

Über die Aktivitätssteigerung mikrobieller Neuraminidasen bei niedrigen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen

Bakterielle Neuraminidasen galten lange Zeit als pathogenetisch bedeutungslose Enzyme. Das war wohl dadurch bedingt, dass die Bakterien, bei denen zuerst Neuraminidase entdeckt wurde, wie *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae* und *Corynebacterium diphtheriae* für die Pathogenese wesentlich wichtigere Toxine besitzen. Hier tritt die Bedeutung der Neuraminidase als Pathogenitätsfaktor in den Hintergrund und es ist verständlich, dass sie deshalb völlig übersehen wurde.

Inzwischen fand sich aber bei einer Reihe anderer pathogener Mikroorganismen ebenfalls Neuraminidase, so bei Pneumokokken^{1, 2}, *Pasteurella multocida*^{3, 4}, *Erysipelothrix insidiosa*^{3, 5}, *Corynebacterium acnes*^{3, 6}, *Bacteroides fragilis*⁷ und anderen Arten der Familie Bacteroidaceae^{8, 9} und schliesslich auch bei Mykoplasmen wie *Mycoplasma gallisepticum*¹⁰. Und bei keinem dieser Keime ausser vielleicht bei *M. gallisepticum* besass man bisher Ansatzpunkte für eine Erklärung ihrer Pathogenität. Andererseits wurde neuerdings eine Reihe von Beobachtungen bekannt, die eine pathogenetische Bedeutung der Neuraminidase gerade bei diesen Keimen wahrscheinlich machen.

Speziell bei Mykoplasmen wird ausserdem schon seit einiger Zeit das Wasserstoffperoxid als ein Pathogenitätsfaktor angesehen¹¹⁻¹⁴. Dafür spricht eine Reihe von Beobachtungen. Aber auch im Stoffwechsel vieler anderer Mikroorganismen spielt das Wasserstoffperoxid eine grosse Rolle. Wieweit es allerdings hier auch pathogenetische Bedeutung besitzt, ist nicht bekannt. In der folgenden Arbeit wurde die Einwirkung von Wasserstoffperoxid auf einige bakterielle Neuraminidasen untersucht, um an diesen Modellsystemen die Frage zu klären, ob Wasserstoffperoxid die Enzymaktivität der Neuraminidase verändert. Daraus liess sich ein besseres Verständnis für den Pathomechanismus von Mikroorganismen erwarten, die sowohl Neuraminidase als auch Wasserstoffperoxid produzieren, wenn man einmal von der Frage absieht, ob nicht auch Wasserstoffperoxid im Gewebe des infizierten Makroorganismus die bakteriellen Neuraminidasen aktivieren kann¹⁵.

Material und Methodik. 1. Material: Bakterielle Neuraminidasen. Neuraminidase von *Clostridium perfringens* wurde von Fa. Boehringer, Mannheim, bezogen und in einer Aktivität von 0,3 U/ml (bei 37°C und Mucin als Substrat) untersucht. Neuraminidase von *Vibrio cholerae* wurde von den Behringwerken Marburg bezogen. Sie kam in

einer Aktivität von 250 U/ml (bei 37°C und saurem α_1 -Glykoprotein als Substrat) zur Untersuchung. Neuraminidase von *Pasteurella multocida* wurde folgendermassen gewonnen: Die Zellen von *P. multocida* wurden nach 48-stündiger Bebrütung von Tryptose-Agarplatten mit physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt, mit Ultraschall aufgebrochen, hochtourig zentrifugiert und der Überstand über eine Sephadex-G 100-Säule perkoliert. Anhand einer Enzymverteilungskurve wurde die Fraktion mit dem höchsten Enzymgehalt gesammelt und mit Lyphogel (Fa. CAMAG, Muttenz, Schweiz) eingeengt. Die spezifische Aktivität betrug 200 U/ml (bei 37°C und saures α_1 -Glykoprotein als Substrat).

2. Methodik: Zu einer geometrischen H_2O_2 -Verdünnungsreihe von 10 Verdünnungsstufen beginnend mit 3% H_2O_2 und einer Kontrolle ohne H_2O_2 wurden jeweils gleiche Mengen der verschiedenen Neuraminidasen zugesetzt, so dass eine H_2O_2 -Endkonzentration resultierte, die von 1,5% bis zu 0,0029% reichte. Das Gemisch wurde für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und danach katalasehaltiges Humanserum als Substrat für die Neuraminidase zugegeben. Nach weiterer Bebrütung über 4 Stunden bei 37°C wurde die freigesetzte Acylneuraminsäure als Mass der

- ¹ H. E. MÜLLER, Dt. med. Wschr. 94, 2149 (1969).
- ² H. E. MÜLLER, Z. Immun.-Forsch. 140, 417 (1970).
- ³ H. E. MÜLLER, Zentbl. Bakt. Parasit Kde. 217, 254 (1971).
- ⁴ H. E. MÜLLER, Z. Immun.-Forsch. 142, 31 (1971).
- ⁵ H. E. MÜLLER, Pathologia Microbiol. 37, 241 (1971).
- ⁶ H. E. MÜLLER, Z. med. Mikrobiol. Immunol. 156, 240 (1971).
- ⁷ H. E. MÜLLER und H. WERNER, Z. med. Mikrobiol. Immunol. 156, 98 (1970).
- ⁸ H. E. MÜLLER und H. WERNER, Pathologia Microbiol. 36, 135 (1970).
- ⁹ H. WERNER und H. E. MÜLLER, Zentbl. Bakt. Parasit Kde. 216, 96 (1971).
- ¹⁰ K. K. SETHI und H. E. MÜLLER, Infection Immunity 5, 260 (1972).
- ¹¹ P. C. BRENNAN und R. N. FEINSTEIN, J. Bact. 98, 1036 (1969).
- ¹² J. D. CHERRY und D. TAYLOR-Robinson, Infection, Immunity 2, 431 (1970).
- ¹³ G. COHEN und N. L. SOMERSON, J. Bact. 98, 547 (1969).
- ¹⁴ O. SOBESLAVSKY und R. M. CHANOCK, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 129, 531 (1968).
- ¹⁵ N. L. SOMERSON, B. E. WALLS und R. M. CHANOCK, Science 150, 226 (1965).

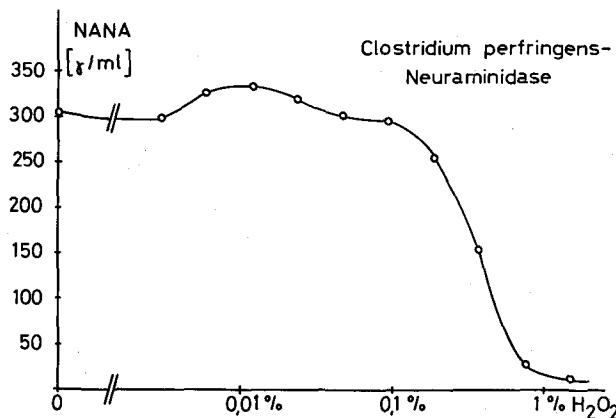


Fig. 1. Die Abhängigkeit der *Clostridium perfringens*-Neuraminidase-Aktivität von der H_2O_2 -Konzentration.

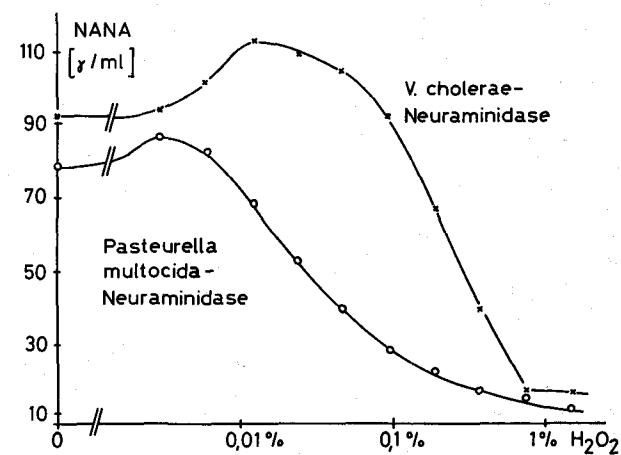


Fig. 2. Die Abhängigkeit der *Pasteurella multocida*- und der *Vibrio cholerae*-Neuraminidase-Aktivität von der H_2O_2 -Konzentration.

Enzymaktivität mit der Thiobarbiturat-Methode nach WARREN¹⁶ in üblicher Weise bestimmt.

Ergebnisse. Die Ergebnisse der Neuraminidase-Aktivitätsbestimmungen nach Einwirkung von H₂O₂ verschiedener Konzentration auf die Neuraminidasen sind aus den Figuren 1 und 2 zu ersehen. Bei allen drei bakteriellen Neuraminidasen findet sich zwar bei hohen H₂O₂-Konzentrationen von 1,5% eine Enzymaktivierung. Bei *V. cholerae*- und *C. perfringens*-Neuraminidase beeinflussten schon Konzentrationen von 0,1% H₂O₂ die Enzymaktivität nicht mehr merklich, bei *P. multocida* allerdings war erst bei weniger als 0,01% H₂O₂ die Enzymaktivität nicht mehr erniedrigt. Aber darüber hinaus ergab sich die überraschende Beobachtung, dass zwar bei etwas verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen für die einzelnen Enzyme doch gleichlaufend in der Tendenz bei allen untersuchten Neuraminidasen eine deutliche Aktivierung durch niedrige Wasserstoffperoxid-Konzentrationen erfolgt, was aus der Tatsache deutlich wird, dass die H₂O₂-freie Enzymkontrolle (als Nullwert bei den Kurven aufgetragen) stets wesentlich niedrigere Aktivität aufwies als die H₂O₂-haltigen Proben. Und zwar liegt das Optimum der Enzymaktivierung für *C. perfringens* und für *V. cholerae* etwa bei 0,01% H₂O₂, für *P. multocida* bei etwa 0,002% H₂O₂.

Diskussion. Die vorliegenden Untersuchungen über den Einfluss von H₂O₂ auf die Neuraminidase-Aktivität wurden als Modellsysteme an den zur Zeit verfügbaren bakteriellen Neuraminidasen durchgeführt, um das besonders bei Mykoplasmen wichtige Zusammenwirken der beiden Pathogenitätsfaktoren Neuraminidase und Wasserstoffperoxid zu studieren. Ob bei den katalasehaltigen Neuraminidase-Bildnern wie *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium acnes*, *Pasteurella multocida* und *Vibrio cholerae* dieser synergistische Effekt des H₂O₂ auf die Neuraminidase eine geringere Rolle spielt als bei den Katalase-negativen Keimen wie *Bacteroides fragilis* und anderen Neuraminidase-positiven Keimen der *Bacteroides*-Gruppe⁹, *Clostridium perfringens* und andere Neuraminidase-positiven Closteriden der Gasödemgruppe, *Diplococcus pneumoniae*,

Erysipelothrix insidiosa und nicht zuletzt bei *Mycoplasma gallisepticum* muss offenbleiben, denn die hier studierten in vitro-Systeme werden durch die in vivo-Verhältnisse überlagert. Hier aber entsteht ebenfalls Wasserstoffperoxid, so etwa bei der Oxidation reduzierter Flavin-Systeme, das dann durch die im Makroorganismus meist vorhandene Katalase oder Peroxidase metabolisiert wird. Mit grosser Wahrscheinlichkeit wird daher die Aktivität der bakteriellen Neuraminidasen durch H₂O₂ auch innerhalb des Makroorganismus erhöht. In diesem Sinn ist auch der Befund zu deuten, wonach etwa die *P. multocida*-Neuraminidase bei geringeren Wasserstoffperoxid-Konzentrationen aktiviert wird. Entsprechend verfügt *P. multocida* selbst über Katalase und trägt damit zu einem relativ niedrigen H₂O₂-Gehalt selbst bei. Umgekehrt besitzt *Clostridium perfringens* keine Katalase und die Aktivierung durch H₂O₂ erfolgt bei etwas höheren H₂O₂-Konzentrationen. Bei *V. cholerae* schliesslich ist zwar eine bakterien-eigene Katalase vorhanden, aber im Darm ist der Katalase-Gehalt vergleichsweise geringer als im infizierten Wundgewebe.

Summary. The activity of bacterial neuraminidases can be influenced by H₂O₂ secreted by some organisms. Thus, at low H₂O₂ concentrations (0.002–0.01%), an increase of neuraminidase activities was observed, whereas at concentrations 0.1% the enzyme activities were destroyed.

H. E. MÜLLER und K. K. SETHI

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
der Universität,
D-53 Bonn-Venusberg 1 (Deutschland),
25. August 1971.

¹⁶ L. WARREN, J. biol. Chem. 234, 1971 (1959).

Antifibrinolytic Properties of Basic Proteins

Amongst many various biological properties of basic proteins, their action upon the blood haemostasis attracts particular attention. The heparin neutralizing effects of basic proteins of thrombocytes¹ and leukocytes² have been shown. These proteins, similarly to protamine sulphate, precipitate from plasma in a non-enzymatic manner soluble complexes of fibrin monomers and fibrinogen, degradation product of fibrinogen and fibrin and also fibrinogen itself^{1,3}.

Recently it has been shown that basic proteins of thrombocytes, leukocytes and various tissues and mainly histones interact with soluble complexes of fibrinogen-fibrin monomers and form molecular aggregates of various size and organisation and enhanced the clot formation. This effect can be inhibited by addition of acid mucopolysaccharides such as heparin and chondroitin sulphate³, which neutralized these effects of basic proteins. One can suppose that basic proteins are not only incorporated into the structure of a thrombin-induced clot but they also alter this structure. According to several authors, a changed structure of the clot of desmofibrin^{4,5} and the clot changed by synthetic antifibrinolytic^{5,6} are more resistant to the plasmin proteolytic action.

On the basis of these observations, in the present report the authors attempt to answer the question whether basic proteins exhibit antifibrinolytic properties or not.

Table I indicates that both histones and protamine possess a marked antifibrinolytic action dependent on the concentration of these basic proteins. At the same concentrations, histones and protamine do not inhibit the fibrin proteolysis when measured by the increase of TCA-soluble tyrosine. The assay of arginine in the fibrin clot showed greater amounts of this amino acid in samples in which fibrinogen was clotted in the presence of histones and prot-

¹ S. NIEWIAROWSKI, A. POPLAWSKI, B. LIPINSKI and R. FARBISZEWSKI, Expl. Biol. Med. 3, 121 (1968).

² H. J. SABA, H. R. ROBERTS and J. C. HERION, Blood 31, 369 (1968).

³ M. KOPEC, S. WĘGRZYNOWICZ and Z. S. LATALLO, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 135, 675 (1970).

⁴ J. GORMSEN, A. P. FLETCHER, N. ALKJAERSIG and S. SHERRY, Arch. Biochem. Biophys. 120, 654 (1967).

⁵ H. LUKASIEWICZ and S. NIEWIAROWSKI, Thromb. Diath. haemorrh. 19, 584 (1968).

⁶ R. E. MAXWELL and D. ALLEN, Nature, Lond. 209, 211 (1966).