

# Michaelis-Konstanten von Neuraminidasen bei pathogenen und apathogenen Mikroorganismen

Michaelis Constants of Neuraminidases of Pathogenic and Apathogenic Microorganisms

Hans E. Müller, Hubertus von Nicolai und Fritz Zilliken

Staatliches Medizinisches Untersuchungsamt Braunschweig und Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Bonn

(Z. Naturforsch. 30 c, 417–419 [1975]; eingegangen am 27. Dezember 1974)

Neuraminidase, Microorganisms, Michaelis Constant, Pathogenicity

The  $K_m$ -values of neuraminidasen from different pathogenic and apathogenic microorganisms have been determined on low and high molecular substrates. The substrate specificity and the affinity to the different types of substrates in relation to the pathogenicity of the microorganisms are discussed.

Die Frage, ob mikrobiellen Neuraminidasen (Sialidase, N-Acylneuraminatglycohydrolase, EC 3.2.1.18) eine pathogenetische Bedeutung beim Infektionsgeschehen zukommt, wurde schon auf verschiedene Weise zu beantworten versucht. In diesem Sinne sprechen etwa die engen Korrelationen zwischen der Neuraminidase-Produktion und der Pathogenität bzw. der Virulenz bei verschiedenen Bakterien-Arten oder Stämmen einer Art, wie das bei *Bacteroides*<sup>1</sup>, *Corynebacterium*<sup>2</sup>, *Erysipelothrix*<sup>3</sup>, *Pasteurella multocida*<sup>4</sup> oder NAG-Vibronen<sup>5</sup> gezeigt werden konnte. Außerdem lassen einige klinische Befunde an eine pathogene Wirkung der Neuraminidasen denken<sup>6, 7</sup>.

Neuraminidasen kommen zwar bei vielen pathogenen Mikroorganismen vor<sup>8</sup>, die Tatsache jedoch, daß auch das völlig apathogene *Bifidobacterium bifidum* aus dem Darm brusternährter Säuglinge ebenfalls Neuraminidase bildet<sup>9, 10</sup>, macht eine etwas differenziertere Betrachtungsweise notwendig.

In diesem Zusammenhang bestimmten wir bei einer Reihe verschiedener mikrobieller Neuraminidasen die Michaelis-Konstanten ( $K_m$ ) sowohl für niedrig- als auch für hochmolekulare Substrate, soweit sie nicht bereits aus der Literatur zugänglich waren.

## Material und Methoden

a. Neuraminidasen wurden aus folgenden Mikroorganismen isoliert: *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*, identisch mit *Lactobacillus bifidus*

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. F. Zilliken, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, D-5300 Bonn, Nußallee 11.

var. *penn.*, ATCC 11863; *Corynebacterium haemolyticum*, ATCC 9345; *Erysipelothrix insidiosa*, Stamm 119 (K.-H. Böhm, Hannover); *Mycoplasma gallisepticum*, Stamm TT (A. Ruys, Amsterdam); *Pasteurella multocida*, Stamm 9133/67; *Trichomonas foetus*, Stamm Schleißheim (Dr. Beck, Ober-Schleißheim). Die Präparation der Neuraminidasen ist aus vorhergehenden Arbeiten zu entnehmen<sup>11, 12</sup>.

b. Substrate waren die folgenden Oligosaccharide, deren Isolierung aus Kuhcolostrum und Frauenmilch anderenorts beschrieben ist<sup>13</sup>: 3'-Neuraminosyl-lactose = Neu-NAca2 → 3Galβ1 → 4Glc = 3'-SL; 6'-Neuraminosyl-lactose = Neu-NAca2 → 6Galβ1 → 4Glc = 6'-SL; Di-neuraminosyl-lactose = Neu-NAca2 → 8NeuNAca2 → 3Galβ1 → 4Glc = 8',3'-DSL. Außerdem wurden ein kommerzielles Isomeren-Gemisch aus Kuhcolostrum mit ca. 80% 3'-SL und 20% 6'-SL und reine Humanproteine verwendet (siehe Tab. I).

c. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach der von Aminoff<sup>14</sup> modifizierten Thiobarbituratmethode nach Warren<sup>15</sup>. Die Michaelis-Konstanten wurden graphisch nach Lineweaver-Burk ermittelt.

## Ergebnisse und Diskussion

In Tab. I sind die  $K_m$ -Werte mikrobieller Neuraminidasen zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß ausnahmslos alle Neuraminidasen niedrigere  $K_m$ -Werte und damit höhere Affinität gegenüber hochmolekularen Substraten wie etwa Glykoproteinen und umgekehrt höhere  $K_m$ -Werte und deshalb auch geringere Affinitäten gegenüber niedermolekularen Neuraminosyl-laktosen bzw. Sialyllaktosen aufweisen. Das mag im Zusammenhang mit der



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I. Michaelis-Konstanten ( $K_m$ ) von Neuraminidasen bei niedermolekularen und hochmolekularen Substraten.

Lfd. Neuraminidase Nr. von	niedermolekulare Substrate	hochmolekulare Substrate	$K_m$ [M]	Lit.
	pH Substrat	pH Substrat		
1 <i>Bifidobacterium bifidum</i> var. <i>penn.</i>	5,0 3'-SL 6'-SL 8',3'-DSL	1,0 × 10 <sup>-3</sup> 2,0 × 10 <sup>-3</sup> 3,5 × 10 <sup>-3</sup>	5,0 saures $\alpha_1$ -Glykoprotein	5 × 10 <sup>-4</sup>
2 <i>Clostridium perfringens</i>	4,5 SL a	2,4 × 10 <sup>-3</sup>	6,0 Fetuin	10 <sup>-4</sup> 19, 20
3 <i>Corynebacterium haemolyticum</i>	5,0 3'-SL 6'-SL 8',3'-DSL	4,0 × 10 <sup>-4</sup> 4,0 × 10 <sup>-4</sup> 1,0 × 10 <sup>-3</sup>	5,0 saures $\alpha_1$ -Glykoprotein	4 × 10 <sup>-4</sup>
4 <i>Diplococcus pneumoniae</i>	6,5 SL a	1,8 × 10 <sup>-3</sup>	6,5 saures $\alpha_1$ -Glykoprotein	3,5 × 10 <sup>-4</sup> 20
5 <i>Erysipelothrix insidiosa</i>	6,5 SL a	1,6 × 10 <sup>-3</sup>	6,5 saures $\alpha_1$ -Glykoprotein Haptoglobin Transferrin $\beta_2$ -Glykoprotein-I	6,5 × 10 <sup>-5</sup> 5,5 × 10 <sup>-5</sup> 1,4 × 10 <sup>-4</sup> 1,7 × 10 <sup>-4</sup>
6 <i>K-Streptococcus</i>	5,5 SL a	9,0 × 10 <sup>-4</sup>	5,5 Rinder-Submaxillaris-Mucin (BSM)	1,7 × 10 <sup>-4</sup> 21
7 <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	4,5 SL a	3,0 × 10 <sup>-3</sup>	5,8 saures $\alpha_1$ -Glykoprotein Transferrin	5,0 × 10 <sup>-4</sup> 3,5 × 10 <sup>-4</sup>
8 <i>Pasteurella multocida</i>	6,0 3'-SL	2 × 10 <sup>-4</sup>	5,5 saures $\alpha_1$ -Glykoprotein Haptoglobin Transferrin $\beta_2$ -Glykoprotein-I	5 × 10 <sup>-5</sup> 6 × 10 <sup>-5</sup> 5 × 10 <sup>-5</sup> 4 × 10 <sup>-5</sup>
9 <i>Trichomonas foetus</i>	6,5 SL a	5,5 × 10 <sup>-3</sup>	6,5 saures $\alpha_1$ -Glykoprotein Haptoglobin $\beta_2$ -Glykoprotein-I	2 × 10 <sup>-5</sup> 1 × 10 <sup>-5</sup> 2 × 10 <sup>-5</sup>
10 <i>Vibrio cholerae</i>	5,6 SL a	1,2 × 10 <sup>-3</sup>	5,5 saures $\alpha_1$ -Glykoprotein Haptoglobin Transferrin $\beta_2$ -Glykoprotein-I Haemopexin $\alpha_2$ -HS-Glykoprotein	1,5 × 10 <sup>-4</sup> 1,3 × 10 <sup>-4</sup> 1,5 × 10 <sup>-4</sup> 1,4 × 10 <sup>-4</sup> 9 × 10 <sup>-5</sup> 7 × 10 <sup>-5</sup>

Abkürzungen: SL a, Sialyllactose aus Kuhcolostrum als Isomerengemisch;

3'-SL, N-Acetylneuraminyl-( $\alpha$ , 2 → 3)-lactose;

6'-SL, N-Acetylneuraminyl-( $\alpha$ , 2 → 6)-lactose;

8',3'-DSL, N-Acetylneuraminyl-( $\alpha$ , 2 → 8)-N-acetylneuraminyl-( $\alpha$ , 2 → 3)-lactose.

Tatsache gesehen werden, daß alle Neuraminidaseproduzierenden Keime ihren normalen Standort auf tierischen Schleimhäuten, Ausscheidungen oder Kadavern besitzen, wo sie durch ihre Fähigkeit zum Abbau und wohl auch zum Metabolismus von Mucinen und Glykoproteinen bevorzugte ökologische Bedingungen finden. Aus den vorliegenden Untersuchungen ergibt sich kein Zusammenhang zwischen den  $K_m$ -Werten und der Pathogenität der einzelnen Mikroorganismen, wie zunächst vermutet worden war.

Es dürften demnach andere molekulare Parameter für die pathogene Wirkung von Bedeutung sein. Hier spielt wohl neben der Enzymmenge die Substratspezifität eine entscheidende Rolle, soweit sich das aus den wenigen bisher vorliegenden Untersuchungen ersehen läßt. Insbesondere hier weicht die *Bifidobacterium bifidum*-Neuraminidase wesentlich von den bisher untersuchten Enzymen obligat

pathogener Infektionserreger wie *Vibrio cholerae* oder *Clostridium perfringens* ab. Denn die *Bifidobacterium*-Neuraminidase besitzt eine höhere Substratspezifität und somit ein engeres Substratspektrum als die bisher untersuchten Enzyme hochpathogener Keime<sup>9–11, 16, 17</sup>; denn es wird lediglich ( $\alpha$ , 2 → 3)-gebundene N-Acetylneuraminsäure glatt abgespalten, während ( $\alpha$ , 2 → 6)- und ( $\alpha$ , 2 → 8)-Bindungen wesentlich langsamer angegriffen werden<sup>9, 10</sup>.

Bei Viren findet man ähnliche Verhältnisse. Die bisher untersuchten Neuraminidasen der Myxoviren besitzen teilweise noch engere Substratspektren<sup>16, 17</sup>. Und ganz entsprechend lassen sich bei diesen Viren keine Beziehungen zwischen Neuraminidase-Produktion und Pathogenität erkennen<sup>18</sup>.

Zusammenfassend ergibt sich, daß Neuraminidasen offensichtlich nur dann eine pathogene Bedeutung im Infektionsverlauf besitzen, wenn sie in gro-

ßer Menge gebildet werden und bei breitem Substratspektrum und damit geringer Substratspezifität viele makromolekulare Substanzen abbauen können.

- <sup>1</sup> H. E. Müller u. H. Werner, Path. Microbiol. **36**, 135 [1970].  
<sup>2</sup> S. B. Arden, W. H. Chang u. L. Barksdale, J. Bacteriol. **112**, 1206 [1972].  
<sup>3</sup> Chr. Krasemann u. H. E. Müller, Path. Microbiol., im Druck.  
<sup>4</sup> H. E. Müller u. Chr. Krasemann, Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A, im Druck.  
<sup>5</sup> H. E. Müller u. R. Lütticken, Path. Microbiol., im Druck.  
<sup>6</sup> K. Fischer, A. Poschmann u. H. Oster, Monatsschr. Kinderheilk. **119**, 2 [1971].  
<sup>7</sup> H. E. Müller, Dtsch. med. Wschr. **94**, 2149 [1969].  
<sup>8</sup> H. E. Müller, Dtsch. med. Wschr. **99**, 1933 [1974].  
<sup>9</sup> H. v. Nicolai u. F. Zilliken, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 1015 [1972].  
<sup>10</sup> H. v. Nicolai u. F. Zilliken, Behring Institute Mitt. **55**, 78 [1974].  
<sup>11</sup> H. v. Nicolai, H. E. Müller u. F. Zilliken, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **356**, 105 [1975].  
<sup>12</sup> H. E. Müller, Zbl. Bakt., Hyg., I. Abt. Orig. A **217**, 326 [1971].  
<sup>13</sup> H. v. Nicolai, Dissertation Bonn 1971.  
<sup>14</sup> D. Aminoff, Biochem. J. **81**, 384 [1961].  
<sup>15</sup> L. Warren, J. Biol. Chem. **234**, 1971 [1959].  
<sup>16</sup> H. v. Nicolai, R. Drzeniek u. F. Zilliken, Z. Naturforsch. **26 b**, 1049 [1971].  
<sup>17</sup> R. Drzeniek, Curr. Topics Microbiol. Immunol. **59**, 35 [1972].  
<sup>18</sup> R. Rott u. G. Müller, Arch. ges. Virusforsch. **17**, 139 [1965].  
<sup>19</sup> E. Balke u. R. Drzeniek, Z. Naturforsch. **24 b**, 599 [1969].  
<sup>20</sup> T. E. Barman (ed.), Enzyme Handbook, Springer-Verlag, Berlin 1969.  
<sup>21</sup> S. Hayano u. K. Tanaka, J. Bacteriol. **95**, 1551 [1969].  
<sup>22</sup> G. L. Ada, E. L. French u. P. E. Lind, J. Gen. Microbiol. **24**, 409 [1961].  
<sup>23</sup> H. J. Schick u. R. Schmidtberger, Behring Institute Mitt. **55**, 123 [1974].

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe.