



Lokalisierung und Funktion des Lectins B
aus *Pseudomonas aeruginosa*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe
Kai-Malte Bartels
aus Essen

Düsseldorf, Dezember 2009

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET)
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich

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

Referent: Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Herr Prof. Dr. Michael Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2010

meinen Eltern, meiner Schwester, Sandra und
Freunden

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich für die Übergabe des interessanten Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Außerdem möchte ich mich für das aufrichtige Interesse am Fortschritt meiner Forschungen und die anregenden Diskussionen bedanken. Für das Zugeständnis großer experimenteller Freiheit und die Möglichkeit internationalen wissenschaftlichen Austausches bin ich besonders dankbar.

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. Frank Rosenau und Frau Dr. Susanne Wilhelm bedanke ich mich für die konstruktiven und anregenden Diskussionen und für die Durchsicht des Manuskripts.

Frau Dr. Meleanie Brocker vom Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich danke ich für die Unterstützung bei den MALDI-TOF-MS Messungen.

Prof. Dr. Jean-Louis Reymond des *Department of chemistry and biochemistry* an der *University of Bern* danke ich für die konstruktive Kooperation bei der Identifizierung der Glycopeptid-Dendrimere.

Prof. Dr. Robert Hancock vom *Department of Microbiology and Immunology* der *University of British Columbia* danke ich für die Bereitstellung des OprF-Proteins.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET, insbesondere den Kolleginnen und Kollegen aus den Laboren 206 und 306 danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft im Laufe der gesamten Diplom- und Promotionszeit.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für die Unterstützung in den letzten Jahren und vor allem im Laufe meiner Promotion besonders danken.

Abschließend möchte ich Sandra danken, die immer für mich da war und mir stets Halt gegeben hat.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Tielker, D., Rosenau F., Bartels K.-M., Rosenbaum T., Jaeger, K.-E. (2006). Lectin-based affinity tag for one-step protein purification. *Biotechniques* **41**: 327-332

Johansson, E.M., Crusz, S.A., Kolomiets, E., Buts, L., Kadam, R.U., Cacciarini, M., Bartels, K.-M., Diggle, S.P., Cámara, M., Williams, P., Loris, R., Nativi, C., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Darbre, T., Reymond, J.-L. (2008). The inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimeres targeting the fucose-specific lectin LecB. *Chem Bio.* **15**: 1249-1257

Gustke, H., Kleene, R., Loers, G., Jaehne, M., Bartels, K.-M., Jaeger, K.-E., Schachner, M., Schumacher, U. Inhibition of the bacterial lectins of *Pseudomonas aeruginosa* with monosaccharides and peptides. Manuskript submitted.

Bartels, K.-M., Brocker, M., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E.

The lectin LecB of *Pseudomonas aeruginosa* interacts with the outer membrane porin OprF. Manuskript in Vorbereitung.

Bartels, K.-M., Wilhelm, S., Funken, H., Jaeger, K.-E., Rosenau, F.

The secreted Lectin B of *Pseudomonas aeruginosa* is a glycosylated protein with periplasmic intermediates. Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge im Rahmen internationaler Kongresse:

Bartels, K.M., Rosenau, F., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E. Jaeger (2008).

The lectin LecB of *Pseudomonas aeruginosa*. COST D34-meeting, Utrecht, Niederlande.

Johansson, E.M., Crusz, S.A., Kolomiets, E., Buts, L., Kadam, R.U., Cacciarini, M., Bartels, K.M., Diggle, S.P., Cámara, M., Williams, P., Loris, R., Nativi, C., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Darbre, T., Reymond, J.L. (2009). The inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimeres targeting the fucose-specific lectin LecB. COST D34-meeting, Edinburgh, Schottland.

Posterpräsentationen:

Bartels K.M., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2007). The fucose-specific lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa* – Physiology of a membrane associated adhesin –. COST D34-meeting, Bern, Schweiz.

Bartels K.M., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K.-E. (2008) The interactom of the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. Biospektrum: Sonderausgabe zur VAAM Jahrestagung, Frankfurt.

Bartels K.M., Wilhelm S., Hancock R. E.W., Rosenau F., Jaeger K.-E. (2009) The lectin LecB of *Pseudomonas aeruginosa* interacts with the outer membrane porin OprF. Book of abstracts der *Pseudomonas* Konferenz, Hannover.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	IV
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Lectine	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Geschichte der Lectine	1
1.1.3 Physiologische Funktion der Lectine	2
1.1.4 Lectin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen	3
1.1.5 Lectine in Bakterien	5
1.1.6 Anti-Adhäsions-Therapie bei bakteriellen Pathogenen	7
1.2 Das Pathogen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
1.2.1 Lectine aus <i>P. aeruginosa</i>	12
1.2.2 Pathogenität der Lectine	16
1.2.3 Biofilme von <i>P. aeruginosa</i>	18
1.2.4 Porine der äußeren Membran von <i>P. aeruginosa</i>	20
1.3 Glycoproteine in Bakterien	23
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Chemikalien und Enzyme	27
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	27
2.3 Oligonukleotide	28
2.4 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	29
2.5 Isolierung von Nukleinsäuren	30
2.6 Gelelektrophorese	30
2.7 <i>In vitro</i>-Rekombination von DNA	30
2.8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	30
2.9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	30
2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.10.1 Standard-PCR	31
2.10.2 Ortsspezifische Mutagenese	31
2.11 Sequenzierung von DNA	31

2.12 Inkubation von <i>P. aeruginosa</i> Zellen mit verschiedenen Zuckerlösungen	31
2.13 Gewinnung von Gesamtzellextrakten	32
2.14 Fraktionierung von <i>P. aeruginosa</i> Zellen (modifiziert nach Witholt <i>et al.</i>, 1976)	32
2.15 Präparation der äußeren Membranfraktion	32
2.16 Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	33
2.16.1 Reinigung von LecA mittels Speharose 4b	33
2.16.2 Reinigung von LecB und LecB-Liganden mittels D-Mannose-Agarose	33
2.16.3 Reinigung von LecB als Poly-Histidin-Fusionsprotein	33
2.16.4 Isolierung von Proteinen aus <i>P. aeruginosa</i> mittels immobilisiertem LecB-Histidin-Fusionsprotein	33
2.17 Größenausschlusschromatographie mittels HPLC	34
2.18 Konzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen	34
2.19 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	34
2.20 Hämagglutinationstest (HAT)	34
2.21 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.22 2-D-Gelelektrophorese	35
2.23 Immunologischer Nachweis von Proteinen	35
2.24 MALDI-TOF-MS-Analysen	36
2.24.1 Identifizierung von Proteinen	36
2.24.2 Glycan-Analyse	36
2.25. Nachweis von Glycosylierungen in Proteinen	36
2.26 Computerprogramme und Online-Datenbanken	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Reinigung der Lectine LecA und LecB aus <i>P. aeruginosa</i>	38
3.1.1 Heterologe Expression der Gene <i>lecA</i> und <i>lecB</i> und Reinigung der Lectine mittels Affinitätschromatographie	38
3.1.2 Heterologe Expression des <i>lecB</i> -Gens als Histidin-Fusionsprotein und Reinigung des Fusionsproteins mittels IMAC	39
3.1.3 Hämagglutinationstest der isolierten Lectine	40
3.1.4 Inhibierung von LecA und LecB mittels Lectin-spezifischer Dendrimere	41
3.2 Charakterisierung des periplasmatischen LecB	47
3.2.1 Isolierung und Identifizierung zweier periplasmatischer LecB-Varianten	47
3.2.2 Hinweise auf Glycosylierungen im periplasmatischen LecB-Protein	51
3.2.3 LecB interagiert mit der niedermolekularen Variante	53
3.2.4 Charakterisierung der putativen N-Glycosylierungsstelle von LecB	53

3.3 Nachweis von LecB auf der Zelloberfläche von Biofilmzellen	55
3.3.1 LecB interagiert mit Zuckerrezeptoren der Zelloberfläche	56
3.4 Nachweis und Identifizierung LecB-spezifischer Liganden in <i>P. aeruginosa</i>	57
3.4.1 LecB interagiert mit anderen <i>P. aeruginosa</i> -Proteinen	58
3.4.2 LecB interagiert mit dem äußeren Membran Porin OprF	59
3.4.3 Hinweise auf N-Glycosylierungen im OprF-Protein	62
3.4.4 OprF ist der Zelloberflächen-Rezeptor von LecB	65
4 Diskussion	66
4.1 Heterologe Expression und Reinigung von LecA und LecB	66
4.2 Screening und Aktivitätsbestimmung Lectin-spezifischer Dendrimere	68
4.3 Charakterisierung des periplasmatischen LecB-Proteins	71
4.4 Die N-Glycosylierungsstelle Asn22 beeinflusst den zellulären Transport von LecB	77
4.5 LecB interagiert mit Zuckerrezeptoren auf der Zelloberfläche	78
4.6 Detektion von putativen LecB-Liganden in <i>P.aeruginosa</i>	79
4.7 Identifizierung von OprF als LecB-Oberflächen-Rezeptor	79
5 Zusammenfassung	84
6 Literatur	87

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1 Schematische Darstellung eines Bakteriums mit einer Flagelle und mehreren Pili sowie unterschiedlicher Zucker-bindender Proteine, die strukturell analysiert wurden (S. 6)
- Abb. 2 Schematische Darstellung einer *P. aeruginosa*-Zelle mit Zell-assoziierten sowie sekretierten und translozierten Virulenzfaktoren (S. 11)
- Abb. 3 Gesamtstruktur des LecB-Proteins (S. 15)
- Abb. 4 Biofilme des Wildtyps und einer LecB-negativen Mutante unter statischen Kulturbedingungen (S. 18)
- Abb. 5 Schematische Darstellung des N-Glycosylierungs-Biosyntheseweges von *C. jejuni* (S. 24)
- Abb. 6 SDS-PAGE-Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung der Lectine LecA und LecB (S. 39)
- Abb. 7 SDS-PAGE-Analyse der affinitäts-chromatographischen Reinigung des LecB-Histidin-Fusionsproteins (S. 40)
- Abb. 8 Hämagglutinationstest der gereinigten Lectine LecA und LecB (S. 41)
- Abb. 9 Struktur der Peptide-Dendrimer-Bibliotheken (S. 42)
- Abb. 10 Biofilmbildung von *P. aeruginosa* (S. 45)
- Abb. 11 Modell des LecB-FD2-Komplexes (S. 46)
- Abb. 12 Subzelluläre Lokalisierung des Lectins LecB in sessilen Zellen von *P. aeruginosa* (S. 47)
- Abb. 13 Analyse der aus dem Periplasma gereinigten LecB-Varianten (S. 49)
- Abb. 14 Analyse der Untereinheiten der periplasmatischen LecB-Oligomere (S. 50)
- Abb. 15 Nachweis von Zuckern in den LecB-Varianten (S. 51)
- Abb. 16 Vorhersage der potentiellen N-Glykosylierungsstelle im LecB-Protein (S. 52)
- Abb. 17 Inkubation der LecB-Varianten mit der N-Glycosidase F (S. 52)
- Abb. 18 Isolierung der niedermolekularen periplasmatischen LecB-Variante mittels immobilisiertem LecB-Histidin-Fusionsprotein (S. 53)
- Abb. 19 Austausch der putativen N-Glykosylierungsstelle im LecB-Protein (S. 54)
- Abb. 20 Immunologische, subzelluläre Lokalisierung der mutierten LecB^m-Variante (S. 55)
- Abb. 21 Verdrängung des LecB-Proteins von der Zelloberfläche durch L-Fucose (S. 57)
- Abb. 22 Nachweis putativer LecB-Liganden durch Far Western Blot (S. 58)
- Abb. 23 Isolierung potentieller LecB-Liganden aus *P. aeruginosa* (S. 60)
- Abb. 24 Isolierung von OprF aus der äußeren Membran-Fraktion des *lecB*-defizienten *P. aeruginosa*-Stamms PATI2 (S. 62)
- Abb. 25 Nachweis von Glykosylierungen in dem OprF-Protein (S. 63)
- Abb. 26 Inkubation des OprF-Proteins mit der N-Glycosidase F (S. 64)
- Abb. 27 Subzelluläre Lokalisierung des Lectins LecB in sessilen Zellen des OprF-negativen *P. aeruginosa*-Stamms H636 (OprF-) (S. 65)
- Tab. 1 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme (S. 27)
- Tab. 2 Übersicht der verwendeten Vektoren (S. 28)

Tab. 3	Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide (S. 28)
Tab. 4	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (S. 28)
Tab. 5	Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika (S. 29)
Tab. 6	Struktur und ELLA- bzw. HAIT-Daten für die Referenzliganden und die LecB-spezifischen Glycopeptide-Dendrimere (S. 44)
Tab. 7	Struktur und HAIT-Daten für die Referenzliganden und die bifunktionalen LecA und LecB-spezifischen Glycopeptide-Dendrimere (S. 44)
Tab. 8	Verifizierung des periplasmatischen und heterologen LecB-Proteins durch MALDI-TOF-MS (S.50)
Tab. 9	Identifizierung der putativen LecB-Liganden durch MALDI-TOF-MS (S. 60)
Tab. 10	Verifizierung der degradierten OprF-Varianten durch MALDI-TOF-MS (S. 64)

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
A. dest.	Aqua destillata
AHL	N-Acyl-Homoserinlacton
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
C	Celsius
Cm	Chloramphenicol
CLSM	konfokale(s) Laser-Scanning Mikroskop(ie)
CP	Cytoplasma
Cs	Cycloserin
C-Terminus	Carboxyterminus
3-D	Dreidimensional
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DIG	Digoxigenin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
Gm	Gentamycin
GZE	Gesamtzellextrakt
h	Stunde(n)
HAT	Hämagglutinationstest
HAIT	<i>hemagglutination-inhibition-assay</i>
H-Brücke	Wasserstoffbrückenbindung
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Wellenlänge
Lac	Lactose
LB	<i>Luria-Bertani broth</i>
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight</i>
M	Molar
MBP	Maltose-bindendes Protein
min	Minute(n)
mM	Millimolar
μ	Micro
n	Nano
NB	Nährbouillon
NTA	Nitrilo-3-Essigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
O.D.	optische Dichte
p	pico

p.A.	<i>pro analysi</i>
PBP	periplasmatisches Bindeprotein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAG	SDS-Polyacrylamidgel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sm	Streptomycin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMF	Transformationspuffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtskultur
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Lectine

1.1.1 Definition

Lectine sind Proteine nicht immunogenen Ursprungs, die an spezifische Kohlenhydrat-Epitope binden ohne sie zu modifizieren. Sie dienen als zentrale Vermittler der Informationsübertragung in biologischen Systemen, in dem sie mit Glycoproteinen, Glykolipiden und Oligosacchariden wechselwirken. (Nilsson, 2007).

1.1.2 Geschichte der Lectine

Bereits im Jahr 1860 stellte Weir Mitchell fest, dass diverse Schlangengifte die Eigenschaft besitzen, rote Blutzellen (Erythrozyten) zu verklumpen (Hämagglutination) (Nilsson, 2007). Einige Jahre später berichtete von Stillmark (1888) über hämagglutinierende Pflanzeninhaltsstoffe. Im Rahmen seiner Dissertationsarbeit beobachtete er das Zusammenklumpen von Erythrozyten durch das toxische Ricin, einem Extrakt aus den Samen von *Ricinus communis*. Das Wissen um die hämagglutinierende Wirkung von Lectinen führte in den darauffolgenden Jahren vorerst zur Entdeckung weiterer pflanzlicher Lectine, die als Phythämagglutinine bezeichnet wurden. Ehrlich (1891 a/b) verwendete Ricin und Abrin aus *Abrus precatorius* in seinen Untersuchungen über das Immunsystem als Antigene und konnte mit ihrer Hilfe Erkenntnisse über die Bildung und Spezifität von Antikörpern erlangen. Die Reversibilität der Hämagglutination durch pflanzliche Agglutinine wurde durch Landsteiner (1902) nachgewiesen. Zusammen mit Raubitschek gelang Landsteiner 1908 erstmals die Isolierung von nicht-toxischen Phyttagglutininen, die nach ihrer Herkunft zunächst als Phasine (von *Phaseolus vulgaris*) bezeichnet wurden. Im Jahre 1936 machten Summer und Howell die Beobachtung, dass das Lectin Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis* nicht nur die Agglutination von Erythrozyten verursacht, sondern auch Stärkegranula verklumpt sowie Mukoproteine und Glykogen präzipitiert. Gleichzeitig wiesen sie eine Inhibition der Hämagglutination durch Sucrose nach. Hieraus wurde erstmals die Schlussfolgerung gezogen, dass es sich bei den Rezeptoren der Lectine um Kohlenhydratgruppen handeln könnte. Unabhängig voneinander beschrieben sowohl Renkonen (1948) als auch Boyd und Reguera (1949) die unterschiedliche Stärke der Hämagglutination in Abhängigkeit von der jeweiligen

Blutgruppe und wiesen somit für bestimmte Lectine eine Blutgruppenspezifität nach. Boyd verwendete gemeinsam mit Shapleigh 1954 erstmals den Terminus Lectin. Die Bezeichnung Lectin leitet sich vom lateinischen Wort *legere* (zu Deutsch: auswählen) ab und berücksichtigt die Blutgruppenspezifität einzelner Lectine. Zu dieser Zeit wurden auch die ersten bakteriellen Lectine entdeckt, welche die Kohlenhydrat-spezifische Adhäsion der Bakterien an Oberflächen-exponierte Glycokonjugate von Wirtszellen vermittelten und an den Pili und Fimbrien lokalisiert waren (Duguid *et al.*, 1955; Rivier & Darekar, 1975; Salit & Gotschlich 1977 a/b).

1.1.3 Physiologische Funktion der Lectine

Lectine spielen eine zentrale Rolle in vielen Lebensprozessen und wurden in Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen identifiziert (Gabijs *et al.*, 2002). Die Vielfalt ihrer Funktion spiegelt sich oft in ihrer Lokalisierung wieder (Nilsson, 2007). Intrazelluläre Lectine sind an der Verteilung von Proteinen innerhalb der Zelle beteiligt. So vermittelt der Calcium-abhängige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor des endoplasmatischen Reticulums den Transport neu synthetisierter, lysosomaler Hydrolasen an ihren Bestimmungsort (Hauri *et al.*, 2000). Membrangebundene Lectine hingegen dienen der Zell-Zell- und Zell-Wirt-Erkennung. Ein Beispiel hierfür ist das Influenza A Hämagglutinin, das an die Sialinsäure der Glucane bindet, die auf der Oberfläche von Vogel- und Säugetierzellen vorkommen (Stevens, *et al.*, 2006). Sekretierte pflanzliche Lectine, wie zum Beispiel das Rizin aus dem Samen von *Ricinus communis*, sind oft sehr giftig (Halling *et al.*, 1985). Eine Vielzahl tierischer Lectine besitzt nicht nur eine Bindungsregion für Kohlenhydrate, sondern auch für andere Strukturen wie beispielsweise das Mannan-bindende Lectin, das neben Mannan auch Phospholipide erkennt (Köttgen *et al.*, 2003). Damit können diese Lectine primär intra- und extrazellulär Erkennungs- und Bindungsfunktion gegenüber Kohlenhydrat-Liganden erfüllen und sekundär durch die weitere Bindungsspezifität ein ganzes Spektrum verschiedener Signalkaskaden induzieren. Der biologische Nutzen der Lectine steht in engem Zusammenhang mit der Funktion des jeweiligen Liganden. Im Gegensatz zu Homopolysacchariden wie der Cellulose, in der die Glukosemoleküle in monotoner Regelmäßigkeit aneinander gereiht vorliegen, sind die an Glycolipide und -proteine gebundenen Oligosaccharide äußerst reich an struktureller Information (Gabijs *et al.*, 2002). Die Oligosaccharide bilden verzweigte Strukturen, wobei Art und Umfang der Verzweigung für individuelle Glycane (Oligo- und Polysaccharide) stark variieren kann (Andre *et al.*, 2006). Die Anzahl der möglichen Permutationen durch

Kombination der verschiedenen Oligosaccharide ist im Vergleich zu den linearen Sequenzen von Nukleinsäuren und Proteinen ausgesprochen hoch (Hughes, 1983; Lehninger *et al.*, 1998). Auf der Ebene eines Trimers ergibt sich für Nukleinsäuren eine Anzahl von $4^3=64$ möglichen Permutationen, während die für Peptide $20^3=8000$ beträgt. Im Gegensatz dazu kann ein Trisaccharid etwa 9 Millionen unterschiedliche Isomere ausbilden (Laine, 1997). Die Hauptquelle dieser Strukturdiversität liegt in der Vielfalt der Verknüpfungsmöglichkeiten der einzelnen Monosaccharide untereinander (Köttgen *et al.*, 2003). Die Bindungen können über die drei bis vier Hydroxylgruppen, mit denen ein Monosaccharid ausgestattet ist, erfolgen, aber auch über die anomeren Zentren der C1-Atome der Monosaccharide. Hierbei kann die Verknüpfung in der Ebene der beiden Monosaccharide (α -glykosidisch) aber auch senkrecht zu ihr erfolgen (β -glykosidisch). Zusätzlich kann durch die Einführung nur eines Substituenten, z. B. einer Sulfatgruppe, an eine freie Hydroxylgruppe eines Zuckers die Anzahl der möglichen Isomere verzehnfacht werden (Laine, 1997).

Die Oligosaccharidketten zellulärer Glykokonjugate (Glycoproteine, Glykolipide, Proteoglykane) sind an vielen biologischen Prozessen wie z. B. der Zelladhäsion beteiligt (Gabijs & Gabijs, 1997). Die Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen hat gezeigt, dass Oligosaccharide Signale darstellen (Villalobo *et al.*, 2006). Ihre Information wird durch Bindungspartner (Rezeptoren) gelesen und in biologische Reaktionen übersetzt. Solche Rezeptoren sind in der Regel Lectine (Andre *et al.*, 2006).

1.1.4 Lectin-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen

Die Interaktion von Lectinen mit Kohlenhydraten erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen (H-Bindungen), Metall-Ionen-Koordination, van der Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen (Elgavish & Shaanan, 1997). Das Vorhandensein einer großen Anzahl von Hydroxyl-Gruppen ermöglicht es den Kohlenhydraten, ein komplexes Netzwerk an H-Bindungen mit dem Interaktionspartner einzugehen, wobei die sp^3 -hybridisierten Sauerstoffatome der Hydroxylgruppen des Zuckers zugleich als Akzeptor von je zwei und Donor von je einer H-Brücke dienen (Quiocho, 1989; Weis & Drickamer, 1996). Die Seitenketten meist saurer Aminosäuren agieren als H-Brücken-Akzeptoren, während die Aminogruppen der Hauptketten verschiedener Aminosäuren sowie der Seitenketten von Asparagin und seltener Glutamin als Donoren fungieren (Weis & Drickamer, 1996; Elgavish & Shaanan, 1997). Die H-Brücken zwischen den Proteinen und den Kohlenhydraten sind entweder direkt oder durch Wassermoleküle vermittelt (Quiocho, 1989; Weis & Drickamer,

1996). Dementsprechend sind an der Bindung von Galactose sowohl durch das Enterotoxin von *Escherichia coli* als auch durch das Choleratoxin drei Wassermoleküle beteiligt (Sixma *et al.*, 1992; Merrit *et al.*, 1994). Darüber hinaus spielen auch divalente Kationen, wie Ca^{2+} und Mn^{2+} , eine Rolle bei der Interaktion von Lektinen mit den Zucker-Liganden. Hierbei interagieren die Ionen entweder direkt mit dem Kohlenhydrat, wie zum Beispiel die Ca^{2+} -Ionen der C-type Lectine (Weis *et al.*, 1992; Weis & Drickamer, 1996), oder indirekt, indem sie an der Stabilisierung der Liganden-Bindestelle beteiligt sind, wie es bei vielen Lectinen aus Hülsenfrüchten der Fall ist (Shaanan *et al.*, 1991; Weis & Drickamer, 1996). Trotz des hydrophilen Charakters der Kohlenhydrate sind hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen an der Erkennung durch Lektine beteiligt. So erzeugen die aliphatischen Protonen und die Kohlenstoffatome der epimeren Zentren der Kohlenhydrate gemeinsam mit dem exocyclischen Kohlenstoff eine apolare Fläche. Diese richtet sich in vielen Strukturen gegen den Rest einer aromatischen Aminosäure. Dementsprechend ist in den Bindetaschen Galactose-spezifischer Lectine die apolare Fläche gegen die Seitenkette eines Tryptophans oder eines Phenylalanins gerichtet (Burley & Petsko, 1985; Levitt & Perutz 1988; Weis & Drickamer, 1996). Während Monosaccharide durch Lectine mit relativ niedrigen Dissoziationskonstanten im Bereich von 1 mM gebunden werden, erfolgt die Bindung natürlicher Polysaccharide mit einer Konstante im mikromolaren Bereich (Weis & Drickamer, 1996). Dieser Anstieg der Bindungsaffinität resultiert aus dem Vorhandensein einer sekundären Bindestelle, die vorwiegend in direkter Umgebung der primären Bindestelle zu finden ist und *extended site* genannt wird (Loris, 2002). Der terminale Zucker eines komplexen Polysaccharids interagiert mit der primären Bindestelle des Lectins, wohingegen die sekundäre Bindestelle an einen verzweigten Zucker bindet. Sehr oft weist das Lectin allein zum terminalen Zucker als Monosaccharid eine signifikante Affinität auf, weswegen dieser als primäre Determinante bezeichnet wird (von der Lieth *et al.*, 2002). Dieser Mechanismus zur Erhöhung der Bindungsaffinität der Lectine wird als *subsite*-Multivalenz bezeichnet. Eine weitere Steigerung der Dissoziationskonstante bis in den nanomolaren Bereich wird durch die sogenannte *subunit*-Multivalenz bewirkt (Lundquist *et al.*, 2000). Diese kommt durch Bindung verzweigter Zucker in einer sekundären, räumlichen und thermodynamisch von der primären deutlich zu unterscheidenden Bindestelle zustande. Hierbei kann die sekundäre Bindestelle entweder auf demselben Protomer oder aber auf einer zweiten Untereinheit eines Oligomers lokalisiert sein. Außerdem kann die Bindungsaffinität durch das Vorhandensein multipler, voneinander unabhängiger Bindestellen weiter gesteigert werden (Rini, 1995). In vielen Fällen wird eine Steigerung der Affinität durch das Zusammenlagern mehrerer

identischer Bindedomänen erreicht. Eine besonders hohe Affinität von Lectinen zu ihren natürlichen Liganden wurde bei der Interaktion des Cholera Enterotoxins (Turnbull *et al.*, 2004) sowie des Clostridium Toxins (Krell *et al.*, 2003) zu ihren Gangliosid-Liganden auf humanen Epithelzellen berichtet.

1.1.5 Lectine in Bakterien

Bakterien sind heterotrophe Organismen, die durch Saprophytismus, Symbiose oder Pathogenität ihren Energiehaushalt aufrechterhalten. Diese Art zu leben erfordert, dass sie organische Substanzen, aber auch Wirtsgewebe für die Adhäsion und darauffolgende Invasion spezifisch erkennen (Imberty *et al.*, 2005). Eine Strategie hierfür beinhaltet neben unspezifischen Faktoren, wie hydrophoben Wechselwirkungen und elektrostatischen Kräften (Mirelman & Ofek 1986; Richardson & Steiner, 1995), die hochspezifische Bindung von Lectinen an Glykokonjugate des Wirtsgewebes. Sie verleiht den Erregern neben einem verbesserten Erwerb von Nährstoffen auch eine erhöhte Resistenz gegen die Selbstreinigungsmechanismen des Wirtsorganismus sowie gegen Angriffe des Immunsystems (Vierbuchen, 1991; Sharon & Ofek, 2002). Neben den bakteriellen Lectinen tragen aber auch Kohlenhydrat-bindende Proteine der Zellmembranen des Wirtorganismus zur spezifischen Adhäsion bei (Sharon & Ofek, 2002). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der urotheliale CD44-Rezeptor, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Bindungen vermittelt, die Interaktion von *Escherichia coli* mit dem Urothel und damit auch die Infektion des Wirtsorganismus erleichtert (Rouschop *et al.*, 2006).

Bakterien produzieren viele unterschiedliche Arten von Lectinen, die für die Anheftung an das Gewebe des Wirtsorganismus verwendet werden. So spielen zum Beispiel fimbriale Lectine, die am oberen Ende der Pili oder Flagellen lokalisiert sind, eine entscheidende Rolle bei der Bindung an die Epithelzellen (Abb. 1C). Sie besitzen nur eine Liganden-Bindestelle, was zur Folge hat, dass ihnen die Möglichkeit zur Multivalenz, eine Eigenschaft, die gemeinhin bei Lectinen bekannt ist, fehlt (Imberty *et al.*, 2005). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Scherkräfte, wie zum Beispiel Urin- oder Speichelfluss, die Bindungsstärke der Adhäsine erhöhen (Thomas *et al.*, 2002). Das uropathogene Bakterium *E. coli* nutzt zum Andocken an das Darmepithel entweder das Mannose-spezifische Lectin FimH, das an den Typ 1-Pili der Bakterien lokalisiert ist, wodurch eine Entzündung der Harnblase (Cytitis) hervorgerufen wird (Connell *et al.*, 1996, Hung *et al.*, 2002), oder aber das Galabiose (α Gal1-4Gal)-spezifische Lectin PapG des P-Pilus, um in den Urinaltrakt einzudringen, was eine

Nierenbeckenentzündung (Pyelonephritis) zur Folge hat (Roberts *et al.*, 1994; Dodson *et al.*, 2001).

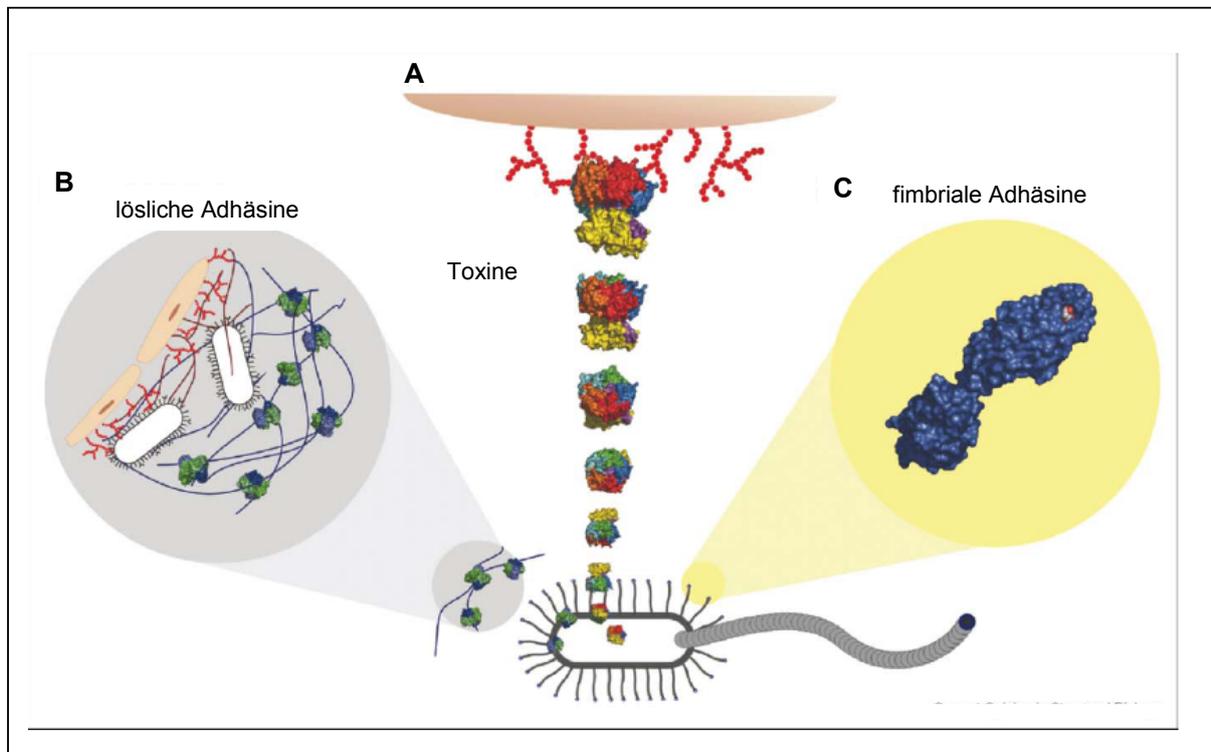


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Bakteriums mit einer Flagelle und mehreren Pili sowie unterschiedlicher Zucker-bindender Proteine, die strukturell analysiert wurden. AB-Toxine, die Glykolipide auf der Zelloberfläche erkennen (A), lösliche Lectine, die mit Mukin-Filamenten der Wirtszelle interagieren (B) und fimbriale Adhäsine (C) (Imberly *et al.*, 2005).

Darüber hinaus gibt es Lectine, die als Domänen bakterieller Toxine die Adhäsion an Glycokonjugate vermitteln und damit das Eindringen in die Zielzelle ermöglichen (Abb. 1A). So bestehen die bakteriellen AB-Toxine aus einer Lectin-Domäne, die die Adhäsion des Toxins an die Zellmembran des Wirts vermittelt, und einer aktiven Domäne, einer ADP-ribosyltransferase, die nach dem Eintritt des Holoproteins in die Zelle die cytotoxischen Effekte ausübt (Burnette, 1994; Fan *et al.*, 2000). Das Cholera Toxin aus *Vibrio cholera* bindet über die homotetramere Lectin-Domäne an den GM1-Rezeptor der Darmzellen und wird nach der Internalisierung über den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Reticulum in das Cytoplasma transportiert (Tavallaie *et al.*, 2004; Vanden Broek *et al.*, 2007). Dort wird unter Einfluss der heterodimeren aktiven Domäne der cAMP-Spiegel der Zelle erhöht, was zu Wasser- und Elektrolyten-Verlust führt und sich in einer typischen Diarrhoe äußert (De Haan & Hirst, 2004; Vanden Broek *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel ist das hochgiftige Neurotoxin von *Clostridium botulinum*, das zu Tetanus und Botulismus führt (Tavallaie *et al.*, 2004; Lalli *et al.*, 2003) und von Ärzten für die Behandlung von Faltenbildung eingesetzt

wird (Farahvash & Arad, 2007). Lectine wurden auch im Periplasma Gram-negativer Bakterien lokalisiert. So fungiert das Maltose-bindende Protein (MBP) von *E. coli* als Substrat-bindende Domäne des ABC-Transporters, der für die Aufnahme von Maltose und Maltodextrin verantwortlich ist (Duplay *et al.*, 1987; Nikaido, 1994). Die löslichen Lectine aus *Pseudomonas* und verwandten Gram-negativen Bakterien (Abb. 1B) wurden als Proteine vorgeschlagen, die eine Rolle bei der Erkennung von Wirtszellen, der Biofilmbildung und der Zellkohärenz spielen (Tielker *et al.*, 2005; Imberty *et al.*, 2005). Diese Lectine werden in Kapitel 1.2.1 ausführlicher besprochen.

1.1.6 Anti-Adhäsions-Therapie bei bakteriellen Pathogenen

Die Adhäsion von Enterobakterien und Bakterien im Bereich des Mundes und der Atemwege ist essentiell für die Kolonisierung durch die pathogenen Bakterien und die darauffolgende Entwicklung der Krankheit (Ofek *et al.*, 2003). Außerdem üben Bakterien eine signifikant höhere Resistenz gegenüber der Beseitigung durch allgemeine Reinigungsmechanismen des Wirts und der Tötung durch Immunelemente, bakteriolytische Enzyme und Antibiotika aus, wenn sie an Zelloberflächen adhären (Ofek *et al.*, 2003). Oberflächen-gebundene Bakterien können besser ihre Nahrung aufnehmen und steigern ihre Möglichkeit zu überleben und den Wirtsorganismus zu infizieren (Ofek *et al.*, 2003). Die Blockade und Hemmung von Lectinen sowie Rezeptoren durch geeignete Zucker oder ihre Analoga für die Prävention und Behandlung mikrobieller Krankheiten ist das Ziel der Anti-Adhäsions-Therapie (Ofek *et al.*, 1996; Zopf & Roth, 1996; Irvin & Bautista, 1999; Sharon & Ofek; 2002; Ofek *et al.*, 2003). Die Entwicklung von Resistenzen gegen eine solche Therapie, die die Bindung pathogener Mikroorganismen an das Epithel des Wirts verhindert und auf diese Weise eine entstehende Infektion rechtzeitig abwehrt, ist nicht zu erwarten (Ofek *et al.*, 2003), da die Verwendung dieser Antiadhäsiva weder zum Absterben der Keime führt noch einen direkten Einfluss auf das Wachstumsverhalten des Pathogens ausübt (Sharon, 2006). Bedingt durch die Spezifität der Inhibierung werden nicht-pathogene Organismen der natürlichen Flora verschont und können mit resistenten Keimen um das vorhandene Nährstoffangebot wetteifern, wodurch die Selektion resistenter Organismen, die neue Möglichkeiten zur Adhäsion an das Wirtsepithel erworben haben, unterbunden wird (Mulvey *et al.*, 2001).

Vor über dreißig Jahren wurde das erste Mal davon berichtet, dass es möglich ist, Tiere unter Verwendung von Zuckern gegen experimentell herbeigeführte Infektionen durch Lectin-produzierende Bakterien zu schützen. So konnte die Besiedelung des Urinaltrakts von Mäusen

durch das Typ I-Pili-synthetisierende Bakterium *E. coli* unter Koinjektion von Methyl- α -Mannosiden blockiert werden, während die Verwendung von Methyl- α -Glucosiden zu keinem Erfolg führte (Aronson *et al.*, 1979). Neugeborene Kälber, die kein Kolostrum (Vormilch) erhalten haben und denen eine lethale Dosis des *E. coli*-Stamms K99 verabreicht wurde, konnten durch das Trinken von Wasser, welches Glycopeptide aus Plasma-Glycoproteinen von Kühen enthielt, geheilt werden (Mouricout *et al.*, 1990). Hierbei wurde die Anzahl der Bakterien, die an die intestinalen Epithelzellen der Kälber binden konnten, um das 100-fache verringert. Im Rahmen weiterer Studien wurde die Adhäsion mehrerer Pathogene, wie *Burkholderia cenocepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* und *Yersinia pestis* an alveolare Epithelzellen durch den Einsatz von Zuckern unterbunden (Thomas & Brooks, 2004). Beispiele für endogene, anti-adhäsive Substanzen sind unterschiedliche Oligosaccharide der menschlichen Muttermilch, die zum Teil in sehr hohen Konzentrationen von 1-500 mg pro Liter vorkommen und Oberflächen-Lectine unterschiedlicher Bakterienspezies inhibieren (Newburg *et al.*, 2005; Morrow *et al.*, 2005). Von besonderem Interesse sind die fucosylierten Oligosaccharide, die effektive Inhibitoren der Adhäsion des Enteropathogens *Campylobacter jejuni* an menschliche Zellen sind (Sharon, 2006). Ein großes Problem bei der Inhibierung der bakteriellen Adhäsion mittels einfacher Kohlenhydrate liegt darin, dass aufgrund der niedrigen Bindekonstante der Zucker zu den Lectinen sehr hohe Konzentrationen des entsprechenden Zuckers verwendet werden müssen. Dies kann durch den Einsatz multivalenter Kohlenhydrat-Liganden (Autar *et al.*, 2003) oder durch die Verwendung von Glycomimetika (Ofek *et al.*, 2003) umgangen werden. In Rahmen einer Studie wurde ein synthetischer, multivalenter Ligand identifiziert, der die Typ I-Pili von *E. coli* mit 140-fach höherer Affinität pro Zucker inhibiert hat als der monovalente Ligand Mannose. In weiteren Studien wurden auch potente, multivalente Liganden zur Hemmung der Adhäsion von *Helicobacter pylori* an epitheliale Monolayer (Simon *et al.*, 1997) und von *Streptococcus pneumoniae* an Epithelzellen des Respirationstraktes entdeckt (Barthelsson *et al.*, 1998). Eine besondere Spezies von multivalenten Lectin-Liganden sind sogenannte Glycopeptide-Dendrimere. Hierbei handelt es sich um synthetische, verzweigte Strukturen aus Peptiden, die als funktionelle Gruppe ein Kohlenhydrat enthalten (Darbre & Reymond, 2008). Zum Beispiel konnten ein octavalentes Dendrimer, das Glabiose als funktionelle Gruppe enthielt, die durch das Bakterium *Streptococcus suis* induzierte Hämagglutination inhibieren, wobei die minimale Hemm-Konzentration 0,3 nanomolar betrug (Joosten *et al.*, 2004).

Eine weitere anti-adhäsive Strategie ist die Verwendung von geeigneten Antikörpern. Antikörper, die gegen die Typ I-Pili oder Mannose, die Zucker-Determinante des komplementären Rezeptors der Wirtszelle, gerichtet sind, konnten die Anheftung von *E. coli* an eukaryotische Zellen unterbinden (Abraham *et al.*, 1983) und Mäuse gegen bakterielle Infektionen des Urinaltrakts schützen (Abraham *et al.*, 1985). Es wurde außerdem durch anti-adhäsive Antikörper die Pili-vermittelte Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa* an Asialo-GM1-Rezeptoren sowie die Adhäsion des Pathogens an Rezeptoren des menschlichen, bukkalen Epithels inhibiert (Lee *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass durch aktive Immunisierung mit einem Komplex aus FimH und seinem periplasmatischen Chaperon FimC Mäuse und nicht-menschliche Primaten vor Harnwegsinfektionen des uropathogenen Bakterium *E. coli* geschützt werden konnten (Langermann & Ballou, 2001).

1.2 Das pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein polar begeißeltes, stäbchenförmiges, Gram-negatives Bakterium (Botzenhardt & Döring, 1993), dessen 6,3 Mb große Genomsequenz im Jahr 2000 publiziert wurde (Stover *et al.*, 2000). Die Bezeichnung *P. aeruginosa* (aerugo, lat. = Grünspan) wurde aufgrund der charakteristischen Farbe, die sich durch die Bildung der Farbstoffe Pyocyanin, Pyoverdin, Pyrorubin und Pyomelanin ergibt, gewählt (Braveny & Krump-Schmidt, 1985). Weiterhin lässt sich das Bakterium physiologisch durch die Fähigkeit zur Denitrifikation, seinen Oxidase-positiven Phänotyp und die Befähigung, bei 43°C zu wachsen, charakterisieren (Palleroni, 1993). *P. aeruginosa* gilt als einer der am häufigsten vorkommenden Organismen (Costeron & Anwar, 1994) und wird phylogenetisch der γ -Subklasse der *Proteobacteria* zugeordnet, die anhand von 16S-rRNA-Homologievergleichen in fünf Gruppen eingeteilt werden (Palleroni, 1993). Der Saprophyt stellt nur sehr geringe Anforderungen an seinen Lebensraum und unterscheidet sich dadurch von anderen Bakterien, dass er die Eigenschaft besitzt, viele unterschiedliche Nahrungsquellen verwerten zu können (Palleroni, 1993). Das Bakterium ist durch selektive Regulation der Genexpression in der Lage, sich an ein großes Spektrum vielfältiger Lebensbedingungen anzupassen (Govan & Deretic, 1996). So überlebt *P. aeruginosa* zum Beispiel im Boden, in kalten Fließgewässern, in Krankenhäusern, in denen unterschiedliche Arten von Agenzien gegen *P. aeruginosa* verwendet werden, als auch in desinfizierenden Lösungen und sogar in Düsenflugzeugbezin (Kobayashi *et al.*, 2009). Diese hohe Anpassungsfähigkeit macht *P. aeruginosa* zu einem

ubiquitären Bakterium, das hauptsächlich gegen Austrocknung empfindlich ist (Botzenhardt und Döring, 1993).

P. aeruginosa ist in der Lage, sauerstoffarme Umgebungen zu besiedeln und dort mittels Denitrifikation zu überleben (Yoon *et al.*, 2002). So bietet beispielsweise die Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose (CF), einer autosomal rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung, eine attraktive Umgebung für die Besiedelung durch *P. aeruginosa* und daraus resultierende chronische Lungeninfektionen (Gomez & Prince, 2007). Diese Infektionen gelten als Hauptursache für die Sterblichkeit von CF-Patienten (Jaeger, 1994; Gomez & Prince, 2007). Als opportunistischer Krankheitserreger infiziert *P. aeruginosa* nicht nur an CF erkrankte Personen sondern auch andere immunsupprimierte und immundefiziente Patienten, die z.B. an Krebs oder AIDS leiden (Winkler *et al.*, 1985; Fergie *et al.*, 1994; Richard *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996; Lyczak *et al.*, 2002). Hierzu zählen auch Infektionen von Verbrennungswunden und der Kornea, die bakterielle Meningitis, postoperative Wundinfekte sowie chronische Harnwegsinfektionen (Bodey *et al.*, 1983; Winkler *et al.*, 1985; Nicas & Iglewski, 1986; Kadurugamuwa & Beveridge, 1995; Lyczak *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist dieser pathogene Keim für die meisten durch Gram-negative Bakterien verursachten nosokomialen Infektionen verantwortlich (Picard *et al.*, 1994; Römling *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 2004). Therapien gegen *P. aeruginosa*-Infektionen werden durch die hohe intrinsische Antibiotikaresistenz sowie durch die Ausbildung von Biofilmen auf dem Wirtsgewebe erschwert (Quinn, 1992; Høiby, 2002; Conway *et al.*, 2003). Viele *P. aeruginosa*-Isolate aus CF-Patienten sind multiresistent, was die Tatsache widerspiegelt, dass die Infektion unausrottbar ist und immer wieder dem Zyklus von Selektionsdruck durch Antibiotika, co-selektierender Resistenz und Hypermutabilität ausgesetzt wurde (Oliver *et al.*, 2000; Henrichfreise *et al.*, 2007; Livermore, 2009).

Die Ursache für die hohe Pathogenität von *P. aeruginosa* ist die Produktion einer Vielzahl an extrazellulären Virulenzfaktoren (Abb. 2), die nach der Besiedelung des Wirtsorganismus zu starken Gewebeschäden führen können und die Invasion sowie die Verbreitung des Bakteriums und der Virulenzfaktoren im Blutkreislauf ermöglichen (van Delden & Iglewski, 1998; Wagner & Iglewski, 2008). Zu den Virulenzfaktoren zählen neben den Zell-assoziierten Komponenten wie dem Exopolysaccharid Alginate die Lipopolysaccharide (LPS), die Pili und das Flagellum, aber auch zahlreiche von den Bakterien sekretierte extrazelluläre Enzyme (Winkler *et al.*, 1985; Kadurugamuwa & Beveridge, 1995; Van Delden & Iglewski, 1998). Hierzu gehören die Toxine Exotoxine A und Exoenzym S sowie mehrere Proteasen, Phospholipasen und Lipasen (Liu, 1979; Ohman & Chakrabarty, 1981; Cryz *et al.*, 1984;

Nicas & Iglewski, 1986; Jaeger *et al.*, 1992 a/b; König *et al.*, 1996; Bitter, 2003; Barker *et al.*, 2004).

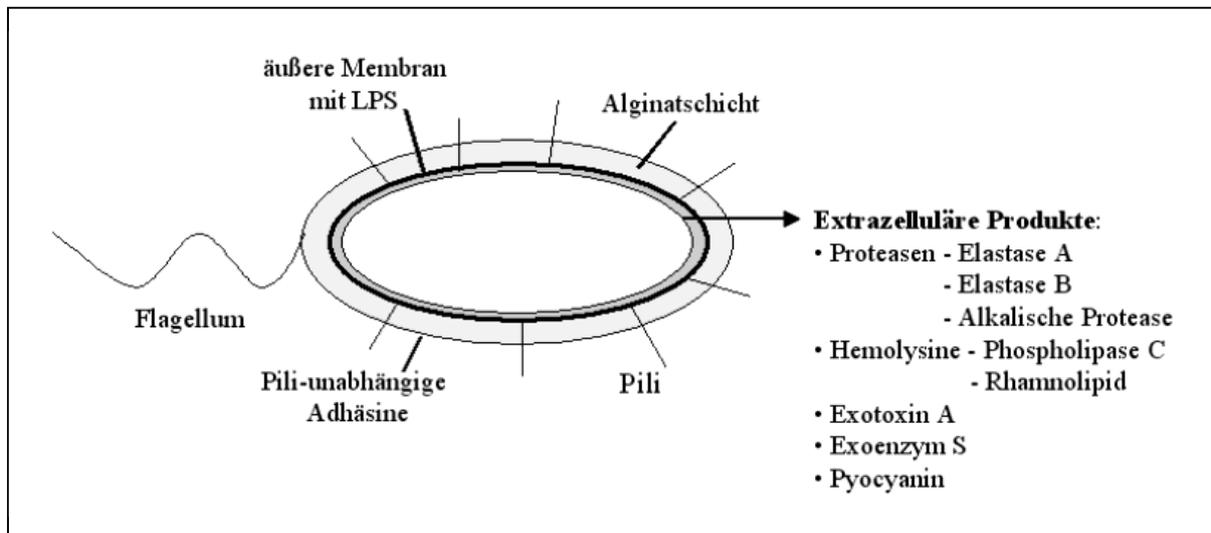


Abb. 2 Schematische Darstellung einer *P. aeruginosa*-Zelle mit Zell-assoziierten sowie sekretierten und translozierten Virulenzfaktoren (Van Delden & Iglewski, 1998).

Zum Auscheiden der Virulenzfaktoren besitzt *P. aeruginosa* verschiedene Sekretionssysteme. Die Transportwege können in Ein-Schritt- und in Zwei-Schritt-Wege unterteilt werden (Koster *et al.*, 2000; Rosenau & Jaeger, 2000; Ma *et al.*, 2003). Zu den Ein-Schritt-Systemen gehören das Typ I-Sekretionssystem, das einen ABC-vermittelten Transport zur Sekretion von Proteasen nutzt (Schmidt & Tampe, 2002), und das unter pathogenen Gram-negativen Bakterien weit verbreitete Typ III Sekretionssystem (TTSS), welches die Virulenzfaktoren Exoenzym S, T, U und Y direkt in die Wirtszelle injiziert und eine strukturelle Homologie zu den Proteinen des Flagellen-Export-Apparats aufweist (Hueck, 1998; Blocker *et al.*, 2003; Engel & Balachandran, 2009). Die Sekretion des Substrats erfolgt unter ATP-Verbrauch direkt über die innere und äußere Membran. Zur Ausscheidung der Virulenzfaktoren Elastase (LasB), Exotoxin A, alkalische Phosphatase und Phospholipase C benötigt *P. aeruginosa* ein Zwei-Schritt-Sekretionssystem. Hierbei erfolgt der Transport über die innere Membran entweder durch das Sec- oder das Tat-System (Economou, 1999; Berks *et al.*, 2000). Proteine, die über den Sec-Weg transportiert werden, weisen am N-Terminus eine 20-25 AS lange Signalsequenz auf, die sich in eine positive, eine hydrophobe und eine polare Domäne unterteilt. Die Signalsequenz, die für den Proteintransport über den Tat-Weg verantwortlich ist, ist durchschnittlich 14 AS länger und enthält zusätzlich das sog. Twin arginine-Motiv (Ochsner *et al.*, 2002). Zur Überwindung der äußeren Membran dient die Typ II-Sekretionsmaschinerie, die in *P. aeruginosa* aus den 12 Xcp-Proteinen gebildet wird (Filloux,

2004; Arts *et al.*, 2006). Ein weiterer Transportmechanismus ist die Typ-IV Sekretion, bei der die Proteine, die zunächst über den Sec-Weg in das Periplasma gelangen, ihren eigenen Transport über die äußere Membran vermitteln (Henderson *et al.*, 2004). Die an der Virulenz beteiligte Esterase EstA ist das erste charakterisierte Autotransporterprotein aus *P. aeruginosa* (Wilhelm *et al.*, 1999, 2007).

Zur Kontrolle der Expression von Virulenzfaktoren und der Entwicklung von Biofilmen existiert in *P. aeruginosa* ein Zelldichte-abhängiges interzelluläres Kommunikationssystem, das als Quorum Sensing (QS) bezeichnet wird (Passador *et al.*, 1993). In *P. aeruginosa* existieren zwei QS-Systeme, das Las- und das Rhl-System. Beide Systeme bestehen aus zwei Proteinen, einem Transkriptionsregulator (LasR bzw. RhlR) und einer Autoinducer-Synthase (LasI bzw. RhlI) (Williams *et al.*, 1992; Gambello *et al.*, 1993; Passador *et al.*, 1993; Brint & Ohman, 1995; Ochsner & Reiser, 1995). Diese Enzyme katalysieren die Synthese sogenannter acylierter Homoserinlactone (AHLs), die als kleine, diffundierbare Signalmoleküle agieren. LasI ist verantwortlich für die Bildung von N-(3-oxododecanoyl)-Homoserinlacton (3-O-C12-HSL) (Pearson *et al.*, 1994) und RhlI synthetisiert den Autoinducer N-butanoyl-Homoserinlacton (C4-HSL) (Pearson *et al.*, 1995). Diese AHLs binden an ihren entsprechenden Regulator unter Bildung eines funktionellen transkriptionsregulatorischen Komplexes, welcher die Transkription von ca. 6% der auf dem *P. aeruginosa*-Genom befindlichen open reading frames (ORFs) induziert, darunter die Mehrzahl der bekannten Virulenzfaktoren (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird die Expression vieler Virulenzfaktoren durch den alternativen Sigma-Faktor RpoS, dessen Expression beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase induziert wird, kontrolliert (Schuster *et al.*, 2004).

P. aeruginosa produziert außerdem in großen Mengen zwei lösliche Lectine LecA und LecB, die als Virulenzfaktoren angesehen werden (Gilboa-Garber, 1997).

1.2.1 Lectine aus *P. aeruginosa*

Der initiierte Schritt einer *P. aeruginosa* Infektion, die in einer chronischen Kolonisierung endet, ist die Adhäsion des Bakteriums an die Epithelien des Respirations- oder des Gastrointestinaltraktes sowie anderer Organe (Beachey, 1981; Doig *et al.*, 1990; Prince, 1992). Die Adhäsion ist eine komplexe Interaktion zwischen Rezeptoren und auf den Zelloberflächen exprimierten Liganden (Bos *et al.*, 1999). An diesem Prozess und der anschließenden Ausbildung eines Biofilms sind neben unspezifischen Wechselwirkungen

viele Adhäsionsrezeptoren beteiligt. Dazu zählen das Alginat (Doig *et al.*, 1987; Ramphal und Pier, 1985), das Flagellin und das FliD-Protein, die beide Kohlenhydrat-Liganden im Muzin erkennen, sowie die an Asialo-GM1- und -GM2-Glycosphingolipide bindenden Typ IV-Pili (Hahn, 1997; O'Toole & Kolter, 1998; Scharfman *et al.*, 2001, Klausen *et al.*, 2003 a/b). Desweiteren vermutet man, dass die Anheftung von *P. aeruginosa* an das Gewebe des Wirtsorganismus durch bakterielle Lectine vermittelt wird (Gilboa-Garber & Garber, 1989; Gilboa-Garber & Garber, 1992; Imberty *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* produziert neben einigen mit der Zelloberfläche assoziierten Adhäsinen zwei lösliche Lectine, die als LecA und LecB bezeichnet (Gilboa-Garber, 1972; Gilboa-Garber *et al.*, 1977; Winzer *et al.*, 2000) und durch Gene kodiert werden, die im *P. aeruginosa*-Genom relativ weit auseinander liegen (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Das *lecA*-Gen besteht aus 366 bp, während das *lecB*-Gen nur 345 bp enthält. Beiden Genen folgt eine Region, welche die Ausbildung einer hairpin-Struktur und somit eine Rho-unabhängige Transkriptionstermination ermöglicht (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Die Zelldichte-abhängige Expression der beiden Gene wird durch QS und den Sigma-Faktor RpoS reguliert (Winzer *et al.*, 2000).

Das LecA-Protein ist ein Homotetramer, bestehend aus vier gleichen 12,76 kDa großen Untereinheiten, die jeweils aus 121 AS bestehen (Avichever *et al.*, 1992, 1994). Jedes Monomer enthält eine Zuckerbindestelle mit einem Ca^{2+} -Ion, das für die Zuckerbindung essentiell ist (Cioci *et al.*, 2003). Das Lectin LecA weist eine abnehmende Spezifität zu den Zuckern Melibiose > Methyl- α -D-Galactose > D-Galactose > Methyl- β -D-Galactose > N-Acetylgalactosamin auf (Chen *et al.*, 1998) und bindet außerdem mit hoher Affinität an Adenin und N-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL) (Stoitsova *et al.*, 2003; Boteva *et al.*, 2005), wobei die Interaktion mit den beiden zuletzt genannten Substanzen von der Zuckerbindung unabhängig ist und daher auf eine weitere Bindestelle für hydrophobe Liganden hinweist. Das LecA-Protein ist reich an Asparagin, Asparaginsäure, Alanin und Glycin, während Arginin-, Histidin- und Methionin-Reste nur in geringer Anzahl enthalten sind, was eine Gemeinsamkeit zu vielen pflanzlichen (Schnell & Etzler, 1988; Muramoto & Kamiya, 1990; Young *et al.*, 1991), tierischen (Whitney *et al.*, 1986) und bakteriellen Lectinen (Romeo *et al.*, 1986) darstellt. Der relativ niedrige isoelektrische Punkt ($pI = 4,94$), der überwiegend hydrophobe Kern des Proteins und das umfangreiche Netz an β -Faltblättern ist ebenfalls vielen Lectinen gemein (Becker *et al.*, 1975; Shaanan *et al.*, 1991; Weis *et al.*, 1991).

Das LecB-Protein bildet ein Homotetramer, das aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 11,73 kDa besteht (Gilboa-Garber *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2002; Loris *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2005). Jedes Monomer ist ein 114 Aminosäuren langes

Protein, das einen Gehalt an Alanin, Arginin, Glutamin und Glutaminsäure hat, der ähnlich hoch ist wie in LecA. LecB enthält weder Cysteine noch Histidine und ist im Vergleich zum LecA-Protein reich an Valin, Asparagin, Threonin und Serin. Der Gehalt von Glycin und Isoleucin ist geringer als in LecA. Der isoelektrische Punkt (pI) des LecB-Proteins liegt bei 3.88 und das Lectin besitzt am C-Terminus eine hydrophobe Domäne. (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Das LecB-Protein zeigt eine abnehmende Zuckerspezifität zu p-Nitrophenyl- α -L-Fucose > L-Fucose > Fucosylamin = L-Galactose > D-Mannose > D-Fructose, wobei die Affinität zu L-Fucose mit einer Bindekonstante von $K_A = 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ verglichen mit anderen Lectinen ausgesprochen hoch ist (Garber *et al.*, 1987). Die Struktur des Lectins LecB wurde vor einiger Zeit aufgeklärt und ist in Abbildung 3A zu sehen (Mitchell *et al.*, 2002, 2005; Loris *et al.*, 2003). Das Grundgerüst des Proteins besteht aus einem 9-strängigen, antiparallelen β -sandwich, der aus zwei antiparallelen β -Faltblättern aus vier bzw. fünf Strängen gebildet wird (Loris *et al.*, 2003). Durch die Interaktion der 5-strängigen β -Faltblätter zweier Monomere bildet sich das Dimer, wofür vor allem hydrophobe Wechselwirkungen sowie einige H-Brücken an den Enden der entsprechenden Stränge verantwortlich sind. Durch antiparallele Interaktionen der β -Stränge zweier Dimere bestehend aus den Aminosäuren 79–85 kommt es zur Ausbildung des Tetramers (Mitchell *et al.*, 2002). Sowohl beim LecB-Dimer als auch beim Tetramer handelt es sich um äußerst starre Strukturen, so dass auch die Interaktion mit den verschiedenen Liganden keine Konformationsänderung hervorruft (Tielker, 2005). Als wesentliche Bestandteile der Bindestelle sind zwei Ca^{2+} -Ionen über die Interaktion mit jeweils drei Hydroxylgruppen des gebundenen Monosaccharids direkt an der Zuckerbindung beteiligt (Abbildung 3B). Diese Ca^{2+} -Ionen werden hauptsächlich durch einen *loop* bestehend aus den Aminosäuren Asn95–Asp104 koordiniert (Loris *et al.*, 2003). Zusätzlich gehen die Seitenketten der Aminosäuren Ser22, Ser23, Asp96, Asp99, Asp101 und Gly114 H-Brücken mit dem Liganden ein, wobei Gly114 vom C-Terminus des jeweils korrespondierenden Monomers stammt, was eine bislang einzigartige Eigenschaft des LecB-Proteins darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Gly114 die Bindungsaffinität des Lectins zu L-Fucose verringert, was einen Einfluß der Dimerisierung des Proteins auf die Liganden-Bindungsaffinität impliziert (Wimmerova *et al.*, 2009). Die Zucker-Spezifität von LecB wird durch die Aminosäure Ser22 des sogenannten Spezifitäts-Loops, der aus den Aminosäuren Ser22, Ser23 und Gly24 besteht, festgelegt (Adam *et al.*, 2007).

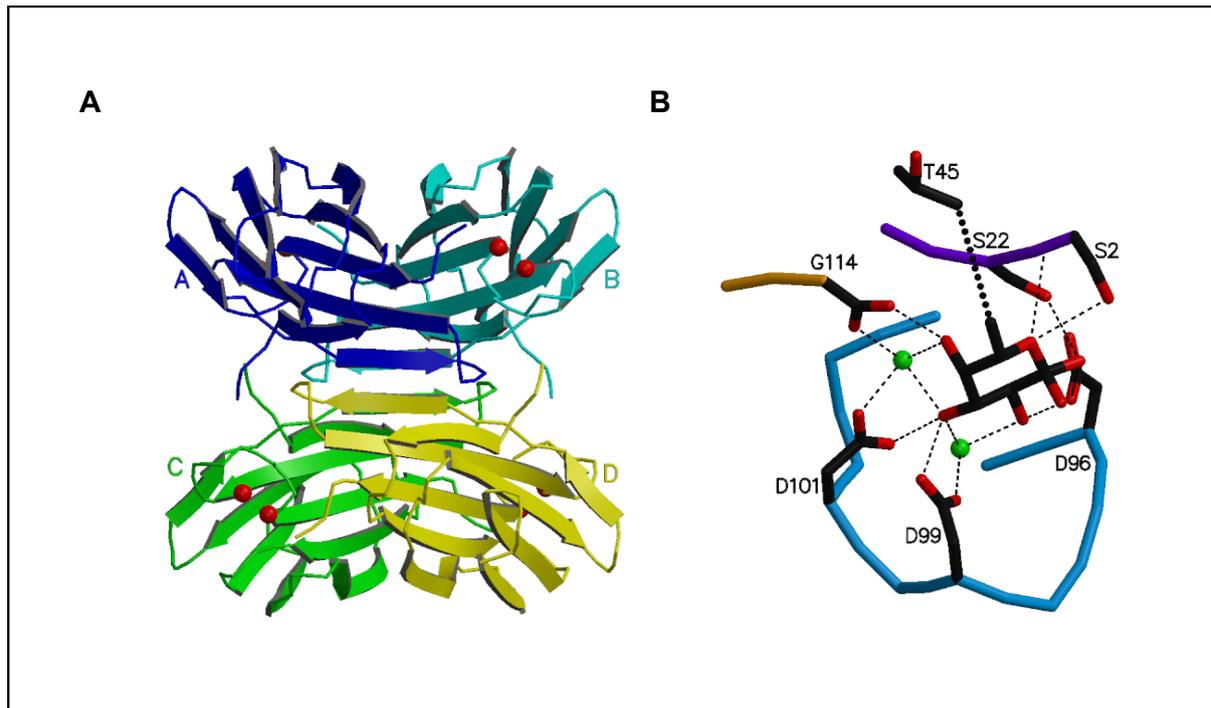


Abb 3. Struktur des LecB-Proteins. A. Das LecB-Tetramer mit jedem Monomer (A-D) in einer anderen Farbe. Die Ca^{2+} -Ionen sind als rote Kugeln dargestellt. B. Darstellung der Zuckerbindestelle mit gebundener Fucose. Der Ca^{2+} -bindende *loop* ist in blau gezeichnet, der C-Terminus des korrespondierenden Monomers in orange, die beiden Ca^{2+} -Ionen in grün. H-Brücken und Interaktionen mit den Ca^{2+} -Ionen sind als dünne Linien, van der Waals Kontakte als dicke Linien dargestellt (Loris *et al.*, 2003).

Beiden reifen *P. aeruginosa* Lectinen fehlt die Initiatoraminosäure Methionin (Gilboa-Garber *et al.*, 2000) und, obwohl die Proteinsequenzen potentielle Glycosylierungsstellen enthalten, liegt im Gegensatz zu den meisten pflanzlichen Lectinen (Schnell & Etzler, 1988) der größte Teil der Proteine in den Zellen nicht glycosyliert vor (Gilboa-Garber *et al.*, 2000).

Die Lectine LecA und LecB ähneln in vielen physiologischen Eigenschaften den klassischen Ca^{2+} -abhängigen Lectinen der Pflanzen (Imberty *et al.*, 2004). So besitzen sie eine relativ hohe Resistenz gegenüber Proteolyse, Säuren und hohen Temperaturen. Beide Lectine gelten als Breitspektrumagglutinine, da sie Erythrocyten verschiedener Tiere wie Ratten, Kaninchen, Hunde, Mäuse und Schafe agglutinieren. (Gilboa-Garber, 1972). Die Hämagglutination durch LecA beruht auf der Bindung des Proteins an das P^{K} -, das P_1 - und das B-Antigen (Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Lanne *et al.*, 1994; Sudakevitz *et al.*, 1996 a) der Erythrozytenoberfläche in Abhängigkeit von der Präsenz des I-Antigens (Sudakevitz *et al.*, 1996 b). LecB hingegen bindet an das H-Antigen (selbst in A-, B-, oder AB-Typ Erythrozyten) und weist eine geringere Affinität zu Oh-Erythrozyten auf (Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2006). Die Temperaturprofile der Agglutinationsreaktion menschlicher Erythrozyten durch die beiden Lectine zeigen entgegengesetzte Verläufe. Während das Agglutinationsoptimum von LecA bei etwa 4 °C liegt, ist die Agglutination durch LecB bei 42 °C am stärksten (Gilboa-Garber

& Sudakevitz, 1999). Beide Lectine wurden im Cytoplasma, im Periplasma und in beiden Membran-Fraktionen nachgewiesen, wobei das LecA-Protein hauptsächlich im Cytoplasma und das LecB-Protein im Cytoplasma und der äußeren Membran vorkommt (Glick & Garber, 1983, Tielker *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das LecB-Protein mit Kohlenhydrat-Liganden in der äußeren Membran von *P. aeruginosa*-Biofilmzellen interagiert und für das Lectin zugängliche Liganden auf der Zelloberfläche existieren (Tielker *et al.*, 2005). Diese Tatsachen sprechen dafür, dass das Lectin auf der Zelloberfläche exponiert vorliegt. Die spezifische Aggregation von *P. aeruginosa*-Zellen durch die Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem L-Fucose-Chitosan unterstützt diese Annahme (Morimoto *et al.*, 2001). Weder im LecA- noch im LecB-Protein ist ein Signal für die bekannten Transportmechanismen von *P. aeruginosa* vorhanden (Vodkin *et al.*, 1983; Avichezer *et al.*, 1994). Es ist daher unwahrscheinlich, dass der extracytoplasmatische Anteil der Lectine über den Sec- oder Tat-Sekretionsweg transportiert wird.

Die Genome des Pflanzen-pathogenen Bakteriums *Ralstonia solanacearum* und des opportunistischen human-pathogenen Bakteriums *Chromobacterium violaceum* enthalten eine Kopie eines Gens, das dem LecB-Protein sehr ähnlich ist und alle für die Zucker- und Calcium-Bindung essentiellen Aminosäuren besitzt (Gilboa-Garber *et al.*, 2000; Sudakevitz *et al.*, 2004; Imberty *et al.*, 2005). Für das Protein aus dem Bakterium *R. solanacearum* wurde eine hohe Spezifität für Mannose und Fructose nachgewiesen (Sudakevitz *et al.*, 2004), während das Lectin aus *C. violaceum* die Bindung an Fucose bevorzugt (Pokorna *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurden in dem opportunistisch pathogenen Bakterium *Burkholderia cenocepacia* drei Gene identifiziert, die für lösliche Zucker-bindende Proteine kodieren, die C-terminale, LecB-ähnliche Domänen mit einer Affinität zu Mannose aufweisen (Lameignere *et al.*, 2008). Die gleichen Gene wurden in dem Insekten-pathogenen Bakterium *Photorhabdus luminescens* gefunden (Imberty *et al.*, 2004). Mit Ausnahme von *P. luminescens* und *R. Ralstonia* sind alle diese Organismen ubiquitär in Böden verbreitet und fakultativ pathogen und können daher ernste Infektionen in immunsupprimierten Patienten auslösen (Mitchell *et al.*, 2005).

1.2.2 Pathogenität der Lectine

Viele Studien lassen vermuten, dass die Lectine LecA und LecB eine entscheidende Rolle bei der Virulenz von *P. aeruginosa* spielen. Das LecA-Protein ruft *in vitro* cytotoxische Effekte gegenüber Zellen des respiratorischen Traktes hervor, indem es die Wachstumsrate der

Epithelzellen sowie die Anzahl aktiver Zellen des Flimmerepithels vermindert (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass LecA sowohl bei der Adhäsion von *P. aeruginosa* an die intestinalen Epithelzellen bei einer vom Darm ausgehenden Sepsis behilflich ist als auch einen Permeabilitäts-Defekt induziert, der extrazellulären Virulenzfaktoren wie Exotoxin A ermöglicht, die epitheliale Barriere zu überwinden (Laughlin *et al.*, 2000). Die Expression des *lecA*-Gens wird durch Zell-Zell-Kontakt mit Epithelzellen des Intestinums sowie mit Zellen der eigenen Spezies (Wu *et al.*, 2003) als durch das Cytokin Interferon- γ induziert (Wu *et al.*, 2005). Letzteres lässt vermuten, dass *P. aeruginosa* Veränderungen innerhalb des Immunsystems des Wirtsorganismus erkennen und darauf reagieren kann. Beide Lectine binden an die Schleimhautzellen des Respirationstraktes und vermindern die Schlagfrequenz der dort befindlichen Zilien (Adam *et al.*, 1997 a/b; Mewe *et al.*, 2005). Außerdem wurden LecA-Rezeptoren in unterschiedlichen Mausgeweben identifiziert (Kirkeby *et al.*, 2006) und die Bindung beider Lectine an Neoglycoproteine und an Bereiche des Pankreas- und Lungengewebes von gesunden Nerzen demonstriert (Kirkeby *et al.*, 2007). In klinischen Studien konnte die Beteiligung der Lectine LecA und LecB bei Infektionen mit *P. aeruginosa* dadurch belegt werden, dass Patienten mit einer *P. aeruginosa*-induzierten Otitis Externa Diffusa (Steuer *et al.*, 1993), einer Entzündung des Respirationstraktes (von Bismarck *et al.*, 2001) und einer Cystischen Fibrose (Hauber *et al.*, 2008) erfolgreich durch die Verabreichung von Lösungen, die die LecA- und LecB-spezifischen Zucker D-Galactose bzw. L-Fucose enthielten, geheilt wurden. Hierbei haben vermutlich die Zuckerlösungen die Lectin-vermittelte Adhäsion an die entsprechenden Wirtszellen verhindert. Unterstützt wird diese Annahme durch eine kürzlich erschienene Publikation, die demonstriert hat, dass LecA- und LecB-negative *P. aeruginosa*-Stämme im Vergleich zum Wildtypstamm weniger toxisch gegenüber Lungenepithelzellen sind und weniger stark mit diesen interagieren (Chemani *et al.*, 2009). Außerdem bindet LecB mit hoher Affinität den fucosylierten Lewis a-Rezeptor, der die Adhäsion von *P. aeruginosa* an CF-Patienten vermittelt (Mitchell *et al.*, 2002), und an Lewis a-Trisaccharide, die in der Muttermilch von Frauen vorkommen (Wu *et al.*, 2006; Marotte *et al.*, 2007). Weiterhin konnte die Hämagglutinations-Aktivität beider Lectine durch menschliche Milch blockiert werden (Lesman-Movshovich *et al.*, 2003), was im Einverständnis mit der Tatsache ist, dass die Milch Säuglinge gegen mikrobielle Infektionen schützt (Newburg *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist die Expression der Lectingene an die Synthese anderer Virulenzfaktoren wie der Elastase, alkalische Protease, LasA Protease, Exotoxin A, Pyocyanin, Pyoverdin und Hämolyisin gekoppelt (Whitley *et al.*, 1999; Winzer *et al.*, 2000). Durch den Einfluss von

LecB auf die Pilus-Biogenese und die Protease IV-Aktivität wird die Verbindung zwischen LecB und den Virulenzfaktoren veranschaulicht (Sonawane *et al.*, 2006). Weiterhin wurde in Studien an LecA- und LecB-negativen *P. aeruginosa*-Stämmen die Beteiligung beider Lectine an der Biofilmbildung demonstriert (Tielker *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2006) (Abb. 4).

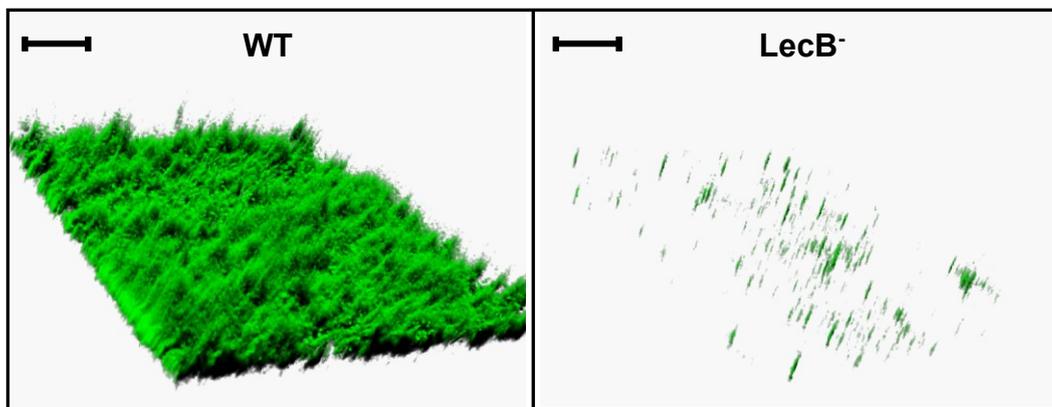


Abb. 4 Biofilme des Wildtyps und einer LecB-negativen Mutante unter statischen Kulturbedingungen. Die Aufnahmen der Biofilme des *P. aeruginosa*-Wildtyps (WT) sowie der LecB-negativen Mutante (LecB-) erfolgten mittels eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (Tielker, 2005).

1.2.3 Biofilme von *P. aeruginosa*

P. aeruginosa bildet Zusammenschlüsse von Zellen, die in eine extrazelluläre Matrix, bestehend aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) wie sekretierten Proteinen, Exopolysacchariden, Nukleinsäuren und Zelltrümmern, eingeschlossen sind und an biotische oder abiotische Oberflächen anheften (Parsek & Greenberg, 2005). Diese Zusammenschlüsse werden als Biofilme bezeichnet und weisen eine äußerst komplexe Struktur auf. Ein Netz aus wasserführenden Kanälen vermittelt den Transport von Nähr- und Abfallstoffen (Costeron *et al.*, 1995, 1999; Flemming & Wingender, 2001). Biofilme sind von klinischer Relevanz, da immer offensichtlicher wird, dass auf Biofilmen beruhende Infektionen weit verbreitet sind (Wagner & Iglewski, 2008). Klassische Beispiele hierfür sind Infektionen, die auf medizinischen Geräten wie intravaskulären Kathetern, Urin-Kathetern, orthopädischen Geräten und Dialysemaschinen entstehen (Costerton *et al.*, 1999; Costerton & Stewart, 2001). Es gibt immer mehr Beweise dafür, dass chronische Infektionen, wie die wiederkehrende Ohrinfektion Otitis Media, und Lungeninfektionen in CF-Patienten durch in Biofilmen lebende Bakterien hervorgerufen werden (Govan & Deretic, 1996; Donlan & Costerton, 2002; Costerton, 2002). Bei 65-80% aller mikrobiellen Infektionen sollen Biofilme eine Rolle

spielen (Costeron *et al.*, 1999; Hentzer *et al.*, 2003). Darüber hinaus stellen bakterielle Biofilme in Rohren und Leitungen ein großes Problem für die Industrie dar und zeichnen sich durch eine hohe Resistenz gegenüber den in der Industrie zur Bekämpfung des *biofouling* eingesetzten chemischen Bioziden aus (Brown & Gilbert, 1993). Die Behandlung von Infektionen durch biofilmbildende Erreger wird dadurch erschwert, dass Bakterien sessiler Gemeinschaften im Vergleich zu planktonischen Zellen bis zu tausendmal widerstandsfähiger gegenüber herkömmlichen Antibiotika und der Immunantwort des Wirtsorganismus sind (Brown *et al.*, 1988; Stewart & Costerton, 2001; Mah & O'Toole, 2001; Mah *et al.*, 2003).

Die Ausbildung der *P. aeruginosa*-Biofilme geschieht in mehreren Stufen und ist besonders von den gegebenen Umständen, zum Beispiel der Zusammensetzung und Strömungsgeschwindigkeit des Mediums, abhängig (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2003 a; Reisner *et al.*, 2005). Für die Fortbewegung planktonischer *P. aeruginosa*-Zellen ist die einzelne, polare Flagelle verantwortlich. In mehreren Untersuchungen wurde demonstriert, dass durch die Flagelle der Bakterien auch die reversible Adhäsion der Zellen an Oberflächen vermittelt wird (O'Toole & Kolter, 1998; Sauer *et al.*, 2002). Darüber hinaus verfügt *P. aeruginosa* ebenso über eine weitere Bewegungsform, die als *twitching motility* bezeichnet wird und durch die Streckung und Retraktion der Typ IV-Pili hervorgerufen wird (Bradley, 1980; Merz *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Bewegung kommt es zur Aggregation der angehefteten Zellen zu Mikrokolonien, die als Basis eines Biofilms angesehen werden (Costeron *et al.*, 1995; O'Toole & Kolter, 1998; Chiang & Burrows, 2003). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die Ausbildung von Mikrokolonien unabhängig von den Typ IV-Pili aufgrund hintereinander folgender Teilungszyklen einzelner Bakterienzellen vorkommen kann (Singh *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2003 a/b). Die anschließende Bildung des reifen Biofilms ist durch die Produktion der EPS, die an der Erhaltung der strukturellen Integrität des Biofilms beteiligt (Costerton *et al.*, 1981; Costerton *et al.*, 1987) und somit für die gesamte Stabilität der Biofilm-Biozönose (Uhlinger & White, 1983) verantwortlich sind, gekennzeichnet. Die mechanische Stabilität des Biofilms wird durch nicht-kovalente Bindungsarten der EPS-Bestandteile hervorgerufen. Dazu zählen elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals Wechselwirkungen (Mayer *et al.*, 1999; Flemming *et al.*, 2000). Der mukoide Phänotyp von *P. aeruginosa* ergibt sich durch die Überproduktion des EPS-Bestandteils Alginat, eines Polymers aus Mannuron- und Guluronsäure (Evans & Linker, 1973). Es wurde vorgeschlagen, dass das Alginat eine schützende Funktion in Umgebungen hat, in denen die Bakterien kontinuierlich oxidativem Stress und Attacken durch das Immunsystem ausgesetzt

sind (Simpson *et al.*, 1989). Endobronchiale, chronische Infektionen, die durch den mukoiden *P. aeruginosa* Phänotyp hervorgerufen werden, lassen sich sehr schwer mit Antibiotika behandeln (Pedersen *et al.*, 1992). Innerhalb einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass das Arzneimittel Ambroxol die Struktur mukoider Biofilme beeinträchtigen kann und die Synthese von Alginat reduziert (Li *et al.*, 2008). Die Biofilme nicht-mukoider Stämme enthalten dagegen als primäre Zuckerbestandteile der EPS Glucose, Mannose und Rhamnose (Wozniak *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2004; Matsukawa & Greenberg, 2004; Frieman & Kolter, 2004 a/b). In der späten Entwicklungsphase differenziert sich eine komplexe, dreidimensionale, heterogene Struktur des Biofilms, die zum einen durch Bereiche hoher Zelldichte, zum anderen durch Nährstoff-, und Abfall-führende Kanäle gekennzeichnet ist (Costerton *et al.*, 1994, 1999; Flemming & Wingender, 2001). Für die Bildung und Aufrechterhaltung des Kanal-Netzwerks ist die Synthese von Rhamnolipiden verantwortlich (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003).

Letztendlich lösen sich stellenweise vielleicht aufgrund eines eintretenden Nährstoffmangels einzelne Zellen oder größere Zellaggregate aus dem Biofilmverband, um an einem anderen Ort neue Kolonien zu bilden (Costerton *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004; Reisner *et al.*, 2005). Dies geschieht entweder durch aktive Bewegung oder passiv, wodurch Löcher in der Biofilmarchitektur entstehen (Sauer, 2002).

Es gibt Hinweise darauf, dass die Biofilmbildung durch QS reguliert wird. So wurde gezeigt, dass mutierte *P. aeruginosa*-Stämme, die Defekte im Las-QS-System aufweisen, unstrukturierte und schwache Biofilme ausbilden (Davies *et al.*, 1998) und außerdem die QS-abhängige Regulation des Schwärmens (Shrout *et al.*, 2006) und der DNA-Freisetzung in die Biofilmentwicklung involviert sind (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Weiterhin haben Studien an *lasI*- und *rhl*-negativen *P. aeruginosa*-Stämmen die QS-abhängige Regulation der *pel*-Gene, die für die Synthese Glucose-reicher Exopolysaccharide der Biofilmmatrix verantwortlich sind, demonstriert (Sakuragi & Kolter, 2007).

1.2.4 Porine der äußeren Membran von *P. aeruginosa*

Die äußere Membran von *P. aeruginosa* bildet einen atypischen Lipidbilayer, bei dem die innere Lipidschicht in ihrerer Zusammensetzung der cytoplasmatischen Membran Gram-negativer Bakterien ähnelt und hauptsächlich aus Phosphatidylethanolamin und zu einem geringeren Anteil aus Phosphatidylglycerol, Diphosphatidylglycerol und anderen sauren Phospholipiden besteht (Pinkart & White, 1997). Die äußere Schicht hingegen enthält nur

wenige Phospholipide und ist hauptsächlich aus dem Lipopolysaccharid, das das endotoxische Lipid A enthält, aufgebaut (Hancock *et al.*, 1994). Eingebettet in die äußere Membran sind Proteine, die an Transport, Adhesion, Membranstabilität und Erkennung des Immunsystems beteiligt sind. Dazu gehören ungefähr 160 transmembrane Proteine, von denen die meisten eine β -Faltblatt-Struktur aufweisen, und einige Lipoproteine, die für gewöhnlich mit der inneren Lipidschicht assoziiert sind und die äußere Membran mit dem periplasmatischen Peptidoglycan verankern (Tamber & Hancock, 2004). Die Lipoproteine OprI, OprL und das Tol System spielen eine strukturelle und Membran-stabilisierende Rolle, wie zum Beispiel bei der Aufrechterhaltung der Form der Zelle (Llamas *et al.*, 2000; Rodriguez-Herva & Ramos, 1996).

Die äußere Membran von *P. aeruginosa* bildet eine Barriere für Antibiotika und andere große hydrophobe Moleküle (Hancock, 1997), während zum Beispiel kleine, hydrophile Antibiotika und Substrate durch die mit Wasser gefüllten Kanäle der Porine die Membran passieren können. Insbesondere die Porine von *P. aeruginosa*, die für die Nahrungsaufnahme genutzt werden, sind entweder ineffizient oder hoch spezifisch und lassen einige Substrate in die Zelle, die größer als ein Monosaccharid (ca. 200 Da) sind (Hancock & Brinkman, 2002). Es existieren vier Klassen von Porinen. Spezifische Porine erleichtern die Aufnahme eindeutiger Substrate durch stereo-spezifische Bindestellen (Tamber & Hancock, 2004). Die am besten charakterisierten Proteine dieser Gruppe sind OprB, das Glucose und andere Monosaccharide in die Zelle lässt (Trias *et al.*, 1988; Wylie & Worobec, 1995), OprD, das die Aufnahme der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin sowie von Peptiden, die diese Aminosäuren enthalten, ermöglicht, (Trias & Nikaido, 1990) und das Phosphat-spezifische OprP (Hancock & Worobec, 1998). OprD spielt außerdem eine spezifische Rolle bei der Antibiotika-Resistenz von *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 1999; Pai *et al.*, 2001). Die TonB-abhängigen Porine aus *P. aeruginosa* umfassen eine große Familie von 35 homologen Proteinen, die für die Aufnahme von Siderophor-Eisen-Komplexen verantwortlich sind (Stover *et al.*, 2000; Cornelis & Matthijs, 2002). Dazu gehören unter anderem der Pyridin-Rezeptor FpvA (Kilburn *et al.*, 1998) und der an der Virulenz von *P. aeruginosa* beteiligte Pyochelin-Rezeptor FptA (Wang *et al.*, 1996; Castignetti, 1997). Weiterhin gibt es die Efflux Porine, die in Zusammenarbeit mit Pumpen der inneren Membran und periplasmatischer Linker-Proteine toxische Moleküle aus der Zelle ausstoßen (Tamber & Hancock, 2004). Das am besten charakterisierte Protein dieser Gruppe ist OprM, welches in Verbindung mit dem Linker-Protein MexA und dem Pump-Protein MexB für die Resistenz gegenüber einer Reihe von Antibiotika verantwortlich ist (Poole, 2001).

In *P. aeruginosa* scheinen vor allem zwei Porine die Eigenschaft zu besitzen, unbestimmte Substrate durchzulassen. Zum einen das spezifische Porin OprD, das als unspezifisches Porin bei der Aufnahme nicht verwandter kleiner Moleküle von weniger als 200 Da beteiligt ist (Huang & Hancock, 1993), zum anderen das Porin OprF, das für Moleküle zwischen 200 und 3000 Da durchlässig zu sein scheint (Bellido *et al.*, 1992). Das Protein OprF ist mit einer Kopienzahl von ungefähr 200.000 pro Zelle eines der Hauptproteine in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* (Bellido *et al.*, 1992), aufgrund dessen großes Interesse darin besteht, einen Impfstoff basierend auf diesem Protein zu entwickeln (Cripps *et al.*, 1995; von Specht *et al.*, 2000, Price *et al.*, 2001). Ein dreidimensionales Modell von dem N-Terminus des Proteins, das basierend auf den homologen Regionen des N-Terminus von OmpA aus *E. coli* konstruiert wurde, weist daraufhin, dass dieser ein acht-strängiges β -Faltblatt ausbildet (Brinkman *et al.*, 2000). OprF gilt als ein multifunktionales Protein, das an der Aufrechterhaltung der Zellform beteiligt ist und mit dem Peptidoglycan interagiert (Rawling *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde berichtet, dass OprF entweder eine kleine Pore (0,36 ns) oder eine größere Pore (2-5 ns) ausbildet (Bellido *et al.*, 1992), wobei der Anteil der letzteren Form mit ungefähr 400 von 200.000 Poren nur sehr gering ist (Brinkman *et al.*, 2000). Interessanterweise wurde gezeigt, dass Varianten des OprF-Proteins, die am C-Terminus verkürzt sind, nur kleine Poren ausbilden, was darauf hinweist, dass OprF für die Bildung einer großen Pore eine andere Konformation einnimmt, woran unter Umständen der C-terminale Anteil des Porins beteiligt ist (Rawling *et al.*, 1998). In Rahmen einer aktuelleren Studie wurde demonstriert, dass OprF zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen kann (Sugawara *et al.*, 2006). Die häufiger vorkommende Konformation erzeugt einen geschlossenen Kanal und besteht aus einem N-terminalen, acht-strängigem β -Faltblatt und einer C-terminalen, globulären, periplasmatischen Domäne. Dahingegen faltet sich die seltenere Konformation zu einer einzelnen Domäne aus einer größeren Anzahl von transmembranen β -Strängen, oligomerisiert und bildet einen offenen Kanal aus, wobei der C-terminus des Proteins Oberflächen-exponiert vorliegt.

In mehreren Studien wurden Hinweise darauf gefunden, dass OprF eine Rolle bei der Pathogenität von *P. aeruginosa* spielt. So wurden sowohl OprF als auch OprF-Antikörper aus dem Mukus von chronisch infizierten Patienten isoliert (Yoon *et al.*, 2002). Außerdem steht die Expression von OprF unter der Kontrolle des Regulators AlgU, der für die Produktion von Alginate und die Umwandlung von *P. aeruginosa* in die mukoide Form verantwortlich ist, (Firoved *et al.*, 2002) und dem ECF-(*extra cytoplasmatic function*)-Sigmafaktor SigX (Brinkman *et al.*, 1999). Darüber hinaus bilden OprF-negative *P. aeruginosa*-Stämme magere

Biofilme aus. Ein Grund dafür ist die Tatsache, dass diese Stämme keine Aktivität der Nitrat-Reduktase besitzen, die sie benötigen, um anaerobe Biofilme auszubilden (Hasset *et al.*, 2002; Tamber & Hancock, 2004). Aufgrund dessen wurde die Beteiligung von OprF an der Aufnahme von Nitrat und Nitrit in die Zelle vorgeschlagen. Andererseits könnte dieser Defekt auch strukturelle Mängel dieser mutagenen Stämme reflektieren (Tamber & Hancock, 2004). Weiterhin wurden klinische Isolate gefunden, denen das OprF-Protein fehlt und die eine Resistenz gegen mehrere Antibiotika aufwiesen (Brinkman *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass *P. aeruginosa* die OprF-Produktion als Antwort auf die Behandlung mit Antibiotika herunter reguliert, wenn die Infektion erst einmal etabliert ist, um sowohl die Effekte des Immunsystems als auch der Antibiotika zu umgehen (Tamber & Hancock, 2004). Außerdem wurde demonstriert, dass OprF als Adhäsion bei der Anheftung von *P. aeruginosa* an Epithelzellen der Lunge fungiert (Azghani *et al.*, 2002).

1.3 Glycoproteine in Bakterien

Glycosylierung die postrtranslationale Modifizierung eines Proteins mit Oligosacchariden ist seit langer Zeit als eine elementare Strategie eukaryotischer Organismen bekannt, um die Struktur und Funktion eines Proteins zu beeinflussen und zu modifizieren (Taylor & Drickamer, 2002). Es wird jedoch durch die Identifizierung einer stetig größer werdenden Anzahl von Glycoproteinen in Prokaryoten immer deutlicher, dass Protein-Glycosylierung auch in diesen Organismen häufig vorkommt. Die Glucane, die in Prokaryoten identifiziert wurden, sind weitaus facettenreicher im Hinblick auf ihre Zucker-Komposition als solche, die in Eukaryoten gefunden wurden (Hitchen & Dell, 2006). Bedingt durch die strukturelle Vielfalt der Oligosaccharide scheint die Glycosylierung von Proteinen eine schier grenzenlose Strategie zur Regulierung von Zell-Zell-Erkennung und -Kommunikation zu sein (Benz & Schmidt, 2002). Es sind zwei Arten der Protein-Glycosylierung bekannt: Bei der N-Glycosylierung wird das Oligosaccharid über eine N-glykosidische Bindung mit einem Asparaginrest des Proteins verknüpft, während bei der O-Glycosylierung das Oligosaccharid über eine O-glykosidische Bindung an einen Serine-, Threonin-Rest des Proteins gekoppelt wird (Szymanski & Wren, 2005). Die eukaryotische Konsensussequenz für N-Glycosylierungen Serin/Threonin-Xaa-Asparagin, wobei Xaa jede beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin sein kann (Gavel & von Heijne, 1990), konnte auch in den Prokaryoten *Mycobacterium tuberculosis* und *Clostridium thermocellum* identifiziert werden (Moens & Vanderleyden, 1997). Als erstes nicht-eukaryotische Glycoprotein wurde vor über drei

Jahrzehnten das S-Layer-Protein des Haloarchaea-Bakterium *Halobacterium halobium* identifiziert (Mescher & Strominger, 1976). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Pilin-Proteine der Pathogene *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Pseudomonas aeruginosa* (Stimson *et al.*, 1995; Castric *et al.*, 2001; Hegge *et al.*, 2004) als auch die Flagellen der Bakterien *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Listeria monocytogenes* (Schirm *et al.*, 2003, 2004 a/b; Thibault *et al.*, 2001) O-glycosyliert vorliegen. Die ersten bakteriellen N-glycosylierten Proteine wurden in *Campylobacter jejuni* identifiziert (Young *et al.*, 2002). Intensive Studien an diesem Darmmukosa-Pathogen haben zu der Entschlüsselung des Biosyntheseweges der N-Glycosylierung geführt (Weerepana & Imperiali, 2006). Eine schematische Darstellung dieses Biosynthesewegs ist in Abbildung 5 zu sehen.

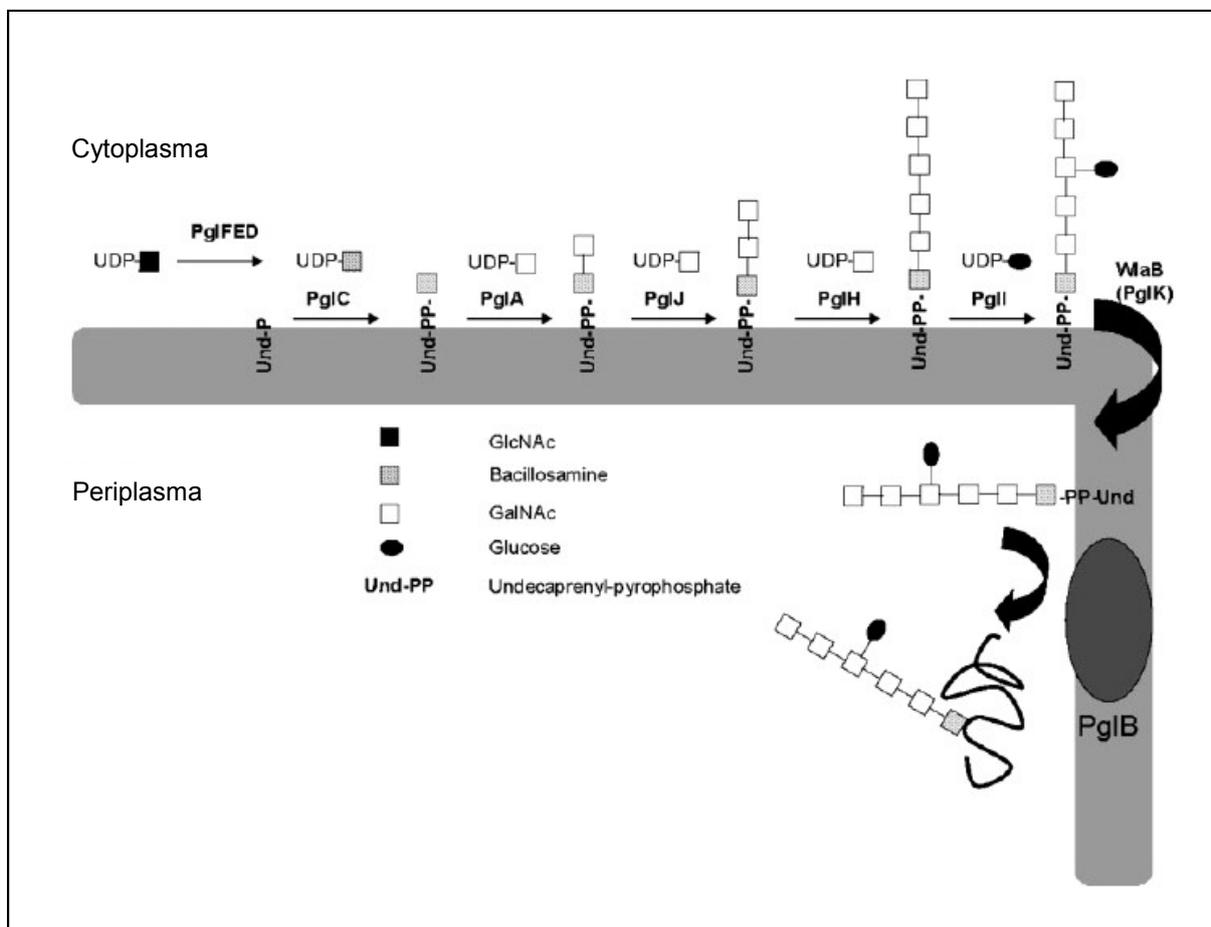


Abb. 5 Schematische Darstellung des N-Glycosylierungs-Biosyntheseweges von *C. jejuni* (Weerapana & Imperiali, 2006).

Der Gen-Cluster *pgl* kodiert neben anderen Proteinen fünf putative Glycosyltransferasen PglA, PglC, PglH, PglI und PglJ, die an dem Aufbau von Heptasacchariden auf einem Lipid-Carrier beteiligt sind, und das PglB-Protein, das den Transfer des Glucans von dem Carrier

auf das entsprechende Protein vermittelt (Abu-Qarn *et al.*, 2008). Derselbe Gen-Cluster kodiert ebenso für die UDP-N-Acetylglucosamine-C-6-Dehydratase PglF (Creuzenet, 2004), die C-4-Aminotransferase PglE (Schoenhofen *et al.*, 2006; Vijayakumar *et al.*, 2006) und die N-Acetyltransferase PglD (Olivier *et al.*, 2006), die für die Umwandlung von UDP-GlcNAc zu UDP-Bacillosamine verantwortlich sind, und die Flippase WlaB (PglK), die den Transport des Heptasaccharids von der cytoplasmatischen Seite der Membran zur periplasmatischen Seite vermittelt (Weerapana & Imperiali, 2006).

Ein weiteres Beispiel für ein N-glycosyliertes Protein ist das 40 kDa große, äußere Membranprotein MOMP (*major outer membrane protein*) des Pathogens *Chlamydia trachomatis*, welches *high-mannose-type* Oligosaccharide enthält und für die Aufrechterhaltung der Integrität des Bakteriums essentiell ist (Swanson & Kuo, 1996; Kuo *et al.*, 1996). Es wird diskutiert, dass es über die Glycosylierung mit Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren der humanen Zelle interagieren kann und so an der Adhäsion beteiligt ist (Kuo *et al.*, 1996, Kuo *et al.*, 2004).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

P. aeruginosa ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium, das sowohl bei akuten als auch bei chronischen Infektionen eine Rolle spielt (Fagon *et al.*, 1996; Lyczak *et al.*, 2002). Die therapeutischen Möglichkeiten bei so einer Infektion sind begrenzt, da dieses Bakterium Resistenzen gegen viele Antibiotika aufweist (Rossolini & Mantengoli, 2005). Daher ist es dringend notwendig, dass neue Therapeutika gegen Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* gefunden werden.

Ein potentielles Ziel können dabei die Lectine von *P. aeruginosa* sein, die bei der initialen Adhäsion eine wichtige Rolle spielen. In Zusammenarbeit mit anderen Gruppen sollte die inhibierende Wirkung von Glycopeptid-Dendrimeren auf Lectine A und B von *P. aeruginosa* analysiert werden. Dazu sollten die Lectine nach heterologer Überexpression in präparativem Maßstab affinitätschromatographisch isoliert werden und die Interaktionen untersucht werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte die multiple Lokalisierung des Lectins B untersucht werden. Der Sekretionsmechanismus, der zur extracytoplasmatischen Lokalisierung von LecB führt, ist unbekannt. In vorhergehenden Studien konnte das Lectin B nicht nur im Cytoplasma und der äußeren Membran, sondern auch, wenn auch in geringen Mengen, im Periplasma von *P. aeruginosa* detektiert werden (Glick & Garber, 1983). Da diese Beobachtung auf einen

Zwei-Schritt-Sekretionsmechanismus hinweist, sollte das LecB-Protein im Periplasma näher untersucht werden.

Gereinigtes LecB-Protein interagiert mit spezifischen Kohlenhydrat-Rezeptoren in der äußeren Membran von *P. aeruginosa*, wenn es von außen zugegeben wird (Tielker *et al.*, 2005). Ob das Lectin LecB unter physiologischen Bedingungen ebenfalls auf der Zelloberfläche exponiert vorliegt, sollte in dieser Arbeit geklärt werden.

Weiterhin sollten Liganden, die in der Zelle mit Lectin B interagieren, identifiziert werden. Die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern kann für die Aufklärung der Lokalisation hilfreich sein. Die Identifizierung der Liganden sollte mittels Interaktion mit dem heterolog-produzierten nativen Lectin B und LecB-Histidin-Fusionsprotein erfolgen und unter Einsatz von affinitätschromatographischen Methoden isoliert werden. Die so identifizierten Liganden sollten hinsichtlich ihrer Funktion für LecB näher untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen:

Antibiotika: Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)

Chemikalien: Biomol (Hamburg), Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg)

Enzyme: MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach), Sigma (Deisenhofen), Stratagen (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Roche (Penzberg)

Medienkomponenten: Difco (Detroit, USA), Gibco BRL, Oxoid (Wesel)

Antikörper: Der Zweitantikörper, Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat, wurde von der Firma Biorad bezogen.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren und rekombinante Plasmide sind in Tab. 1, Tab. 2 und Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 1 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme. Die Bezeichnungen der Genotypen entsprechen der allgemeinen Nomenklatur für *E. coli* (Bachmann, 1983) und *P. aeruginosa* (Holloway & Matsumoto, 1984).

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	Woodcock <i>et al.</i> , 1989
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Ec294::[RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)], <i>pro</i> , <i>res, recA, tra</i> ⁺ , Tp ^r , Sm ^r	Simon <i>et al.</i> , 1986
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (λ <i>Its857</i> <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1</i>)	Studier & Moffat, 1986
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> H636	Δ <i>oprF</i> :: Ω Sm ^r	Woodruff & Hancock, 1988
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PATI2	Δ <i>lecB</i> :: Ω Gm ^r	Tielker <i>et al.</i> , 2005

Tab. 2 Übersicht der verwendeten Vektoren.

Vektor für <i>E. coli</i>	Genetische Marken	Referenz/Bezugsquelle
pET19	ColE1 P _{T7Φ10} Ap ^r <i>lacI</i> ^q	Novagen, Madison, USA
pET22b	ColE1 P _{T7Φ10} Ap ^r <i>pelB lacI</i> ^q	Novagen, Madison, USA
Vektoren mit weitem Wirtsbereich		
pBBR1MCS	<i>lacZα Cm^r rep mob</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1994

Tab. 3 Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
pEC1	371 bp <i>NdeI/BamHI</i> -PCR-Produkt in pET22b+ (<i>lecA</i> -Gen P _{T7Φ10} -kontrolliert)	Tielker, 2001
pEC2	345 bp <i>NdeI / BamHI</i> -PCR-Produkt in pET22b (<i>lecB</i> -Gen P _{T7Φ10} -kontrolliert)	Loris <i>et al.</i> , 2003
pEXCHA22	345 bp <i>NdeI / BamHI</i> -PCR-Produkt in pET22b (<i>lecB^m</i> -Gen P _{T7Φ10} -kontrolliert)	diese Arbeit
pBBC2	398 bp <i>XbaI / SacI</i> -Fragment aus pEC2 in pBBR1MCS (<i>lecB P_{lac}</i> -kontrolliert)	Tielker <i>et al.</i> , 2005
pBBXCHA22	398 bp <i>XbaI / SacI</i> -Fragment aus pEC2 in pBBR1MCS (<i>lecB^m P_{lac}</i> -kontrolliert)	diese Arbeit
pPURE	pET19b mit synthetischem Polylinker und 345 bp <i>NdeI / BamHI</i> PCR-Produkt mit <i>lecB</i> -Gen	Bartels, 2004

2.3 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Thermo Scientific (Dreieich) oder MWGBiotech (Ebersberg) in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form bezogen und sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die DNA wurde jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen, wodurch sie in einer Konzentration von 100 pmol/μL vorlagen.

Tab. 4 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Merkmal
LIINdeI	AAA ACA TAT GGC AAC ACA AGG AGT GTT CAC	<i>NdeI</i>
LIIBamHI	AAA AGG ATC CCT AGC CGA GCC AGT TGA TC	<i>BamHI</i>
A22Xchup	GCCTTCGCCGCATCGTCCGGA	AS-Austausch Asn22Ala
A22Xchup	TCCGGACGATGCGGCGAAGGC	AS-Austausch Asn22Ala

2.4 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Kulturen von *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden in LB-Medium angelegt und bei 37 °C bebrütet. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina im Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH) bei 180–220 UpM kultiviert. Dabei entsprach das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10. Stämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 5) kultiviert. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine $O.D._{580\text{ nm}} = 0,05$ beimpft. Die Expression der heterologen *lecA* und *lecB*-Gene erfolgte in den *E. coli* Stämmen BL21 (DE3) bei 37 bzw. 30 °C. Hierbei wurde die Expression der T7-RNA-Polymerase bei einer Zelldichte, die einer $O.D._{580}$ von 0,5 entsprach, durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

LB-Medium: 10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefextrakt

NB-Medium: 8 g/l Bouillon (Lab Lemco Broth, Oxoid); 4 g/l NaCl

M63-Medium: Lösung I 2g/l NH_4SO_4 , 3g/l KH_2PO_4 , 9,1g/l K_2HPO_3
 Lösung II 2g/l Glucose)
 Lösung III 2g/l $MgCl_2$

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und in folgendem Verhältnis eingesetzt: 10 % (v/v) Lsg. I; 10 % (v/v) Lsg. II; 10 % (v/v) Lsg. III.

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Hitzelabile Chemikalien wurden mit Membranfiltern mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm (Schleicher und Schüll, Dassel) sterilfiltriert und den autoklavierten Medien bei einer Temperatur von ≤ 60 °C zugesetzt.

Tab. 5 Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration für <i>E. coli</i> (µg/ml)	Konzentration für <i>P. aeruginosa</i> (µg/ml)
Ampicillin (Ap)	100	-
Gentamycin (Gm)	10	50
Chloramphenicol (Cm)	50	450
Streptomycin (Sm)	50	500

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller.

Chromosomale DNA aus Zellen von *P. aeruginosa* wurde nach Gamper *et al.* (1992) oder mit Hilfe des „DNeasy Tissue Kits“ der Firma Qiagen isoliert.

2.6 Gelelektrophorese

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,6 % - 2 % (w/v) nach Sambrook *et al.* (1989) elektrophoretisch getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde $0,5 \times$ TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$; pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurde die „1kb-ladder“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystem der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin Extract“-Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren) sowie des „QiaEx II“-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.7 *In vitro*-Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach Sambrook *et al.* (1989) sowie nach Angaben des Herstellers des jeweiligen Enzyms in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.8 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation sowie die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli* Zellen wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.9 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 ml einer ÜK des Plasmid-haltigen Donorstamms *E. coli* S17-1 mit 1 ml Zellen des jeweiligen Rezipientenstamms von *P. aeruginosa*, die zuvor für 10 min bei 46 °C inkubiert wurden, gemischt und durch Zentrifugation (3 min; 5.000 g; RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für mindestens 4 h bei 37 °C auf einer LB-Agarplatte inkubiert, bevor diese in 0,14 M NaCl suspendiert und in Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-6} auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion des Donorstamms enthielt der Selektivagar zusätzlich 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, CH).

2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.10.1 Standard-PCR

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Pfu*-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 × (10 min: 98 °C); 30 × (1 min: 98 °C; 0,5 min: 50–60 °C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5-2 min × 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); 1 × (5 min: 72 °C). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin Extract“-Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

2.10.2 Ortsspezifische Mutagenese

Die Einführung von zielgerichteten Basenaustauschen wurde mittels overlap-extension PCR durchgeführt (Ho *et al.*, 1989), wobei bei Austausch eines Codons nach Gupta & Gosh (2001) auf die Verwendung eines häufig benutzen Triplets geachtet wurde. Für die PCR-Reaktionen wurde die *Pfu*-Polymerase verwendet. In den ersten PCR-Reaktionen wurden durch flankierende Primer und Primer, die an der zu mutagenisierenden Sequenz binden und die gewünschten Austausch tragen, mutagenisierte Genfragmente erstellt. Hierbei wurden die mutagenisierenden Primer so gewählt, dass sich die PCR-Produkte in ihrer Sequenz überschneiden. Anschließend wurden die erstellten Genfragmente zusammen mit den flankierenden Primern in einer weiteren PCR-Reaktion eingesetzt. Die flankierenden Primer amplifizierten jeweils die Einzelstränge der Genfragmente, die durch ihre Überlappung miteinander hybridisierten und durch die DNA-Polymerase aufgefüllt werden konnten, so dass als PCR-Produkt das mutagenisierte Gen entstand.

2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Squeiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

2.12 Inkubation von *P. aeruginosa* Zellen mit verschiedenen Zuckerlösungen

Zellen des *P. aeruginosa* Stamms PAO1, der das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielt, wurden für 48 h bei 37 °C auf NB-Agar kultiviert. Anschließend wurden die Bakterienzellen (12 mg Trokengewicht) in 20 ml PBS-Puffer suspendiert und durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 3000 g). Das Pellet wurde dreimal in PBS-Puffer gewaschen und dann in PBS-Puffer aufgenommen, der zusätzlich 20 mM L-Fucose bzw. D-Galactose enthielt. Nach Inkubation für 1 h bei 4 °C wurden die Ansätze zentrifugiert (10 min, 3000 g). Die Pellets wurden direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen, während die Proteine der Überstände zunächst sterilfiltriert (Schleicher & Schuell Einmalfilter,

Porendurchmesser = 0,2 μm) und anschließend durch TCA-Fällung nach Sivaraman *et al.* (1997) präzipitiert wurden.

2.13 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Um Proteine aus *E. coli* Expressionskulturen oder *P. aeruginosa* Kulturen zu isolieren, wurden zunächst Proben entnommen und die Zelldichte über Messung der O.D.₅₈₀ bestimmt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 5000 rpm, 4 °C) sedimentiert. Das Zellsediment wurde je nach weiterem Verwendungszweck entsprechend einer O.D.₅₈₀ = 20 im Equilibrierungspuffer für eine D-Mannose-Reinigung (100 mM Tris-HCL, pH 8) oder eine Ni-NTA-Reinigung (50 mM KPi, pH 8; 20 mM Imidazol; 300 mM NaCl) aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 3 x 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Der GZE wurde zentrifugiert (30 min, 10.000 g, RT) und der Überstand in die Reinigung eingesetzt.

2.14 Fraktionierung von *P. aeruginosa* Zellen (modifiziert nach Witholt *et al.*, 1976)

P. aeruginosa Zellen wurden 48 h bei 37 °C auf NB-Agar in Form eines ungesättigten Biofilms sowie in NB-Flüssigmedium kultiviert und anschließend in 0,14 M NaCl suspendiert. Die Fraktion der extrazellulären Proteine wurde durch Zentrifugation (10 min, 3.000 g, EZ, RT) und anschließender Sterilfiltration (Schleicher & Schuell Einmalfilter, Porendurchmesser = 0,2 μm) gewonnen. Die Bakterienzellen (1,2 mg Trockengewicht) wurden in 240 μl 100 mM Tris-HCl, pH 8 mit 20 % (w/v) Saccharose suspendiert. Nach der Zugabe von 240 μl desselben Puffers, der zusätzlich 5 mM EDTA und 20 μg Lysozym enthielt und Inkubation des Ansatzes für 30 min bei RT wurden die Spheroplasten durch Zentrifugation für 20 min bei 10.000 g isoliert. Der Überstand enthielt die Proteine der periplasmatischen Fraktion. Die Spheroplasten wurden in 240 μl 100 mM Tris-HCL, pH 8 suspendiert und anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen (Branson-Sonifier W250, 3 x 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Nach Zentrifugation für 10 min bei 5.000 g zur Entfernung der Zelltrümmer wurde der Ansatz erneut zentrifugiert (1 h, 13.000 g). Die sedimentierten Membranproteine wurden direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen, während die extrazellulären Proteine sowie die Proteine der periplasmatischen und cytoplasmatischen Fraktion zunächst durch TCA-Fällung nach Sivaraman *et al.* (1997) präzipitiert wurden. Für die Isolierung von LecB aus der periplasmatischen Fraktion von *P. aeruginosa* wurde die periplasmatische Fraktion aus 500 mg Zellen gewonnen, zusätzlich mit 50 mM CaCl_2 versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.15 Präparation der äußeren Membranfraktion

P. aeruginosa Zellen wurden für 48 h bei 37 °C in NB-Medium kultiviert. 500 mg Zellen (Trockengewicht) wurden durch Zentrifugation (10 min, 300 g) sedimentiert, anschließend in 200 ml Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert und nach Zugabe von 10 mg Lysozym für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an den Zellaufschluss unter Verwendung von Ultraschall (30 W, 4 min, 50 %, „SONOPULS HD60“, Bandelin, Berlin) wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 5.000 g) sedimentiert. Die Membranproteine wurden anschließend durch erneute Zentrifugation des Überstands (1 h, 13.000 g) isoliert, in 10 ml Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8; 2 % (w/v)) aufgenommen und 1 h bei RT inkubiert.

Daraufhin wurde die äußere Membranfraktion durch Zentrifugation (40 min, 45.000 g) sedimentiert und in 10 ml 100 mM Tris (pH 8) resuspendiert.

2.16 Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

2.16.1 Reinigung von LecA mittels Sepharose 4b

Die Reinigung von LecA mittels Affinitätschromatographie wurde entsprechend dem Temperaturprofil der Hämagglutinationsreaktion des LecA-Proteins bei 4°C durchgeführt. Nach der Equilibrierung des Säulenmaterials (25 ml Sepharose 4b, Pharmacia,) mit Tris-Puffer (100 mM Tris-HCL, pH 8) wurde die Säule mit dem Überstand des GZE einer *lecA*-Überexpressionskultur beladen. Dann wurde die Säule mit 250 ml Waschpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8) gewaschen und das LecA-Protein anschließend mit 20 ml 200 mM D-Galaktose in 100 mM Tris-HCl, pH 8 eluiert.

2.16.2 Reinigung von LecB und LecB-Liganden mittels D-Mannose-Agarose

Die Reinigung von LecB bzw die Co-Reinigung von LecB-Liganden mittels Affinitätschromatographie wurde entsprechend dem Temperaturprofil der Hämagglutinationsreaktion des LecB-Proteins bei 37°C durchgeführt. Nach der Equilibrierung des Säulenmaterials (25 ml D-Mannose-Agarose, Sigma, Deisenhofen) mit Tris-Puffer (100 mM Tris-HCL, pH 8) und dem Beladen der Säule mit der jeweiligen Probe wurde die Säule mit 250 ml Waschpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8; 140 mM NaCl) gewaschen und gebundene Proteine anschließend mit 20 ml 20 mM D-Mannose in 100 mM Tris-HCl, pH 8 eluiert.

2.16.3 Reinigung von LecB als Poly-Histidin-Fusionsprotein

Zur Aufreinigung des LecB-Proteins als Poly-Histidin-Fusionsprotein wurde die immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) angewendet, die die Eigenschaft einiger Aminosäuren ausnutzt, als Elektronendonator an der Oberfläche von Proteinen reversibel an immobilisierte Metallionen zu binden (Porath et al., 1975).

Nach der Equilibrierung des Säulenmaterials (25 ml Ni-NTA-Agarose, Qiagen, Hilden) und dem Beladen der Säule mit dem Überstand des GZE der *lecB_{His6}*-Expressionskultur wurde diese mit 250 ml Waschpuffer (50 mM KPi, pH 8; 50 mM Imidazol; 300 mM NaCl) gewaschen und das LecB-Fusionsprotein anschließend mit 20 ml Elutionspuffer (50 mM KPi, pH 8; 250 mM Imidazol; 300 mM NaCl) eluiert.

2.16.4 Isolierung von Proteinen aus *P. aeruginosa* mittels immobilisiertem LecB-Histidin-Fusionsprotein

Die Isolierung von *P. aeruginosa*-Proteinen mittels immobilisiertem LecB-Histidin-Fusionsprotein erfolgte bei 37 °C. Zunächst wurden 2 mg des LecB-Histidin-Fusionsproteins mit der entsprechenden *P. aeruginosa*-Zellfraktion für 1 h inkubiert. Nach Equilibrierung des Säulenmaterials (5 ml Ni-NTA-Agarose, Qiagen, Hilden) und dem Beladen der Säule mit

dem Inkubationsansatz wurde diese mit 50 ml Waschpuffer (50 mM KPi, pH 8; 50 mM Imidazol; 300 mM NaCl) gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend mit 5 ml Elutionspuffer (50 mM KPi, pH 8; 20 mM L-Fucose; 300 mM NaCl) eluiert.

2.17 Größenausschlusschromatographie mittels HPLC

Die Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes der periplasmatischen LecB-Varianten wurde mit einer TOSOH TSK Gel G2000SWxL (Gelfiltrationssäule) durchgeführt. Nach Equilibrierung der Säule mit 100 mM NaPO₄-Puffer (pH 6,8) wurde diese mit den Proteingrößen-Standards Thyroglobulin (670 kDa), IGG (150 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und Uridin (0,244 kDa) kalibriert. Als Probe wurden 10 µl des gereinigten Proteins in einer Konzentration von 1 mg/ml im Equilibrierungspuffer verwendet.

2.18 Konzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen

Das Entfernen der zur Elution benötigten Puffer sowie die Konzentrierung der Proteinlösungen erfolgten unter Verwendung von Zentrifugationskonzentratoren (Vivaspin 6, Vivascience, Hannover) gegen A. dest. mit einer Ausschlussgröße von 5.000 MWCO nach den Angaben des Herstellers in Ausschwingrotoren einer Kühlzentrifuge (Rotina 35R, Hettich, Bäch, CH) bei 3.000 g. Die Proteinlösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.19 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen von Gesamtzellextrakten (GZE) wurden nach den Methoden von Bradford (1976), Lowry *et al.* (1951) oder mit Hilfe des „BCA Protein Assay“ (Pierce, Rockford, USA) ermittelt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA). Die Konzentration von gereinigten Proteinproben wurde durch spektrophotometrische Messung der O.D.₂₈₀ ermittelt. Die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Proteine, die zur Berechnung der Konzentrationen eingesetzt wurden, betragen: LecB = 0,588 M⁻¹ · cm⁻¹, LecB_{His6} = 0,536 M⁻¹, LecA = wobei gilt: O.D.₂₈₀ = 1 ≡ 1 g/l des jeweiligen Proteins.

2.20 Hämagglutinationstest (HAT)

Die hämagglutinierende Aktivität vom LecB-, LecB-Histidin und LecA-Protein wurde mittels HAT nach Glick & Garber (1983) in Mikrotiterplatten (Rundboden, Nunc, Wiesbaden) ermittelt. Zur Gewinnung der Erythrozyten wurde Citrat-Blut vom Kaninchen zentrifugiert (15 min, 2.000 g, RT). Die Erythrozyten wurden 3-mal in PBS-Puffer (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄) gewaschen und in der Menge PBS-Puffer aufgenommen, dass eine 5 % (v/v) Suspension entstand. Die Erythrozytensuspension wurde im Verhältnis 9:1 mit einer 1 % (w/v) Papainlösung (*crude powder*: 1,5-3,5 U/mg, Sigma, Deisenhofen) und 0,1 % (w/v) L-Cystein versetzt, 1 h bei 37 °C inkubiert und erneut 3-mal in PBS-Puffer gewaschen.

Nach Zugabe von 50 µl dieser 5 % (v/v) Zellsuspension zu 50 µl einer LecB bzw. LecA-Lösung (dreifache Verdünnungsreihe ausgehend von 0,5 mg/ml in PBS) und Inkubation für 1 h bei RT wurden die Erythrozyten durch Zentrifugation sedimentiert (30 sec, 1.000 g, RT) und die hämagglutinierende Aktivität optisch bestimmt. Zur spezifischen Hemmung der Reaktion wurden den Ansätzen L-Fucose, D-Galactose oder Peptide-Dendrimere, die entweder für LecA, LecB oder beide Lectine spezifisch waren, in verschiedene Konzentrationen hinzugegeben.

2.21 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli *et al.* (1970), bestehend aus einem 5 % Sammel- und einem 12 oder 16 % Trenngel. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merrill (1990) mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg) oder mittels „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese durch TCA-Fällung nach Sivaraman *et al.* (1997) präzipitiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.22 2-D-Gelelektrophorese

Alle für diese Methode verwendeten Geräte und Materialien wurden von der Firma GE Healthcare (München) bezogen. Zunächst wurden IPG-Streifen (13 cm) in einem IPG-Streifenhalter mit 200 µl Rehydrierungspuffer (8 M Urea; 2-4 % Chaps; 2% IPTG-Puffer, 0,1 % Bromphenolblau (1 %)), der 150-200 µg des zu untersuchenden Proteins enthielt, überschichtet. Daraufhin wurden die Proteine mittels der Apparatur Ettan IPGphor 3 bei einer Spannung von 500-8000 V isoelektrisch fokussiert. Die Trennung in der zweiten Dimension erfolgt in einem 12,5 % Trenngel durch das System Ruby SE 600. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merrill (1990) mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg) gefärbt.

2.23 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung der Apparatur „Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, München) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektroblob in einem nach Dunn (1986) beschriebenen Puffer (10 mM NaHCO₃; 3 mM Na₂CO₃; 20 % (v/v) Methanol) bei 150 mV für 15 min und bei 300 mV für weitere 20 min. Die PVDF-Membran wurde anschließend für 2,5 h in TBST (50 mM Tris/HCl pH 6,8; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl₂; 0,2 % (v/v) Tween 20) mit 1 % (w/v) Milchpulver blockiert.

Der indirekte immunologische Nachweis von dem auf der PVDF-Membran immobilisierten LecB-Protein erfolgte unter Verwendung eines LecB-spezifischen polyklonalen Antiserums (Tielker, 2001) oder eines OprF-spezifischen monoklonalen Antikörpers (Finnen *et al.*, 1992) in einer Verdünnung von 1:20000 bzw. 1:5000. Die Detektion erfolgte nach Angaben des

Herstellers mit dem „ECL-Western Blotting Detection“-System (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) unter Verwendung des Zweit-Antikörpers Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Bio-Rad, München) in einer Verdünnung von 1:5.000. Im Falle des Far Western Blots und des Lectin-Blots wurde die PVDF-Membran vor der Antikörper Behandlung mit 1 µg/ml LecB bzw Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten LecB in TBST-Puffer vorinkubiert. Die Markierung des LecB-Proteins mit der Meerrettich-Peroxidase erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Roche, Penzberg) unter Verwendung des „Peroxidase Labelling Kits“.

2.24 MALDI-TOF-MS-Analysen

2.24.1 Identifizierung von Proteinen

Zur Analyse der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden die Proteinbanden aus Coomassie-gefärbten SDS-Gelen ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden nach 2 x 10 min Schütteln mit 650 µL 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril versetzt, 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 6 µL 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng/µL Trypsin [Promega] rehydratisiert. Nach 30 min wurden weitere 6 µL 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben über Nacht bei RT verdaut. Die Proteine wurden durch Zugabe von 5 µL A. dest., 15minütiger Inkubation bei RT, Zugabe von 5 µL 0,2 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril und nochmals 10 minütiger Inkubation bei RT eluiert.

Die massenspektrometrische Analyse der Proteine erfolgte mittels MALDI-TOF-MS im Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich, AG Biochemie.

2.24.2 Glycan-Analyse

Der direkte Nachweis der Glycane im OprF-Protein erfolgte durch die Firma Protagen (Dortmund).

2.25. Nachweis von Glycosylierungen in Proteinen

Der Nachweis von Glycosylierungen erfolgte nach den Angaben des Herstellers unter der Verwendung des „Glycan Detection Kits“, der N-Glycosidase F oder N-Glycosidase O (Roche, Penzberg).

2.26 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde durch die Computerprogramme „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software), dem „DNASTAR“-Programmpaket (Lasergen) und diversen Anwendungen des „Expert Protein Analysis“-Systems (<http://us.expasy.org/>) unterstützt.

Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997).

DNA-Sequenzinformationen von *P. aeruginosa* wurden von dem „*Pseudomonas*-Genome Project“ bezogen (<http://www.pseudomonas.com>). Die Auswertung der Massenspektren der Peptide, die durch MALDI-TOF-MS erhalten wurden, erfolgte mittels des Mascot-Servers (<http://us.expasy.org/>). Potentielle N-Glycosylierungsstellen wurden mittels des NetNGlyc 1.0 Servers (<http://.cbs.dtu.dk/services/netnglyc>) ermittelt.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Hierbei handelt es sich um die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen, der Immunoblots und der Analysen mit dem „Glycan detection kit“. Im Verlauf der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Veränderungen der Abbildungen vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung der Lectine LecA und LecB aus *P. aeruginosa*

Zunächst wurden die Lectine LecA und LecB produziert und gereinigt, da viele Experimente der vorliegenden Arbeit auf der Verwendung dieser Proteine basieren. Sie wurden für die Entwicklung LecA- und LecB-spezifischer Hemmstoffe sowie für die Identifizierung und Isolierung von LecB-Liganden aus *P. aeruginosa* eingesetzt.

3.1.1 Heterologe Expression der Gene *lecA* und *lecB* und Reinigung der Lectine mittels Affinitätschromatographie

Die heterologe Überexpression der Gene *lecA* und *lecB* aus *P. aeruginosa* in *E. coli* und die anschließende Reingung der Lectine mittels Affinitätschromatographie war bereits Gegenstand vorangegangener Arbeiten (Tielker, 2001 und 2005, Loris *et al.*, 2003). Die Expression der Lectine erfolgte unter Verwendung der Plasmide pEC1 (kodiert für LecA) oder pEC2 (kodiert für LecB). Diese Vektoren tragen das jeweilige Lectingen unter der Kontrolle des T7-Promotors und ermöglichen somit eine Expression in dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3), der eine chromosomal codierte T7-Polymerase trägt. Die Reinigung der Lectine erfolgte aus dem Rohextrakt der Überexpressionskulturen mittels Affinitätschromatographie. Hierbei wurde die natürliche Affinität von LecA zu Sepharose 4B unter Verwendung von Q-Sepharose 4B und von LecB zu D-Mannose unter Verwendung von D-Mannose-Agarose ausgenutzt. Die Elution der Lectine erfolgte durch das Waschen der Säule mit einem Elutionspuffer, der 200 mM D-Galactose bzw. 20 mM D-Mannose enthielt. Der Erfolg der Reinigung der Lectine wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 6). Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass sowohl LecA als auch LecB bis zu einer elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden konnten. Nach der Entfernung der zur Elution verwendeten Zucker unter Einsatz von Zentrifugationskonzentratoren betrug die erzielte Proteinausbeute 41 mg LecA und 65 mg LecB pro Liter Expressionskultur.

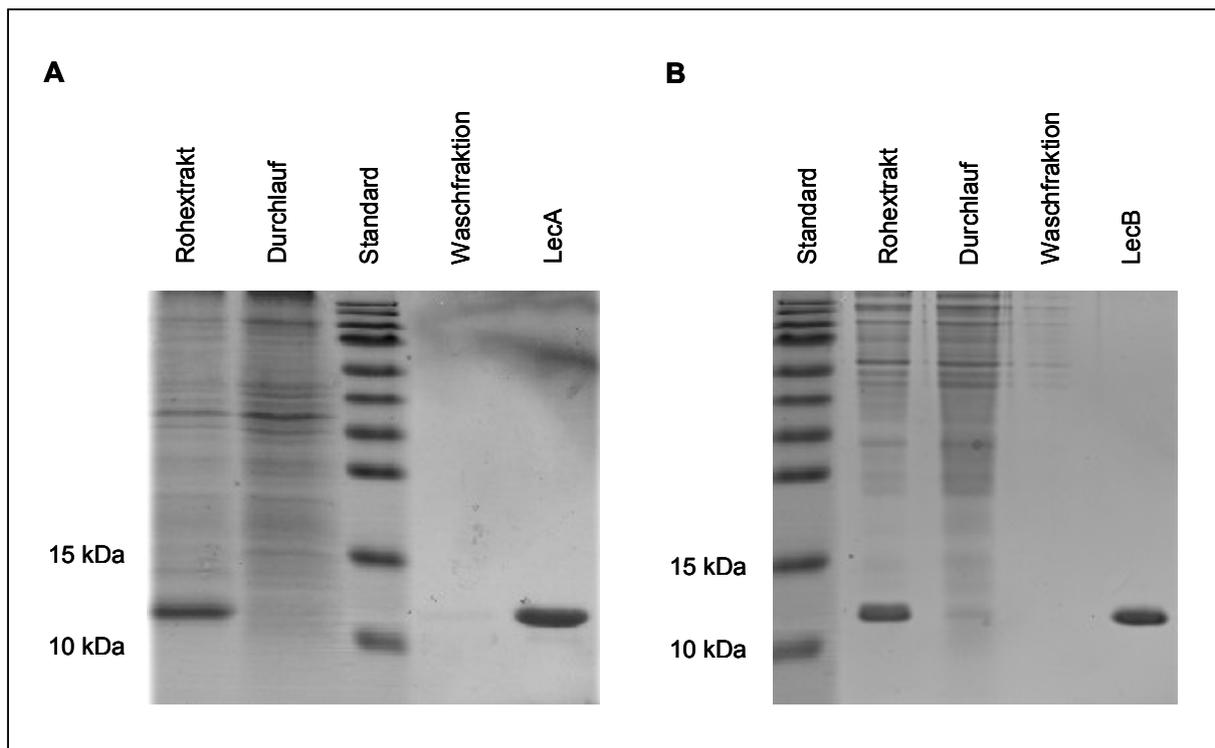


Abb. 6 SDS-PAGE-Analyse der affinitätschromatographischen Reinigung der Lectine LecA (A) und LecB (B). Es wurden 5 μ l des Rohextrakts sowie 10 μ l der übrigen Fraktionen eingesetzt. Als Marker diente der „PageRuler™ Prestained Protein Standard“ (Fermentas).

3.1.2 Heterologe Expression des *lecB*-Gens als Histidin-Fusionsprotein und Reinigung des Fusionsproteins mittels IMAC

Um das LecB-Protein in nachfolgenden Versuchen an eine Ni-NTA-Matrix immobilisieren zu können, wurde das *lecB*-Gen als Fusionsprotein mit einem N-terminalem Histidin-Tag exprimiert. Hierfür wurde *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Plasmid pURE (Bartels, 2004) transformiert, welches einen für das Fusionsprotein kodierenden Bereich trägt, der unter die Kontrolle des T7-Promotors gestellt ist. Nach erfolgter Expression wurde das Protein über eine IMAC gereinigt. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Wie anhand der SDS-PAGE zu erkennen war (Abb. 7), band das LecB-Histidin-Fusionsprotein selektiv an der Säulenmatrix und eluierte in nahezu elektrophoretischer Homogenität. Nach der Entfernung des zur Elution verwendeten Imidazols unter Einsatz von Zentrifugationskonzentratoren betrug die erzielte Proteinausbeute 39 mg LecB pro Liter Expressionskultur.

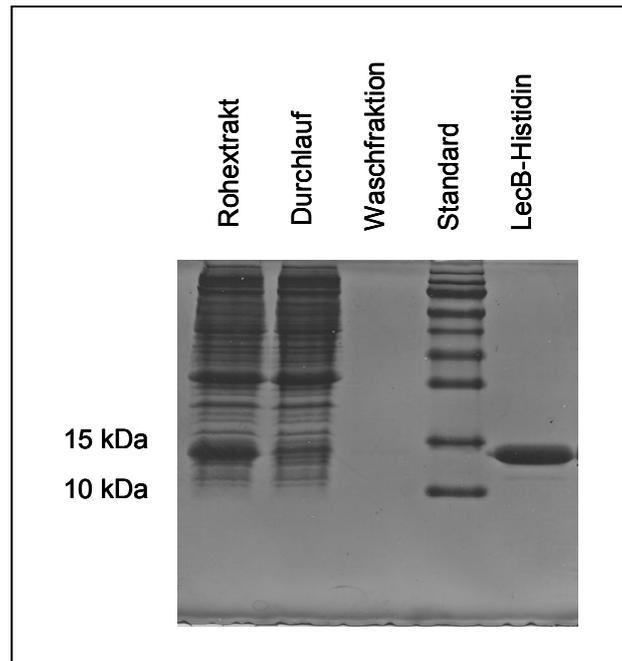


Abb. 7 SDS-PAGE-Analyse der affinitäts-chromatographischen Reinigung des LecB-Histidin-Fusionsproteins. Es wurden 5 μl des Rohextrakts sowie 10 μl der übrigen Fraktionen eingesetzt. Als Standard wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Standard“ (Fermentas) verwendet.

3.1.3 Hämagglutinationstest der isolierten Lectine

Zur Begutachtung der Konformation der gereinigten Lectine wurde die Eigenschaft der Lectine, Erythrozyten zu agglutinieren, in einem Hämagglutinationstest (HAT) überprüft. Die Hämagglutination von LecA beruht auf der Interaktion mit Glactosemolekülen auf der Oberfläche der Erythrozyten, während die Hämagglutination von LecB auf der Interaktion mit Fucosemolekülen beruht (Gilboa-Garber *et al.*, 1994). Die Reaktion wird durch die Vorbehandlung der Erythrozyten mit der Endopeptidase Papain verstärkt. Darüber hinaus musste für den weiteren Einsatz des LecB-Proteins sichergestellt werden, dass die D-Mannose des Elutionspuffers aus den Bindetaschen des Lectins entfernt wurde. Rückstände des Zuckers in der Probe würden eine Hemmung der Hämagglutinationsreaktion hervorrufen. Dazu wurden die gewonnenen Lectinlösungen jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Erythrozyten, die zuvor mit Papain behandelt wurden, in die *wells* einer Rundboden-Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation für 1 h und kurzer Zentrifugation der Mikrotiterplatte wurde die hämagglutinierende Aktivität optisch bestimmt. Im Fall einer positiven Hämagglutinationsreaktion sedimentierten die agglutinierten Erythrozyten als Zellteppich, was zu einer Färbung des gesamten Bodens führte. Im negativen Fall sammelten sich die Erythrozyten punktuell im Zentrum des Rundbodens. Die Ergebnisse zeigen, dass alle

gereinigten Lectine eine hämagglutinierende Aktivität aufweisen (Abb. 8). Der Titer des LecA-Proteins, d.h. die geringste Konzentration, die erforderlich war, um die Hämagglutination auszulösen, lag bei etwa 8,75 $\mu\text{g/ml}$, während der Titer des LecB-Proteins bzw. LecB-Fusionsproteins 6 $\mu\text{g/ml}$ betrug.

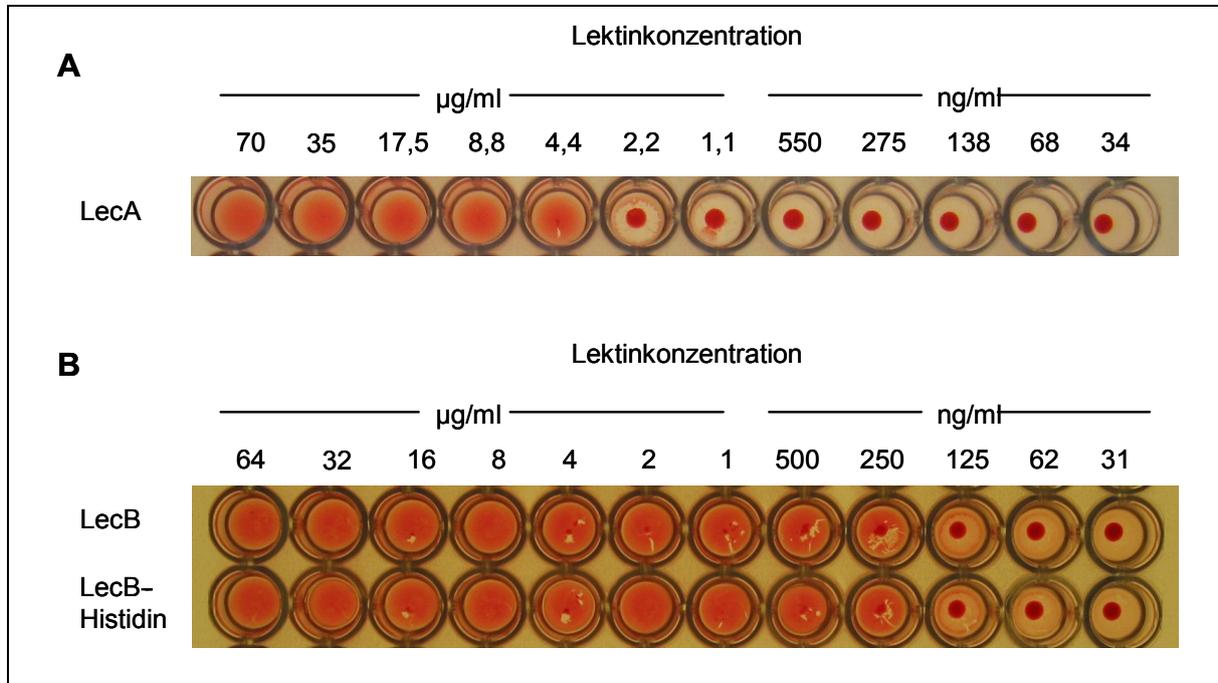


Abb. 8 Hämagglutinationstest der gereinigten Lectine LecA (A) und LecB (B). 50 μl einer dreifachen Verdünnungsreihe des jeweiligen Lectins wurden zu 50 μl Erythrozyten, die zuvor mit Papain behandelt wurden, in die wells einer Rundboden-Mikrotiterplatte gegeben und für 1 h inkubiert. Die positive Hämagglutinationsreaktion resultierte in einem vollständig mit Erythrozyten bedeckten Boden.

3.1.4 Inhibierung von LecA und LecB mittels Lectin-spezifischer Dendrimere

Therapien gegen *P. aeruginosa*-Infektionen werden durch die hohe intrinsische Antibiotikaresistenz sowie durch die Ausbildung von Biofilmen, die eine physikalische Barriere gegen das Eindringen von Antibiotika bilden, erschwert (Quinn, 1992; Høiby, 2002; Conway *et al.*, 2003; Wagner & Iglewski, 2008). Daher ist die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe, die die Mechanismen der Adhäsion an das Wirtsgewebe oder der Biofilmbildung inhibieren, von großer Bedeutung (Drenkard, 2003). Es ist bekannt, dass die Lectine LecA und LecB von *P. aeruginosa* an der Biofilmbildung beteiligt sind. (Tielker *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2006). Außerdem ist es in früheren klinischen Studien gelungen, durch *P. aeruginosa* induzierte Infektionen erfolgreich zu therapieren, indem die Patienten mit einer Lösung aus den LecA- und LecB-spezifischen Zuckern (D-Galactose bzw. L-Fucose) behandelt wurden (Steuer *et al.*, 1993; von Bismarck *et al.*, 2001; Hauber *et al.*,

2008). Da dieser antibakterielle Effekt jedoch nur unter Verwendung sehr hoher Konzentrationen dieser relativ schwachen Lectin-Liganden zu verzeichnen war, konnte die Verbindung zwischen dem antibakteriellem Effekt und der Lectin-Bindung nicht eindeutig hergestellt werden. Um zu überprüfen, ob eine therapeutische Strategie gegen *P. aeruginosa*, die auf der Hemmung der Lectine beruht, tatsächlich möglich ist, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Reymond (*Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern, Schweiz*) kombinatorische Bibliotheken tetravalenter (Abb. 9A) und octavalenter Glycopeptide-Dendrimere (Abb. 9B) gegen LecB bzw. LecA und LecB synthetisiert. Die Dendrimere enthielten als primäre Erkennungselemente für LecA und LecB Galactosyl- bzw. Fucosyl-Reste. Um eine diverse Menge an Dendrimeren zu erhalten, wurden kationische, anionische, polare, hydrophobe oder aromatische Aminosäure-Reste an die variablen Positionen X1-X6 gesetzt (Abb. 9C).

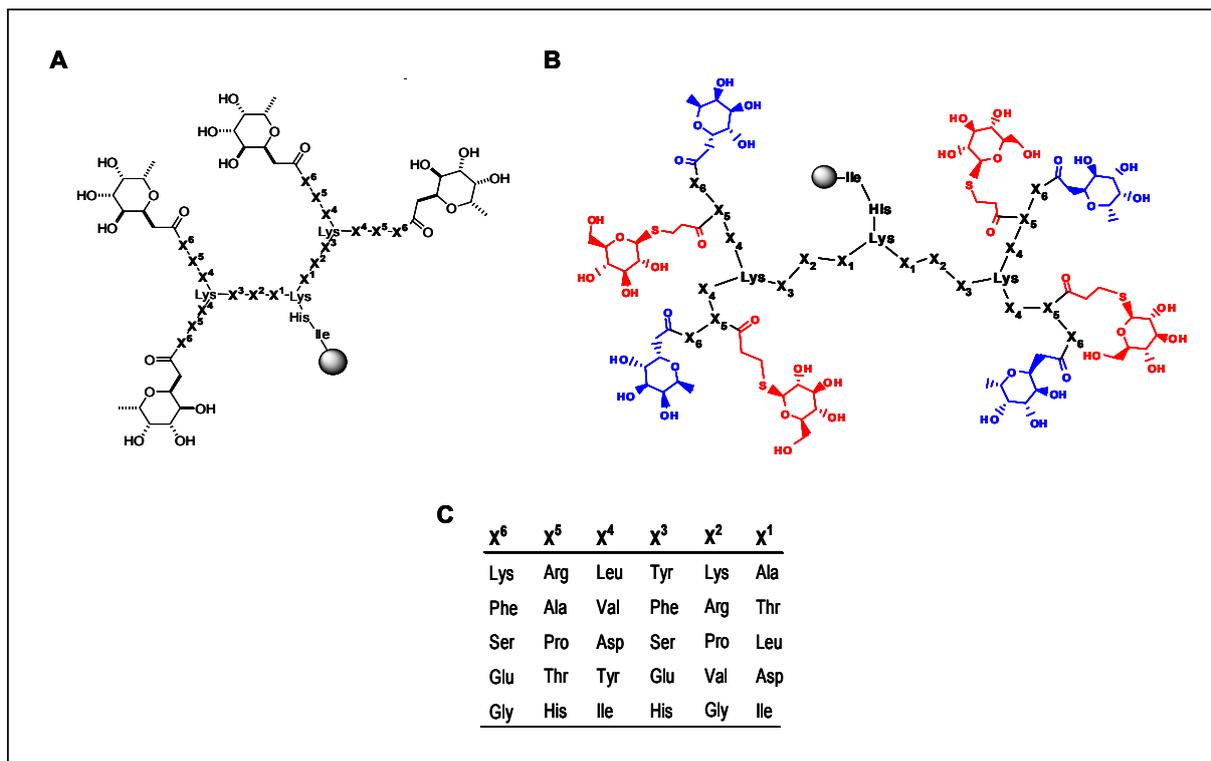


Abb. 9 Struktur der Peptide-Dendrimer-Bibliotheken. **A.** Tetravalente LecB-spezifische Dendrimere mit endständigen Fucosyl-Resten. **B.** Octovalente LecA- und LecB-spezifische Dendrimere mit endständigen Fucosyl- und Galactosyl-Resten. Die Synthese erfolgte auf Tenagel beads (graue Kugeln) als Trägermaterial. **C.** Die Aminosäure-Reste der variablen Positionen X1-X6 im 3-Buchstabenkode (nach Johansson *et al.*, 2008).

Nach einem Screening der Bibliotheken unter Verwendung der gereinigten LecA- und LecB-Proteine, wurden die aktivsten Dendrimere resynthetisiert und in einem ELLA (*enzyme-linked lectin-assay*) untersucht (Johanson *et al.*, 2008). Als Referenzliganden dienten L-Fucose, α -

NPF (*p*-nitrophenyl- α -L-fucose), der monovalente Ligand 2G0 und das divalente Dendrimere 2G1. Die LecB-spezifischen, tetravalenten Dendrimere hemmten das Lectin mit IC_{50} -Werten im Bereich zwischen 0,11 – 0,75 μ M mit bis zu 100-facher Affinitätssteigerung relativ zu Fucose (Tab. 6). Als IC_{50} -Wert wird die Konzentration eines Inhibitors bezeichnet, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Die Vielfalt der AS-Sequenzen der Dendrimere, die besonders gut mit LecB interagiert haben, spricht dafür, dass der Affinitätsanstieg durch Multivalenz hervorgerufen wurde. Einen weiteren Beweis hierfür liefert im Fall des stärksten Dendrimers FD2 die Untersuchung der nieder-valenten Analoga 2G0 und 2G1. Der monovalente Ligand 2G0, der die gleiche AS-Sequenz enthält wie der terminale Zweig von FD2, übt eine ähnliche Affinität zu LecB aus wie der monovalente Referenzligand α -NPF. Außerdem hat das divalente Dendrimere 2G1 die gleiche relative Bindungsstärke pro Fucose wie die monovalenten Liganden. Für die Untersuchung der bifunktionalen, octovalenten Dendrimere konnten im ELLA keine geeigneten Bedingungen gefunden werden (mündliche Mitteilung von Dr. Magdalena Swiderska, *Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern, Schweiz*). Um IC_{50} -Werte für die bifunktionalen Dendrimere zu erhalten und die Werte der LecB-spezifischen Dendrimere zu bestätigen, erfolgte die Untersuchung der Liganden in einem HAIT (*hemagglutination-inhibition-assay*). Hierbei wurden jeweils Lösungen von LecA und LecB mit einem Titer von 8,75 bzw. 6 μ g/ml zu unterschiedlichen Verdünnungen der entsprechenden Dendrimere gegeben und daraufhin den Agglutinationsoptima der Lectine entsprechend für 1 h bei 4 bzw. 37° C inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen Erythrozyten hinzugefügt und anhand der hämagglutinierenden Aktivität die IC_{50} -Werte ermittelt (Tab. 6 und Tab. 7). Als Referenzliganden dienten hierbei für LecA D-Galactose und für LecB L-Fucose. Die bifunktionalen Dendrimere hemmten LecA und LecB mit IC_{50} -Werten im Bereich zwischen 2,49 - 8 μ M bzw. 0,51 – 0,62 mit bis zu 643- und 25-facher Affinitätssteigerung relativ zu D-Galactose bzw. L-Fucose. Der beachtliche Anstieg der Affinität der Dendrimere zu LecA und die Diversität der AS-Sequenzen in den getesteten Dendrimeren lassen wieder auf einen Multivalenz-Effekt schließen.

Tab. 6 Struktur und ELLA (*enzyme-linked lectin-assay*)- bzw. HAIT (*hemagglutination-inhibition-assay*)-Daten für die Referenzliganden und die LecB-spezifischen Glycopeptide-Dendrimere.

Bezeichnung	Struktur	IC ₅₀ (μM) ELLA	IC ₅₀ (μM) HAIT
L-Fucose	α-L-Fucose	11	20
α-NPF	4-nitrophelyl-α-L-Fucosid	5,27	-
2G0	cFuc-LysProLeuNH ₂	5,94	-
2G1	(cFuc-LysProLeu) ₂ LysPheLysIleNH ₂	2,7	-
FD2	(cFuc-LysProLeu) ₄ (LysPheLysIle) ₂ LysHisIleNH ₂	0,14	1,5
PA5	(cFuc-GlyArgVal) ₄ (LysGluGlyLeu) ₂ LysHisIleNH ₂	0,75	0,5
PA6	(cFuc-GlyThrVal) ₄ (LysHisProThr) ₂ LysHisIleNH ₂	0,30	1,5
PA8	(OFuc-LysAlaAsp) ₄ (LysSerGlyAla) ₂ LysHisIleNH ₂	0,11	1,4
PA9	(OFuc-GluHisAsp) ₄ (LysGluValAla) ₂ LysHisIleNH ₂	0,35	1,8

Tab. 7 Struktur und HAIT (*hemagglutination-inhibition-assay*)-Daten für die Referenzliganden und die bifunktionalen LecA und LecB-spezifischen Glycopeptide-Dendrimere

Bezeichnung	Struktur	IC ₅₀ (μM) LecA	IC ₅₀ (μM) LecB
L-Fucose	α-L-Fucose	-	12,59
D-Galactose	α-D-Galactose	1600	-
MAS-5	(C-Fucose-β-Ala-Lys(S-Galactose)-Gly) ₄ (Lys-Ser-Arg-Leu) ₂ Lys-His-IleNH ₂	2,49	0,62
MAS-9	(C-Fucose-Thr-Lys(S-Galactose)-Ala) ₄ (Lys-Ser-Gly-Ala) ₂ Lys-His-IleNH ₂	8	0,55
Luc-3	(C-Fucose-Ser-Lys(S-Galactose)-Gly) ₄ (Lys-Val-Tyr-Asp) ₂ Lys-His-IleNH ₂	3,84	0,51

Im Anschluss wurden die tetravalenten, LecB-spezifischen Dendrimere in einem Biofilm-Inhibierungs-Test und einem Biofilm-Verdrängungs-Test untersucht. Bei Ersterem wurden die Biofilme in einem Medium, das geeignete Konzentrationen der jeweiligen Dendrimere enthielt, für 48 h angezogen, während beim Letzteren die Liganden erst nach 48 h zu den Biofilmen gegeben wurden, die daraufhin für weitere 2 h inkubierten. Als Kontrolle dienten hierbei Kulturen, die keine Dendrimere enthielten, und als Referenzligand wurde α-NPF

verwendet. In beiden Versuchen stellte sich das Dendrimer FD2 als stärkster Ligand heraus (Abb. 10A). Es konnten alle *P. aeruginosa*-Kolonien komplett von dem Stahl-Coupon verdrängt werden (Abb. 10B). Die Analyse der Stahl-Coupons nach der Verdrängung der Biofilme ergab eindeutig, dass jegliche Färbungen nach der Behandlung mit dem Ligand FD2 durch Rückstände von ehemals angehefteten *P. aeruginosa*-Zellen oder durch Unreinheiten, aber nicht durch adhärenzte Bakterien hervorgerufen wurden. Darüber hinaus konnte das Dendrimer FD2 die Biofilmbildung von den klinischen Isolaten A014, A021, A035 aus CF-Patienten inhibieren (Abb. 10C), was darauf hindeutet, dass der inhibitorische Effekt allgemeingültig ist und das Potential dieser Dendrimere in einem klinischen Kontext verdeutlicht. Das Dendrimer FD2 hatte auf die Biofilmbildung eines LecB-negativen *P. aeruginosa*-Stamms (LecB-) keine Auswirkungen.

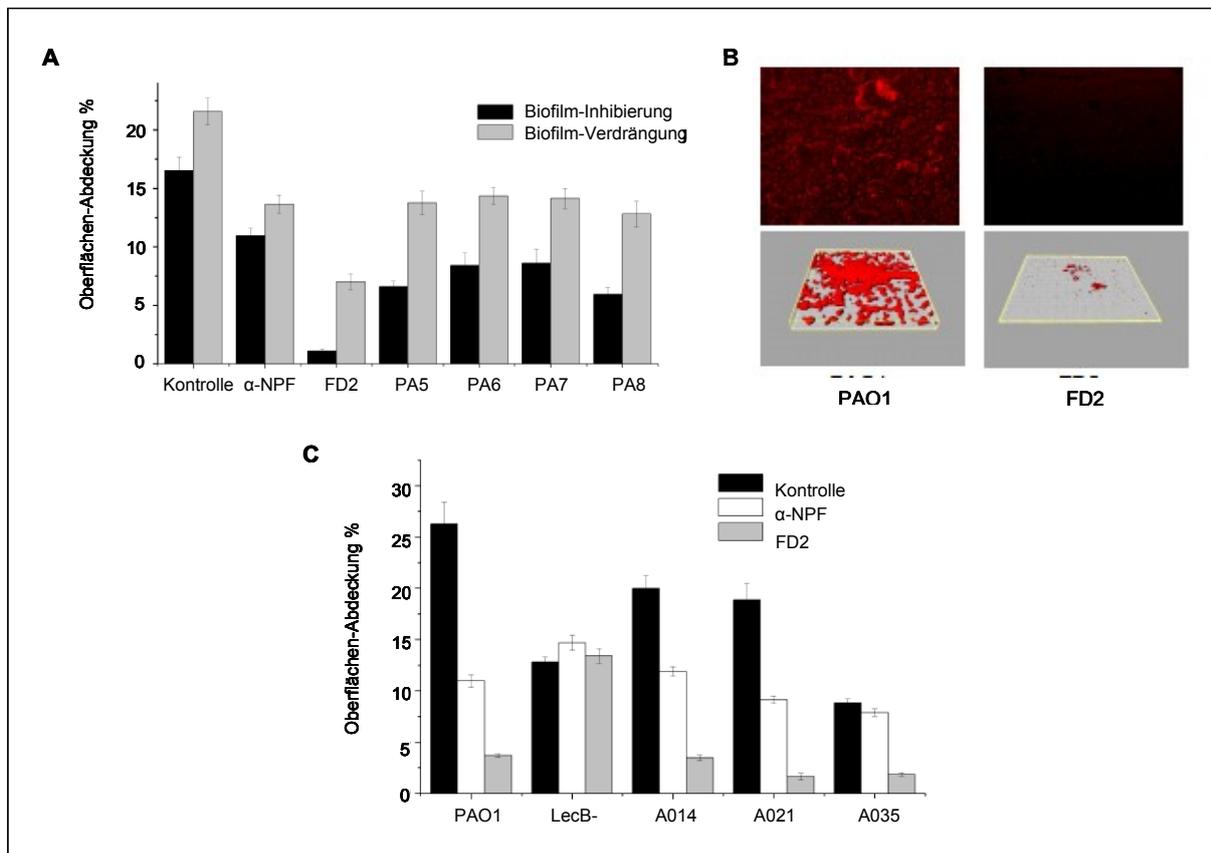


Abb. 10 Biofilmbildung von *P. aeruginosa*. **A.** Inhibierung und Verdrängung von Biofilmen des *P. aeruginosa*-Wildtypstamms PAO1 mit α -NPF (0,5 mM) und den Dendrimeren (0,05 mM). **B.** CLSM-Aufnahme von Biofilmen vor und nach der Verdrängung durch das Dendrimer FD2. Die Biofilme wurden mit dem Farbstoff Acridinorange angefärbt. **C.** Biofilm-Inhibierung des Wildtypstamms PAO1, einer LecB-negativen Mutante (LecB-) und drei klinischen Stämmen (A014, A021, A035) mit α -NPF (0,5 mM) und dem Dendrimer FD2 (0,05 mM) (Johansson *et al.*, 2008). Beim Inhibierungs-Test wurden die Biofilme in einem Medium, das geeignete Konzentrationen der jeweiligen Dendrimere enthielt, für 48 h angezogen, während beim Verdrängungs-Test die Liganden erst nach 48 h zu den Biofilmen gegeben wurden, die darauhin für weitere 2 h inkubierten.

Die Abhängigkeit der Stärke der LecB-Hemmung von der Aminosäuresequenz der Glycopeptide-Dendrimere lässt darauf schließen, dass für einen Anteil der Affinität zu LecB sekundäre Interaktionen außerhalb der Fucose-Bindetasche verantwortlich sind. Aufgrund dessen wurde durch die Arbeitsgruppe Loris (*Laboratorium voor Ultrastructuur, Instituut voor Moleculaire Biologie, Vrije Universiteit Brussel, Belgien*) ein Modell des LecB-FD2-Komplexes angefertigt, das auf der Kristallstruktur eines 1:4-Komplexes aus LecB und dem Tripeptid 2G0, das den terminalen Zweig von FD2 enthält, basiert (Abb. 11). Dieses Modell offenbarte, dass das Dendrimer zu klein ist, um zwei unterschiedliche Fucose-Bindetaschen zu überbrücken. Außerdem wurden zusätzliche Protein-Dendrimer-Kontakte außerhalb der Fucose-Bindetasche vorhergesagt. Hierbei soll der Fucosyl-Tripeptid-Arm eine Rolle spielen, der dem in der Bindetasche gebundenen Arm, benachbart ist. An diesen zusätzlichen Kontakten sollen eine H-Brücke zwischen der Aminosäure Arg13 des LecB-Proteins und der Carbonyl-Gruppe des Prolins in dem Arm des Dendrimers sowie einige hydrophobe Wechselwirkung involviert sein. Solche Interaktionen könnten die Sequenz-abhängige LecB-Affinität erklären, die in den unterschiedlichen Dendrimeren beobachtet wurde.

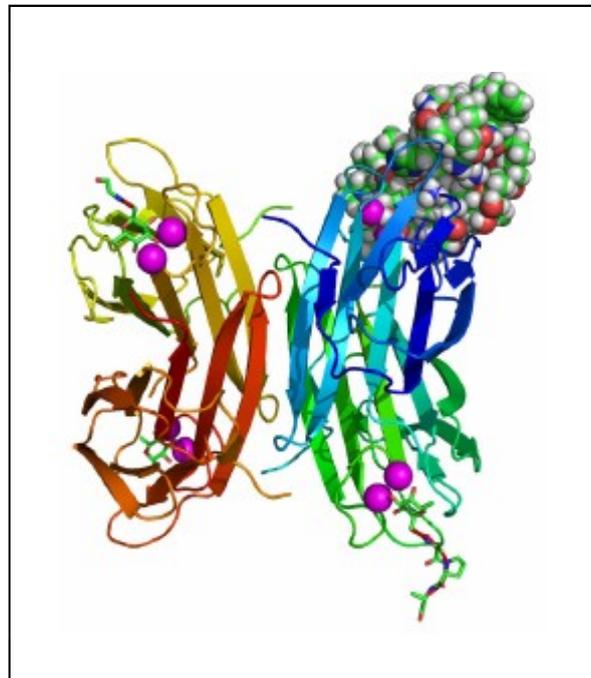


Abb. 11 Modell des LecB-FD2-Komplexes. Das Modell wurde durch molekulare Dynamik-Simulation erhalten. Die Calcium-Ionen sind in magenta dargestellt und deuten die Lokalisation der Fucose-Bindetasche an. Drei Bindetaschen sind mit den Fucosyl-Resten von 2G0 und die vierte mit dem Dendrimer FD2 modelliert.

Die octovalenten LecA- sowie LecB-spezifischen Dendrimere werden momentan ebenfalls hinsichtlich ihres Potentials Biofilme zu verdrängen oder zu inhibieren getestet.

3.2 Charakterisierung des periplasmatischen LecB

In früheren Studien konnte das Lectin LecB nicht nur im Cytoplasma und der Membran sondern auch im Periplasma von *P. aeruginosa*-Zellen detektiert werden (Glick & Garber, 1983; Tielker, 2005). Da der Sekretionsweg des Lectins bisher noch unbekannt ist und diese Tatsache auf einen Zwei-Schritt-Weg-Transportmechanismus hinweist, sollte dieses Phänomen näher untersucht werden.

3.2.1 Isolierung und Identifizierung zweier periplasmatischer LecB-Varianten

Zunächst wurden Zellen des *P. aeruginosa* Wildtyp-Stamms PAO1 als konfluenter Bakterienrasen auf NB-Agarplatten für 48 h bei 37 °C in Form eines ungesättigten Biofilms angezogen. Anschließend erfolgte die Präparation der Fraktionen der extrazellulären Proteine, des Cytoplasmas, des Periplasmas und der Gesamtmembran nach Witholt *et al.* (1976). Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend das LecB-Protein durch Immunoblotting unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums nachgewiesen (Abb. 12).

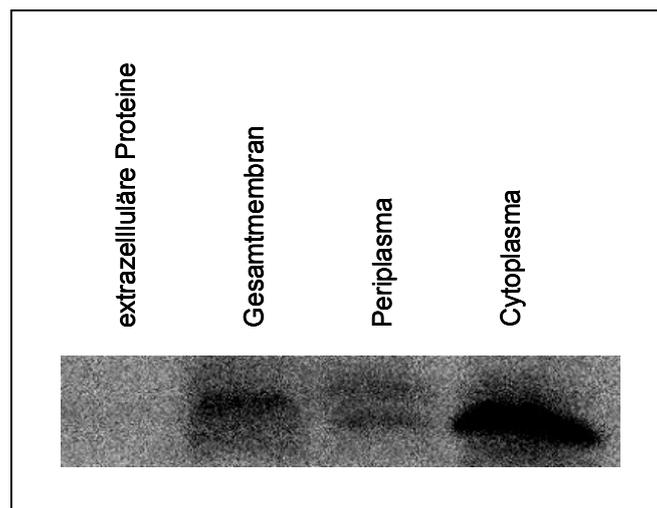


Abb. 12 Subzelluläre Lokalisierung des Lectins LecB in sessilen Zellen von *P. aeruginosa*. Bakterien des Wildtyp-Stamms PAO1 wurden für 48 h bei 37 °C auf NB-Agar als konfluenter Bakterienrasen kultiviert und anschließend fraktioniert. Durch Immunoblotting unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums wurden die einzelnen Fraktionen auf die Präsenz des LecB-Proteins hin untersucht. Die eingesetzten Volumina der Fraktionen entsprachen einer O.D.₅₈₀ = 1.

Das LecB-Protein wurde in der Membranfraktion, dem Periplasma und dem Cytoplasma detektiert. Interessanterweise wurden im Periplasma zwei Varianten des Lectins, die sich in ihrem Laufverhalten während der SDS-PAGE unterschieden, gefunden. Um diese Varianten näher untersuchen zu können und ihre Funktionalität zu überprüfen, sollten sie aus dem Periplasma mittels Affinitätschromatographie über D-Mannose-Agarose gereinigt werden. Da es sehr aufwendig ist, größere Mengen an Periplasma aus sessilen Zellen zu gewinnen und bekannt ist, dass periplasmatisches LecB-Protein auch in planktonischen Zellen vorhanden ist (Glick & Garber, 1983), wurde das Periplasma aus einer *P. aeruginosa*-Flüssigkultur isoliert. Dazu wurden *P. aeruginosa*-Zellen des Wildtyp-Stamms PAO1 für 48 h bei 37 °C in NB-Medium kultiviert und daraufhin die Periplasma-Fraktion aus den Zellen isoliert. Nach Auftragen des Periplasmas auf die Chromatographiesäule erfolgte die Reinigung der LecB-Varianten, wie für das heterolog exprimierte LecB-Protein beschrieben. Die anschließende Analyse der isolierten Proteine mittels SDS-PAGE demonstrierte, dass beide Varianten bis zu einer elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden konnten (Abb. 13A). Als Referenz wurde zusätzlich das heterolog in *E. coli* exprimierte LecB-Protein auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurden unter Verwendung der Software AIDA (Raytest, Straubenhardt) die Größen der einzelnen Proteine bestimmt. Die ermittelten Werte des Molekulargewichtes betragen 13,8 bzw. 12,6 kDa für die periplasmatischen Lectine und 11,6 kDa für das heterologe LecB-Protein. Die Identität der LecB-Varianten wurde mittels Immunodetektion (Abb. 13B) und MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight*) verifiziert.

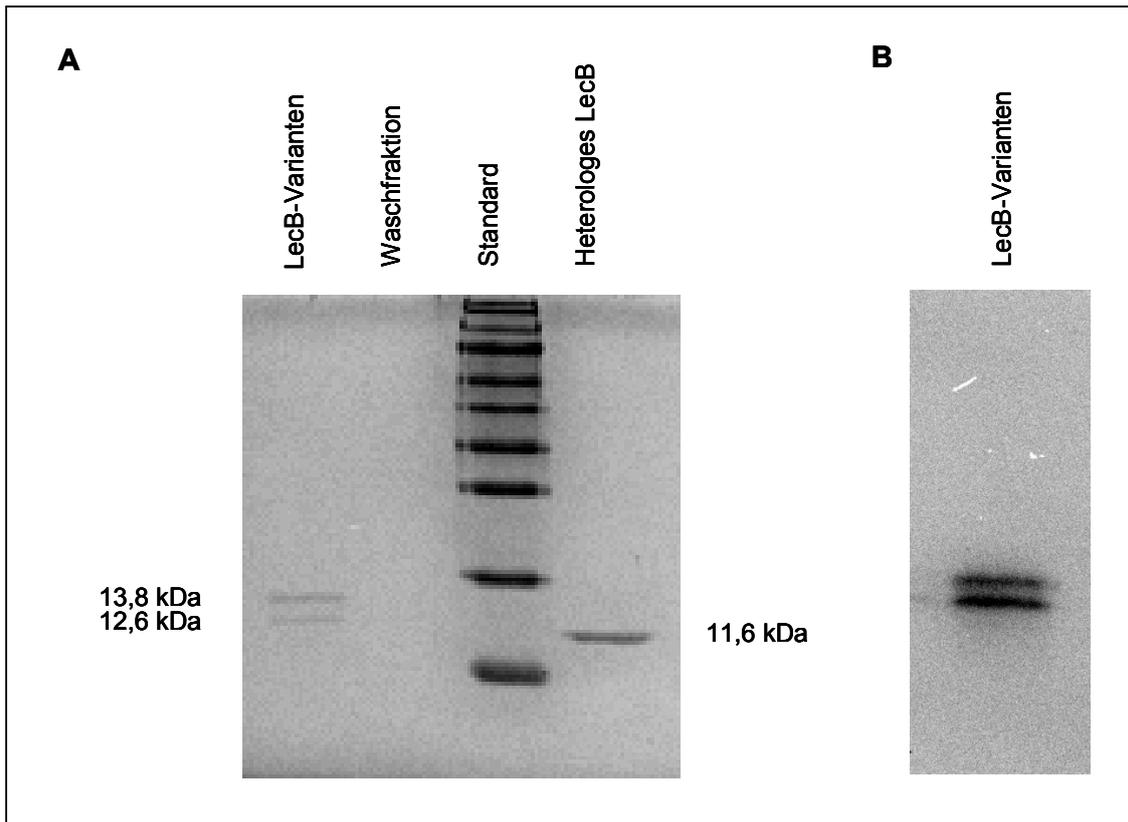


Abb. 13 Analyse der aus dem Periplasma gereinigten LecB-Varianten. Die Varianten wurden aus dem Periplasma von Zellen des Wildtyp-Stamms PAO1, die für 48 h bei 37 °C in NB-Medium kultiviert wurden, isoliert. **A.** SDS-PAGE-Analyse der Reinigung. **B.** Verifizierung der LecB-Varianten mittels Westernblot unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums. Es wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Standard“ (Fermentas) verwendet.

Für letzteres wurden die zu untersuchenden Proteine mit Chymotrypsin im Gel verdaut und die dabei entstehenden Fragmente massenspektrometrisch im Institut für Biotechnologie 1 am Forschungszentrum Jülich GmbH vermessen. Mithilfe des Massenspektrums der Peptide und einer anschließenden MASCOT-Datenbankabfrage der Aminosäuresequenzen wurden alle drei Proteine als LecB identifiziert. Die *score*- und *sequence-coverage*-Werte sind in Tabelle 8 dargestellt. Der *score*-Wert wird basierend auf einem Algorithmus ermittelt, der die Wahrscheinlichkeit (P) bestimmt, mit welcher die Übereinstimmung von ermittelten und berechneten Massenwerten ein zufälliges Ereignis ist. Dieser *score*-Wert berechnet sich als $-10 \times \log(P)$. Er ist von verschiedenen Parametern wie z.B. Größe der Datenbank, Signifikanz der einzelnen Massenübereinstimmungen und Sauberkeit der Probe abhängig. Vereinfacht gilt, je mehr ermittelte Massenwerte mit den berechneten Massenwerten eines bestimmten Proteins übereinstimmen, desto kleiner wird die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Ereignisses, und der *score*-Wert wird größer. Unter *sequence coverage* versteht man die prozentuale Abdeckung der Aminosäuresequenz eines Proteins mit den bei der Identifizierung gefundenen Peptiden.

Tab. 8 Verifizierung des periplasmatischen und heterologen LecB-Proteins durch MALDI-TOF-MS.

Apparente MW der LecB-Varianten	Systematischer Name	Score	Sequence Coverage
13,8 kDa	PA3361	45	23 %
12,6 kDa	PA3361	42	26 %
11,6 kDa	PA3361	60	39 %

Nach Entfernung der zur Elution der periplasmatischen LecB-Varianten verwendeten D-Mannose unter Einsatz von Zentrifugationskonzentratoren betrug die erzielte Proteinausbeute 3,6 mg LecB pro Liter Bakterienkultur.

Es ist bekannt, dass das Lectin LecB, welches in *Escherichia coli* heterolog produziert wurde, als Homotetramer bestehend aus 4 unabhängigen Untereinheiten vorliegt (Mitchell *et al.*, 2002; Loris *et al.*, 2003,). Zur Klärung des Oligomerisierungszustands des periplasmatischen LecB-Proteins, wurden die Varianten in einer Größenausschlusschromatographie mittels HPLC untersucht. In den Chromatogrammen der HPLC-Analyse konnten zwei Signale detektiert werden. Die apparenten Molekulargewichte der voneinander getrennten Proteine betragen 42 und 28 kDa. Um zu zeigen, aus welchen Monomeren diese Oligomere bestehen, wurden sie mittels SDS-PAGE und anschließender Immunodetektion analysiert (Abb. 14). Die Analyse ergab, dass das Oligomer mit einem apparenten Molekulargewicht von 42 kDa aus 13,8 kDa schweren Untereinheiten gebildet wird und somit eher ein Trimer als ein Tetramer ist. Das Oligomer mit einem apparenten Molekulargewicht von 28 kDa besteht hingegen aus 12,6 kDa schweren Untereinheiten und könnte demzufolge ein Dimer sein.

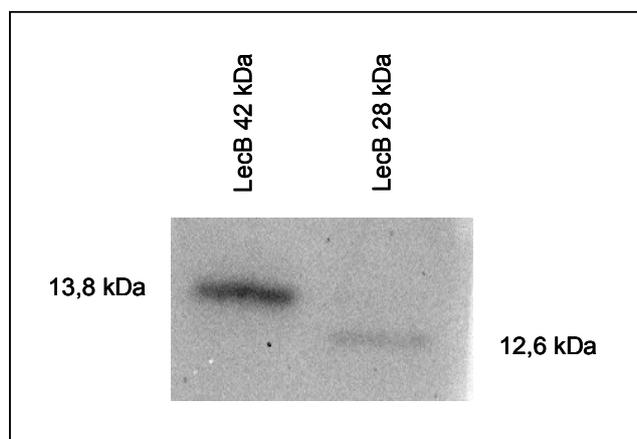


Abb. 14 Analyse der Untereinheiten der periplasmatischen LecB-Oligomere. Es wurden jeweils 10 μ l der durch die HPLC-Analyse gewonnenen 42- bzw. 28-kDa schweren LecB-Proteine mittels Immunodetektion unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums analysiert.

3.2.2 Hinweise auf Glycosylierungen im periplasmatischen LecB-Protein

Das Lectin LecB wurde bisher als ein Protein beschrieben, das aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 11,7 kDa besteht (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Die vorausgehenden Analysen zeigten jedoch, dass das periplasmatische LecB-Protein aus Monomeren besteht, die ein abweichendes Laufverhalten im SDS-Gel aufweisen. Dies ist oft ein erster Hinweis darauf, dass Proteine glykosyliert vorliegen (Hitchen & Dell, 2006). Um einen weiteren Beweis dafür zu finden, wurden die LecB-Varianten mittels eines „DIG Glycan Detection Kits“ (Roche, Penzberg) analysiert, das auf der Oxidation von Zuckern mit Periodat beruht (Abb. 15). Hierbei wird das Glycoprotein mit dem Steroid-Hapten Digoxigenin (DIG) kovalent verbunden und anschließend das Digoxigenin-markierte Glycokonjugate in einem Enzym-Immunoassay mit Hilfe eines Digoxigenin-spezifischen Antikörpers, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, nachgewiesen. Die Analyse zeigte, dass beide periplasmatischen LecB-Formen glykosyliert vorliegen.

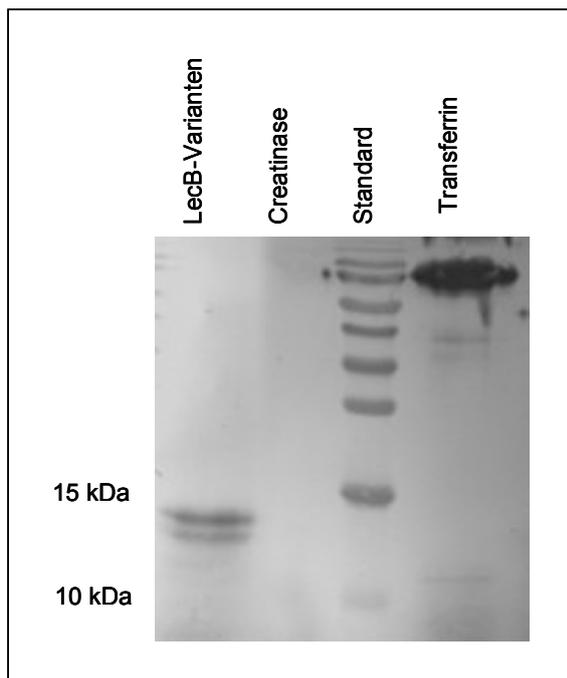


Abb. 15 Nachweis von Zuckern in den LecB-Varianten. Es wurden 1 µg des gereinigten LecB-Proteins gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit einem „DIG Glycan Detection Kits“ (Roche, Penzberg) analysiert. Als Negativ- und Positivkontrolle dienten jeweils 1 µg des nicht-glykosylierten Proteins Creatinase bzw. des Glycoproteins Transferrin.

Es ist bekannt, dass die N-Glykosylierung von Proteinen, bei der das N-Glykan über das Asparagin der eukaryotischen Konsensussequenz Asparagin-X-Serin/Threonin an das Protein geknüpft ist (Young *et al.*, 2002), auch in Bakterien vorkommt. Hierbei steht das X für jede beliebige Aminosäure außer Prolin. Um festzustellen, ob das LecB-Protein potentielle Glykosylierungstellen aufweist, wurde die Aminosäuresequenz des Lectins unter

Verwendung des NetNGlyc 1.0 Servers (<http://cbs.dtu.dk/services/netnglyc>), der für die Vorhersage von N-Glykosylierungsstellen in menschlichen Proteinen gedacht ist, analysiert (Abb. 16). Es wurden zwei Konsensus-Sequenzen in dem Lectin gefunden, jedoch nur die Aminosäure Asparagin 22 (Asn22) als potentielle Glykosylierungsstelle vorhergesagt.

N-Terminus MATQGVFTLPANTRFGVTAFANSSGTQTVNVLVNETAATFSGQSTNNAV 50

Abb. 16 Vorhersage der potentiellen N-Glykosylierungsstelle im LecB-Protein. Die vorkommenden Konsensus-Sequenzen Asparagin-X-Serin/Threonin sind rot hervorgehoben. Der Asparagin-Rest Asn 22, der als potentielle Glykosylierungsstelle vorhergesagt wurde, ist außerdem unterstrichen.

Um zu überprüfen, ob das periplasmatische Lectin N-glykosyliert ist, wurde es mit der N-Glycosidase F (PNGaseF) aus *Flavobacterium meningosepticum* für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die N-Glycosidase F spaltet alle Typen von Asparagin-gebundenen N-Glycanen, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen (Tarentino et al., 1985). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der keine N-Glycosidase enthielt. Die SDS-PAGE-Analyse dieses Experiments zeigte, dass die höher molekulare Variante des periplasmatischen Lectins degradiert wurde, wodurch die Intensität der Bande, die das niedriger molekulare Protein enthielt, zunahm (Abb. 17). Diese Beobachtung weist daraufhin, dass die höher molekulare LecB-Variante N-glykosyliert vorliegt.

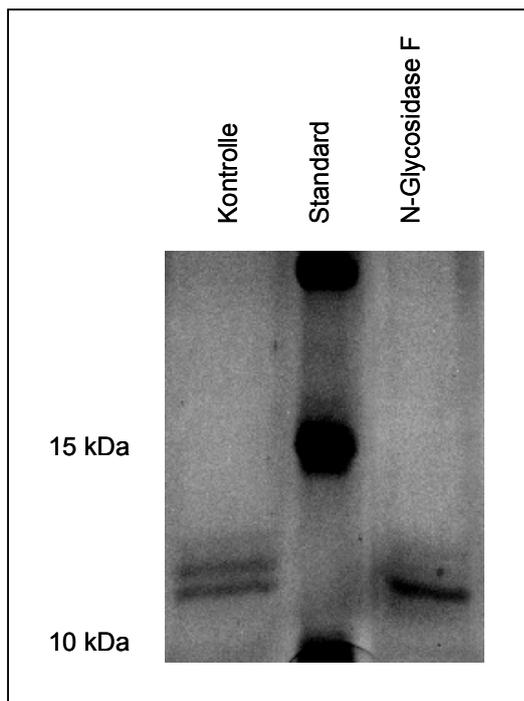


Abb. 17 Inkubation der LecB-Varianten mit der N-Glycosidase F. Es wurden 2,5 µg des gereinigten periplasmatischen LecB-Proteins mit der N-Glycosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum* für 16 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der keine N-Glycosidase F enthielt. Es wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Standard“ (Fermentas) verwendet

3.2.3 LecB interagiert mit der niedermolekularen Variante

Die vorangegangenen Experimente weisen daraufhin, dass im Periplasma zwei voneinander verschiedene LecB-Oligomere existieren, die glycosyliert sind. Um zu überprüfen, ob das Lectin an diese Glycosylierungen binden und somit mit sich selber interagieren kann, wurde die periplasmatische Fraktion des *P. aeruginosa* Wildtyp-Stamms PAO1, der in NB-Medium für 48 h bei 37 °C kultiviert wurde, mit gereinigtem LecB-Histidin-Fusionsprotein für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend der Inkubationsansatz auf eine IMAC-Säule gegeben. Daraufhin erfolgte die Elution der Proteine, die über das Fusionsprotein an die Säule immobilisiert wurden, durch das Waschen der Säule mit einem Puffer, der 20 mM des hochaffinen LecB-Liganden L-Fucose enthielt. Im Anschluss wurde das Fusionsprotein mittels Zugabe von 250 mM Imidazol von der Säule gespült. Die Analyse des Experiments erfolgte mittels Immunodetektion (Abb. 18). Als Negativkontrolle wurde das gleiche Experiment ohne LecB-Histidin-Fusionsprotein durchgeführt.

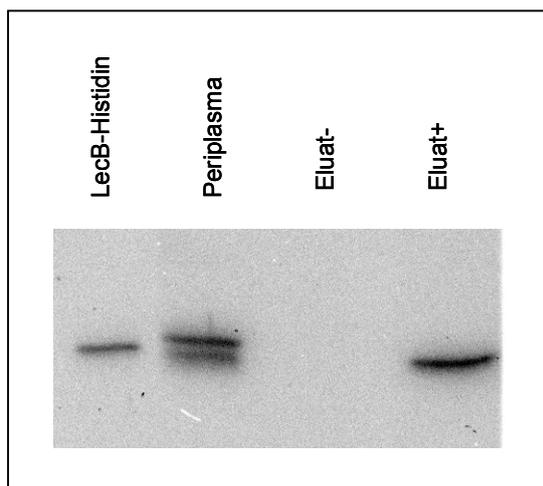


Abb. 18 Isolierung der niedermolekularen periplasmatischen LecB-Variante mittels immobilisiertem LecB-Histidin-Fusionsprotein. Es wurden 10 µl des Periplasmas und des LecB-Histidin-Fusionsproteins-Proteins sowie 100 µl des Eluat aufgetragen (Eluat+). Als Negativkontrolle diente das Eluat des Experiments, das ohne LecB-Histidin-Fusionsprotein durchgeführt wurde (Eluat-).

Die Analyse zeigte, dass die niedermolekulare Variante des periplasmatischen LecB-Proteins über das LecB-Histidin-Fusionsprotein an die Säule gebunden und anschließend mittels L-Fucose eluiert werden konnte. Dieses Ergebnis weist eindeutig auf eine Glycosylierung des Lectins hin, die LecB-spezifische Kohlenhydrate in sich birgt.

3.2.4 Charakterisierung der putativen N-Glycosylierungsstelle von LecB

Um zu überprüfen, ob die potentielle Glycosylierungsstelle Asn22 eine Rolle bei der Translokation von LecB in die äußere Membran spielt, sollte mittels ortsspezifischer

Mutagenese eine mutierte Variante des LecB-Protein (LecB^m) konstruiert werden, in der Asn22 gegen Alanin ausgetauscht wurde (Abb. 19).

LecB (WT)	19	AFA	N	SSGTQTVNVLVNNETAATFSGQSTNNAVIGTQVLNSGS	60
LecB^m	19	AFA	A	SSGTQTVNVLVNNETAATFSGQSTNNAVIGTQVLNSGS	60

Abb. 19 Austausch der putativen N-Glykosylierungsstelle im LecB-Protein. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurde die Sequenz des *lecB*-Gens, die für die putative N-Glykosylierungsstelle Asn22 kodiert, so modifiziert, dass im resultierenden Protein (LecB^m) Asn22 gegen Alanin ausgetauscht wurde. WT: Wildtyp

Zuerst wurde das *lecB*-Gen unter Verwendung der Oligonukleotidprimer A22Xchup und A22Xchdw, die die modifizierte DNA-Sequenz enthielten und in 5'- sowie in 3'-Richtung des Gens banden, und der Primer LIINdeI und LIIBamHI amplifiziert. Über die inserierten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI/BamHI* wurde das erhaltene PCR-Fragment (*lecB^m*) in den Vektor pET22b kloniert, woraus das Plasmid pEXCHA22 resultierte. Um eine Expression in *P. aeruginosa* zu ermöglichen, wurde das *lecB^m*-Gen zusammen mit der Ribosomenbindungsstelle des Plasmids pET22b durch Hydrolyse des Plasmids pEXCHA22 mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI/SacI* isoliert und über dieselben Erkennungssequenzen in den Vektor pBBR1MCS eingefügt.

Um die subzelluläre Lokalisation des mutierten LecB^m-Proteins in sessilen Zellen mit der des nativen Lectins zu vergleichen, wurden jeweils das resultierende Plasmid pBBXCHA22 und das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 durch konjugativen Transfer in den LecB-negativen Stamm PATI2 mobilisiert und daraufhin die Zellen für 16 und 48 h bei 37 °C als konfluenter Bakterienrasen auf NB-Agarplatten kultiviert. Nach der anschließenden Zellfraktionierung erfolgte die Immunodetektion der Lectine unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums (Abb.20). Sowohl das mutierte LecB^m-Protein als das native Lectin wurden nach einer Inkubationszeit von 16 h im Cytoplasma detektiert. Weiterhin konnte letzteres auch im Periplasma nachgewiesen werden. Nach 48 h wurde das native Lectin, wie erwartet, im Cytoplasma und der Gesamtmembran detektiert, während das mutierte Lectin gar nicht mehr nachweisbar war. Diese Beobachtung weist daraufhin, dass die putative Glycosylierungsstelle Asn22 für die Sekretion und die Stabilität des Lectins LecB essentiell ist.

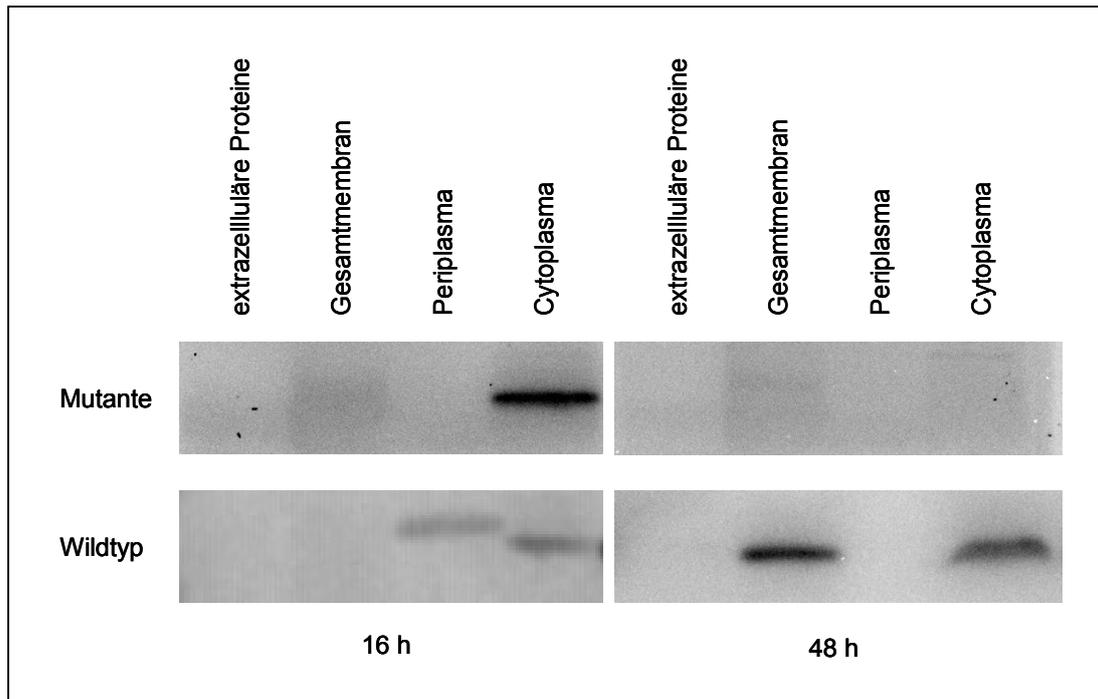


Abb. 20 Immunologische, subzelluläre Lokalisierung der mutierten LecB^m-Variante. *P. aeruginosa* Biofilmzellen, die das LecB⁻ (Wildtyp) oder das LecB^{*}-Protein (Mutante) synthetisierten, wurden nach Kultivierung auf NB-Agarplatten für 16 und 48 h fraktioniert. Die präparierten Zellfraktionen wurden durch Immunoblotting unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums auf die Anwesenheit der beiden Lectin-Varianten hin untersucht. Es wurden Volumina der Fraktionen eingesetzt, die einer O.D.₅₈₀ = 0,5 entsprechen.

3.3 Nachweis von LecB auf der Zelloberfläche von Biofilmzellen

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Lectin LecB über die Interaktion mit Rezeptoren, die LecB-spezifische Zucker enthalten, mit der äußeren Membran von *P. aeruginosa* assoziiert ist. Außerdem konnten putative LecB-Rezeptoren unter der Verwendung von fluoreszenzmarkiertem LecB-Protein auf der Zelloberfläche detektiert werden (Tielker *et al.*, 2005). Um zu demonstrieren, dass das Lectin auch *in vivo* auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa* lokalisiert ist, sollte es von dieser spezifisch verdrängt werden. Dazu wurden Biofilmzellen mit dem LecB-spezifischen Zucker L-Fucose inkubiert und nach erfolgter Zentrifugation das Zellpellet und der Kulturüberstand durch Immunodetektion analysiert. Da es bekannt ist, dass das LecB-Protein bei einer Temperatur von 4 °C das Hämagglutinationsminimum aufweist und somit die geringste Affinität zu seinen Liganden hat (Gilboa-Garber, N. & Sudakevitz, D., 1999), wurde das Experiment bei dieser Temperatur durchgeführt.

3.3.1 LecB interagiert mit Zuckerrezeptoren der Zelloberfläche

Zu Beginn der Versuche zur Verdrängung des LecB-Proteins von der Zelloberfläche wurde der Wildtyp-Stamm PAO1 verwendet. Da die Menge des von den Zellen verdrängten Lectins dabei an der immunologischen Nachweisgrenze lag, wurde für die weiteren Untersuchungen das Expressionsplasmid pBBC2 (Tielker *et al.*, 2005) verwendet, welches das *lecB*-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiven *lacUV*-Promotors enthält, um die Syntheserate des Lectins zu steigern. Nachdem das Plasmid durch Konjugation in den Wildtyp-Stamm PAO1 mobilisiert wurde, erfolgte die Kultivierung der Zellen in Form eines ungesättigten Biofilms. Anschließend wurden die Zellen in PBS-Puffer suspendiert, der zusätzlich 20 mM L-Fucose bzw D-Galactose enthielt. Die Interaktion des Lectins LecB mit L-Fucose weist eine besonders hohe Bindekonstante auf, während die Affinität zu D-Galactose gleich Null ist (Garber *et al.*, 1987). Die D-Galactose konnte somit als Referenz verwendet werden. Nach der Inkubation der Proben für 1h bei 4 °C wurden die Zellen sedimentiert. Daraufhin wurde die Anwesenheit des LecB-Proteins in den Zellpellets und den erhaltenen Überständen immunologisch überprüft (Abb. 21A). Um zu demonstrieren, dass die Zellen im Verlauf des Experiments nicht zerstört wurden, erfolgte die Analyse der gleichen Proben unter Verwendung eines Antiserums, das gegen das periplasmatische Protein DsbA gerichtet ist (Abb. 21B). Das LecB-Protein konnte im Pellet und im Überstand der mit Fucose inkubierten Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu fehlte das Lectin in dem Überstand der mittels D-Galactose behandelten Zellen. Die Tatsache, dass das DsbA-Protein nur in den Zellen und nicht in den Überständen lokalisiert wurde, spricht für eine Unversehrtheit der Zellen im Verlauf des Versuchs.

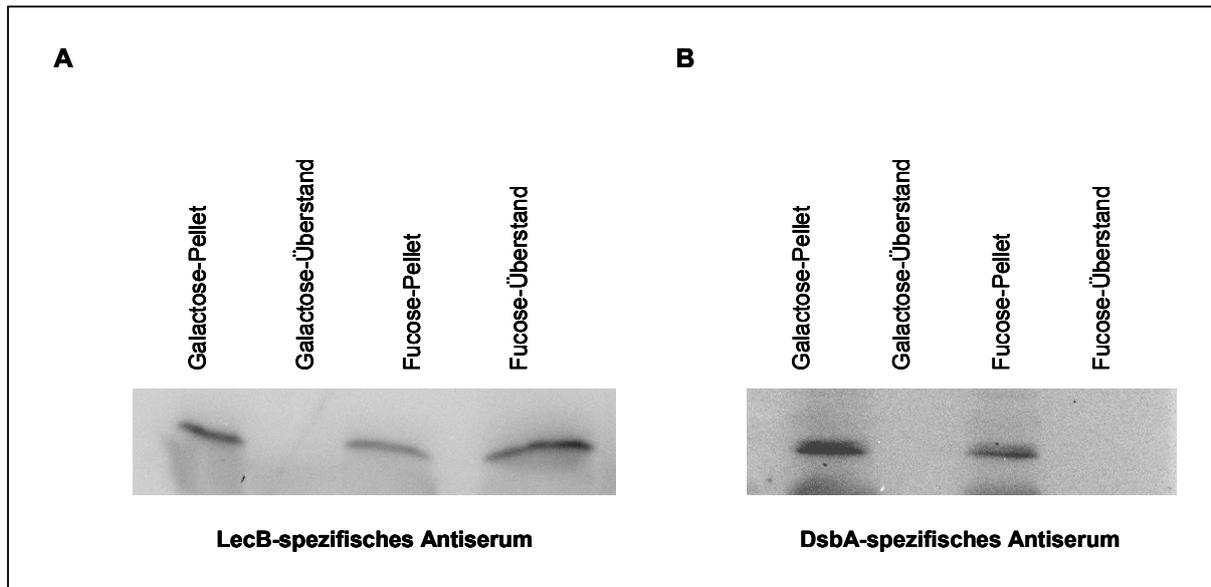


Abb. 21 Verdrängung des LecB-Proteins von der Zelloberfläche durch L-Fucose. Bakterien des *P. aeruginosa* -Wildtypstamms PAO1, die das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielten, wurden für 48 h bei 37 °C auf NB-Agar als konfluenter Bakterienrasen kultiviert und anschließend in PBS-Puffer, der zusätzlich 20 mM L-Fucose bzw. D-Galactose enthielt, für 1 h bei 4 °C inkubiert. D-Galactose diente als Referenz. Nach anschließender Zentrifugation wurde das Lectin LecB in den erhaltenen Überständen und den entsprechenden Zellpellets mittels des LecB-spezifischen Antiserums lokalisiert (**A**). Die eingesetzten Volumina der Zellpellets und Überstände entsprachen einer $O.D._{580} = 0,5$ bzw. 2. Die Unversertheit der Zellen wurde mittels eines Antiserums überprüft, das für das periplasmatische Protein DsbA spezifisch ist (**B**).

Diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass das Lectin LecB auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa*-Biofilmzellen vorliegt und dort mit LecB-spezifischen Zuckerrezeptoren interagiert.

3.4 Nachweis und Identifizierung LecB-spezifischer Liganden in *P. aeruginosa*

Wie demonstriert wurde, bindet das Lectin LecB über die Interaktion mit Rezeptoren, die LecB-spezifische Zucker enthalten, an die Zelloberfläche von *P. aeruginosa* Biofilmzellen. Weiterhin ist bekannt, dass das Lectin an der Biofilmbildung (Tielker *et al.*, 2005), der Pilus-Biogenese und der Protease-Aktivität IV von *P. aeruginosa* (Sonawane *et al.*, 2006) beteiligt ist. Zur Identifizierung der LecB-spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche und um weitere Informationen über die Beteiligung von LecB an der Physiologie von *P. aeruginosa* zu erhalten, sollten LecB-spezifische Liganden in *P. aeruginosa*-Biofilmzellen nachgewiesen und isoliert werden.

3.4.1 LecB interagiert mit anderen *P. aeruginosa*-Proteinen

Zum Nachweis potentieller LecB-Liganden in *P. aeruginosa* wurde der Wildtypstamm PAO1 für 48 h bei 37 °C als konfluente Bakterienrasen auf NB-Agarplatten kultiviert. Nach erfolgter Zellfraktionierung wurden potentielle LecB-Liganden mittels Far Western Blot (Abb. 22A) detektiert. Hierbei wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend nach dem Transfer auf eine Blotmembran für 2 h bei RT mit gereinigtem LecB-Protein inkubiert. Danach erfolgte die Detektion des Lectins und somit auch LecB-gebundener Interaktionspartner unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums (Abb. 22B). Als Negativkontrolle wurde das gleiche Experiment ohne Inkubation der *P. aeruginosa*-Proteine mit dem gereinigten LecB-Protein durchgeführt (ohne Abbildung). Wie in Abbildung B zu sehen ist, wurden mehrere potentielle LecB-Liganden in der Fraktion der Gesamtmembran, des Periplasmas sowie des Cytoplasmas nachgewiesen. In dem Immunoblot, der als Negativkontrolle diente wurde nur das LecB-Protein detektiert.

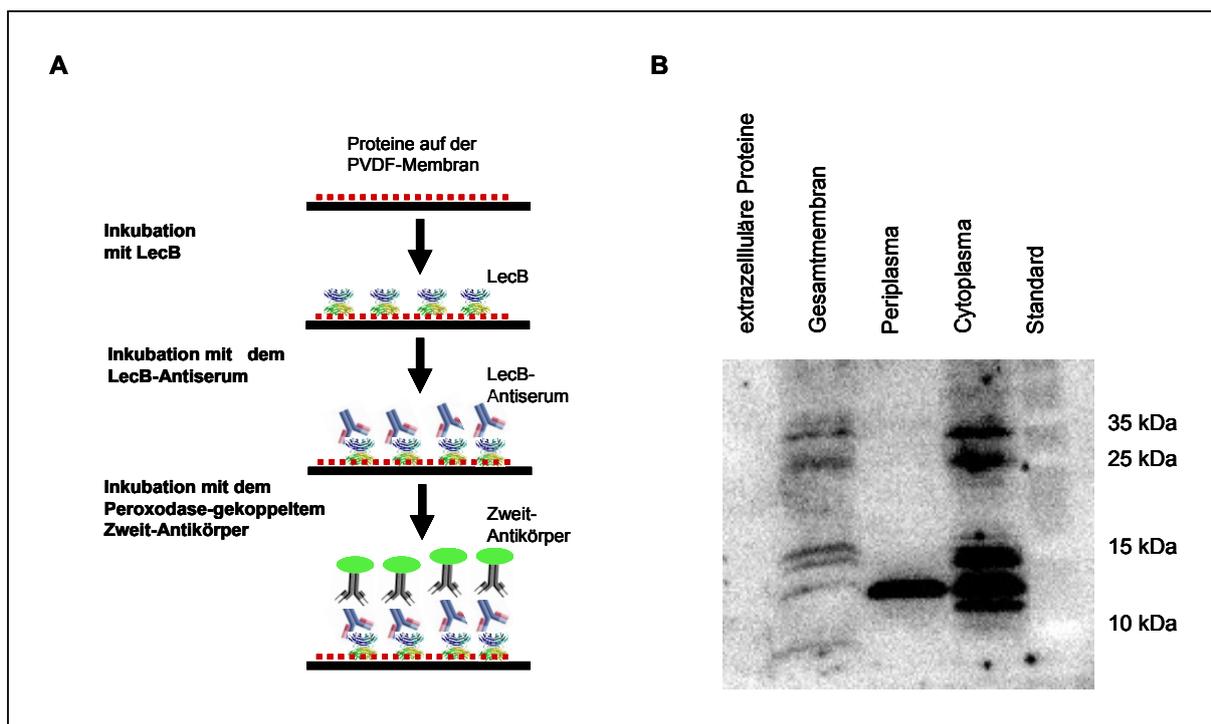


Abb. 22 Nachweis putativer LecB-Liganden durch Far Western Blot. **A.** Schematische Darstellung des Far Western Blots. **B.** Far Western Blot-Analyse der präparierten Zellfraktionen des Wildtypstamms PAO1. *P. aeruginosa*-Biofilmzellen des Wildtypstamms PAO1 wurden nach der Kultivierung auf NB-Agarplatten für 48 h bei 37 °C fraktioniert. Die präparierten Zellfraktionen wurden durch Far Western Blotting unter Verwendung des gereinigten LecB-Proteins und des LecB-spezifischen Antiserums auf die Anwesenheit von LecB-Liganden hin untersucht. Es wurden Volumina der Fraktionen eingesetzt, die einer O.D.₅₈₀ = 1 entsprachen.

3.4.2 LecB interagiert mit dem äußeren Membran Porin OprF

In dem nachfolgenden Experiment sollten die LecB-Liganden, die mittels Far Western Blot in *P. aeruginosa* nachgewiesen wurden, aus dem Lysat von *P. aeruginosa*-Zellen des Wildtypstamms PAO1 isoliert werden. Die Isolierung der Liganden erfolgte mittels Affinitätschromatographie über D-Mannose-Agarose (Abb. 23A). Hierbei wurden die Liganden über das LecB-Protein unter der Ausnutzung der Spezifität des Lectins zu D-Mannose an die Chromatographiesäule gebunden. Anschließend erfolgte die Elution der Interaktionspartner unter Waschen der Säule mit einem Puffer, der 20 mM D-Mannose enthielt. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Experiment mit dem LecB-negativen Stamm PATI2 durchgeführt. Die Analyse des Versuchs mittels SDS-PAGE zeigte, dass aus dem Wildtypstamm PAO1 neben dem LecB-Protein zwei weitere Proteine gereinigt wurden, die in etwa einem Molekulargewicht von 35 kDa entsprachen (Abb. 23B). Die Identität des LecB-Proteins wurde mittels Immunodetektion verifiziert (ohne Abbildung). Um die potentiellen LecB-Liganden für nachfolgende Analysen besser verfügbar zu machen, wurde das Eluat durch zweidimensionale-(2D)-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 23C). Die Analyse der resultierenden Spots mittels MALDI-TOF-MS und die Auswertung der Daten erfolgte, wie für die LecB-Varianten beschrieben (3.3.1), mit der Ausnahme, dass die Proteine diesmal durch Trypsin verdaut wurden. Es konnten das äußere Membranporin OprF und die hypothetische, periplasmatische Glutaminase-Asparaginase (PA1337) identifiziert werden. Die *score*- und *sequence-coverage*-Werte sind in Tabelle 9 dargestellt. Aus dem LecB-negativen *P. aeruginosa*-Stamm PATI2 konnte kein Protein isoliert werden (Abb. 23A). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das Lectin LecB mit den Proteinen OprF und PA1337 interagiert.

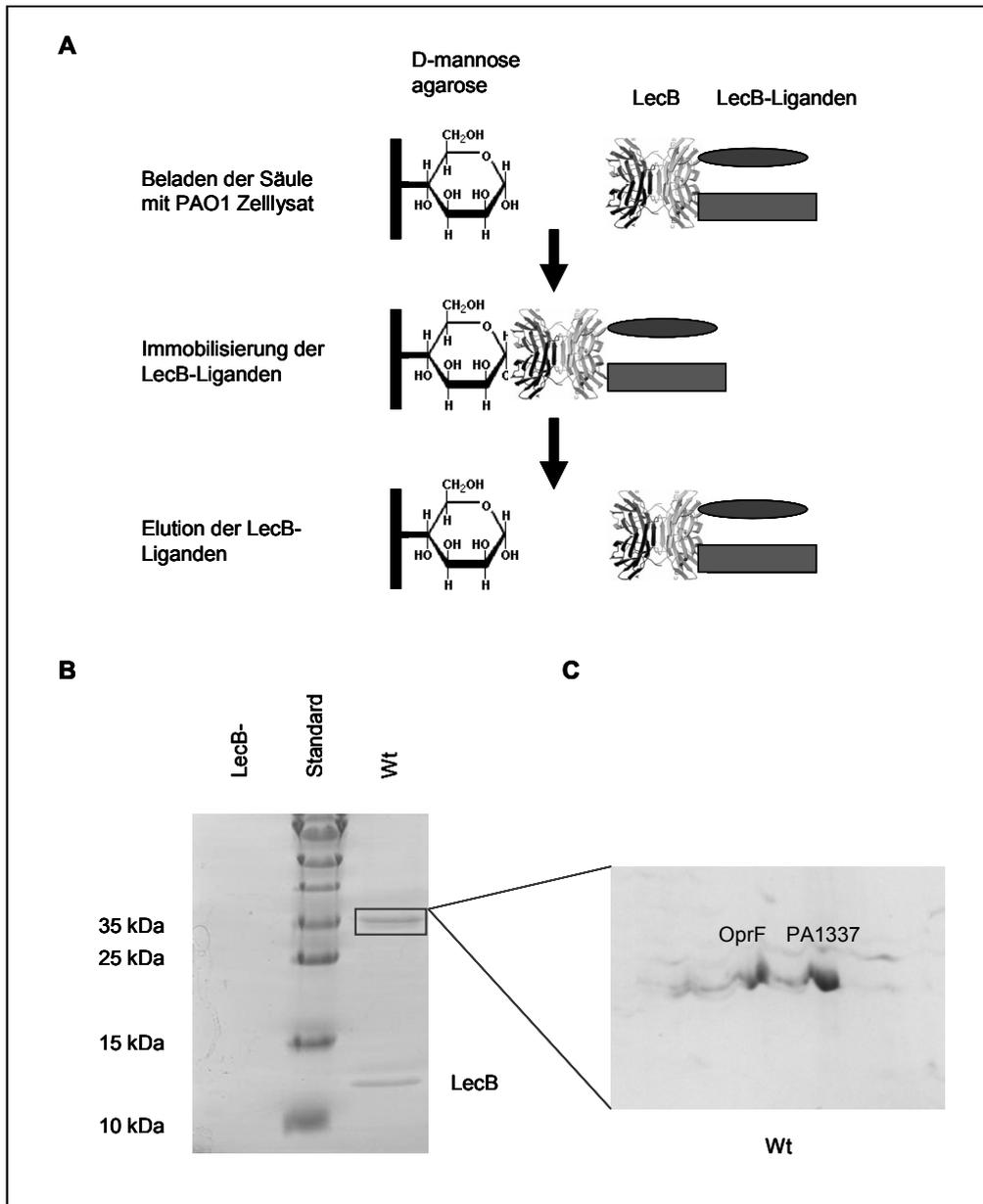


Abb. 23 Isolierung potentieller LecB-Liganden aus *P. aeruginosa*. **A**. Schematische Darstellung der Isolierung der LecB-Liganden über D-Mannose-Agarose. SDS-PAGE- (**B**) und 2D-Gelelektrophorese- Analyse (**C**) der Proteine, die aus dem Zelllysate des *P. aeruginosa*-Wildtypstamms PAO1 (Wt) isoliert wurden. Es wurden 200 μ l des gewonnenen Eluates auf das SDS-Gel und 2 ml auf das 2D-Gel aufgetragen. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels MALDI-TOF-MS. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Versuch mit dem *lecB*-defizienten Stamm PATI2 durchgeführt. Es wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Standard“ (Fermentas) verwendet.

Tab. 9 Identifizierung der putativen LecB-Liganden durch MALDI-TOF-MS.

Identifizierter Ligand	Systematischer Name	Score	Sequence Coverage
Porin OprF	PA1777	328	23%
Glutaminase-Asparaginase	PA1337	116	13 %

Die Funktion des Proteins PA1337 als Glutaminase-Asparaginase ist als hypothetisch vorhergesagt und der Anknüpfungspunkt für eine Interaktion mit LecB nicht offensichtlich. Sehr interessant hingegen erscheint die Interaktion mit OprF, einem Porin der äußeren Membran, die im Folgenden genauer untersucht werden soll.

Wie in Abschnitt 3.4.1 gezeigt wurde, ist das Lectin LecB auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa* Biofilmzellen lokalisiert. Da es sich bei dem Porin OprF um ein Protein der äußeren Membran handelt und es somit ein Ligand des Lectins auf der Zelloberfläche sein könnte, sollte die Interaktion des LecB-Proteins mit dem Porin OprF bestätigt werden. Dazu wurde das Porin unter Verwendung des zuvor produzierten LecB-Histidin-Fusionsproteins aus der äußeren Membranfraktion von *P. aeruginosa*-Zellen isoliert. Es wurde angenommen, dass die LecB-Bindestellen des OprF-Proteins im Wildtypstamm PAO1 durch natives Lectin abgedeckt sind. Daher wurde für dieses Experiment die äußere Membranfraktion aus dem *lecB*-defizienten Stamm PATI2 isoliert. Da es sehr aufwendig ist, große Mengen der äußeren Membranfraktion aus Biofilmzellen zu gewinnen und außerdem bekannt ist, dass das OprF-Protein auch in planktonischen *P. aeruginosa*-Zellen in der äußeren Membran lokalisiert ist (Azghani *et al.*, 2002), wurde die äußere Membran aus Bakterien isoliert, die für 48 h bei 37 °C in NB-Medium gewachsen waren. Nach Inkubation der Membranfraktion mit 2 mg des LecB-Histidin-Fusionsproteins für 2 h bei 37 °C wurde der Ansatz auf eine IMAC-Säule gegeben, wodurch LecB-gebundenes OprF-Protein an die Säule immobilisiert wurde. Durch das Waschen der Säule mit einem Puffer, der 20 mM L-Fucose enthielt, wurde LecB-gebundenes Protein von der Säule eluiert. Um die eluierten Proteine für eine nachfolgende MALDI-TOF-MS-Analyse möglichst genau voneinander zu trennen, erfolgte die Analyse des Eluats mittels 2D-Gelelektrophorese (Abb. 24A). Es wurde ein Spot detektiert, der mittels MALDI-TOF-MS als das Porin OprF identifiziert wurde, wobei der *score*-Wert 85 und der *sequence-coverage*-Wert 35% betrug. Zur erneuten Manifestierung der LecB-OprF-Interaktion erfolgte eine Detektion des isolierten Porins mittels eines Lectin-Blots unter Verwendung von Horseradish-Peroxidase-makiertem LecB-Protein (Abb. 24B). Um zu demonstrieren, dass das LecB-Protein für die Isolierung des Porins essentiell war, wurde das gleiche Experiment ohne LecB-Histidin-Fusionsprotein durchgeführt. In diesem Fall wurde kein Protein von der Säule eluiert (ohne Abbildung).

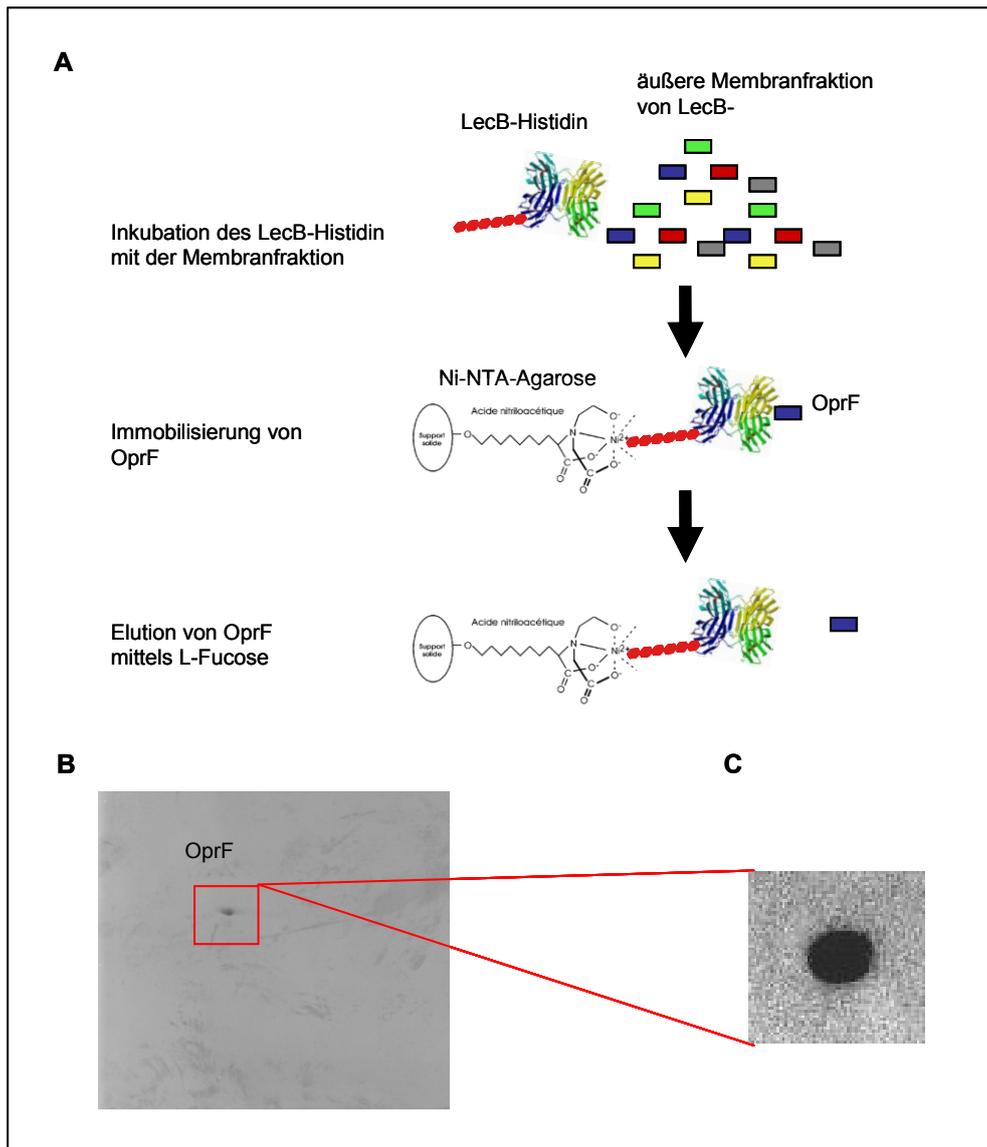


Abb. 24 Isolierung von OprF aus der äußeren Membranfraktion des *lecB*-defizienten *P. aeruginosa*-Stamms PAT12 (LecB-). Schematische Darstellung der Isolierung von OprF unter Verwendung des LecB-Histidin-Fusionsproteins (A). 2-D-Gelelektrophorese- (B) und Lectin-Blot-Analyse (C) des isolierten Proteins. Es wurden jeweils 1 ml des isolierten Proteins analysiert. Die Identifizierung von OprF erfolgte mittels MALDI-TOF-MS.

3.4.3 Hinweise auf N-Glycosylierungen im OprF-Protein

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Lectin LecB mit Rezeptoren der äußeren Membran, die LecB-spezifische Zucker beinhalten, interagiert (Tielker *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde in Abschnitt 3.4.1 gezeigt, dass das Lectin unter Verwendung des LecB-spezifischen Zuckers L-Fucose von der Zelloberfläche verdrängt werden kann. Basierend auf diesen Tatsachen sollten mittels der Methoden, die schon für die Analyse des

periplasmatischen LecB-Proteins verwendet wurden, Hinweise auf eine mögliche Glykosylierung des OprF-Proteins gefunden werden. Da durch den vorangegangenen Versuch nur eine geringe Menge des Porins gewonnen werden konnten, die nicht für die nachfolgenden Untersuchungen ausreichte, wurde uns freundlicher Weise von Professor Hancock (*Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Canada*) gereinigtes OprF-Protein, das aus der äußeren Membran des *P. aeruginosa*-Wildtypstamm PAO1 isoliert wurde (Azghani *et al.*, 2002), zur Verfügung gestellt.

Zunächst sollten Glykosylierungen innerhalb des OprF-Proteins unter Verwendung des „DIG Glycan Detection Kits“ nachgewiesen werden. Die Analyse wies daraufhin, dass das Porin OprF glykosyliert vorliegt (Abb. 25).

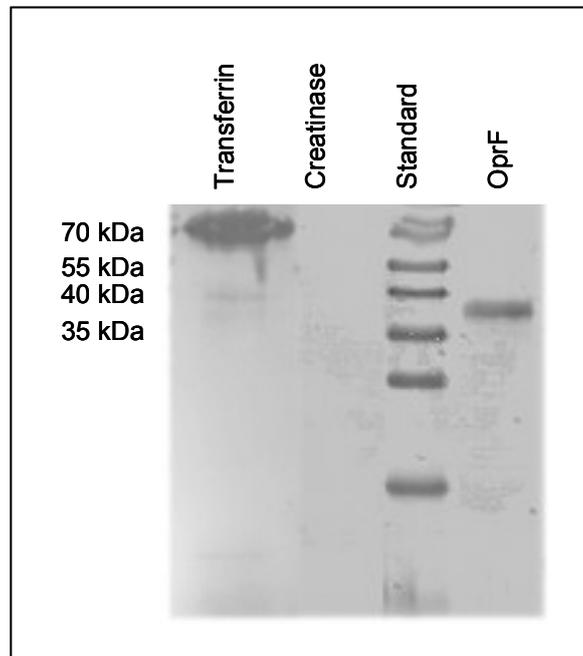


Abb. 25 Nachweis von Glykosylierungen in dem OprF-Protein. Es wurden 1 µg des gereinigten OprF-Proteins gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit einem „DIG Glycan Detection Kits“ (Roche, Penzberg) analysiert. Als Negativ- und Positivkontrolle dienten jeweils 1 µg des nicht-glykosylierten Proteins Creatinase bzw. des Glycoproteins Transferrin.

Aufgrund dessen wurde überprüft, ob das OprF-Protein potentielle N-Glykosylierungstellen aufweist. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des Porins unter Verwendung des NetNGlyc 1.0 Servers analysiert. Es wurden die vier Asparagin-Reste 91, 120, 221 und 329 als potentielle N-Glykosylierungsstellen vorgeschlagen. Um zu überprüfen, ob das Protein tatsächlich N-glykosyliert vorliegt, wurde es mit der N-Glykosidase F (PNGaseF) aus *Flavobacterium meningosepticum* für 16 h bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente hierbei ein Ansatz, der keine N-Glykosidase enthielt. Die Analyse des Versuchs mittels SDS-

PAGE zeigte, dass das OprF-Protein, das im SDS-Gel bei 37,42 kDa lief, durch die PNGaseF zu drei niedermolekularen Varianten von 37,01, 36,61 und 35,81 kDa degradiert wurde (Abb. 26).

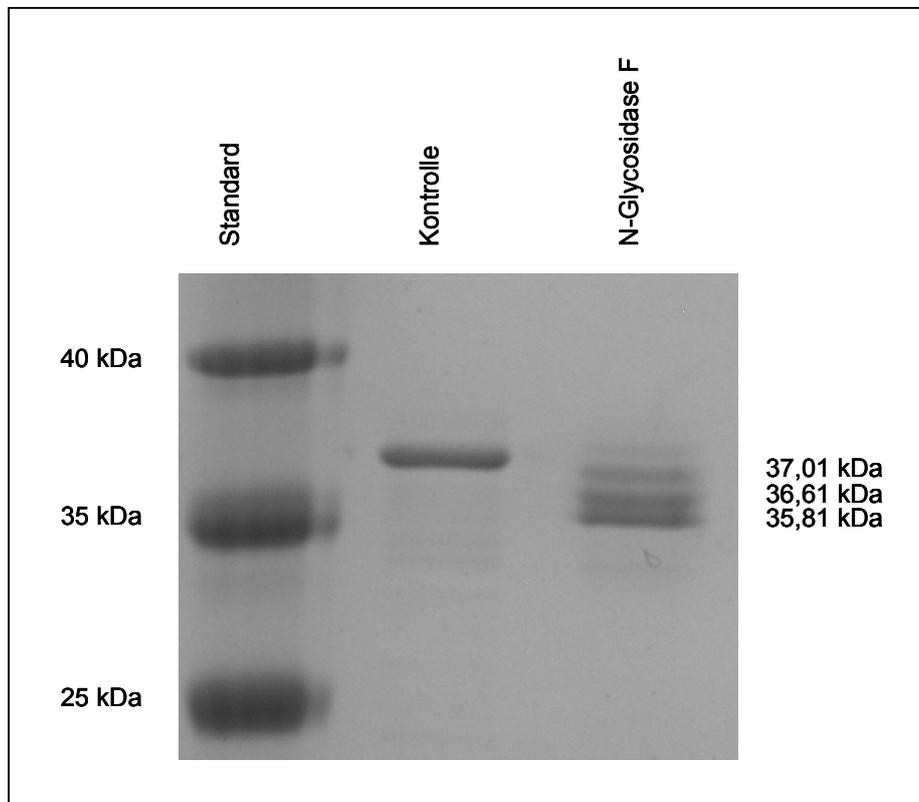


Abb. 26 Inkubation des OprF-Proteins mit der N-Glycosidase F. Es wurden 3 µg des gereinigten OprF-Proteins mit der N-Glycosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum* für 16 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der keine N-Glycosidase F enthielt. Die Molekulargewichtsbestimmung der einzelnen Proteine erfolgte unter Verwendung der Software AIDA (Raytest, Straubenhardt). Es wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Standard“ (Fermentas) verwendet.

Die Verifizierung der niedermolekularen OprF-Varianten erfolgte mittels MALDI-TOF-MS. Die *score*- und *sequence-coverage*-Werte sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10 Verifizierung der degradierten OprF-Varianten durch MALDI-TOF-MS.

OprF-Variante	Systematischer Name	Score	Sequence Coverage
37,01 kDa	PA1777	51	19 %
36,61 kDa	PA1777	56	19 %
35,81 kDa	PA1777	92	37 %

Diese Resultate lassen die Annahme zu, dass das OprF-Protein ein N-glycosyliertes Protein mit drei für das Enzym PNGaseF zugänglichen N-Glycosylierungstellen ist.

3.4.4 OprF ist der Zelloberflächen-Rezeptor von LecB

Wie zuvor gezeigt wurde, interagiert das Lectin LecB mit dem äußeren Membranprotein OprF. Um den Einfluss von OprF auf die subzelluläre Lokalisierung des LecB-Proteins in sessilen *P. aeruginosa*-Zellen zu untersuchen, wurden die Bakterien des OprF-negativen Stamms H636, die das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielten, für 48 h bei 37 °C auf NB-Agar kultiviert. Nach Präparation der subzellulären Kompartimente erfolgte der Nachweis des Lectins mittels Immunodetektion. Hierbei diente der *P. aeruginosa*-Wildtypstamm PAO1, der das Plasmid pBBC2 enthielt, als Referenzstamm. Wie in Abbildung 27 dargestellt, wurde das Lectin im Cytoplasma, Periplasma und der Fraktion der extrazellulären Proteine des OprF-negativen *P. aeruginosa*-Stamms und im Cytoplasma sowie der Gesamtmembran des Wildtypstamms nachgewiesen.

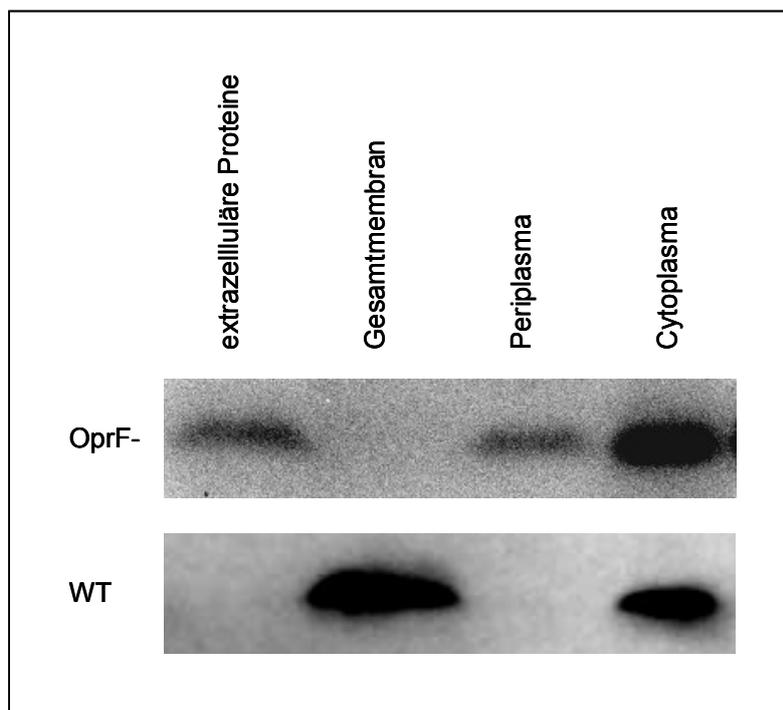


Abb. 27 Subzelluläre Lokalisierung des Lectins LecB in sessilen Zellen des OprF-negativen *P. aeruginosa*-Stamms H636 (OprF-). Bakterien des OprF-negativen *P. aeruginosa*-Stamms H636, der das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielt, wurden für 48 h bei 37 °C auf NB-Agar als konfluente Bakterienrasen kultiviert und anschließend fraktioniert. Durch Immunoblotting unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums wurden die einzelnen Fraktionen auf die Präsenz des LecB-Proteins hin untersucht. Als Referenzstamm diente der Wildtypstamm PAO1, der das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielt. Die eingesetzten Volumina der Fraktionen entsprachen einer O.D.₅₈₀ = 0,5.

Diese Beobachtung weist eindeutig darauf hin, dass das Porin OprF der Rezeptor von LecB auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa*-Zellen ist.

4 Diskussion

4.1 Heterologe Expression und Reinigung von LecA und LecB

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistisches humanpathogenes Bakterium, das für eine Reihe von Infektionen verantwortlich ist und der primäre Grund für den Tod von Patienten mit einem geschwächten Immunsystem ist, insbesondere von CF- und Krebs-Patienten. Die Therapie solcher Infektionen gestaltet sich sehr schwierig, da dieser pathogene Keim eine hohe Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika besitzt. Diese Widerstandsfähigkeit wird unter anderem durch die Ausbildung von Biofilmen auf Oberflächen hervorgerufen, welche eine physikalische Barriere für den Durchgang von Antibiotika ausbilden (Wagner & Iglewski, 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die Lectine LecA und LecB bei der Biofilmbildung eine Rolle spielen und somit möglicherweise am Infektionsprozess von *P. aeruginosa* beteiligt sind (Tielker *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2006). Aus diesem Grund erschien es als eine geeignete therapeutische Strategie, Substanzen zu entwickeln, die diese beiden Lectine inhibieren. Dazu wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Reymond (*Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern, Schweiz*) LecA- und LecB-spezifische Glycopeptide-Dendrimere synthetisiert. Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, LecA- und LecB-Protein zu produzieren, um es für das Screening und die Aktivitätsbestimmung dieser Dendrimere zu verwenden.

Darüber hinaus wurde LecB-Histidin-Fusionsprotein produziert. Dieses Fusionsprotein wurde anschließend für die Isolierung von putativen LecB-Interaktionspartnern aus *P. aeruginosa* Zellen eingesetzt.

Die Expression der Lectin-Gene erfolgte im Wirt *E. coli* BL21 (DE3) unter Verwendung der Vektoren pEC1 (kodiert für LecA), pEC2 (kodiert für LecB) und pURE (kodiert für das LecB-Histidin), bei denen die jeweiligen Gene unter der transkriptionellen Kontrolle des T7-Promotors stehen. Durch die hohe Selektivität gegenüber dem Promotor T7 Φ 10 und die große Prozessivität der T7-RNA-Polymerase können mit diesem Expressionssystem Ausbeuten an rekombinantem Protein erreicht werden, die bis zu 50 % der Gesamtproteinmenge ausmachen (Studier *et al.*, 1990; Baneyx, 1999). Die Expression des *lecA*-Gens erfolgte bei 37 °C (Tielker 2001), während die LecB-Proteine bei 30 °C produziert wurden, da in einer früheren Studie gezeigt wurde, dass die Überexpression bei 37 °C zur Reduktion der LecB-Ausbeute führte (Tielker, 2005). Die Reinigung des LecB-Proteins in nur einem chromatographischen

Schritt unter Ausnutzung der natürlichen Affinität des Lectins zu D-Mannose wurde bereits optimiert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte das Protein erfolgreich gereinigt werden (Abb. 6B), wobei die Proteinausbeute mit 65 mg LecB pro Liter in etwa dem Literaturwert entsprach. Bei der Reinigung des LecA-Proteins unter Nutzung der natürlichen Affinität von LecA zu Sepharose 4B wurden bisher großen Mengen des Lectins in der Waschfraktion detektiert (Tielker, 2001), was auf eine relativ schwache Affinität von LecA zu dem Säulenmaterial schließen lässt. Um die Verdrängung des LecA-Proteins von dem Säulenmaterial während des Waschschritts zu verhindern, wurde diesmal auf die Verwendung von Salz, das in der Regel für die Entfernung unspezifisch gebundener Proteine bei Affinitätschromatographischen Methoden eingesetzt wird (Terpe, 2003), verzichtet. Es wurden nur geringe Mengen an LecA-Protein in der Waschfraktion detektiert, und die Proteinausbeute konnte von 19 mg auf 41 mg pro Liter Expressionskultur gesteigert werden, wobei das Protein bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden konnte (Abb. 6A).

Um für nachfolgende Interaktionsversuche das LecB-Protein an eine IMAC-Säule immobilisieren zu können, sollte das Lectin als Histidin-Fusionsprotein exprimiert werden. Da der C-Terminus für die Zuckerbindung des Proteins essentiell ist (Loris *et al.*, 2003), sollte der Histidin-Tag mit dem freiliegenden N-Terminus fusioniert werden. Hierfür war das Plasmid pPURE geeignet, das eigentlich für die Fusion eines beliebigen Gens mit dem *lecB*-Gen konstruiert wurde, um nach erfolgter Expression die resultierenden Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen zu können (Bartels, 2005; Tielker *et al.*, 2006). Da dieses Plasmid jedoch ohne Klonierung eines Fusionsanteils bereits auch für ein LecB-Protein mit N-terminalem Histidin-Tag kodiert, bei dem sich zwischen dem Tag und dem Lectin eine Linker-Region befindet, wurde es für die Produktion des Fusionsproteins verwendet. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte über eine IMAC-Säule und es konnten 39 mg LecB-Histidinfusionsprotein pro Liter Expressionskultur gewonnen werden (Abb. 7).

Nach der Entfernung der zur Elution der einzelnen Proteine verwendeten Substanzen unter Einsatz von Zentrifugationskonzentratoren wurde die Funktionalität der Lectine LecA und LecB überprüft. Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte mittels der Agglutinationsreaktion von Erythrozyten, die auf der Bindung von Galactose- bzw. Fucosemolekülen auf der Erythrozytenoberfläche beruht. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die mittels der Agglutinationsreaktion (Abb. 8) ermittelten Titer des LecA- und LecB-Proteins bzw. LecB-Histidin-Fusionsproteins den Literaturwerten entsprachen, die bisher für die Hämagglutination von humanen Erythrozyten durch die Lectine beschrieben wurden

(Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Gilboa-Garber & Sudakevitz, 1999; Tielker, 2005). Zum besseren Verständnis ist zu erwähnen, dass mit dem Titer die Verdünnung eines Lectins gemeint ist, die gerade noch eine positive Agglutinationsreaktion auslöst. Die Tatsache, dass die Titer der einzelnen Lectine den Literaturwerten entsprachen, spricht für eine korrekte Konformation der rekombinanten Proteine und für die vollständige Entfernung der D-Galactose bzw D-Mannose der Elutionspuffer aus der Bindetasche der Lectine.

4.2 Screening und Aktivitätsbestimmung Lectin-spezifischer Dendrimere

Es konnte demonstriert werden, dass das Galactose-spezifische Lectin LecA und das Fucose-spezifische Lectin LecB eine Rolle bei der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* spielen. Die daran beteiligten Mechanismen sind jedoch noch unverstanden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Reymond (*Department of Chemistry and Biochemistry, University of Bern, Schweiz*) konnten multivalente Glycopeptid-Dendrimere gegen LecB bzw. LecA und LecB identifiziert werden. Die Aktivitäten der Dendrimere sollten sowohl in einem ELLA (*enzyme-linked lectin-assay*) als auch einem HAIT (*hemagglutination-inhibition-assay*) bestimmt werden. Der Vorteil des HAIT gegenüber dem ELLA liegt darin, dass die Bedingungen des Tests eher den Bedingungen bei einer *P. aeruginosa*-Infektion ähnlich sind. Außerdem hat er sich bei vielen Untersuchungen bezüglich der beiden *P. aeruginosa* Lectine bewährt (Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Lesman-Movshovich *et al.*, 2003; Lerrer *et al.*, 2007). Sowohl im ELLA als auch im HAIT zeigten die LecB-spezifischen Dendrimere miteinander vergleichbare Aktivitäten (Tab. 6).

Alle getesteten LecB-spezifischen Dendrimere konnten erfolgreich für die Inhibierung der Biofilmbildung und für die Verdrängung bereits etablierter Biofilme verwendet werden. Hierbei stellte sich in beiden Fällen das Dendrimer FD2 als aktivster Ligand heraus. Das Dendrimer FD2 hatte auf die Biofilmbildung der *lecB*-Deletionsmutante keine Auswirkungen (Abb. 10B). Diese Beobachtung liefert einen starken Hinweis darauf, dass die Inhibierung der Biofilme durch die direkte Interaktion des Dendrimers mit dem Lectin LecB erfolgt. Das Dendrimer FD2 konnte nicht nur die Biofilmbildung des *P. aeruginosa*-Wildtypstamms PAO1 hemmen, sondern auch die verschiedener klinischer Isolate aus der Lunge von CF-Patienten (Abbildung 10B). Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Dendrimere für therapeutische Zwecke wie zum Beispiel die Behandlung von CF-Patienten eingesetzt werden könnten, zumal Patienten mit einer *P. aeruginosa*-induzierten Otitis Externa Diffusa, (Steuer *et al.*, 1993), einer Entzündung des Respirationstraktes (von Bismarck *et al.*, 2001) und einer

Cystischen Fibrose (Hauber *et al.*, 2008), schon erfolgreich durch die Verabreichung von Lösungen, die die monovalenten Lectin-Liganden D-Galactose bzw. L-Fucose enthielten, therapiert wurden.

Im ELLA zeigte sich das Dendrimer PA8 am effektivsten. Es übte eine 100-fach höhere Affinität zu LecB aus als der monovalente Ligand Fucose. Darüber hinaus wurde durch isothermale Titrations-Kalorimetrie abgeschätzt, dass der Affinitäts-Anstieg des Dendrimers FD2 gegenüber Fucose 46-fach ist (Johansson *et al.*, 2008). Damit repräsentieren diese Glycopeptid-Dendrimere die stärksten multivalenten Liganden, die bisher identifiziert wurden. Die strukturellen Untersuchungen und die Abhängigkeit der Affinität der Dendrimere von der Aminosäuresequenz lassen vermuten, dass wahrscheinlich zusätzliche Dendrimer-LecB-Interaktionen außerhalb der Fucose-Bindetasche vorkommen. Es ist vorstellbar, dass die Dendrimere die Bildung von Proteinaggregaten verursachen, die das lösliche Lectin effektiv von den *P.aeruginosa*-Zellen verdrängen, was die Inhibierung der Biofilmbildung oder die Verdrängung der etablierten Biofilme erklären würde. Präzipitate, die bei dem Versuch, einen FD2-LecB-Komplex zu kristallisieren, entstanden sind, weisen eindeutig auf die Ausbildung solcher Aggregate hin. Diese Theorie würde auch dafür sprechen, dass das LecB-Protein Zelloberflächen-exponiert vorliegt. Die spezifische Aggregation von *P. aeruginosa*-Zellen durch die Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem L-Fucose-Chitosan (Morimoto *et al.*, 2001) und die Tatsache, dass das LecB-Protein mit Kohlenhydrat-Liganden in der äußeren Membran von *P. aeruginosa*-Biofilmzellen interagiert und für das Lectin zugängliche Liganden auf der Zelloberfläche existieren (Tielker *et al.*, 2005), unterstützen diese These. Damit könnte Oberflächen-exponiertes LecB-Protein, wie schon zuvor vermutet (Tielker *et al.*, 2005), durch die multivalente Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche von Organismen der eigenen oder auch einer anderen Spezies an der Aggregation von Zellen beteiligt sein und so zur Stabilität einer Biofilmstruktur beitragen. Der IC₅₀-Wert des stärksten Liganden FD2 bei der Biofilmverdrängung betrug 10 µM (Johansson *et al.*, 2008), was einem 50-fachen Affinitäts-Anstieg gegenüber dem monovalenten Liganden α-NPF entspricht. Bezieht man in die Rechnung mit ein, dass das Dendrimer viermal so viele Fucosemoleküle enthält, ist der Affinitätsanstieg nur noch 12,5-fach pro Fucosemolekül und durchaus noch zu steigern. Dendrimere wurden auch schon in anderen Studien als hochaffine Lectin-Liganden eingesetzt. So konnten zum Beispiel octavalente Dendrimere, die Galabiose enthielten, die Hämagglutination, die durch das Bakterium *Streptococcus suis* induziert wird, hemmen (Joosten *et al.*, 2004). Es wurden außerdem synthetische Di- und Trisaccharide-Analoga des natürlichen LecB-Liganden Lewis^a synthetisiert, die das Lectin mit ungefähr 3- bis 10-facher

Affinität gebunden haben als Fucose, wobei zusätzliche Interaktionen außerhalb der Fucose-Bindetasche eine Rolle spielten (Marotte *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurden Dendrimere mit Lewis^a-Strukturen entwickelt und für die Hemmung des Lectins eingesetzt (Marotte *et al.*, 2007). Hierbei konnten jedoch keine multivalenten Effekte beobachtet werden. Außerdem wurde von fucosylierten Pentaerythrityl-Phosphodiester Oligomeren berichtet, die mit dem LecB-Protein interagiert haben (Morvan *et al.*, 2007). Obwohl diese Liganden nicht hinsichtlich ihres Potentials Biofilme zu verdrängen getestet wurden, verdeutlichen sie dennoch, dass ein Anstieg der Affinität der Liganden-Bindung erreicht werden kann, indem man zum Beispiel wie im Fall der Dendrimere die Aminosäuren variiert.

Es konnte demonstriert werden, dass die LecB-spezifischen Glycopeptid-Dendrimere abgesehen von der Inhibierung und der Verdrängung der Biofilme keine toxischen Effekte auf *P. aeruginosa*-Zellen ausüben. Darüber hinaus wurde für das Dendrimer FD2 mittels eines Cytotoxizitäts-Test gezeigt, dass es nicht toxisch gegenüber menschlicher Zelllinien ist (Johansson *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass eine starke LecB-Bindung in einigen Fällen durch Dendrimere ausgeübt wurde, die kationische, aber auch anionische und neutrale Aminosäuren enthielten, spricht dafür, dass eine Verbesserung der Dendrimere durch Aminosäure-Modifikationen erreicht werden kann.

Eine weitere Möglichkeit, um die Aktivität der Dendrimere bei der Biofilm-Inhibierung zu steigern, ist das Einfügen einer zweiten funktionellen Gruppe, die für das *P. aeruginosa* Lectin LecA spezifisch ist, das ebenso an der Virulenz von *P. aeruginosa* beteiligt sein soll (Gilboa-Garber, 1997; Chemani *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurden octavalente Dendrimere synthetisiert, die vier funktionelle Gruppen für jedes Lectin enthalten (Abb. 9A). Die Aktivität dieser Dendrimere konnte mittels HAIT bestimmt werden, während für den ELLA keine geeigneten Bedingungen gefunden wurden. Das Problem beim Testen der bifunktionalen Dendrimere liegt darin, dass beide Lectine ein gegensätzliches Temperaturprofil bei der Hämagglutinationsreaktion aufweisen (Gilboa-Garber, 1999). Zunächst wurden die Dendrimere bei Raumtemperatur getestet, was jedoch zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führte. Letztendlich wurden die optimalen Bedingungen für LecA und für LecB bei 4 °C bzw. 37 °C gefunden. Die bifunktionalen Dendrimere banden mit hoher Affinität sowohl an LecA als auch an LecB (Tab. 7) und werden zurzeit hinsichtlich ihrer Möglichkeit *P. aeruginosa*-Biofilme zu inhibieren oder zu verdrängen getestet (mündliche Mitteilung von Prof. Reymond *Department of chemistry and biochemistry, University of Bern, Schweiz*).

4.3 Charakterisierung des periplasmatischen LecB-Proteins

Viele Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* wie zum Beispiel LasB und Exotoxin A werden durch Zwei-Schritt-Sekretionssysteme aus der Zelle geschleust (Filloux *et al.*, 1998; Koster *et al.*, 2000). Der Sekretionsweg des LecB-Proteins, das auch als Virulenzfaktor angesehen wird, ist bisher noch unbekannt. Da das LecB-Protein in früheren Studien im Periplasma von *P. aeruginosa*-Zellen detektiert werden konnte (Glick & Garber, 1983; Tielker, 2005), wurde vermutet, dass auch das Lectin auf einen Zwei-Schritt-Weg-Transportmechanismus aus der Zelle gelangt. Aufgrund dessen wurde die periplasmatische Zustandsform des Lectins näher charakterisiert.

Im Periplasma existieren zwei voneinander verschiedene LecB-Varianten

Die Lokalisierung des Lectins wurde wie zuvor beschrieben in sessilen Zellen durchgeführt (Morimoto *et al.*, 2001; Tielker *et al.*, 2005). Die Kultivierung der Bakterien erfolgte auf NB-Agarplatten für 48 h. Durch die Kultivierung von *P. aeruginosa* auf Agarplatten entstehen ungesättigte Biofilme (Steinberger *et al.*, 2002), die den Biofilmen in den Lungen von CF-Patienten, die von einer *P. aeruginosa*-Infektion betroffen sind, entsprechen (Lyczak *et al.*, 2002). Die Fraktionierung der Zellen erfolgte nach Witholt *et al.* (1976), da diese Methode schon in anderen Studien erfolgreich für die Lokalisierung von Proteinen angewandt wurde (Wilhelm *et al.*, 1999; Tielker *et al.*, 2005). Die Detektion des LecB-Proteins erfolgte immunologisch unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums, das schon zuvor mit Erfolg für den Nachweis des LecB-Proteins verwendet wurde (Tielker, 2005; Tielker *et al.*, 2005). Zunächst wurden Aliquots der subzellulären Fraktionen des *P. aeruginosa*-Wildtypstamms PAO1 analysiert, die einer O.D.₅₈₀ von 0,5 entsprachen. Hierbei lag jedoch die Menge des LecB-Proteins an der Nachweisgrenze (ohne Abbildung). Aufgrund dessen wurden die Aliquots der Fraktionen auf eine O.D.₅₈₀ von 1 eingestellt und erneut analysiert. Hierdurch konnte das Lectin im Cytoplasma und der Fraktion der Gesamtmembran, aber auch im Periplasma nachgewiesen werden (Abb. 12). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Glick & Garber, widerspricht aber den Beobachtungen von Tielker *et al.*, (2005), die das Lectin nach Wachstum für 48 h nur im Cytoplasma und der äußeren Membranfraktion detektieren konnten. Letzteres könnte darin begründet sein, dass in dieser Studie für die Lokalisierung des Lectins LecB-negative *P. aeruginosa*-Zellen, die ein *lecB*-Expressionsplasmid enthielten, verwendet wurden, um auf diese Weise die Syntheserate des

Lectins zu erhöhen. Möglicherweise gelangt deswegen das Lectin schneller in nachweisbaren Mengen in die äußere Membranfraktion und ist nach der Inkubationszeit von 48 h nicht mehr im Periplasma nachweisbar. Eine alternative Erklärung für die fehlende Detektion des LecB-Proteins im Periplasma war die Annahme, dass durch die Überproduktion des LecB-Proteins der für die Sekretion des Lectins verantwortliche Transportapparat der inneren Membran im Verlauf der Zeit gesättigt war. Im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss der N-Glycosylierungsstelle Asn22 (Abb. 20) und des OprF-Proteins (Abb. 27) auf die subzelluläre Lokalisierung des LecB-Proteins wurde ebenfalls unter der Verwendung des *lecB*-Expressionsplasmids pBBC2 das Lectin nach 48 h Wuchsphase ausschließlich im Cytoplasma und in der Gesamtmembranfraktion detektiert.

Die Lokalisierung des LecB-Proteins im Periplasma demonstriert, dass der extra-cytoplasmatische Anteil des Lectins durch einen Zweischnitt-Sekretionsmechanismus aus der Zelle gelangen muss. Da das Lectin aber kein Signal für die bekannten Transportmechanismen von *P. aeruginosa* enthält (Vodkin *et al.*, 1983; Avichezer *et al.*, 1994), ist es unwahrscheinlich, dass das Lectin über den Sec- oder Tat-Sekretionsweg transportiert wird, es sei denn, der Export erfolgte über einen Co-Transport zusammen mit einem weiteren Protein, das seinerseits entsprechende Signale hätte. Es ist nachgewiesen, dass *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren entweder durch das Sec- oder das Tat-System über die innere Membran transportiert werden (Economou, 1999; Berks *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist die Synthese des Lectins LecB durch QS und den Sigma-Faktor RpoS reguliert (Winzer *et al.*, 2000) und damit gekoppelt mit der anderer Virulenzfaktoren. Es ist also denkbar, dass das LecB-Protein als Komplex mit einem der Virulenzfaktoren entweder über das Sec- oder das Tat-System über die innere Membran co-transportiert wird. Weiterhin wäre der Transport durch ein noch nicht identifiziertes Transportsystem der inneren Membran vorstellbar und muss derzeit als wahrscheinlich angenommen werden. Interessanterweise wurden im Periplasma zwei LecB-Varianten detektiert, die sich in ihrem Laufverhalten im SDS-Gel voneinander unterschieden. Dieses Phänomen konnte erstmalig in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die LecB-Varianten liegen als Dimer bzw. Trimer vor

Um die beiden LecB-Varianten besser untersuchen zu können und die Funktionalität der Lectine zu überprüfen, wurden sie mittels Affinitätschromatographie über D-Mannose-

Agarose aus dem Periplasma von *P. aeruginosa*-Zellen isoliert. Aus praktischen Gründen wurde das Periplasma aus planktonischen Zellen, die für 48 h Stunden in NB-Medium inkubiert wurden, isoliert. Dies erschien möglich, da bekannt ist, dass periplasmatisches LecB-Protein auch in planktonischen Zellen vorkommt (Glick & Garber, 1983). Die SDS-PAGE-Analyse ergab, dass beide LecB-Varianten erfolgreich isoliert wurden und die Eigenschaft besitzen, mit D-Mannose zu interagieren.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine basierend auf dem Laufverhalten im SDS-Gel wurde die Software AIDA (Raytest, Straubenhardt) verwendet. Die Analyse ergab, dass die LecB-Varianten ein Molekulargewicht von 12,6 und 13,8 kDa aufwiesen (Abb. 13 A). Im Gegensatz dazu entsprach das als Referenz verwendete heterolog in *E.coli* exprimierte Lectin einem Molekulargewicht von 11,6 kDa. Die Identität der LecB-Varianten wurde mittels Immunodetektion (Abb. 13B) und MALDI-TOF-MS-Analyse (Tab. 8) verifiziert. Nach Entfernung der zur Elution der periplasmatischen LecB-Varianten verwendeten D-Mannose unter Einsatz von Zentrifugationskonzentratoren betrug die erzielte Proteinausbeute 3,6 mg LecB pro Liter Bakterienkultur.

Zur Klärung des Oligomerisierungszustands der LecB-Varianten wurden sie in einer Größenausschlusschromatographie mittels HPLC untersucht. Die Analyse ergab, dass die 12,6 kDa großen Monomere ein Oligomer mit einem apparenten Molekulargewicht von 28 kDa ausbilden, was in etwa dem zweifachen Molekulargewicht eines Monomers und somit einem Dimer entspricht. Im Gegensatz dazu lagern sich die 13,8 kDa großen Monomere zu einem Oligomere mit einem apparenten Molekulargewicht von 42 kDa zusammen. Dieses Molekulargewicht entspricht in etwa dem dreifachen Molekulargewicht eines Monomers und somit einem Trimer (Abb. 14). Beide Oligomere besitzen die Fähigkeit mit D-Mannose zu interagieren.

Die Kristall-Struktur von heterolog in *E.coli* exprimiertem LecB-Protein wurde vor einiger Zeit aufgeklärt (Mitchell *et al.*, 2002, 2005; Loris *et al.*, 2003). Hierbei konnte gezeigt werden, dass das LecB-Protein ein Tetramer ausbildet und mindestens ein Dimer sein muss, um Zucker binden zu können, da an der Zuckerbindung eines Monomers der C-terminus des korrespondierenden Monomers beteiligt ist. Die Bildung eines Dimers erfolgt über die Interaktionen der β -Faltblätter zweier korrespondierender Monomere, wobei die Interaktionsflächen stark hydrophob sind (Loris *et al.*, 2003). Die Interaktion zweier Dimere ist eher schwächer und hydrophiler Natur. Daher ist es denkbar, dass das LecB-Protein in Lösung als Gemisch aus Dimeren und Tetrameren vorhanden ist, die im Gleichgewicht vorliegen, was sich im apparenten Molekulargewicht eines Trimers zeigt. Es konnte im Falle

anderer multimerer Proteine nachgewiesen werden, dass bei einem solchen, sich schnell einstellenden Gleichgewicht zwischen verschiedenen Assoziationsformen nicht einzelne, distinkte Peaks bei Größenausschlusschromatographie-Experimenten detektierbar sind, sondern einzelne Peaks mit einem intermediären apparenten Molekulargewicht (Waheed & Figura, 1990; Hejtmancik *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007; Guterl *et al.*, 2009).

Die LecB-Varianten liegen glycosyliert vor

Da die beiden LecB-Varianten im Vergleich zum heterolog exprimierten LecB-Protein ein abweichendes Laufverhalten zeigten, wurde vermutet, dass diese beiden Proteine glycosyliert vorliegen. Die Untersuchung dieser Proteine mit einem kommerziell erhältlichen „DIG-Glycan-Detection-Kit“, das erfolgreich in mehreren Studien für die Detektion von Glycoproteinen eingesetzt wurde (Lindenthal & Elsinghorst, 1999; Hogenkamp *et al.*, 2008), lieferte einen eindeutigen Hinweis darauf, dass beide LecB-Varianten des Periplasmas glycosyliert vorliegen (Abb. 15).

Anschließend wurde überprüft, ob die Aminosäuresequenz von LecB potentielle N-Glycosylierungsstellen enthält. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des Lectins unter Verwendung des NetNGlyc 1.0 Servers (<http://.cbs.dtu.dk/services/netnglyc>) analysiert. Die Analyse ergab, dass das Protein zwei Konsensus-Sequenzen für N-Glycosylierungen enthält. Es wurde jedoch nur die Aminosäure Asn22 als N-Glycosylierungsstelle vorhergesagt (Abb. 16). Die Aminosäure Asn22 wurde auch schon in einer vorherigen Studie als potentielle N-Glycosylierungsstelle des Lectins vorgeschlagen (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Der NetNGlyc 1.0 Server ist eigentlich für die Vorhersage von N-Glycosylierungen in menschlichen Proteinen gedacht, wurde jedoch für geeignet erachtet, da die Konsensussequenz für die N-Glycosylierungen im Menschen auch in Bakterien vorkommt (Hitchen & Dell, 2006).

Eine anerkannte Methode für die Identifizierung von N-glycosylierten Proteinen ist die Verwendung von N-Glycosidasen, welche die N-Glycane in Glycoproteinen abspalten. In dieser Arbeit wurde die N-Glycosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum* verwendet, die schon erfolgreich für die Analyse einer Reihe von Glycoproteinen genutzt wurde und alle Typen von Asparagin-gebundenen N-Glycanen, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen, spaltet (Tarentino *et al.*, 1985). Die Inkubation der periplasmatischen LecB-Varianten mit der N-Glycosidase F führte zur Degradierung der höhermolekularen Variante, wodurch die Intensität der Bande, die das

niedermolekulare Protein enthielt, zunahm (Abb. 17). Dieser Befund suggeriert, dass die 13,8 kDa schwere LecB-Variante einen signifikanten Anteil an N-Glycanen enthält.

Da das Protein aber nur auf das Niveau der niedermolekularen LecB-Variante degradiert wurde und außerdem die N-Glycosidase F keinen Effekt auf letzteres ausübte, wurde spekuliert, dass das LecB-Protein eine weitere Glycosylierungsstelle enthält. Im Verlaufe der Analyse der Aminosäuresequenz des LecB-Proteins hinsichtlich potentieller N-Glycosylierungsstellen wurde neben der Konsensussequenz der N-Glycosylierung, die die N-Glycosylierungsstelle Asn22 enthielt, eine weitere Konsensussequenz gefunden. Daher wurde vermutet, dass die in dieser Konsensussequenz vorkommende Aminosäure Asn35 möglicherweise N-glycosyliert vorliegt, aber unter nativen Inkubationsbedingungen nicht für die N-Glycosidase F zugänglich war. Daher wurde diesmal der N-Glycosidase-Verdau der periplasmatischen LecB-Varianten unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Auch unter diesen Inkubationsbedingungen konnte nur die höhermolekulare LecB-Variante degradiert werden (ohne Abbildung).

Weiterhin wurde das periplasmatische Lectin mit der O-Glycosidase aus *Diplococcus pneumoniae* behandelt. Dieses Enzym wird zur Abspaltung von Gal β (1-3) GalNAc-Einheiten von O-Glycanen (Glycoproteinen oder Glycopeptiden) verwendet, wobei sowohl die Bindung zu Serin als auch zu Threonin gespalten wird. Die Inkubation der periplasmatischen LecB-Varianten mit der O-Glycosidase erfolgte sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen. Unter beiden Inkubationsbedingungen konnte kein Effekt auf die Proteine erzielt werden, was suggeriert, dass sie nicht O-glycosyliert vorliegen (ohne Abbildung).

Interessanterweise befindet sich die N-Glycosylierungsstelle Asn22 in der Zuckerbindestelle des LecB-Proteins und interagiert mit einer Hydroxyl-Gruppe der gebundenen Zucker-Liganden (Loris *et al.*, 2003). Daher ist es zulässig zu spekulieren, dass eine Modifizierung dieser Aminosäure durch eine N-Glycosylierung eine Veränderung der Liganden-Bindungsaffinität des Lectins hervorruft. Um Verwirrungen vorzubeugen, muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass bei Loris *et al.* (2003) Asn22 als Asn21 nummeriert ist. Diese Aminosäurenummerierungs-Verschiebung kommt dadurch zustande, dass in dieser Studie die Struktur des LecB-Proteins aufgeklärt wurde und deswegen die im reifen Lectin fehlende Initiatoraminosäure Methionin nicht mitgezählt wurde.

Es ist bewiesen, dass *P. aeruginosa* Proteine durch Glycosylierungen modifizieren kann (Power and Jennings, 2003). Bei den bisher beschriebenen Modifikationen handelt es sich um O-Glycosylierungen, die an die Zelloberflächen-Proteine α -Typ Flagellin und Pilin geknüpft

sind (Castric *et al.*, 2001; Schirm *et al.*, 2004 a/b). Diese Glycoproteine bilden die Untereinheiten der Flagelle bzw. der Pili, die bei der Anheftung des Pathogens an Oberflächen involviert sind (Ramphal *et al.*; 1996, Hahn, 1997). In einer Studie wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Glycosylierung des Flagellins eine signifikante Rolle bei der Virulenz von *P. aeruginosa* spielt (Arora *et al.*, 2005). Das Vorkommen von N-glycosylierten Proteinen in *P. aeruginosa* war bisher noch nicht bekannt. Somit wäre das Lectin LecB das erste beschriebene N-glycosylierte Protein in *P. aeruginosa*.

Welchen Einfluss die möglichen Glycosylierungen auf die Struktur, die Zuckerbindeaffinität und die Oligomerisierung des LecB-Proteins haben, muss in nachfolgenden Studien geklärt werden. Weiterhin muss überprüft werden, in welchem Oligomerisierungs- und Glycosylierungszustand das Lectin im Cytoplasma und der äußeren Membran vorliegt.

Das dimere LecB-Protein im Periplasma enthält LecB-spezifische Zucker

In den vorangegangenen Versuchen wurden Hinweise darauf gefunden, dass im Periplasma zwei unterschiedliche LecB-Oligomere existieren, die glycosyliert vorliegen. Außerdem ist bekannt, dass das LecB-Protein eine Zuckerspezifität zu p-Nitrophenyl- α -L-Fucose > L-Fucose > Fucosylamin = L-Galactose > D-Mannose > D-Fructose aufweist (Garber *et al.*, 1987). Daher wurde überprüft, ob das LecB-Protein mit den Glycosylresten der periplasmatischen LecB-Oligomere interagiert. Zunächst wurden durch die Inkubation des heterolog produzierten LecB-Histidin-Fusionsproteins mit der Periplasma-Fraktion des *P. aeruginosa*-Stamms PAO1 Interaktionen zwischen dem Fusionsprotein und den LecB-Oligomeren ermöglicht. Durch Immobilisierung des Fusionsproteins an eine IMAC-Säule und anschließende Inkubation der Säule mit einem Fucose-haltigen Puffer konnte das 28 kDa große Oligomer aus dem Periplasma isoliert werden (Abb. 18). Dieser Befund lässt vermuten, dass die Glycosylierungen des 28 kDa großen Oligomers LecB-spezifische Zucker enthalten. Daher ist es interessanterweise möglich, dass das 28 kDa große Oligomer durch Kohlenhydrat-vermittelte Interaktionen mit sich selbst, aber auch mit dem 42 kDa großen Oligomer eingehen kann.

4.4 Die N-Glycosylierungsstelle Asn22 beeinflusst den zellulären Transport von LecB

Es ist bekannt, dass N-Glycosylierungen in Eukaryoten eine Rolle bei der Verteilung von Proteinen innerhalb der Zelle spielen (Helenius & Aebi, 2001). Außerdem wurde im Rahmen einer Veröffentlichung vermutet, dass diese Funktion auch auf die N-Glycosylierungen in Bakterien zutrifft (Szymanski & Wren, 2005).

Auf Grund dessen wurde der Einfluss der N-Glycosylierungsstelle Asn22 auf den zellulären Transport von LecB untersucht. Dazu wurde die Aminosäure durch ortsspezifische Mutagenese gegen ein Alanin ausgetauscht. Bakterien des LecB-negativen Stamms PATI2, die das resultierende LecB^m-Protein synthetisierten, wurden für 16 und 48 h bei 37 °C auf NB-Agarplatten als ungesättigter Biofilm kultiviert. Anschließend erfolgten der immunologische Nachweis des LecB^m-Proteins in den einzelnen Zellfraktionen und der Vergleich mit der zellulären Verteilung des nativen LecB-Proteins (Abb. 20). Sowohl das native als auch das mutierte LecB-Protein konnten nach 16 h im Cytoplasma der Zellen detektiert werden. Das native Lectin wurde zusätzlich im Periplasma nachgewiesen. Nach 48 h wurde das native Lectin im Cytoplasma und der Gesamtmembran detektiert, während das mutierte LecB^m-Protein nicht mehr nachweisbar war. Diese Beobachtung lässt auf einen Einfluss der potentiellen N-Glycosylierungsstelle Asn22 auf die Translokation von LecB aus dem Cytoplasma in das Periplasma schließen. Wie schon in Kapitel 4.3. erwähnt, ist die Aminosäure Asn22 an der Zuckerbindung des LecB-Proteins beteiligt. Daher ist anzunehmen, dass sich durch den Austausch dieser Aminosäure gegen ein Alanin die Liganden-Bindungsaffinität des Lectins verändert hat. Falls das Lectin, wie zuvor vermutet (Kapitel 4.3), über einen Komplex mit einem interagierenden Liganden über die Cytoplasmamembran transportiert wird, würde es aufgrund der veränderten Bindungsaffinität zu diesem Liganden im Cytoplasma verbleiben. Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen einer früheren Studie spekuliert, dass eine intakte Zuckerbindestelle für den Transport von LecB aus dem Periplasma in die äußere Membran essentiell ist, da eine Variante des LecB-Proteins mit vollständig inaktivierter Zuckerbindestelle nach 24 h im Periplasma nachweisbar war, aber nicht von dort in die Membran transportiert wurde (Tielker, 2005).

Eine alternative Erklärung für den fehlenden Transport des Lectins über die innere Membran ist die Annahme, dass die N-Glycosylierung des Lectins ein Erkennungsmerkmal für einen bisher unbekanntem Transportmechanismus ist und deswegen der Transport des Lectins aus dem Cytoplasma nicht stattfinden kann.

Die fehlende Nachweisbarkeit der LecB-Variante nach 48 h Wuchsphase lässt sich dadurch erklären, dass das Protein aufgrund fehlender N-Glycosylierung destabilisiert und daher im

Cytoplasma degradiert wurde. Die Stabilisierung von Proteinen durch N-Glycosylierungen ist bei Eukaryoten eine gängige Strategie (Mitra *et al.*, 2006). So werden zum Beispiel das Lectin aus der Pflanze *Erythrina corralodendron* (ECorL) (Herrmann *et al.*, 1999) und das Agglutinin SBA aus der Sojabohne durch N-Glycosylierungen stabilisiert (Sinha *et al.*, 2005).

4.5 LecB interagiert mit Zuckerrezeptoren auf der Zelloberfläche

Es konnte gezeigt werden, dass das Lectin LecB über die Interaktion mit Rezeptoren, die LecB-spezifische Zucker enthalten, mit der äußeren Membran von *P. aeruginosa* assoziiert ist und putative LecB-Rezeptoren auf der Zelloberfläche des Pathogens existieren (Tielker *et al.*, 2005). Darüber hinaus liefern die Inhibierung der Biofilmbildung und die Verdrängung von Biofilmen mittels LecB-spezifischer Glycopeptide-Dendrimere (Kapitel 3.1.4) weitere Hinweise darauf, dass das LecB-Protein Oberflächen-exponiert vorliegt. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob es möglich ist, das Lectin von der Zelloberfläche von *P. aeruginosa*-Biofilmzellen zu verdrängen. Das LecB-Protein bindet an L-Fucose mit einer außergewöhnlich hohen Bindekonstante von $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, während es mit D-Galactose überhaupt nicht interagiert (Garber *et al.*, 1987). Weiterhin liegt das Minimum der Agglutinationsreaktion des LecB-Proteins bei 4°C, weswegen vermutet wurde, dass das Lectin bei dieser Temperatur mit geringster Affinität an die Oberflächen-Rezeptoren von *P. aeruginosa*-Zellen bindet. Nach Inkubation von Biofilmzellen des *P. aeruginosa*-Wildtypstamms PAO1 mit einem Fucose-haltigen Puffer bei 4 °C lag die Menge des von den Zellen verdrängten Lectins unter der immunologischen Nachweisgrenze. Daher wurde der Versuch mit Zellen des Wildtypstamms PAO1, die das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielten, wiederholt, um so die Syntheserate des Lectins zu erhöhen. Diesmal konnte das von der Zelloberfläche verdrängte Lectin eindeutig nachgewiesen werden. Die Spezifität der Verdrängung zeigte sich dadurch, dass die Inkubation mit D-Galactose keinen Effekt zeigte. Dieses Ergebnis demonstriert eindeutig eine Interaktion von LecB mit Kohlenhydratstrukturen auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa*-Biofilmzellen.

Dass Adhäsine auf der Zelloberfläche von Bakterien vorliegen, wurde bereits für Lectine anderer Spezies beschrieben. So sind das Mannose-spezifische FimH-Protein und das Galabiose-spezifische Lectin PapG aus *E. coli* an der Spitze der Typ 1-Pili bzw. des P-Pilus lokalisiert und an der Adhäsion des Bakteriums an verschiedene Wirtsepithelien beteiligt (Dodson *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2002). Dahingegen wurde das N-Acetyl-D-Galactosamin-spezifische Lectin EcLS des Gram-negativen Bakteriums *Eikenella corrodens*, das an

zahlreichen humanen Infektionen beteiligt ist, auf der Zelloberfläche nachgewiesen, ohne mit Zellfortsätzen assoziiert zu sein (Nakae *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 2002). Ein weiteres Oberflächen-exponiertes Lectin ist das Lactose-spezifische DltA-Protein des uropathogenen Organismus *Haemophilus ducreyi*, von dem vermutet wird, dass es die Bindung der Bakterien an das Epithel des Genitaltraktes initiiert (Leduc *et al.*, 2004).

4.6 Detektion von putativen LecB-Liganden in *P. aeruginosa*

Das LecB-Protein interagiert mit LecB-spezifischen Zuckerrezeptoren auf der Zelloberfläche und spielt eine Rolle bei der Biofilmbildung, der Pilus-Biogenese und der Protease IV-Aktivität von *P. aeruginosa* (Tielker *et al.*, 2005; Sonavane *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde in Kapitel 4.3 ausführlich diskutiert, ob das LecB-Protein über einen Co-Transport mit einem anderen Virulenzfaktor durch das Sec- oder das Tat-System oder einen noch nicht identifiziertes Transportsystem aus der Zelle gelangt. Aus diesem Grund wurde nach putativen LecB-Liganden in *P. aeruginosa*-Zellen gesucht. Dazu wurden Zellen des *P. aeruginosa* Wildtypstamms PAO1 als ungesättigter Biofilm auf NB-Agarplatten für 48 h bei 37 °C kultiviert. Im Anschluss an die Präparation der verschiedenen Zellfraktionen wurde mittels Far Western Blotting (Abb. 22A) unter Verwendung des isolierten LecB-Proteins und eines LecB-spezifischen Antiserums festgestellt, dass eine Reihe an putativen LecB-Interaktionspartnern im Cytoplasma, im Periplasma und in der Membranfraktion von *P. aeruginosa* existieren (Abb. 22B). In früheren Studien wurde das Lectin LecB für die Detektion von Glycoproteinen in der menschlichen Milch (Leman-Movshovich *et al.*, 2003) und dem Eiweiß von Hühnereiern (Lerrer & Gilboa-Garber, 2001) verwendet. Deswegen kann man spekulieren, dass es sich bei den detektierten Proteinen um Glycoproteine handelt. Diese These wird durch den Befund unterstützt, dass die Vorinkubation des Lectins mit L-Fucose zu keiner Detektion von Proteinen führte (ohne Abbildung). Unter dieser Annahme befinden sich Glycoproteine in der Membran, im Periplasma und im Cytoplasma von *P. aeruginosa*-Zellen, die mit dem Lectin LecB interagieren.

4.7 Identifizierung von OprF als LecB-Oberflächen-Rezeptor

Identifizierung des OprF-Proteins als putativen LecB-Liganden

Es wurde eine Reihe an putativen LecB-Liganden in *P. aeruginosa* detektiert. Um diese Liganden identifizieren zu können, wurden sie mittels affinitätschromatographischer

Methoden aus *P. aeruginosa*-Zellen isoliert. Die anschließende Identifizierung der Liganden erfolgte mittels MALDI-TOF-MS.

Zunächst wurden die Liganden durch Affinitätschromatographie über D-Mannose-Agarose isoliert. Hierbei wurde darauf spekuliert, dass die Liganden über das LecB-Protein unter der Ausnutzung der natürlichen Affinität des Lectins zu D-Mannose an der Säulenmatrix immobilisiert werden (Abb 23A). Als Ausgangsmaterial der Ligandensuche diente hierbei das Lysat von *P. aeruginosa*-Zellen des Wildtypstamms PAO1, die in NB-Medium für 48 h bei 37 °C inkubiert wurden. Neben dem Lectin LecB wurden zwei weitere Proteine aus dem Zelllysate isoliert (Abb. 23B, C) und anschließend mittels MALDI-TOF-MS-Analyse als die hypothetische, periplasmatische Glutaminase-Asparaginase (PA1337) und das *major outer membrane protein* OprF (PA1777) identifiziert.

Bei der Wiederholung des Experiments mit dem LecB-negativen *P. aeruginosa*-Stamm PATI2 konnte kein Protein isoliert werden. Dieser Befund zeigt auf, dass die Isolierung der Interaktionspartner unter Vermittlung des LecB-Proteins erfolgte und nicht auf unspezifischen Interaktionen der Proteine mit der D-Mannose-Agarose beruhte.

Um auszuschließen, dass das Porin OprF in dem LecB-negativen Stamm PATI2 nicht exprimiert wird und deswegen nicht isoliert werden konnte, wurde die Existenz dieses Proteins in diesem *P. aeruginosa*-Stamm durch Immunodetektion unter Verwendung eines OprF-spezifischen Antikörpers nachgewiesen (ohne Abbildung).

Die Funktion des Proteins PA1337 als Glutaminase-Asparaginase ist als hypothetisch vorhergesagt und der Anknüpfungspunkt für eine Interaktion mit LecB war nicht offensichtlich. Sehr interessant hingegen erschien die Interaktion mit OprF, einem Porin der äußeren Membran, die im Folgenden genauer untersucht wurde.

Das OprF-Protein gilt als ein unspezifisches Porin, das mit einer Kopienzahl von ungefähr 200.000 pro Zelle eines der Hauptproteine in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* (Bellido *et al.*, 1992) ist. OprF wird als ein multifunktionales Protein beschrieben, das unter anderem an der Aufrechterhaltung der Zellform beteiligt ist, mit dem Petidoglycan interagiert (Rawling *et al.*, 1998) und als Adhäsion fungiert (Azghani *et al.*, 2002).

Um die Interaktion des Lectins LecB mit dem OprF-Protein zu bestätigen, wurde das Porin aus der äußeren Membranfraktion von *P. aeruginosa*-Zellen unter Verwendung des LecB-Histidin-Fusionsproteins und einer IMAC-Säule isoliert. Als Ausgangsmaterial diente hierbei die äußere Membranfraktion des LecB-negativen *P. aeruginosa*-Stamms PATI2, der für 48 h bei 37 °C angezogen wurde. Im diesem Fall wurde ein LecB-negativer *P. aeruginosa*-Stamm verwendet, um auszuschließen, dass das nativ produzierte LecB-Protein die LecB-

Bindestellen des OprF-Proteins bedeckt. Zunächst wurden durch die Inkubation des LecB-Histidin-Fusionsproteins mit der äußeren Membranfraktion des LecB-negativen *P. aeruginosa*-Stamms Interaktionen zwischen dem Fusionsprotein und dem OprF-Protein ermöglicht. Nach der Immobilisierung von OprF an die IMAC-Säule mittels des LecB-Histidin-Proteins konnte es durch die Inkubation mit L-Fucose von der Säule eluiert werden. Das isolierte Protein (Abb. 24A) wurde durch MALDI-TOFF-MS analysiert und als das Porin OprF identifiziert. Durch einen Lectinblot mittels Peroxidase-gekoppelten LecB-Protein wurde die LecB-OprF-Interaktion erneut bestätigt (Abb. 24B).

Das äußere Membranprotein OprF liegt glycosyliert vor

Die Beobachtung, dass das OprF-Protein durch Inkubation mit Fucose von der Chromatographiesäule eluiert wurde, weist stark daraufhin, dass die Bindung von LecB an OprF über Kohlenhydrat-Interaktionen erfolgt. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob das OprF-Protein glycosyliert vorliegt.

Unter Verwendung des „DIG Glycan Detection Kits“ wurden Hinweise auf Glycosylierungen im OprF-Protein gefunden (Abb. 25). Die darauf folgende Analyse der Aminosäuresequenz des OprF-Proteins mit dem NetNGlyc 1.0 Server deklarierte die vier Aminosäuren Asn91, Asn120, Asn221 und Asn329 als potentielle N-Glykosylierungsstellen. Aufgrund dieser Analyse wurde das Porin OprF mit der N-Glycosidase F aus *Flavobacterium meningosepticum*, die schon für die Analyse der periplasmatischen LecB-Varianten verwendet wurde (Kapitel 3.2.2), inkubiert. Die Inkubation resultierte in der Degradierung des Proteins in drei niedermolekularen OprF-Varianten (Abb. 26). Dieser Befund spricht für die Existenz von drei N-Glycosylierungsstellen im OprF-Protein. Der direkte Nachweis der Glycane im OprF-Protein erfolgte durch den Verdau des Proteins mittels der N-Glycosidase F und die anschließende Detektion der abgespaltenen Glycane mittels MALDI-MS. Diese Glycan-Analyse wurde durch die Firma Protagen (Dortmund) durchgeführt. Auf diese Weise konnte in dieser Arbeit das OprF-Protein als erstes N-glycosyliertes Protein von *P. aeruginosa* identifiziert werden.

Es wurden zwar starke Hinweise darauf gefunden, dass das Lectin LecB glycosyliert vorliegt, aber ein direkter Nachweis von Glycanen in dem Protein wurde nicht erbracht.

Dass N-Glycosylierungen in äußeren Membranproteinen vorkommen, ist bekannt. Ein Beispiel gibt das N-glycosylierte, 40 kDa schwere, MOMP (*major outer membrane protein*)

des Pathogens *Chlamydia trachomatis*, welches *high-mannose-type* Oligosaccharide enthält und für die Aufrechterhaltung der Integrität des Bakteriums essentiell ist (Swanson & Kuo, 1996; Kuo *et al.*, 1996). Es wird diskutiert, dass es über die Glycosylierung mit Mannose-6-Phosphat- Rezeptoren der humanen Zellen interagieren kann und so an der Adhäsion beteiligt ist (Kuo *et al.*, 1996, Kuo *et al.*, 2004).

An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass noch andere putative LecB-Liganden in *P. aeruginosa* mittels Far Western Blotting detektiert wurden (Kapitel 3.4.1). Wenn man davon ausgeht, dass es sich hierbei um transiente Interaktionspartner handelt, wäre es sinnvoll, die für die Isolierung von OprF durchgeführten Experimente in Verbindung mit *cross-linking* Methoden zu wiederholen.

Das OprF-Protein ist der Zelloberflächen-Rezeptor von LecB

Als nächstes wurde der Einfluss des OprF-Proteins auf die Lokalisation des Lectins LecB überprüft. Zu Beginn der Untersuchungen wurde auf die Verwendung eines *lecB*-Expressionsplasmids verzichtet. Da dies jedoch zu einem nicht eindeutigen Ergebnis führte (ohne Abbildung), wurden Bakterien des OprF-negativen *P. aeruginosa*-Stamms H636, die das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielten, für 48 h bei 37 °C auf NB-Agarplatten als ungesättigter Biofilm kultiviert. Anschließend erfolgten der immunologische Nachweis des LecB-Proteins in den einzelnen Zellfraktionen und der Vergleich mit der zellulären Verteilung des LecB-Proteins im Wildtypstamm PAO1. Das LecB-Protein konnte, wie erwartet, im Cytoplasma und der Fraktion der Gesamtmembran des Wildtypstamms nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu wurde das LecB-Protein im OprF-negativen Stamm H636 im Cytoplasma, Periplasma und erstmals in der extrazellulären Fraktion, aber nicht in der Fraktion der Gesamtmembran detektiert. Diese Beobachtung zeigt eindeutig, dass das OprF-Protein essentiell für die Bindung des Lectins an die Zelloberfläche von *P. aeruginosa* ist, aber keinen Einfluss auf die Sekretion des Lectins ausübt, was gegen einen OprF-vermittelten Co-Transport des Lectins aus den Bakterienzellen spricht.

Die Detektion des LecB-Proteins im Periplasma war unter diesen Versuchsbedingungen, d.h. unter der Verwendung des *lecB*-Expressionsplasmids pBBC2, überraschend und wirft die Frage auf, ob das Protein auch auf der periplasmatischen Seite der äußeren Membran mit dem OprF-Protein interagiert.

Es ist bekannt, dass das OprF-Protein aus einer N-terminalen Domäne, die ein achtsträngiges β -Faltblatt in der äußeren Membran ausbildet, und einer C-terminalen, periplasmatischen Domäne, die reich an alpha-Helices ist, besteht (Sugawara *et al.*, 2006). Daher ist es denkbar, dass das LecB-Protein sowohl im Periplasma als auch auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa*-Zellen mit dem OprF-Protein interagiert.

Im Rahmen einer Studie (Tielker *et al.*, 2005) konnte gezeigt werden, dass das LecB-Protein einen Einfluss auf die Biofilmbildung hat, in der äußeren Membran mit Glycostrukturen interagiert und gereinigtes, von außen zugegebenes LecB-Protein an putative Kohlenhydrat-Liganden auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa*-Biofilmzellen bindet. Aufgrund dessen wurde vorgeschlagen, dass das Lectin mit spezifischen Glycostrukturen auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa*-Biofilmzellen assoziiert vorliegt und durch die multivalente Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche von Organismen der eigenen oder auch einer anderen Spezies an der Aggregation von Zellen beteiligt ist und so zur Stabilität einer Biofilmstruktur beiträgt. Da der direkte Beweis, dass das LecB-Protein Zelloberflächen-exponiert vorliegt, in dieser Studie nicht erbracht wurde, bezweifelte eine andere Gruppe (Sonavane *et al.*, 2006) den direkten Einfluss des Lectins auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*. Sie zeigte auf, dass das LecB-Protein eine Rolle bei der Pilus-Biogenese spielt und hat damit den Einfluss des Lectins auf die Biofilmbildung begründet.

Die in Kapitel 3.4.4 und 3.3.1 beschriebenen Untersuchungen konnten nun eindeutig demonstrieren, dass das Lectin LecB mit spezifischen Glycostrukturen des OprF-Proteins auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa*-Biofilmzellen assoziiert vorliegt und somit direkt zur Biofilmbildung und Pathogenität von *P. aeruginosa* beitragen kann.

5 Zusammenfassung

P. aeruginosa ist ein fakultativ pathogenes Bakterium, das in Patienten mit geschwächtem Immunsystem für eine Vielzahl von Infektionen, insbesondere in den Lungen von CF-Patienten, verantwortlich ist. Zusätzlich zur hohen intrinsischen Resistenz gegenüber vielen der gängigen Antibiotika wird die Behandlung von *P. aeruginosa*-induzierten Infektionen durch die Formation von Biofilmen auf dem betroffenen Gewebe erschwert. Zum pathogenen Potential des Bakteriums tragen diverse Virulenzfaktoren bei. Darunter befinden sich die beiden Lectine LecA und LecB, die eine natürliche Affinität zu D-Galactose bzw. D-Mannose und L-Fucose aufweisen und eine Rolle bei der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* spielen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Funktion und Lokalisierung des Lectins LecB.

Nach der Expression des *lecA*- und des *lecB*-Gens im heterologen Wirt *E. coli* erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung der Lectine unter Ausnutzung der intrinsischen Affinität zu D-Galactose bzw. D-Mannose. Die gereinigten Lectine wurden erfolgreich für die Analyse der inhibierenden Wirkung von LecA- und LecB-spezifischen Glycopeptid-Dendrimeren eingesetzt.

Der Sekretionsmechanismus der zu einer extracytoplasmatischen Lokalisierung von LecB führt, ist derzeit unbekannt. Durch Zellfraktionierung und anschließendem immunologischen Nachweis wurden zwei LecB-Varianten im Periplasma von *P. aeruginosa* detektiert. Dieses Vorhandensein periplasmatischer Intermediate beweist, dass die Sekretion des Lectins durch einen Zweischritt-Sekretionsmechanismus erfolgen muss. Ferner wurde erstmalig gezeigt, dass im Periplasma zwei voneinander verschiedene LecB-Oligomere vorliegen, wobei eines das apparente Molekulargewicht eines Dimers und das andere das apparente Molekulargewicht eines Trimers aufweist. Das Dimer wird aus 12,6 kDa großen Monomeren und das Trimer aus 13,8 kDa großen Monomeren ausgebildet. Mittels entsprechender Nachweismethoden wurde gezeigt, dass das 12,6 kDa große Monomer wahrscheinlich Fucose- oder Mannosereste und das 13,8 kDa große Monomer am Asparaginrest 22 eine N-Glycosylierung trägt.

Durch den immunologischen Nachweis in subzellulären Fraktionen mit einer LecB-Variante, in der die N-Glycosylierungsstelle Asn22 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, konnte nachgewiesen werden, dass die Integrität dieser (N-Glycosylierungs-) stelle Voraussetzung für eine LecB-Sekretion über die Cytoplasmamembran ist. Es ist bekannt, dass die

Aminosäure Asn22 in der Zuckerbindestelle des Lectins vorliegt. Dies wirft die Frage auf, ob eine veränderte Zuckerbindeaffinität oder die N-Glycosylierung des Lectins direkt die molekulare Erklärung für die Unterschiede bei der Translokation des Proteins über die innere Membran ist.

Außerdem wurde in dieser Arbeit das äußere Membranprotein OprF als Zelloberflächenrezeptor des Lectins LecB und als erstes N-glycosyliertes Protein in *P. aeruginosa* überhaupt identifiziert. Dieser Befund bietet einen Einstieg in weiterführende Studien zum Verhalten von *P. aeruginosa* während früher Phasen von Infektionen, in denen Adhäsionsphänomene an Gewebe von entscheidender Bedeutung sind. Sollte eine Modulation von Bindeeigenschaften zu einer Veränderung der Infektiosität führen, würden Strategien zur Veränderung der LecB- OprF-Interaktionen Wege zur Entwicklung neuartiger Therapeutika eröffnen können. Ferner könnte ein detaillierteres Verständnis dieser neuen Oberflächenstrukturen Grundlage für die Entwicklung neuer und wirksamer Vakzine gegen *P. aeruginosa* sein.

Summary

P. aeruginosa, a facultative pathogenic bacterium, is responsible for a number of infections in immunocompromised patients, especially for cases of pneumonia in patients suffering from cystic fibrosis. In addition to the extensive intrinsic resistance against antibiotics, the treatment of *P. aeruginosa*-induced infections is complicated by the formation of biofilms in the affected tissue. Different factors of virulence, including the lectins A and B, which have a high natural affinity to D-galactose, D-mannose and L-fucose and play an important role in the formation of biofilms of *P. aeruginosa*, contribute to the pathogenicity of these bacteria. The purpose of this study was the examination of the function and localization of lectin B.

The intrinsic affinity to D-galactose and D-mannose, was used to purify the lectins by chromatography after gene expression in *E. coli*. The purified lectins were used to analyse the inhibitory effects of LecA- and LecB-specific glycopeptide dendrimers.

The mechanism of secretion leading to an extra-cytoplasmatic localization of LecB is still unknown. Two different variants of LecB were identified in the periplasm of *P. aeruginosa* by cell fractionation and immunological analysis. The presence of periplasmatic intermediates proves that LecB secretion is a two-step mechanism.

Moreover, two different periplasmic oligomers of LecB were identified for the first time, one with the molecular weight of a dimer, the other of a trimer. The dimer is composed of 12.6

kDa monomers and the trimer of 13.8 kDa monomers. It is shown that the 12.6 kDa monomer is fucosylated or mannosylated and that the 13.8 kDa monomer carries an N-linked-glycosylation at residue Asn22.

Immunological analysis of the cellular location of a LecB-variant which carried mutation Asn22Ala revealed that the integrity of this N-linked-glycosylation is critical for the secretion of LecB to the cell surface. It is known that amino acid Asn22 is located at the LecB glycosylation-site, a fact that raises the question whether the differences in translocation of the protein over the inner membrane can be explained by a modified affinity of glycosylation or by the N-linked-glycosylation of the lectin itself.

Moreover, this study describes for the first time the outer membrane protein OprF as a surface receptor of LecB and as an N-linked-glycosylated protein in *P. aeruginosa*. These findings may guide the way to further studies regarding early phases of infection by *P. aeruginosa*, in which adhesion to tissues is critical. If the modulation of *P. aeruginosa* binding to host tissues results in reduced infectivity, strategies to alter the LecB-OprF-interactions could lead to the development of new therapeutical agents. Moreover, a precise understanding of these surface structures could allow for the development of new anti *P. aeruginosa* vaccines.

6 Literatur

- Abraham, S.N., Beachey, E.H., Simpson, W.A. (1983).** Adherence of *streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells. *Infect Immun* **41**: 1261-1268
- Abraham J.M., Freitag C.S., Clements J.R., Eisenstein B.I. (1985).** An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5724-5727
- Abu-Qarn, M., Eichler, J., Sharon, N. (2008).** Not just for Eukarya anymore: protein glycosylation in Bacteria and Archaea. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 544-550
- Adam, E.C., Mitchell, B.S., Schumacher, D.U., Grant, G., Schumacher, U. (1997a).** *P. aeruginosa* PA-II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am J Resp Cri Care Med* **155**: 2102-2104
- Adam, E.C., Schumacher, D.U., Schumacher, U. (1997b).** Cilia from a cystic fibrosis patient react to ciliotoxic *Pseudomonas aeruginosa* II lectin in a similar manner to normal control cilia: a case report. *J Laryngol Otol* **111**: 760-762
- Adam J., Pokorná M., Sabin C., Mitchell E.P., Imberty A., Wimmerová M. (2007).** Engineering of PA-III lectin from *Pseudomonas aeruginosa* – Unravelling the role of the specificity loop for sugar preference. *BMC Struct Biol* **7**: 36
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen T. (2006).** A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**: 1114-1128
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402
- Andre, S., Kaltner H., Kopitz J., Siebert H.-C. (2006).** Glycosciences: Wie der Zuckercode entschlüsselt wird. *Biospektrum* **12**: 706-709
- Aronson, M., Medalia, O., Schori, L., Mirelman, D., Sharon, N., Ofek, I. (1979).** Prevention of colonization of the urinary-tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl α -D-mannopyranoside. *J Infect Dis* **139**: 329-332
- Arora, S.K., Neely, A.N., Blair, B., Lory, S., Ramphal, R. (2005).** Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect Immun* **73**: 4395-4398
- Autar, R., Khan, A.S., Schad, M., Hacker, J., Liskamp, R.M.J., Pieters, R.J. (2003).** Adhesion inhibition of F1C-fimbriated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* PAK and PAO by multivalent carbohydrate ligands. *Chembiochem* **4**: 1317-1325
- Avichezer, D., Katcoff, D.J., Garber, N.C., Gilboa-Garber, N. (1992).** Analysis of the amino acid sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic PA-I lectin. *J Biol Chem* **267**: 23023-23027
- Avichezer, D., Gilboa-Gaber, N., Garber, N.C., Katcoff, D.J. (1994).** *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin gene molecular analysis and expression in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1218**: 11-20
- Azghani, A.O., Idell, S., Bains, M., Hancock, R.E.W. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb Pathog* **33**: 109-114
- Bachmann, B. (1983).** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiol Rev* **47**: 180-230
- Bajolet-Laudinat, O., Girod-de Bentzmann, S., Tournier, J.M., Madoulet, C., Plotkowski, M.C., Chippaux, C., Puchelle, E. (1994).** Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect Immun* **62**: 4481-4487
- Baneyx, F. (1999).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**: 411-421
- Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J., Vasil, M.L. (2004).** A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* **53**: 1089-1098
- Bartels, K. (2005).** Lektin B aus *Pseudomonas aeruginosa*. Evaluierung des Anwendungspotentials als "Affinitäts-Tags". Diplomarbeit, Ruhr-Universität-Bochum

- Barthelson, R., Mobasser, A., Zopf, D., Simon, P. (1998).** Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells is inhibited by sialylated oligosaccharides. *Infect Immun* **66**: 1439-1444
- Beachey, E.H. (1981).** Bacterial adherence. Chapman and Hall, London
- Becker, J.W., Reeke, G.N. Jr., Wang, J.L., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. (1975).** The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides *J Biol Chem* **25**: 1513-1524
- Bellido, F., Martin, N.L., Siehnel, R.J., Hancock, R.E.W. (1992).** Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. *J Bacteriol* **174**: 5196-5203
- Benz, I. & Schmidt, M.A. (2002).** Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **45**: 267-276
- Berks, B.C., Sargent, F., Palmer, T. (2000).** The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**: 260-274
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523
- Bitter, W. (2003).** Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* **179**: 307-314
- Blocker, A., Komoriya, K., Aizawa, S. (2003).** Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 3027-3030
- Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein V., Jadeja, L. (1983).** Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* **5**: 279-313
- Bos R., van der Mei, H.C., Buscher H.J. (1999).** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions- its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 179-230
- Boteva, R.N., Bogoeva, V.P., Stoitsova, S.R. (2005).** PA-I lectin from *Pseudomonas aeruginosa* binds acyl homoserine lactones. *Biochim Biophys Acta* **1747**: 143-149
- Botzenhart, K., Döring, G. (1993)** *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. Plenum Press, New York
- Boyd, W.C. & Reguera, R.M. (1949).** Hemagglutinating substances in various plants. *J Immunol* **62**: 333-339
- Boyd, W.C. & Shapeleigh, E. (1954).** Specific precipitation of plant agglutinins (lectin). *Science* **119**: 419
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Bradley, D.E. (1980).** A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26**: 146-154
- Braveny, I., & Krump-Schmidt, W. (1985).** *Pseudomonas aeruginosa*. W Zuckschwerdt Verlag, München
- Brinkman, F.S., Bains, M., Hancock, R.E.W. (2000).** The amino terminus of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model. *J Bacteriol* **182**: 5251-5255
- Brint, J.M. & Ohman, D. E. (1995).** Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* **177**: 7155-7163
- Brown, M.R.W., Allison, D.G., Gilbert, P. (1988).** Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother* **22**: 777-780
- Brown, M.R.W. & Gilbert, P. (1993).** Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol* **74**: 87-97
- Burnette, W.N. (1994).** AB₅ADP-ribosylating toxins: comparative anatomy and physiology. *Structure* **2**: 151-158
- Burley S.K., Petsko G.A. (1985).** Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science* **229**: 23-28
- Castignetti, D. (1997).** Probing of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* with the Ferripyochelin Receptor A Gene and the Synthesis of Pyochelin in *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Curr Microbiol* **34**: 250-257

- Castric, P., Cassels, F.J., Carlson, R.W. (2001).** Structural characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycan. *J Biol Chem* **276**: 26479-26485
- Chemani C., Imberty A., de Bentzmann S., Pierre M., Wimmerová M., Guery B.P., Faure K. (2009).** Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* **77**: 2065-2075
- Chen, C.P., Song, S.C., Gilboa-Garber, N., Chang, K.S., Wu, A.M. (1998).** Studies on the binding site of the galactose-specific agglutinin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Glycobiology* **8**: 7-16
- Chiang, P. & Burrows, L.L. (2003).** Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**: 2374-2378
- Cioci, G., Mitchell, E.P., Gautier, C., Wimmerova, M., Sudakevitz, D., Perez, S., Gilboa-Garber, N., Imberty, A. (2003).** Structural basis of calcium and galactose recognition by the lectin PA-IL of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* **555**: 297-301
- Connell I., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S., Svanborg C. (1996).** Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9827-9832.
- Conway, S.P., Brownlee, K.G., Denton, M., Peckham, D.G. (2003).** Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am J Respir Med* **2**: 321-332
- Cornelis, P. & Matthijs, S. (2002).** Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent *pseudomonads*: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* **4**: 787-798
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, E.C., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322
- Costerton, J.W., Irwin R.T., Cheng, K.J. (1981).** The role of bacterial surface structures in pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* **8**: 303-338
- Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. (1987).** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**: 435-464
- Costerton, J.W. & Anwar, H. (1994).** *Pseudomonas aeruginosa*: the microbe and the pathogen. In: Baltch, A.L. & Smith, R.P. (eds.): *Pseudomonas aeruginosa* infections and treatment Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 1-20
- Costerton, J.M., Lewandowski Z., De Beer D., Caldwell D., Korber D., James, G. (1994).** Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* **176**: 2137-3142
- Costerton, J.W. (1999).** Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 217-221
- Costerton, J.W. & Stewart, P.S. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135-138
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322
- Costerton, J.W. (2001).** Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol* **9**: 50-52
- Costerton, J.W. (2002).** Anaerobic biofilm infections in cystic fibrosis. *Mol Cell* **10**: 699-700
- Creuzenet, C. (2004).** Characterization of CJ1293, a new UDP-GlcNAc6 dehydratase from *Campylobacter jejuni*. *FEBS Lett* **559**: 136-140
- Cripps, A.W., Dunkley, M.L., Taylor, D.C., Cousins, S., Clancy, R.L. (1995).** Immunity to *Pseudomonas aeruginosa* induced by OprF following intestinal immunization. *Adv Exp Med Biol* **37**: 761-763
- Cryz Jr., S.J., Pitt, T.L., Fuerer, E., Germanier, R. (1984).** Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **44**: 508-513
- Darbre, T., & Reymond, J.-L. (2008).** Glycopeptide dendrimers for biomedical applications. *Curr Top Med Chem* **8**: 1286-1293
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A. (2003).** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**: 1027-1036
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298

- de Haan, L. & Hirst, T.R. (2004).** Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms. *Mol Membr Biol* **21**: 77-92
- Diggle S.P., Stacey R.E., Dodd C., Cámara M., Williams P., Winzer K. (2006).** The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **8**: 1095–1104.
- Dodson K.W., Pinkner J.S., Rose T., Magnusson G., Hultgren S.J., Waksman G. (2001).** Structural basis of the interaction of the pyelonephritic *E. coli* adhesin to its human kidney receptor. *Cell* **105**: 733-743
- Doig P., Smith N.R., Todd T., Irvin R.T. (1987).** Characterization of the binding of *Pseudomonas aeruginosa* alginate to human epithelial cells. *Infect Immun* **55**: 1517-1522
- Doig, P., Sasrty P.A., Hodges, R.S., Lee K.K., Paranchych, W., Irwin R.T. (1990).** Inhibition of pilus-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells by monoclonal antibodies directed against pili. *Infect Immun* **58**: 124-130
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193
- Drickamer, K. & Taylor, M.E. (2002).** Glycan arrays for functional glycomics. *Genome Biol* **3**: 1034
- Duguid, J.P., Smith, I.W., Dempster, G., Edmunds, P.M. (1955).** Nonflagellar filamentous appendages ("fimbriae") and hemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J Pathol Bacteriol* **70**: 335
- Dunn, S.D. (1986).** Effects of the modification of transfer buffer composition on the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**: 144-153
- Duplay, P., Szmelcman, S., Bedouelle, H., Hofnung, M. (1987).** Silent and functional changes in the periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. I. Transport of maltose. *J Mol Biol* **194**: 663-673
- Economou, A. (1999).** Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* **7**: 315-320
- Eggert, T., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R., Jaeger, K.E. (2000).** A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur J Biochem* **267**: 6459-6469
- Ehrlich, P. (1891a).** Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Über Ricin *Dtsch Med Wschr* **17**: 976-979
- Ehrlich, P. (1891b).** Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Über Abrin *Dtsch Med Wschr* **17**: 1218-1219
- Elgavish, S. & Shaanan, B. (1997).** Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem Sci* **22**: 462-467
- Espinosa-Urgel, M. (2003).** Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J Bacteriol* **185**: 699-700
- Evans, L.R. & Linker, A. (1973).** Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **116**: 915-924
- Fan, J.L., Peterson, J.W., Prabhakar, B.S. (2000).** Adjuvant effects of cholera toxin b subunit on immune response to recombinant thyrotropin receptor in mice. *J Autoimmun* **14**: 43-52
- Farahvash, M.R. & Arad, S. (2007).** *Clostridium botulinum* type A toxin for the treatment of upper face animation lines: an Iranian experience. *J Cosmet Dermatol* **6**: 152-158.
- Fergie, J.E., Shema, S.J., Lott, L., Crawford, R. & Patrick, C.C. (1994).** *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. *Clin Infect Dis* **18**: 390-394
- Filloux, A. (2004).** The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 163-179
- Finnen, R.L., Martin, N.L., Siehnel, R.J., Woodruff, W.A., Rosok, M., Hancock, R.E. (1992).** Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF by use of truncated OprF derivatives and monoclonal antibodies. *J Bacteriol* **174**: 4977-4985
- Flemming, H.C. & Wingender, J. (2001).** Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* **43**: 1-8

- Friedman, L., Kolter, R. (2004 a).** Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* **51**: 675-690
- Friedman, L., Kolter, R. (2004 b).** Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* **186**: 4457-4465
- Gabius, H.-J., & Gabius, S. (1997).** Glycosciences: Status and Perspectives. Chapman & Hall, Weinheim
- Gabius, H.J., Andre, S., Kaltner, H., Siebert, H.C. (2002).** The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta* **1572**: 165-177
- Gambello, M.J., Kaye S., Iglewski B.H. (1993).** LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* **61**: 1180-1184
- Gamper, M., Ganter, B., Polito, M. R., Haas, D. (1992).** RNA processing modulates the expression of the *arcDABC* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **226**: 943-957
- Garber, N.C., Guempel, U., Gilboa-Garber, N., Doyle, R.J. (1987).** Specificity of the fucose-binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **48**: 331-334
- Gavel, Y. & von Heijne, G. (1990).** Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**: 433-442
- Gilboa-Garber, N., Mizrahi, L., Garber, N. (1972).** Purification of the galactose-binding hemagglutinin of *Pseudomonas aeruginosa* by affinity column chromatography using sepharose. *FEBS Lett* **28**: 93-95
- Gilboa-Garber, N. (1972).** Purification and properties of hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells. *Biochim Biophys Acta* **273**: 165-173
- Gilboa-Garber, N., Mizrahi, L., Garber, N. (1977).** Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Biochem* **55**: 975-981
- Gilboa-Garber, N. (1988).** *Pseudomonas aeruginosa* lectins as a model for lectin production, properties, applications and functions. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* **270**: 3-15
- Gilboa-Garber, N. & Garber, N. (1989).** Microbial lectin cofunction with lytic activities as a model for a general basic lectin role. *FEMS Microbiol Rev* **63**: 211-222
- Gilboa-Garber, N., & Garber, N. (1992).** Microbial lectins. In: Allen, H.J., Kisailus, E.C. (eds.): Glycoconjugates: composition, structure and function. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 541-591
- Gilboa-Garber, N., Sudakevitz, D., Sheffi, M., Sela, R., Levene, C. (1994).** PA-I and PA-II lectin interactions with the AB0(H) and P blood group glycosphingolipids may contribute to the broad spectrum adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tissue in secondary infects. *Glycoconjug J* **11**: 414-417
- Gilboa-Garber, N. (1997).** Multiple aspects of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Nova Acta Leopoldina* **301**: 153-177
- Gilboa-Garber, N. & Sudakevitz, D. (1999).** The hemagglutinating activities of *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL exhibit opposite temperature profiles due to different receptor types. *FEMS Immunol Med Microbiol* **25**: 365-369
- Gilboa-Gaber, N., Katcoff, D.J., Garber, N.C. (2000).** Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-IIL lectin gene and protein compared to PA-IL. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**: 53-57
- Glick, J. & Garber, N. (1983).** The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J Gen Microbiol* **129**: 3085-3090
- Gomez, M.I. & Prince, A. (2008).** Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. *Pediatr Pulmonol* **43**: 11-19
- Govan, J.R. & Deretic, V. (1996).** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**: 539-574
- Guo, L., Han, A.D., Bates, D.L., Cao, J., Chen, L. (2007).** Crystal structure of a conserved Nterminal domain of histone deacetylase 4 reveals functional insights into glutamine-rich domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4297-4302
- Gupta, S.K., & Ghosh, T.C. (2001)** Gene expressivity is the main factor in dictating the codon usage variation among the genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **273**: 63-70

- Guterl, J.K., Andexer, J.N., Sehl, T., von Langermann, J., Frindi-Wosch, I., Rosenkranz, T., Fitter, J., Gruber, K., Kragl, U., Eggert, T., Pohl, M. (2009).** Uneven twins: comparison of two enantiocomplementary hydroxynitrile lyases with alpha/beta-hydrolase fold. *J Biotechnol* **141**: 166-173
- Hahn, H.P. (1997).** The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Gene* **192**: 99-108
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hancock, R.E.W., Egli, C., Karunaratne, N. (1994).** Molecular organization and structural role of outer membrane macromolecules. Bacterial Cell Envelope, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam
- Hancock, R.E.W. (1997).** The role of fundamental research and biotechnology in finding solutions to the global problem of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* **24**: 148-150
- Hancock, R.E.W., & E.A., Worobec. (1998).** Outer membrane proteins Biotechnology Handbooks, 10, Plenum Press, London.
- Hancock, R.E., Brinkman, F.S. (2002).** Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* **56**: 17-38
- Hauber H.P., Schulz M., Pforte A., Mack D., Zabel P., Schumacher U. (2008).** Inhalation with fucose and galactose for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Int J Med Sci* **5**: 371-376
- Hauri H.P., Kappeler F., Andersson H., Appenzeller C. (2000).** ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci* **113**: 587-596
- Halling K.C., Halling A.C., Murray E.E., Ladin B.F., Houston L.L., Weaver R.F. (1985).** Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. *Nucleic Acids Res* **13**: 8019-8033
- Hegge, F.T., Hitchen, P.G., Aas, F.E., Kristiansen, H., Lovold, C., Egge-Jacobsen, W., Panico, M., Leong, W.Y., Bull, V., Virji, M., Morris, H.R., Dell, A., Koomey, M. (2004).** Unique modifications with phosphocholine and phosphoethanolamine define alternate antigenic forms of *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 10798-10803
- Hejtmancik, J.F., Wingfield, P.T., Sergeev, Y.V. (2004).** Beta-crystallin association. *Experimental Eye Research* **79**: 377-383
- Helenius, A., & Aebi, M. (2001).** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**: 2364-2365
- Henrichfreise B., Wiegand I., Pfister W. Wiedemann B. (2007).** Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 4062-4070
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., Ala'Aldeen, D. (2004).** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N., Givskov, M. (2003).** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* **22**: 3803-3815
- Herrmann, J.M., Malkus, P., Schenkman, R. (1999).** Out of the ER-outfitters, escorts and guides. *Trends Cell Biol* **9**: 5-7
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K., Molin, S. (2000).** Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**: 2395-2407
- Hitchen, P.G. & Dell, A. (2006).** Bacterial glycoproteomics. *Microbiology* **152**: 1575-1580
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59
- Hogenkamp, A., Isohadouten, N., Reemers, S.S., Romijn, R.A., Hemrika, W., White, M.R., Tefsen, B., Vervelde, L., van Eijk, M., Veldhuizen, E.J., Haagsman, H.P. (2008).** Chicken lung lectin is a functional C-type lectin and inhibits haemagglutination by influenza A virus. *Vet Microbiol* **130**: 37-46
- Holloway, B.W., Krishnapillai, V., Morgan, A.F. (1979).** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**: 73-102

- Holloway, B.W. & Matsumoto, H. (1984).** *Pseudomonas aeruginosa*. In: O'Brien, S.J. (ed.): Genetic maps 1984, Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 194-197
- Høiby, N. (2002).** Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros* **1**: 249-254
- Huang, H., Hancock, R.E.W. (1993).** Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**: 7793-7800
- Huang, B., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S. (2003).** FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**: 7068-7076
- Hueck, C.J. (1998).** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433
- Hughes, R.C. (1983).** Glycoproteins. Chapman and Hall, London
- Hung, C.S., Bouckaert, J., Hung, D., Pinkner, J., Widberg, C., DeFusco, A., Auguste, C.G., Strouse, R., Langermann, S., Waksman, G., Hultgren, S.J. (2002).** Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Molecular Microbiology* **44**: 903-915
- Imberly, A., Wimmerova, M., Mitchell, E.P., Gilboa-Garber, N. (2004).** Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect* **6**: 221-228
- Imberly A., Mitchell, E.P., Wimmerova, M. (2005).** Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Current Opinion in Structural Biology* **15**: 525-534
- Irvin, R.T. & Bautista, D.L. (1999).** Hope for the post-antibiotic era? *Nature Biotechnol* **17**: 20-21
- Jackson, K.D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M.R., Wozniak, D.J. (2004).** Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 4466-4475
- Jaeger, K.-E., Kinscher, D.A., König, B., König, W. (1992a).** Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemistry and potential role as a virulence factor. In: Høiby, N., Pedersen, S.S. (eds.): Cystic fibrosis, basic and clinical research Elsevier, Amsterdam. pp. 119-121
- Jaeger, K.-E., Kinscher, D.A., Philippou, S., Høiby, N., Winkler, U.K. (1992b).** Lipase as a virulence factor in pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections: biochemical and histopathological evidence. (abstr.) International VAAM/DGHM Workshop on molecular pathogenesis of bacteria - basic and applied aspects. Schierke
- Jaeger, K.-E. (1994).** Extrazelluläre Enzyme von *Pseudomonas aeruginosa* als Virulenzfaktoren. *Immun Infekt* **22**: 177-180
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Rosenau, F., Werner, M., Lang, D., Dijkstra, B.W., Zonta, A., Reetz, M.T. (1997).** Bacterial lipases for biotechnological applications. *J Mol Catalyl B: Enzymatic* **3**: 3-12
- Johansson E.M., Crusz S.A., Kolomiets E., Buts L., Kadam R.U., Cacciarini M., Bartels K.-M., Diggle S.P., Cámara M., Williams P., Loris R., Nativi C., Rosenau F., Jaeger K.-E., Darbre T., Reymond J.-L. (2008).** The inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB. *Chem. Biol.* **15**: 1249-1257
- Joosten, J.A.F., Loimaranta, V., Appeldoorn, C.C.M., Haataja, S., El Maate, F.A., Liskamp, R.M.J., Finne, J., Pieters, R.J. (2004).** Inhibition of *Streptococcus suis* adhesion by dendritic galabiose compounds at low nanomolar concentration. *J Med Chem* **47**: 6499-6508
- Kadurugamuwa, J.L. & Beveridge, T.J. (1995).** Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to Gentamicin; a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* **177**: 3998-4008
- Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., Kimura, N. (2004).** Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Science* **95**: 377-384
- Kilburn, L., Poole, K., Meyer, J.M., Neshat, S. (1998).** Insertion mutagenesis of the ferric pyoverdine receptor FpvA of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of permissive sites and a region important for ligand binding. *J Bacteriol* **180**: 6753-6756
- Kirkeby, S., Wimmerova M., Moe, D., Hansen, A.K. (2007).** The mink as an animal model for *Pseudomonas aeruginosa* adhesion: binding of the bacterial lectins (PA-IL and PA-IIL) to neoglycoproteins and to sections of pancreas and lung tissues from healthy mink. *Microbes Infect* **9**: 566-573

- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. (2003a).** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**: 1511-1524
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. (2003b).** Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* **50**: 61-68
- Kobayashi, H., Kobayashi, O., Kawai, S. (2009).** Pathogenesis and clinical manifestations of chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* and its biofilms in the airway tract. *J Infect Chemother* **15**: 125-142
- Köhler, T., Epp, S.F., Curty, L.K., Pechère, J.C. (1999).** Characterization of Mex T, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6300-6305
- König, B., Jaeger, K.-E., Sage, A.E., Vasil, M.L., König, W. (1996).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediation release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes and monocytes). *Infect Immun* **64**: 3252-3258
- Koster M., Bitter W., Tommassen J. (2000).** Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* **290**: 325-331
- Köttgen E., Reutter W., Tauber R. (2003).** Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine. *Med Klin (Munich)* **98**: 717-738
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop II, R.M., Peterson, K.M. (1994).** pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-802
- Kraulis, P. (1991).** MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Crystallogr* **24**:924-950
- Krell T., Greco F., Nicolai M.C., Dubayle J., Renauld-Mongénie G., Poisson N., Bernard I. (2003).** The use of microcalorimetry to characterize tetanus neurotoxin, pertussis toxin and filamentous hemagglutinin. *Biotechnol Appl Biochem* **38**: 241-251
- Kuo, C., Takahashi, N., Swanson, A.F., Ozeki, Y., Hakomori, S. (1996).** An N-linked high-mannose type oligosaccharide, expressed at the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*, mediates attachment and infectivity of the microorganism to HeLa cells. *J Clin Invest* **98**: 2813-2818
- Kuo, C.C., Lee, A., Campbell, L.A. (2004).** Cleavage of the N-linked oligosaccharide from the surfaces of *Chlamydia* species affects attachment and infectivity of the organisms in human epithelial and endothelial cells. *Infect Immun* **72**: 6699-6701
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laine, R.A. (1997).** Information capacity of the carbohydrate code. *Pure and Applied Chemistry* **69**: 1867-1873
- Lalli G., Bohnert S., Deinhardt K, Verastegui C., Schiavo G. (2003).** The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol* **11**: 431-437
- Lameignere E., Malinová L., Sláviková M., Duchaud E., Mitchell E.P., Varrot A., Sedo O., Imberty A., Wimmerová M. (2008).** Structural basis for mannose recognition by a lectin from opportunistic bacteria *Burkholderia cenocepacia*. *Biochem J* **411**: 307-318
- Landsteiner, K. (1902).** Beobachtungen über Hämagglutination. *Wien Klin Wochenschr*: 774
- Landsteiner, K. & Raubitschek, R. (1908).** Beobachtungen zur Hämolysse und Hämagglutination. *Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I: Orig.* **45**: 660-667
- Lanne, B., Ciopraga, J., Bergstrom, J., Motas, C., Karlsson, K.A. (1994).** Binding of the galactose-specific *Pseudomonas aeruginosa* lectin, PA-I, to glycosphingolipids and other glycoconjugates. *Glycoconj J* **11**: 292-298
- Langermann, S. & Ballou, W.R. (2001).** Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infections. *J Infect Dis* **183**: 84-86
- Laughlin, R.S., Musch, M.W., Hollbrook, C.J., Rocha, F.M., Chang, E.B., Alverdy, J.C. (2000).** The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Ann Surg* **232**: 133-142

- Leduc, I., Richards, P., Davis, C., Schilling, B., Elkins, C. (2004).** A novel lectin, DltA, is required for expression of a full serum resistance phenotype in *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* **72**: 3418-3428
- Lee, K.K., Yu, L., Macdonald, D.L., Paranchych, W., Hodges, R.S., Irvin, R.T. (1996).** Anti-adhesin antibodies that recognise a receptor binding motif (adhesintope) inhibit pilus/fimbrial-mediated adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* to asialo-GM(1) receptors and human buccal epithelial cell surface receptors. *Can J Microbiol* **42**: 479-486
- Lehninger, A.L., David, L.N., Michael, M.C. (1998).** Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Lerrer, B., Zinger-Yosovich, K.D., Avrahami, B., Gilboa-Garber, N. (2007).** Honey and royal jelly, like human milk, abrogate lectin-dependent infection-preceding *Pseudomonas aeruginosa* adhesion. *ISME J* **1**: 149-155
- Lesman-Movshovich E., Lerrer B., Gilboa-Garber N. (2003).** Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* lectins by human milk glycans. *Can J Microbiol* **49**: 230-235
- Levitt M., & Perutz M.F. (1988).** Aromatic rings act as hydrogen bond acceptors. *J Mol Biol* **201**: 751-754
- Li, F., Yu, J., Yang, H., Wan, Z., Bai, D. (2008).** Effekts of ambroxol on alginate of mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Microbiol* **57**: 1-7
- Lindenthal, C., & Elsinghorst, E.A. (2001).** Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA glycoprotein adheres to human intestine epithelial cells. *Infect Immun* **69**: 52-57
- Liu, P.V. (1979).** Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Duggert, R.G. (ed.): Clinical manifestations if infection and current therapy. Academic Press, New York, pp. 63-88
- Livermore, M. (2009).** Has the era untreatable infections arrived? *J Antimicrob Chemother* **64**: 29-36
- Llamas, M.A., Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J. (2000).** Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability. *J Bacteriol* **182**: 4764-4772
- Loris, R. (2002).** Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta* **1572**: 198-208
- Loris, R., Tielker, D., Jaeger, K.-E., Wyns, L. (2003).** Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **331**: 861-870
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275
- Lundquist, J.J., Debenham, S.D., Toone, E.J. (2000).** Multivalency effects in protein-carbohydrate interaction: The binding of the Shiga-like toxin 1 binding subunit to multivalent C-linked glycopeptides. *J Org Chem* **65**: 8245-8250
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B. (2002).** Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**: 194-222
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M., Saier, M.H., Jr. (2003).** Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* **1611**: 223-233
- Mah, T.C. & O'Toole, G.A. (2001).** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**: 34-39
- Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A. (2003).** A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**: 306-310
- Marotte K., Préville C., Sabin C., Moumé-Pymbock M., Imberty A., Roy R. (2007).** Synthesis and binding properties of divalent and trivalent clusters of the Lewis a disaccharide moiety to *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III. *Org Biomol Chem* **5**: 2953-2961
- Matsukawa, M. & Greenberg, E.P. (2004).** Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**: 4449-4456
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H.C. (1999).** The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int J Biol Macromol* **26**: 3-16
- Merril, C.R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**: 477-488

- Merritt, E.A., Sarfaty, S., van den Akker, F., L'Hoir, C., Martial, J.A., Hol, W.G. (1994). Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci* **3**: 166-175
- Merritt, E.A. & Hol, W.G. (1995). AB5 toxins. *Curr Opin Struct Biol* **5**: 165-171
- Merz, A.J., So, M., Sheetz M.P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**: 98-102
- Mescher, M.F. & Strominger, L.F. (1976). Structural (shape-maintaining) role of the cell surface glycoprotein of *Halobacterium salinarium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 2687-2691
- Mewe, M., Tielker, D., Schönberg, R., Schachner, M., Jaeger, K.-E., Schumacher, U. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *J Laryng Otol* **119**: 595-599
- Mitchell, E., Houles, C., Sudakevitz, D., Wimmerova, M., Gautier, C., Perez, S., Wu, A.M., Gilboa-Garber, N., Imberty, A. (2002). Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. *Nat Struct Biol* **9**: 918-921
- Mitchell, E.P., Sabin, C., Snajdrova, L., Pokorna, M., Perret, S., Gautier, C., Hofr, C., Gilboa-Garber, N., Koca, J., Wimmerova, M., Imberty, A. (2005). High affinity fucose binding of *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III: 1.0 Å resolution crystal structure of the complex combined with thermodynamics and computational chemistry approaches. *Proteins* **58**: 735-746
- Mirelman, D. & Ofek, I. (1986). Introduction to microbial lectins and agglutinins. In: Mirelman, D. (ed.): Microbial lectins and agglutinins. John Wiley, New York, pp. 1-19
- Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T.N.C., Surolia, A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem Sci* **31**: 156-163
- Moens, S. & Vanderleyden, J. (1997). Glycoproteins in Prokaryotes. *Arch Microbiol* **168**: 169-175
- Morimoto, M., Saimoto, H., Usui, H., Okamoto, Y., Minami, S., Shigemasa, Y. (2001). Biological activities of carbohydrate-branched chitosan derivatives. *Biomacromolecules* **2**: 1133-1136
- Morrow A.L., Ruiz-Palacios G.M., Jiang X., Newburg D.S. (2005). Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr* **135**: 1304-1307
- Morvan, F., Meyer, A., Jochum, A., Sabin, C., Chevotot, Y., Imberty, A., Praly, J.-P., Vasseur, J.-J., Souteyrand, E., and Vidal, S. (2007). Fucosylated pentaerythrityl phosphodiester oligomers (PePOs): Automated synthesis of DNA-based glycoclusters and binding to *Pseudomonas aeruginosa* lectin (PA-III). *Bioconjugate Chem* **18**: 1637-1643
- Mouricout M., Petit J.M., Carias J.R., Julien R. (1990). Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbriae: treatment of experimental colibacillosis. *Infect Immun* **58**: 98-106
- Mulvey, G., Kitov, P.I., Marcato, P., Bundle, D.R., Armstrong, G.D. (2001). Glycan mimicry as a basis for novel anti-infective drugs. *Biochimie* **83**: 841-847
- Muramoto, K. & Kamiya, H. (1990). The amino-acid sequence of multiple lectins of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* and its homology with animal lectins. *Biochim Biophys Acta* **1039**: 42-51
- Murphy, J.T. & Lagarias, J.C. (1997). Purification and characterization of recombinant affinity peptide-tagged oat phytochrome A. *Photochem Photobiol* **65**: 750-758
- Nakae, H., Ebisu, S., Okada, H. (1993). Production and characterization of monoclonal antibodies against bacterial lectin of *Eikenella corrodens*. *J Periodontal Res* **28**: 404-410
- Newburg D.S., Ruiz-Palacios G.M., Morrow A.L. (2005). Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr* **25**: 37-58
- Nicas, T.L. & Iglewski, B.H. (1986). Toxins and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Socolow, J.R. (ed.) The bacteria, Vol X: The biology of *Pseudomonas*. Academic Press, Orlando, pp. 195-213
- Nikaido, H. (1994). Maltose transport system of *Escherichia coli*: an ABC-type transporter. *FEBS Lett* **346**: 55-58
- Nilsson C. L. (2007). Lectins Analytical Technologies, Elsevier, Amsterdam, Oxford

- Ochsner, U.A. & Reiser, J. (1995).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 6424-6428
- Ochsner, U.A., Snyder, A., Vasil, A.I., Vasil, M.L. (2002).** Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 8312-8317
- Ofek I., Kahane I., Sharon N. (1996).** Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. *Trends Microbiol* **4**: 297-299
- Ofek, I., Hasy, D.L., Sharon, N. (2003).** Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 181-191
- Ohman, D.E. & Chakrabarty, A.M. (1981).** Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate. *Infect Immun* **33**: 142-148
- Oliver A., Canton R., Campo P., Baquero F., Blázquez J. (2000).** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**: 1251-1254
- Olivier, N.B., Chen, M.M., Behr, J.R., Imperiali, B. (2006)** In vitro biosynthesis of UDP-N,N'-diacetylbaucillosamine by enzymes of the *Campylobacter jejuni* general protein glycosylation system. *Biochemistry* **45**: 13659-13669
- O'Toole, G.A. & Kolter, B. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304
- Pai, H., Kim, J., Lee, J.H., Choe, K.W., Gotoh, N. (2001).** Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 480-484
- Palleroni, N.J. (1993).** *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 231-251
- Parsek M.R., & Greenberg E.P. (2005).** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 27-33
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H. (1993).** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**: 1127-1130
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P. (1994).** Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 197-201
- Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P. (1995).** A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1490-1494
- Pedersen, S.S. (1992).** Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **28**: 1-79
- Picard, B., Denamur, E., Barakat, A., Elison, J., Goulet, P. (1994).** Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. *J Med Microbiol* **40**: 313-322
- Pinkart, H.C. & White, D.C. (1997).** Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J Bacteriol* **179**: 4219-4226
- Poole, K. (2001).** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 500-508
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975).** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599
- Power, P.M. & Jennings, M.P. (2003).** The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 211-222
- Preston, M.J., Fleiszig, S.M., Zaidi, T.S., Goldberg, J.B., Shorridge, V.D., Vasil, M.L., Pier, G.B. (1995).** Rapid and sensitive method for evaluating *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors during corneal infections in mice. *Infect Immun* **63**: 3497-3501
- Pokorná M., Cioci G., Perret S., Rebuffet E., Kostlánová N., Adam J., Gilboa-Garber N., Mitchell E.P., Imberty A., Wimmerová M. (2006).** Unusual entropy-driven affinity of *Chromobacterium violaceum* CV-III towards fucose and mannose. *Biochemistry* **45**: 7501-7510.
- Price, B.M., Galloway, D.R., Baker, N.R., Gilleland, L.B., Staczek, J., Gilleland, H.E. Jr. (2001).** Protection against *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection in mice by genetic immunization against outer membrane protein F (OprF) of *P. aeruginosa*. *Infect Immun* **69**: 3510-3515

- Prince, A. (1992).** Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. *Microb Pathog* **13**: 251-260
- Quinn, J.P. (1992).** Intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Quichio, F.A. (1989).** Atomic interactions between proteins and carbohydrates. *Am Crystallogr Assoc* **25**: 23-35
- Ramphal, R., & Pier G.B. (1985).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. *Infect Immun* **47**: 1-4
- Ramphal, R., Arora, S.K., Ritchings, B.W. (1996).** Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* **154**: 170-174
- Rawling, E.G., Brinkman, F.S., Hancock, R.E.W. (1998).** Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J Bacteriol* **180**: 3556-3562
- Reisner, A., Hoiby, N., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2005).** Microbial pathogenesis and biofilm development. *Contrib Microbiol* **12**: 114-131
- Renkonen, K.O. (1948).** Studies of hemagglutinins present in seeds of some representatives of leguminosae *Ann Med Exp Fenn* **26**: 66-72
- Richard, P., Le Floch, R., Chamoux, C., Pannier, M., Espaze, E., Richet, H. (1994).** *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains. *J Infect Dis* **170**: 377-383
- Richardson, P.D. & Steiner, M. (1995).** Principles of cell adhesion. CRC Press, Boca Raton
- Rini, J.M. (1995).** Lectin structure. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**: 551-577
- Rivier, D.A. & Darekar, M.R. (1975).** Inhibition of the adhesiveness of enteropathogenic *E. coli*. *Experientia* **31**: 662-664
- Roberts J.A., Marklund B.I., Ilver D., Haslam D., Kaack M.B., Baskin G., Louis M., Mollby R., Winberg J., Normark S. (1994).** The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 11889-11893
- Rodríguez-Herva, J.J., Ramos, J.L. (1996).** Characterization of an OprL null mutant of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **178**: 5836-5840
- Römling, U., Fiedler, B., Bosshammer, J., Grothues, D., Greipel, J., von der Hardt, H. Tümmler, B. (1994).** Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis* **170**: 1616-1621
- Romeo, J.M., Esmon, B., Zusman, D.R. (1986).** Nucleotide sequence of the myxobacterial hemagglutinin gene contains four homologous domains. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 6332-6336
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2000).** Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**: 1023-1032
- Rouschop K.M., Sylva M., Teske G.J., Hoedemaeker I., Pals S.T, Weening J.J., van der Poll T., Florquin S. (2006).** Urothelial CD44 facilitates *Escherichia coli* infection of the murine urinary tract. *J Immunol* **177**: 7225-7232
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491
- Sakuragi, Y., & Kolter, K. (2007).** Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**: 5383-5386
- Salit, J.E. & Gotschlich E.C. (1977a).** Hemagglutination of purified type I *Escherichia coli* pili. *J E Med* **148**: 1169-1181
- Salit, J.E. & Gotschlich E.C. (1977b).** Type I *Escherichia coli* pili. Characterization of binding to monkey kidney cells. *Exp Med* **146**: 1182-1194
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140-1154
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L.A., Davies, D.G., Gilbert, P. (2004).** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* **186**: 7312-7326

- Scharfman, A., Arora, S.K., Delmotte, P., Van Brussel, E., Mazurier, J., Ramphal, R., Roussel, P. (2001). Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **69**: 5243-5248
- Schirm, M., Soo, E.C., Aubry, A.J., Austin, J., Thibault, P., Logan, S.M. (2003). Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **48**: 1579-1592
- Schirm, M., Arora, S.K., Verma, A., Vinogradov, E., Thibault, P., Ramphal, R., Logan, S. M. (2004a). Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**: 2523-2531
- Schirm, M., Kalmokoff, M., Aubry, A., Thibault, P., Sandoz, M., Logan, S.M. (2004b). Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *J Bacteriol* **186**: 6721-6727
- Schmidt, L. & Tampe, R. (2002). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 754-760
- Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., Welsh, M. J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**: 229-236
- Schnell, D.J. & Etzler, M.E. (1988). cDNA cloning, primary structure, and in vitro biosynthesis of the DB58 lectin from *Dolichos biflorus*. *J Biol Chem* **263**: 14648-14653
- Schoenhofen, I.C., McNally, D.J., Vinogradov, E., Whitfield, D., Young, N.M., Dick, S., Wakarchuk, W.W., Brisson, J.R., Logan, S.M. (2006) Functional characterization of dehydratase/aminotransferase pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*: enzymes distinguishing the pseudaminic acid and bacillosamine biosynthetic pathways. *J Biol Chem* **281**: 723-732
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**: 2066-2079
- Shaanan, B., Lis, H., Sharon, N. (1991). Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. *Science* **254**: 862-866
- Sharon, N. & Ofek, I. (2002). Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues. *Crit Rev Food Sci Nutr* **42**: 267-272
- Sharon, N. (2006). Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta* **1760**: 527-537
- Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M.R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* **62**: 1264-1277
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., Puhler, A. (1986). Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* **118**: 640-59
- Simon P.M., Goode, P.L., Mobasser, A., Zopf, D. (1997). Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect Immun* **65**: 750-757
- Simpson J.A., Smith S.E., Dean R.T. (1989). Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radic Biol Med* **6**: 347-353
- Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., Welsh, M.J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**: 552-555
- Sinha, S., Mitra, N., Kumar, G., Bajaj, K., Suroliya, A. (2005). Unfolding studies on soybean agglutinin and concanavalin a tetramers: a comparative account. *Biophys J* **88**: 1300-1310
- Sivaraman, T., Kumar, T.K., Jayaraman, G., Yu, C. (1997). The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation. *J Protein Chem* **16**: 291-297.
- Sixma, T.K., Pronk, S.E., Kalk, K.H., van Zanten, B.A., Berghuis, A.M., Hol, W.G. (1992). Lactose binding to heat-labile enterotoxin revealed by X-ray crystallography. *Nature* **355**: 561-564
- Sonawane A., Jyot J., Ramphal R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins. *Infect Immun* **74**: 7035-7039
- Steinberger, R.E., Allen, A.R., Hansa, H.G., Holden, P.A. (2002). Elongation correlates with nutrient deprivation in *Pseudomonas aeruginosa*-unsaturated biofilms. *Microb Ecol* **43**: 416-423

- Steuer, M.K., Herbst, H., Beuth, J., Steuer, M., Pulverer, G., Matthias, R. (1993). Hemmung der bakteriellen Adhäsion durch Lektinblockade bei durch *Pseudomonas aeruginosa* induzierter Otitis externa im Vergleich zur lokalen Therapie mit Antibiotika. *Otorhinolaryngol Nova* **3**: 19-25
- Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. (2006). Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* **312**: 404-410
- Stewart P.S., Costerton J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *14*: 135-138
- Stillmark, H. (1888). Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Inaug. Diss Dorpat.
- Stimson, E., Virji, M., Makepeace, K., Dell, A., Morris H.R., Payne, G., Saunders, J.R., Jennings, M.P., Barker, S., Panico, M., Blench, I., Moxon, R. (1995) Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol Microbiol* **17**: 1201-1214
- Stoitsova, S.R., Boteva, R.N., Doyle, R.J. (2003). Binding of hydrophobic ligands by *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin. *Biochim Biophys Acta* **1619**: 213-219
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Binkmann, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, K., Spencer, D.L., Wong, G.K.-S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S., Olsen, M.V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective highlevel expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89
- Sudakevitz, D., Levene, C., Sela, R., Gilboa-Garber, N. (1996a). Differentiation between human red cells of P^k and p blood types using *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin. *Transfusion* **36**, 113-116
- Sudakevitz, D., Levene, C., Gilboa-Garber, N. (1996b). The galactophilic lectins of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aplysia* differentiate between I-positive and I-negative human erythrocytes. In: Van Driessche, E., Rouge, P., Beeckmans, T.C., Bog-Hansen, T.C. (eds.): Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry, Textop, Hellerup, pp. 207-211
- Sudakevitz, D., Kostlanova, N., Blatman-Jan, G., Mitchell, E.P., Lerrer, B., Wimmerova, M., Katcoff, D.J., Imberty, A., Gilboa-Garber, N. (2004). A new *Ralstonia solanacearum* high-affinity mannose-binding lectin RS-III structurally resembling the *Pseudomonas aeruginosa* fucose-specific lectin PA-III. *Mol Microbiol* **52**: 691-700
- Sugawara, E., Nestorovich, E.M., Bezrukov, S.M., Nikaïdo, H. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. *J Biol Chem* **281**: 16230-16237
- Sumner, J.B. & S.F. Howell (1936). The identification of the hemagglutination of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* **32**: 277-237
- Swanson, A.F. & Kuo, C.C. (1996). The 18-kDa lectin-binding protein of *chlamydia trachomatis* is different from the 18-kDa histone-like protein. *FEMS Microbiol Lett* **137**: 189-192
- Szymanski, C.M. & Wren, B.W. (2005). Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nat Rev Microbiol* **3**: 225-237
- Tamber, S., & Hancock, R.E.W. (2004). The Outer Membranes of *Pseudomonads*. The *Pseudomonads*, Vol. I., Kluwer Academic, New York
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M., Plummer, T.H. Jr. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry* **24**: 4665-4671
- Tavallaie, M., Chenal, A., Gillet, D., Pereira, Y., Manich, M., Gibert, M., Raffestin, S., Popoff, M.R., Marvaud, J.C. (2004). Interaction between the two subdomains of the C-terminal part of the botulinum neurotoxin A is essential for the generation of protective antibodies. *FEBS Lett* **572**: 299-306
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 523-533

- Thibault, P., Logan, S.M., Kelly, J.F., Brisson, J.R., Ewing, C.P., Trust, T.J., Guerry, P. (2001).** Identification of the carbohydrate moieties and glycosylation motifs in *Campylobacter jejuni* flagellin. *J Biol Chem* **276**: 34862-34870
- Thomas, W.E., Trintchina E., Forero M., Vogel V., Sokurenko E.V. (2002)** Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* **109**: 913-923
- Thomas, R.J. & Brooks, T.J. (2004).** Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to human respiratory epithelial cells. *Microb Pathog* **36**: 83-92
- Tielker, D. (2001).** Klonierung, Überexpression, Reinigung und physiologische Charakterisierung zweier Lektine aus *P. aeruginosa*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**: 1313-1323
- Tielker, D. (2005).** Physiologie und Biotechnologie des Lectins B aus *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., Molin S. (2000).** Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* **182**: 6482-6489
- Trias, J., Rosenberg, E.Y., Nikaido, H. (1988).** Specificity of the glucose channel formed by protein D1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **938**: 493-496
- Trias, J., Nikaido, H. (1990).** Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* **265**: 15680-15684
- Turnbull W.B., Precious B.L., Homans S.W. (2004).** Dissecting the cholera toxin-ganglioside GM1 interaction by isothermal titration calorimetry. *J Am Chem Soc* **126**: 1047-1054
- Uhlinger DJ, White DC. (1983).** Relationship Between Physiological Status and Formation of Extracellular Polysaccharide Glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Appl Environ Microbiol* **45**: 64-70
- Van Delden, C. & Iglewski (1998).** Cell-to-Cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* **4**: 551-560
- Vanden Broek, D., Horvath, C., De Wolf, M.J.S. (2007).** *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**: 1771-1775
- Vierbuchen, M. (1991).** Lectin receptors. *Curr Top Pathol* **83**: 271-361
- Vijayakumar, S., Merckx-Jacques, A., Ratnayake, D.B., Gryski, I., Obhi, R.K., Houle, S., Dozois, C.M., Creuzenet, C. (2006).** Cj1121c, a novel UDP-4-keto-6-deoxy-GlcNAc C-4 aminotransferase essential for protein glycosylation and virulence in *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **281**: 22733-22743
- Villalobo, A., Nogales-González, A., Gabius, H.-J. (2006).** A guide to signaling pathways connecting protein-glycan interaction with the emerging versatile effector functionality of mammalian lectins. *Trends Glycosci Glycotechnol* **1188**: 1-37
- Vodkin, L. O., Rhodes, P.R., Goldberg, R.B. (1983).** cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell* **34**: 1023-1031
- von Bismarck, P., Schneppenheim, R., Schumacher, U. (2001).** Successful treatment of *Pseudomonas aeruginosa* respiratory tract infection with a sugar solution – a case report on a lectin based therapeutic principle. *Klin Pädiatr* **213**: 285-287
- von der Lieth, C.W., Frank, M., Lindhorst, T.K. (2002).** Molecular dynamics simulations of glycoclusters and glycodendrimers. *J Biotechnol* **90**: 311-337
- von Specht, B.U., Gabelsberger, J., Knapp, B., Hundt, E., Schmidt-Pilger, H., Bauernsachs, S., Lenz, U., Domdey, H. (2000).** Immunogenic efficacy of differently produced recombinant vaccines candidates against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Biotechnol* **83**: 3-12
- Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., Iglewski, B.H. (2003).** Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**: 2080-2095
- Wagner, V.E., Gillis, R.J., Iglewski, B.H. (2004).** Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* **22**: 15-20
- Wagner V.E., & Iglewski B.H. (2008).** *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clin Rev Allergy Immunol* **35**: 124-134

- Waheed, A. & Figura, K. (1990).** Rapid Equilibrium between Monomeric, Dimeric and Tetrameric Forms of the 46-Kda Mannose 6-Phosphate Receptor at 37-Degrees-C-Possible Relation to the Function of the Receptor. *European Journal of Biochemistry* **193**: 47-54
- Wang, J., Mushegian, A., Lory, S., Jin, S. (1996).** Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by in vivo selection. *Proc Natl Acad Sci* **17**: 10434:10439
- Weerepana, E. & Imperiali, B. (2006).** Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**: 91-101
- Weis, W.I., Kahn, R., Fourme, R., Drickamer, K., Hendrickson, W.A. (1991).** Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* **254**: 1608-1615
- Weis, W.I., Drickamer, K., Hendrickson, W.A. (1992).** Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* **360**: 127-134
- Weis, W.I. & Drickamer, K. (1996).** Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* **65**: 441-473
- Whitney, P.L., Powell, J.T., Sanford, G.L. (1986).** Oxidation and chemical modification of lung beta-galactoside-specific lectin. *Biochem J* **238**: 683-689
- Whiteley, M., Lee, K.M., Greenberg, E.P. (1999).** Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 13904-13909
- Wilhelm, S., Tommassen, J., Jaeger, K.-E. (1999).** A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6977-6986
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., Jaeger, K.E. (2007).** The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* **189**: 6695-6703
- Williams, P., Bainton, N.J., Swift, S., Chabra, S.R., Winson, M.K., Stewart, G.S., Salmond, G.P., Bycroft, B.W. (1992).** Small molecule-mediated density-dependent control of gene expression in prokaryotes: bioluminescence and the biosynthesis of carbapenem antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **79**: 161-167
- Wimmerova M., Mishra N.K., Pokorna., Koca J. (2009).** Importance of Oligomerisation on *Pseudomonas aeruginosa* Lectin-II binding affinity. In silico and in vitro mutagenesis. *J Mol Model* **15**: 673-679
- Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., Flemming, H.C. (2001).** Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol* **336**: 302-314
- Winkler, U.K., Wingender, J., Jaeger, K.-E. (1985).** Infektion der Atemwege mit *Pseudomonas aeruginosa* bei der Cystischen Fibrose. *Klin Wochenschr* **63**: 490-498
- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M., Williams, P. (2000).** The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* **182**: 6401-6411
- Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., Heerikhuizen, H.V., Leij, L.D. (1976).** An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **74**: 160-170
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W. (1989).** Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478
- Woodruff, W.A. & Hancock, R.E. (1998).** Construction and Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein F-deficient mutants after in vitro and in vivo insertion mutagenesis of the cloned gene. *J Bacteriol* **170**: 2592-2598
- Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A., Parsek, M.R. (2003).** Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 7907-7912
- Wu, L., Holbrook, C., Zaborina, O., Ploplys, E., Rocha, F., Pelham, D., Chang, E., Musch, M., Alverdy, J. (2003).** *Pseudomonas aeruginosa* expresses a lethal virulence determinant, the PA-I lectin/adhesin, in the intestinal tract of a stressed host: the role of epithelia cell contact and molecules of the quorum Sensing Signaling System. *Ann Surg* **238**: 754-764

- Wu L., Estrada O., Zaborina O., Bains M., Shen L., Kohler J.E., Patel N., Musch M.W., Chang E.B., Fu Y.X., Jacobs M.A., Nishimura M.I., Hancock R.E., Turner J.R., Alverdy J.C. (2005). Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **309**: 774-777
- Wu A.M., Wu J.H., Singh T., Liu J.H., Tsai M.S., Gilboa-Garber N. (2006). Interactions of the fucose-specific *Pseudomonas aeruginosa* lectin, PA-IIL, with mammalian glycoconjugates bearing polyvalent Lewis (a) and ABH blood group glycotopes. *Biochimie* **88**: 1479-1492
- Wylie, J.L., Worobec, E.A. (1995). The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **177**: 3021-3026
- Yamada, M., Nakae, H., Yumoto, H., Shinohara, C., Ebisu, S., Matsuo, T. (2002). N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Eikenella corrodens* induces intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) production by human oral epithelial cells. *J Med Microbiol* **51**: 1080-1089
- Yoon S.S., Hennigan R.F., Hilliard G.M., Ochsner U.A., Parvatiyar K., Kamani M.C., Allen H.L., DeKievit T.R., Gardner P.R., Schwab U., Rowe J.J., Iglewski B.H., McDermott T.R., Mason R.P., Wozniak D.J., Hancock R.E., Parsek M.R., Noah T.L., Boucher R.C., Hassett D.J. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* **3**: 593-603
- Young, N.M., Johnston, R.A., Watson, D.C. (1991). The amino acid sequence of peanut agglutinin. *Eur J Biochem* **196**: 631-637
- Young, N.M., Brisson, J.R., Kelly, J., Watson, D.C., Tessier, L., Lanthier, P.H., Jarrell, H.C., Cadotte, N., Michael, F.St., Aberg, E., Szymanski, M. (2002). Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **277**: 42530-42539
- Zhang, Y., Bak, D.D., Heid, H., Geider, K. (1999). Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. *J Mol Biol* **289**: 1239-1251
- Zheng, C.F., Simcox, T., Xu, L., Vaillancourt, P. (1997). A new expression vector for high level protein production, one step purification and direct isotopic labeling of calmodulin-binding peptide fusion proteins. *Gene* **186**: 55-60
- Zopf, D. & Roth, S. (1996). Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet* **347**: 1017-1021

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kai-Malte Bartels
Geburtsdatum: 05.05.1973
Geburtsort: Essen
Familienstand: ledig
Wohnort: Im Dahlacker 74, 40223 Düsseldorf

Schulbildung:

1979 – 1983 Grundsule an der Meisenburgstrasse, Essen
1983 – 1994 Goethe-Gymnasium, Essen

Hochschulbildung:

10/1996 – 01/2005 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Abschluss Diplom, Januar 2005
Diplomarbeit: Thema: „Lektin B aus *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluierung des Anwendungspotentials als „Affinitäts-Tag“
Betreuer: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Anstellung

02/2005-12/2005 als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Promotion

seit 03/2006 Promotion im gleichen Institut mit dem Thema: „Lokalisierung und Funktion des Lectins B aus *Pseudomonas aeruginosa*“
Betreuer: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger