dallas, M. M., Russo, T. A. und Malamy, M. H. (1993). A role for *Bacteroides fragilis* neuraminidase in bacterial growth in two model systems. *Infect. Immun.* 61, 4415-4426.
- Groß, H. J. und Brossmer, R. (1988). Inhibition of *N*-acetylneuraminidase by *N*-acetyl-4-oxo-*D*-neuraminic acid. *FEBS Lett.* 232, 145-147.
- Groß, H. J., Kovac, A., Rose, U., Watzlawick, H. und Brossmer, R. (1988). Interaction of *N*-acetyl-4-*epi-D*-neuraminic acid with key enzymes of sialic acid metabolism. *Biochemistry* 27, 4279-4283.
- Guex, N., Diemand, A. und Peitsch, M. C. (1999). Protein modelling for all. *Trends Biochem. Sci.* 24, 364-367.
- Hagedorn, H. W. und Brossmer, R. (1986). Synthesis and biological properties of *N*-acetyl-4-deoxy-*D*-neuraminic acid. *Helv. Chim. Acta* 69, 2127-2133.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Nakamura, M. und Ohkura, Y. (1985). Determination of alpha-keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatography* 344, 33-39.
- Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Nakamura, M. und Ohkura, Y. (1987). Fluorometric high-performance liquid chromatography of *N*-acetyl- and *N*-glycolylneuraminic acids and its application to their microdetermination in human and animal sera, glycoproteins, and glycolipids. *Anal. Biochem.* 164, 138-145.
- Hara, S., Yamaguchi, M., Takemori, Y., Furuhashi, K., Ogura, H. und Nakamura, M. (1989). Determination of mono-*O*-acetylated *N*-acetylneuraminic acids in human and rat sera by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 179, 162-166.
- Hatheway, C. L. (1990). Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 66-98.
- Haverkamp, J., Spoormaker, T., Dorland, L., Vliegthart, J. F. G. und Schauer, R. (1979). Determination of the β -anomeric configuration of cytidine-5'-monophospho-*N*-acetylneuraminic acid by ^{13}C -NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 4851-4853.
- Haverkamp, J., van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J. F., Pfeil, R. und Schauer, R. (1982). High-resolution ^1H -NMR spectroscopy of free and glycosidically linked *O*-acetylated sialic acids. *Eur. J. Biochem.* 122, 305-311.
- Heimer, R. und Meyer, K. (1956). Studies on sialic acid of submaxillary mucoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42, 728-734.
- Hengen, P. (1995). Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 20, 285-286.

- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H. D., Müller, H. P., Shukla, A. K. und Schauer, R. (1985). The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase. *EMBO J.* 4, 1503-1506.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- Higa, H. H., Rogers, G. N. und Paulson, J. C. (1985). Influenza virus hemagglutinins differentiate between receptor determinants bearing *N*-acetyl-, *N*-glycolyl-, and *N,O*-diacetylneuraminic acids. *Virology* 144, 279-282.
- Hochuli, E., Döbeli, H. und Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411, 177-184.
- Hoyer, L. L., Hamilton, A. C., Steenbergen, S. M. und Vimr, E. R. (1992). Cloning, sequencing and distribution of the *Salmonella typhimurium* LT2 sialidase gene, *nanH*, provides evidence for interspecies gene transfer. *Mol. Microbiol.* 6, 873-884.
- Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H. und Brow, M. A. (1988). DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9436-9440.
- Izard, T., Lawrence, M. C., Malby, R. L., Lilley, G. G. und Colman, P. M. (1994). The three-dimensional structure of *N*-acetylneuraminidase from *Escherichia coli*. *Structure* 2, 361-369.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipkind, R. A., Nordheim, A. und Stunnenberg, H. G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8972-8976.
- Jennings, H. J. (1983). Capsular polysaccharides as human vaccines. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41, 155-208.
- Jerpseth, B., Greener, A., Short, J. M., Viola, J. und Kretz, P. L. (1992). *Stratagies* 5, 81-83.
- Kammann, M., Laufs, J., Schell, J. und Gronenborn, B. (1989). Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucl. Acids Res.* 17, 5404
- Kawamura, S., Tanaka, I., Yamasaki, N. und Kimura, M. (1997). Contribution of a salt bridge to the thermostability of DNA binding protein HU from *Bacillus stearothermophilus* determined by site-directed mutagenesis. *J. Biochem.(Tokyo)* 121, 448-455.
- Kelm, S., Schauer, R. und Crocker, P. R. (1996). The Sialoadhesins - a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. *Glycoconj. J.* 13, 913-926.

- Kelm, S. und Schauer, R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.* 175, 137-240.
- Kim, M. J., Hennen, W. J., Sweers, H. M. und Wong, C.-H. (1988). Enzymes in carbohydrate synthesis: *N*-acetylneuraminic acid aldolase catalyzed reactions and preparation of *N*-acetyl-2-deoxy-D-neuraminic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6481-6486.
- Kolisis, F. N., Sotiroudis, T. G. und Evangelopoulos, A. E. (1980). The protective role of pyruvate against heat inactivation of *N*-acetylneuraminic acid lyase. *FEBS Lett.* 121, 280-282.
- Kolisis, F. N. (1985). Number and function of sulphhydryl groups of *N*-acetylneuraminic acid lyase. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 93, 89-92.
- Kozianka, J., Kozushek, W. und Edelmann, M. (1987). Der Gasbrand - eine "wenig bekannte" Infektion mit hoher Mortalität. *Therapiewoche* 37, 4271-4292.
- Kragl, U., Gyax, D., Ghisalba, O. und Wandrey, C. (1991). Enzymatische zweistufige Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure im Enzym-Membranreaktor. *Angew. Chem.* 103, 854-855.
- Krauss, J. H., Reuter, G., Schauer, R., Weckesser, J. und Mayer, H. (1988). Sialic-acid containing lipopolysaccharides in purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 150, 584-589.
- Kruse, S. (1996). Untersuchungen zu Struktur-Funktionsbeziehungen am Beispiel der intrazellulären Sialidase aus *Clostridium perfringens*. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lasky, L. A. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 113-139.
- LaVallie, E. R. und McCoy, J. M. (1997). Enzymatic and chemical cleavage of fusion proteins. *In* Current Protocols in Molecular Biology. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl, eds. (Boston, USA: John Wiley & Sons), pp. 16.4.5-16.4.17
- Lawrence, M. C., Barbosa, J. A., Smith, B. J., Hall, N. E., Pilling, P. A., Ooi, H.-C. und Marcuccio, S. M. (1997). Structure and mechanism of a sub-family of enzymes related to *N*-acetylneuraminic acid lyase. *J. Mol. Biol.* 266, 381-399.
- Lilley, G. G., von Itzstein, M. und Ivancic, N. (1992). High-level production and purification of *Escherichia coli* *N*-acetylneuraminic acid aldolase (EC 4.1.3.3). *Protein Expr. Purif.* 3, 434-440.
- Lilley, G. G., Barbosa, J. A. und Pearce, L. A. (1998). Expression in *Escherichia coli* of the putative *N*-acetylneuraminic acid lyase gene (*nanA*) from *Haemophilus influenzae*: overproduction, purification, and crystallization. *Protein Expr. Purif.* 12, 295-304.

- Lorber, B. und Giegé, R. (1992). Preparation and handling of biological macromolecules for crystallization. *In* Crystallization of nucleic acids and proteins - a practical approach. D. Rickwood und B. D. Hames, eds. (Oxford: IRL Press), pp. 19-45.
- MacLennan, J. D. (1962). The histotoxic clostridial infections of man. *Bacteriol. Rev.* 26, 177-276.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
- Martinez, J., Steenbergen, S. und Vimr, E. (1995). Derived structure of the putative sialic acid transporter from *Escherichia coli* predicts a novel sugar permease domain. *J. Bacteriol.* 177, 6005-6010.
- Merz, A., Knöchel, T., Jansonius, J. N. und Kirschner, K. (1999). The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges. *J. Mol. Biol.* 288, 753-763.
- Meyer, T. S. und Lamberts, B. L. (1965). Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* 107, 144-145.
- Meysick, K. C., Dimock, K. und Garber, G. E. (1996). Molecular characterization and expression of a *N*-acetylneuraminase lyase gene from *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 289-292.
- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913). *Biochem. Zeitschrift* 49, 333-369.
- Miles, E. W., Kawasaki, H., Ahmed, S. A., Morita, H. und Nagata, S. (1989). The beta subunit of tryptophan synthase. Clarification of the roles of histidine 86, lysine 87, arginine 148, cysteine 170, and cysteine 230. *J. Biol. Chem.* 264, 6280-6287.
- Moffatt, B. A. und Studier, F. W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* 49, 221-227.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.
- Murray, V. (1989). Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucl. Acids Res.* 17, 8889-8889.
- Müller, H. E. (1976). Neuraminidase als Pathogenitätsfaktor bei mikrobiellen Infektionen. *Zentralbl. Bakteriol. [Orig A]* 235, 106-110.
- Nadano, D., Iwasaki, M., Endo, S., Kitajima, K., Inoue, S. und Inoue, Y. (1986). A naturally occurring deaminated neuraminic acid, 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (KDN). Its unique occurrence at the nonreducing ends of oligosialyl chains in polysialoglycoprotein of rainbow trout eggs. *J. Biol. Chem.* 261, 11550-11557.

- Nees, S. und Schauer, R. (1974). Induction of neuraminidase from *Clostridium perfringens* and the co-operation of this enzyme with acylneuraminate pyruvate-lyase. Behring Inst. Mitt. 55, 68-78.
- Nees, S., Schauer, R. und Mayer, F. (1976). Purification and characterization of *N*-acetylneuraminate lyase from *Clostridium perfringens*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 839-853.
- Ohta, Y., Watanabe, K. und Kimura, A. (1985). Complete nucleotide sequence of the *E. coli N*-acetylneuraminate lyase. Nucl. Acids Res. 13, 8843-8852.
- Ooi, H.-C. (1999). Insights into sialic acid aldolase. Dissertation. Monash University, Clayton, Australien.
- Peitsch, M. C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. Biochem. Soc. Trans. 24, 274-279.
- Pilatte, Y., Bignon, J. und Lambré, C. R. (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. Glycobiology 3, 201-218.
- Popenoe, E. A. und Drew, R. M. (1957). The action of an enzyme of *Clostridium perfringens* on orosomucoid. J. Biol. Chem. 228, 673-683.
- QIAGEN (1997). The QIAexpressionist: A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.
- Ratajczak, T., Carrello, A. und Minchin, R. F. (1995). Biochemical and calmodulin binding properties of estrogen receptor binding cyclophilin expressed in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209, 117-125.
- Rath, V. L. und Fletterick, R. J. (1987). Protein structure and design 1987 - Meeting report. Cell 49, 583-586.
- Reissig, J. L., Strominger, J. L. und Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetyl amino sugars. J. Biol. Chem. 217, 959-966.
- Reuter, G. und Schauer, R. (1988). Nomenclature of sialic acids. Glycoconj. J. 5, 133-135.
- Reuter, G., Kelm, S. und Schauer, R. (1988). Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates. Acta Histochem. Suppl. 36, 51-79.
- Reuter, G. und Schauer, R. (1994a). Determination of sialic acids. Methods Enzymol. 230, 168-199.
- Reuter, G. und Schauer, R. (1994b). Enzymic methods of sialic acid analysis. Methods Carbohydr. Chem. 10, 29-39.
- Reuter, G. und Gabius, H. J. (1996). Sialic acids structure – analysis – metabolism – occurrence – recognition. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 377, 325-342.

- Rodríguez-Aparicio, L. B., Reglero, A. und Luengo, J. M. (1987). Uptake of *N*-acetylneuraminic acid by *Escherichia coli* K-235. Biochemical characterization of the transport system. *Biochem. J.* 246, 287-294.
- Rodríguez-Aparicio, L. B., Ferrero, M. A. und Reglero, A. (1995). *N*-acetyl-D-neuraminic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 occurs through condensation of *N*-acetyl-D-mannosamine and pyruvate. *Biochem. J.* 308, 501-505.
- Roggentin, T., Roggentin, P., Kleineidam, R. G., Majewski, D. M. und Schauer, R. (1992). Clostridial sialidases and early diagnosis of gas gangrene (gas oedema). *Trends Glycosci. Glycotech.* 4, 263-268.
- Roggentin, P., Schauer, R., Hoyer, L. L. und Vimr, E. R. (1993a). The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Mol. Microbiol.* 9, 915-921.
- Roggentin, T., Kleineidam, R. G., Majewski, D. M., Tirpitz, D., Roggentin, P. und Schauer, R. (1993b). An immunoassay for the rapid and specific detection of three sialidase-producing clostridia causing gas gangrene. *J. Immunol. Meth.* 157, 125-133.
- Roggentin, P., Kleineidam, R. G. und Schauer, R. (1995). Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens* spp.. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 569-575.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R. und Gehring, W. J. (1992). Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* 256, 673-675.
- Rutter, W. J., Rajkumar, T., Penhoet, E., Kochman, M. und Valentine, R. (1968). Aldolase variants: structure and physiological significance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 102-117.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. N. Ford, C. Nolan und M. Ferguson, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schauer, R. und Wember, M. (1971). Inhibition of acylneuraminate pyruvate-lyase: Evidence of intermediary Schiff's base formation and a possible role of histidine residues. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1517-1523.
- Schauer, R., Wember, M., Wirtz-Peitz, F. und Ferreira do Amaral, C. (1971). Studies on the substrate specificity of acylneuraminate pyruvate-lyase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1073-1080.
- Schauer, R. (1982). Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40, 131-234.

- Schauer, R., Reuter, G., Mühlpfordt, H., Andrade, A. F. und Pereira, M. E. (1983). The occurrence of *N*-acetyl- and *N*-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 364, 1053-1057.
- Schauer, R. (1985). Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem. Sci.* 10, 357-360.
- Schauer, R., Stoll, S., Zbiral, E., Schreiner, E., Brandstetter, H. H., Vasella, A. und Baumberger, F. (1987). Interaction of *N*-acetyl-4-, 7-, 8- or 9-deoxyneuraminic acids and *N*-acetyl-4-, 7- or 8-mono-*epi*- and -7,8-di-*epi*-neuraminic acids with *N*-acetylneuraminidase. *Glycoconj. J.* 4, 361-369.
- Schauer, R. (1991). Biosynthesis and function of *N*- and *O*-substituted sialic acids. *Glycobiology* 1, 449-452.
- Schauer, R. (1992). Sialic acids regulate cellular and molecular recognition. *In Carbohydrates - synthetic methods and applications in medicinal chemistry*. H. Ogura, A. Hasegawa und T. Suami, eds. (Weinheim: VCH), pp. 340-354.
- Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P. und Shaw, L. (1995). Biochemistry and role of sialic acids. *In Biology of sialic acids*. A. Rosenberg, ed. (New York: Plenum Press), pp. 7-67.
- Schauer, R. und Wember, M. (1996). Isolation and characterization of sialate lyase from pig kidney. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 377, 293-299.
- Schauer, R. und Kamerling, J. P. (1997). Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. *In Glycoproteins II*. J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart, und H. Schachter, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 243-402.
- Schauer, R., Sommer, U., Krüger, D., van Unen, H. und Traving, C. (1999). The terminal enzymes of sialic acid metabolism: Acylneuraminidase pyruvate-lyases. *Biosci. Rep.* 19, 373-383.
- Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W. und Nussenzweig, V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65, 1117-1125.
- Sharon, N. und Lis, H. (1997). Microbial lectins and their glycoprotein receptors. *In Glycoproteins II*. J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart und H. Schachter, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 475-506.
- Shaw, L. und Schauer, R. (1988). The biosynthesis of *N*-glycoloylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of *N*-acetylneuraminic acid. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 477-486.

- Shima, S., Tziatzios, C., Schubert, D., Fukada, H., Takahashi, K., Ermler, U. und Thauer, R. K. (1998). Lyotropic-salt-induced changes in monomer/dimer/tetramer association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* in relation to the activity and thermostability of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **258**, 85-92.
- Shukla, A. K. und Schauer, R. (1986). Analysis of sialidase and *N*-acetylneuraminat-pyruvat-lyase substrate specificity by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **158**, 158-164.
- Smith, B. J., Lawrence, M. C. und Barbosa, J. A. R. G. (1999). Substrate-assisted catalysis in sialic acid aldolase. *J. Org. Chem.* **64**, 945-949.
- Sommer, U. (1996). Isolierung und Charakterisierung der Sialat-Pyruvat-Lyase aus Schweineniere und Einblicke in das katalytische Zentrum. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Sommer, U., Traving, C. und Schauer, R. (1999). The sialate pyruvat-lyase from pig kidney: purification, properties and genetic relationship. *Glycoconj. J.* **16**, 425-435.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.
- Sugahara, K., Sugimoto, K., Nomura, O. und Usui, T. (1980). Enzymatic assay of serum sialic acid. *Clin. Chim. Acta* **108**, 493-498.
- Suggs, S. V., Hirose, T., Miyake, T., Kawashima, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K. und Wallace, R. B. (1981). Use of synthetic oligodeoxyribonucleotides for the isolation of cloned DNA sequences. *In* *Developmental biology using purified genes*. D. D. Brown und C. F. Fox, eds. (New York: Academic Press), pp. 683-693.
- Suttajit, M., Urban, C. und McLean, R. L. (1971). *N*-acetylneuraminic acid analogues. II. The action of *N*-acetylneuraminic acid aldolase on 8-carbon and 7-carbon analogues. *J. Biol. Chem.* **246**, 810-814.
- Takahashi, I., Takasaki, Y. und Hori, K. (1989). Site-directed mutagenesis of human aldolase isozymes: the role of Cys-72 and Cys-338 residues of aldolase A and of the carboxy-terminal Tyr residues of aldolases A and B. *J. Biochem. (Tokyo)* **105**, 281-286.
- Traving, C. und Schauer, R. (1996). Sialinsäuren - ein Schutzschild auf Zellen. *Futura* **3**, 168-178.
- Traving, C., Roggentin, P. und Schauer, R. (1997). Cloning, sequencing and expression of the acylneuraminat lyase gene from *Clostridium perfringens* A99. *Glycoconj. J.* **14**, 821-830.
- Traving, C. und Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 1330-1349.

- Uchida, Y., Tsukada, Y. und Sugimori, T. (1984). Purification and properties of *N*-acetylneuraminase lyase from *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* 96, 507-522.
- Varki, A., Hooshmand, F., Diaz, S., Varki, N. M. und Hedrick, S. M. (1991). Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-*O*-acetyltransferase. *Cell* 65, 65-74.
- Varki, A. (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2, 25-40.
- Veillon, A. und Zuber, A. (1898). Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.* 10, 517-545.
- Vimr, E. R. und Troy, F. A. (1985a). Identification of an inducible catabolic system for sialic acids (*nan*) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164, 845-853.
- Vimr, E. R. und Troy, F. A. (1985b). Regulation of sialic acid metabolism in *Escherichia coli*: role of *N*-acetylneuraminase pyruvate-lyase. *J. Bacteriol.* 164, 854-860.
- Vogt, G., Woell, S. und Argos, P. (1997). Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J. Mol. Biol.* 269, 631-643.
- von Itzstein, M., Wu, W. Y., Kok, G. B., Pegg, M. S., Dyason, J. C., Jin, B., Van Phan, T., Smythe, M. L., White, H. F. und Oliver, S. W. (1993). Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 363, 418-423.
- von Itzstein, M. und Kiefel, M. J. (1997). Sialic acid analogues as potential antimicrobial agents. *In Carbohydrates in drug design*. J. Witczak und K. A. Nieforth, eds. (New York: Marcel Dekker Inc.), pp. 39-81.
- Walters, D.M., Stirewalt, V.L. und Melville, S.B. (1999). Cloning, sequence, and transcriptional regulation of the operon encoding a putative *N*-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase (*nanE*) and sialic acid lyase (*nanA*) in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 181, 4526-4532.
- Wong, C.-H., Halcomb, R. L., Ichikawa, Y. und Kajimoto, T. (1995). Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 1). *Angew. Chem.* 107, 453-474.
- Yamasaki, R., Griffiss, J. M., Quinn, K. P. und Mandrell, R. E. (1993). Neuraminic acid is alpha 2-->3 linked in the lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain 6275. *J. Bacteriol.* 175, 4565-4568.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Zbiral, E., Kleineidam, R. G., Schreiner, E., Hartmann, M., Christian, R. und Schauer, R. (1992). Elucidation of the topological parameters of *N*-acetylneuraminic acid and some analogues involved in their interaction with the *N*-acetylneuraminase lyase from *Clostridium perfringens*. *Biochem. J.* 282, 511-516.

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A_{xnm}	Absorption bei x nm
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSM	Rindersubmandibulardrüsenmucin
C_x	Kohlenstoffatom x
CMP	Cytidinmonophosphat
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMB	1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Farad
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
g	relative Zentrifugalbeschleunigung (9,81 m/s ²)
h	Stunde
H ₂ O ^{bidest.}	zweifach deionisiertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k_1	Geschwindigkeitskonstante der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes aus Enzym und Substrat
k_2	Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes in Enzym und Substrat
k_3	Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Enzym-Substrat-Komplexes in Enzym und Produkt
Kdn	Ketodesoxyonulosonsäure
K_M	Michaelis-Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactat-Dehydrogenase
m	Meter
M	Mol pro Liter
ManNAc	N-Acetylmannosamin
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
Neu4,5Ac ₂	N-Acetyl-4-O-Acetylneuraminsäure
Neu5,9Ac ₂	N-Acetyl-9-O-Acetylneuraminsäure
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolyneuraminsäure

NMR	magnetische Kernresonanz
Ω	Ohm
OD _x	optische Dichte bei x nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDMAB	paraDimethylaminobenzaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
[S]	Substratkonzentration
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPL14	rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von <i>Clostridium perfringens</i> , exprimiert nach Klonierung in pET14b
SPL19	rekombinante Sialat-Pyruvat-Lyase von <i>Clostridium perfringens</i> , exprimiert nach Klonierung in pET19b
Tab.	Tabelle
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
T _M	Schmelzpunkt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
V	Geschwindigkeit des Substratumsatzes
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes
°C	Grad Celsius

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenosin	G	Desoxyguanosin
C	Desoxycytidin	T	Desoxythymidin

Symbole für die Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Roland Schauer für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für sein großes Interesse an dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Michael Thomm danke ich für seine Unterstützung und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Christina Traving, die mir in besonderer Weise bei dieser Arbeit beigestanden hat. Ihre Betreuung meiner Arbeit, ihre ständige Gesprächsbereitschaft und ihre wertvollen Ratschläge waren mir eine sehr große Hilfe.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Lee Shaw danke ich sehr herzlich für die vielen Tips und Ratschläge, vor allem bei den Versuchen zur Enzymkinetik. Auch bei der Vorbereitung englischsprachiger Präsentationen war er mir eine sehr große Hilfe.

Bei Herrn Dr. Guido Kohla bedanke ich mich sehr herzlich für die viele Hilfe bei den HPLC-Versuchen, aber auch bei vielen kleinen „technischen“ Schwierigkeiten.

Frau Henrieke van Unen und Frau Andrea Wächter danke ich sehr herzlich für die technische Unterstützung der Arbeit und für das sehr nette Arbeitsklima.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Hans-Christian Siebert bedanke ich mich sehr für die NMR-Untersuchungen der rekombinanten Sialat-Pyruvat-Lyase und für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Garry Taylor danke ich für die interessanten Diskussionen zur Struktur der Sialat-Pyruvat-Lyasen, sein Interesse an dieser Arbeit und die Zusammenarbeit, die hoffentlich bald zur Aufklärung der Röntgenstruktur der clostridiellen Lyase führt.

Herrn Dr. Reinhard Kleineidam danke ich für die Beratung bei der Auswahl der Mutanten.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders bei Ilka, Petra, Alice und Jörg, bedanke ich mich für die freundliche Atmosphäre im Labor und die stete Hilfsbereitschaft.

Frau Antje Krohn danke ich sehr herzlich für die Hilfe bei den Photoarbeiten.

Bei Frau Elfriede Schauer und Frau Rosemarie Stimm möchte ich mich für die vielen kleinen und größeren Hilfestellung sehr herzlich bedanken.

Abschließend möchte ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danken.