

Physiologie und Biotechnologie 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

Denis Tielker

aus

Dortmund

Düsseldorf 2005

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

Referent: Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jäger

Korreferent: Herr Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2005

meiner Familie, meinen Freunden

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Zudem möchte ich mich für das rege Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und für die ungezählten Diskussionen bedanken. Für die Unterstützung bei der Veröffentlichung meiner Ergebnisse, für die Einräumung großer experimenteller Freiheit und für die Ermöglichung internationalen wissenschaftlichen Austausches bin ich besonders dankbar.

Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der „*Pseudomonas*“-Gruppe bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. Frank Rosenau und Frau Dr. Susanne Wilhelm danke ich für die vielen Anregungen, die große Diskussionsbereitschaft und die konstruktive Kritik an meiner Arbeit. Frau Silke Heckmann und Herrn Alexander Schulz danke ich für die Durchsicht des Manuskriptes.

Bei Frau Monika Gehsing möchte ich mich für die experimentelle Unterstützung bei der Aufreinigung des LecB-Proteins sowie der „LecB-getagten“ Proteine bedanken.

Den Herren Prof. Dr. Hans-Curt Flemming, Dr. Jost Wingender und Dr. Martin Strathmann der Abteilung Aquatische Mikrobiologie an der Universität Duisburg-Essen danke ich für die intensive Zusammenarbeit und die große Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Remy Loris aus dem *Laboratorium voor Ultrastructuur* des *Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie* an der *Vrije Universiteit Brussel*, danke ich für die konstruktive Kooperation bei der Strukturaufklärung des LecB-Proteins.

Bei den Herren Prof. Dr. Udo Schumacher und Dr. Marco Mewe des Instituts für Anatomie II: Experimentelle Morphologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit bei den histochemischen Studien bedanken.

Herrn Prof. Dr. Søren Molin sowie allen Mitarbeitern der *Molecular Microbial Ecology Group, BioCentrum-DTU* an der *Technical University of Denmark* möchte ich für die freundliche Aufnahme und die Bereitstellung der komfortablen Unterkunft und des Arbeitsplatzes sowie für die umfangreiche Unterstützung bei der Kultivierung der Biofilme danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Paul Williams und allen Mitarbeitern des *Institutes of Infections and Immunity* an der *University of Nottingham* möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und die Zusammenarbeit bei der Biofilmkultivierung bedanken.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit danken.

Der letzte Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich von Anfang bis Ende unterstützt haben.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion:

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* **33**: 861-870

Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**: 1313-1323

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 Laryngol Otol*. In Druck.

Posterpräsentationen:

Tielker, D., Rosenau, F., Gruetzmacher, S., Jaeger, K.-E. (2001). Cloning, overexpression, and purification of two lectins from *Pseudomonas aeruginosa*. Book of abstracts of the *Pseudomonas* 2001 meeting, Brüssel, Belgien, p. 142.

Tielker, D., Hacker, S., Rosenau, F., Strathmann, M., Wingender, J., Loris, R., Jaeger, K.-E. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is a tetrameric cell surface protein involved in biofilm formation. Book of abstracts of the *Pseudomonas* 2003 meeting, Québec, Canada, p. 149.

Wilhelm, S., Smolski, A., Tielker, D., Molin, S., Kolmar, H., Jaeger, K.-E. (2003). The outer membrane-bound esterase EstA is involved in rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa*. Québec, Canada, p. 85.

Tielker, D., Hacker, S., Rosenau, F., Strathmann, M., Wingender, J., Loris, R., Jaeger, K.-E. (2004). The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is a cell surface protein and involved in biofilm formation. Book of abstracts of the 1st European Conference on Biofilms - Prevention of Microbial Adhesion, Osnabrück, Germany, p. 72.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen | IV |
| Abkürzungen | VI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Lectine | 1 |
| 1.1.1 Geschichte der „Lectinologie“ | 1 |
| 1.1.2 Unterteilung der Kohlenhydrat-bindenden Proteine | 2 |
| 1.1.3 Lectin-Kohlenhydrat-Interaktionen | 3 |
| 1.1.4 Biologische Bedeutung von Lectinen | 5 |
| 1.1.5 Pflanzliche Lectine | 5 |
| 1.1.6 Lectine in Säugern | 6 |
| 1.1.7 Lectine in Mikroorganismen | 7 |
| 1.1.8 Anti-Adhäsions-Therapie | 9 |
| 1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 10 |
| 1.2.1 Die Lectine von <i>P. aeruginosa</i> | 13 |
| 1.2.2 Toxizität der Lectine | 15 |
| 1.2.3 Biofilmbildung bei <i>P. aeruginosa</i> | 17 |
| 1.3 Biotechnologische Nutzung von Lectinen als Affinitäts-tag | 19 |
| 1.3.1 Poly-Histidin-tag | 20 |
| 1.3.2 Strep-tag | 21 |
| 1.3.3 Cellulose-bindendes Protein | 22 |
| 1.3.4 Maltose-bindendes Protein | 22 |
| 1.4 Problemstellung und Zielsetzung | 23 |
| 2 Material und Methoden | 25 |
| 2.1 Chemikalien und Enzyme | 25 |
| 2.2 Bakterienstämme und Plasmide | 25 |
| 2.3 Oligonukleotide | 28 |
| 2.4 Kultivierung und Lagerung von Bakterien | 29 |
| 2.5 Kultivierung von Biofilmen | 30 |
| 2.5.1 Kultivierung von Biofilmen auf Membranfiltern | 30 |
| 2.5.2 Kultivierung von Biofilmen auf Glasobjektträgern | 30 |
| 2.5.3 Kultivierung von Biofilmen in Durchflusszellen | 30 |
| 2.5.4 Chromosomale GFP-Markierung von <i>P. aeruginosa</i> | 30 |
| 2.6 Lectinfärbung von Biofilmzellen | 31 |
| 2.7 Isolierung von Nukleinsäuren | 31 |
| 2.8 Gelelektrophorese | 31 |
| 2.9 <i>In vitro</i>-Rekombination von DNA | 31 |
| 2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA | 31 |
| 2.11 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 2.12 Polymerase-Kettenreaktion | 32 |
| 2.13 Sequenzierung von DNA | 32 |
| 2.14 Konstruktion Lectin-defizienter Stämme von <i>P. aeruginosa</i> | 32 |
| 2.15 Fraktionierung von <i>P. aeruginosa</i>-Zellen | 34 |
| 2.16 Präparation der inneren und äußeren Membranfraktion | 34 |
| 2.17 Bestimmung der NADH-Oxidase- und Esterase-Aktivität | 34 |
| 2.18 Bestimmung der Lipase-Aktivität | 35 |
| 2.19 Waschen der äußeren Membranfraktion mit verschiedenen Zuckerlösungen | 35 |
| 2.20 Bestimmung von Proteinkonzentrationen | 35 |
| 2.21 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 35 |
| 2.22 Immunologischer Nachweis von Proteinen | 36 |
| 2.23 Reinigung des LecB-Proteins | 36 |
| 2.24 Aminoternale Sequenzierung des LecB-Proteins | 37 |
| 2.25 Reinigung der LecB-Fusionsproteine | 37 |
| 2.26 Immobilisierung des LipB-Proteins mittels LecB-tag | 37 |
| 2.27 Hämagglutinationstest | 37 |
| 2.28 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie | 38 |
| 2.29 Computerprogramme und Online-Datenbanken | 38 |
| | |
| 3 Ergebnisse | 40 |
| | |
| 3.1 Reinigung und Strukturaufklärung des Lectins LecB aus <i>P. aeruginosa</i> | 40 |
| 3.1.1 Heterologe Überexpression des <i>lecB</i> -Gens und Reinigung des LecB-Proteins mittels Affinitätschromatographie | 40 |
| 3.1.2 Hämagglutinationstest des isolierten LecB-Proteins | 42 |
| 3.1.3 Strukturaufklärung des gereinigten LecB-Proteins | 43 |
| 3.2 Erzeugung von Lectin-defizienten Mutanten von <i>P. aeruginosa</i> | 46 |
| 3.2.1 Erzeugung und Nachweis <i>lecA</i> - und <i>lecB</i> -defizienter Mutanten von <i>P. aeruginosa</i> | 46 |
| 3.2.2 Erzeugung und Nachweis einer Lectin-Doppelmutante | 47 |
| 3.3 Einfluss der Lectine LecA und LecB auf den Prozess der Biofilmbildung | 49 |
| 3.3.1 Biofilmbildung unter statischen Kulturbedingungen | 49 |
| 3.3.2 Biofilmbildung unter dynamischen Kulturbedingungen | 51 |
| 3.4 Aufklärung der subzellulären Lokalisation des LecB-Proteins | 53 |
| 3.4.1 LecB ist mit der äußeren Zellmembran assoziiert | 53 |
| 3.4.2 LecB interagiert mit Zuckerrezeptoren der äußeren Membran | 55 |
| 3.5 Nachweis LecB-spezifischer Rezeptoren auf der Oberfläche von sessilen <i>P. aeruginosa</i>-Zellen | 57 |
| 3.5.1 LecB bindet spezifisch an die Oberfläche von Biofilmzellen | 57 |
| 3.6 Untersuchungen zur Sekretion des LecB-Proteins | 60 |

| | |
|--|------------|
| 3.6.1 Charakterisierung eines putativen Sekretionssignals im LecB-Protein | 60 |
| 3.6.2 Struktur-Funktions-Beziehung des D-A-V-V-Tetrapeptids | 62 |
| 3.6.3 Untersuchungen zum Einfluss der ORF PA3359 und PA3360 auf die LecB-Translokation | 64 |
| 3.7 Biotechnologische Anwendung des LecB-Proteins: Der LecB-tag | 67 |
| 3.7.1 Konstruktion und Reinigung eines YFP _{LecB} -Fusionsproteins | 67 |
| 3.7.2 Aufnahme der Fluoreszenzspektren der Fusionsproteine | 70 |
| 3.7.3 Hämagglutinationstest des gereinigten YFP _{LecB} -Fusionsproteins | 71 |
| 3.7.4 Reinigung und Immobilisierung lipolytischer Enzyme mittels LecB-tag | 72 |
| 4 Diskussion | 76 |
| 4.1 Untersuchungen zur Physiologie des LecB-Proteins | 76 |
| 4.1.1 Überexpression des <i>lecB</i> -Gens und Reinigung des nativen Lectins | 76 |
| 4.1.2 Strukturauflklärung des LecB-Proteins | 78 |
| 4.1.3 Konstruktion Lectin-defizienter Stämme von <i>P. aeruginosa</i> | 78 |
| 4.1.4 Einfluss der Lectine auf die Biofilmbildung | 79 |
| 4.1.5 Aufklärung der subzellulären Lokalisation des LecB-Proteins | 83 |
| 4.1.6 LecB interagiert mit Zuckerrezeptoren der äußeren Membran | 85 |
| 4.1.7 Ein D-A-V-V-Motiv beeinflusst den zellulären Transport des LecB-Proteins | 88 |
| 4.1.8 Studien zum Einfluss putativer Sekretionsfaktoren auf die LecB-Sekretion | 91 |
| 4.1.9 Modell zur physiologischen Rolle des Lectins LecB von <i>P. aeruginosa</i> | 93 |
| 4.2 Untersuchungen zum biotechnologischen Potential des LecB-Proteins | 97 |
| 4.2.1 Überexpression der <i>yfp::lecB</i> -Genfusion | 98 |
| 4.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung des YFP _{LecB} -Proteins | 99 |
| 4.2.3 Konstruktion des Plasmids pURE | 100 |
| 4.2.4 Reinigung und Immobilisierung lipolytischer Enzyme mittels LecB-tag | 102 |
| 4.2.5 Abschließende Beurteilung des biotechnologischen Potentials des LecB-Proteins | 105 |
| 5 Zusammenfassung | 106 |
| 6 Literatur | 108 |
| 7 Anhang | i |

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1 Schematische Darstellung des Lectin-vermittelten, dualen Erkennungsmechanismus zwischen Bakterien und den Zellen des Wirtsorganismus (S. 8)
- Abb. 2 Schematische Darstellung des Prinzips der Anti-Adhäsions-Therapie (S. 9)
- Abb. 3 Dokumentation der affinitätschromatographischen Reinigung des LecB-Proteins (S. 41)
- Abb. 4 Hämagglutinationstest des gereinigten LecB-Proteins (S. 43)
- Abb. 5 Gesamtstruktur des LecB-Proteins (S. 44)
- Abb. 6 Konservierte Wassermoleküle des LecB-Tetramers (S. 45)
- Abb. 7 Zuckerbindestelle des LecB-Proteins (S. 45)
- Abb. 8 Nachweis der *lecA/B*-Deletion mittels PCR (S. 46)
- Abb. 9 Immunologischer Nachweis der *lecA/B*-Deletion (S. 47)
- Abb. 10 Nachweis der Lectin-Doppelmutante durch PCR und Immunodetektion (S. 48)
- Abb. 11 CLSM-Aufnahmen von Biofilmen des Wildtyps und der LecB-negativen Mutante unter statischen Kulturbedingungen (S. 50)
- Abb. 12 CLSM-Aufnahmen und Quantifizierung von Biofilmen unter dynamischen Kulturbedingungen (S. 52)
- Abb. 13 Subzelluläre Lokalisierung des LecB-Proteins in planktonischen und in sessilen Zellen (S. 54)
- Abb. 14 Enzymaktivitäten der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen (S. 55)
- Abb. 15 Immunologischer Nachweis des LecB-Proteins in der äußeren Membran von sessilen *P. aeruginosa* -Zellen (S. 55)
- Abb. 16 Hemmung der LecB-OM-Interaktion durch *p*NP-Fucose (S. 56)
- Abb. 17 Selektive Bindung von LecB an die Zelloberfläche von *P. aeruginosa* (S. 59)
- Abb. 18 Modifikation des putativen Sekretionsmotivs im LecB-Protein (S. 60)
- Abb. 19 Immunologische, subzelluläre Lokalisierung der mutierten LecB*-Variante (S. 62)
- Abb. 20 Kugel-Stab-Darstellung der Zuckerbindestelle des LecB-Proteins (S. 63)
- Abb. 21 CPK-Modell zur Einschätzung der sterischen Zugänglichkeit des D-A-V-V-Tetrapeptids (S. 64)
- Abb. 22 Lage des *lecB*-Gens im Genom von *P. aeruginosa* (S. 65)
- Abb. 23 Immunologische, subzelluläre Lokalisierung des LecB-Proteins nach Überexpression der ORF PA3360 und PA3359 (S. 66)
- Abb. 24 Schematische Darstellung der Genfusion aus *yfp* und *lecB* (S. 67)
- Abb. 25 Nachweis der Fluoreszenz des YFP_{LecB}-Fusionsproteins (S. 68)
- Abb. 26 Dokumentation der affinitätschromatographischen Reinigung des YFP_{LecB}-Proteins (S. 69)
- Abb. 27 SDS-PAGE-Analyse des gereinigten CFP_{LecB}-Proteins (S. 70)
- Abb. 28 Fluoreszenzspektren der gereinigten Fusionsproteine (S. 71)
- Abb. 29 Hämagglutinationstest des gereinigten YFP_{LecB}-Proteins (S. 72)
- Abb. 30 Tributyrin-Agarplatte zum Nachweis der lipolytischen Aktivität der Fusionsproteine (S. 73)
- Abb. 31 SDS-PAGE-Analyse der Reinigung des CutA_{LecB}-Proteins (S. 74)
- Abb. 32 Immobilisierung des LipB_{LecB}-Proteins an L-Fucose-Agarose (S. 75)

| | |
|---------|---|
| Abb. 33 | Immunologische, subzelluläre Lokalisierung in planktonischen und in Biofilmzellen des <i>P. aeruginosa</i> -Wildtyps PAO1 (S. 84) |
| Abb. 34 | Topologisches Modell der Hämolyisin-Sekretion aus <i>E. coli</i> (S. 92) |
| Abb. 35 | Hypothetisches Modell zur physiologischen Funktion des Oberflächen-exponierten LecB-Proteins (S. 96) |
| Abb. 36 | Graphische Darstellung eines Ausschnitts aus dem Expressionsplasmid pURE (S. 101) |
| Abb. 37 | Konstruktion der <i>lecB</i> -defizienten Mutante PATI2 von <i>P. aeruginosa</i> (S. i) |
| Abb. 38 | Konstruktion der <i>lecB</i> -defizienten Mutante PATI4 von <i>P. aeruginosa</i> (S. ii) |
| Abb. 39 | Konstruktion der <i>lecA</i> - und <i>lecB</i> -defizienten Mutante PATI5 von <i>P. aeruginosa</i> (S. iii) |
| Abb. 40 | Klonierung der ORF PA3360 und PA3359 (S. iii) |
| Abb. 41 | Klonierung des nativen <i>lecB</i> -Gens (S. iv) |
| Abb. 42 | Konstruktion der mutierten <i>lecB</i> *-Variante mittels ortgerichteter Mutagenese (S. iv) |
| Abb. 43 | Plasmidkarte des Expressionsplasmids pURE (S. v) |
| Abb. 44 | Klonierung der Plasmide pURE-lipB und pURE-cutA (S. vi) |
| Abb. 45 | Klonierung der Plasmide pEYL2 und pECL2 (S. vi) |
| | |
| Tab. 1 | Vergleich von Lectinen und Antikörpern (S. 2) |
| Tab. 2 | Übersicht der verwendeten Bakterienstämme (S. 25) |
| Tab. 3 | Übersicht der verwendeten Vektoren (S. 26) |
| Tab. 4 | Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide (S. 26) |
| Tab. 5 | Übersicht der verwendeten Oligonukleotide (S. 28) |
| Tab. 6 | Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika (S. 29) |
| Tab. 7 | Biomasse, mittlere Dicke und Grad der Oberflächenbesiedlung der Biofilme des Wildtyps PAO1 und der LecB-negativen Mutante PATI2 (S. 50) |

Abkürzungen

| | |
|------------|---|
| A | Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| abs. | absolut |
| A. dest. | Aqua destillata |
| AHL | N-Acyl-Homoserinlacton |
| Ap | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| bp | Basenpaare |
| BPB | Bromphenolblau |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C | Celsius |
| CFP | <i>cyan fluorescent protein</i> |
| Cm | Chloramphenicol |
| CLSM | konfokale(s) Laser-Scanning Mikroskop(ie) |
| CP | Cytoplasma |
| Cs | Cycloserin |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| 3-D | dreidimensional |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraacetat |
| EK | Enterokinase (Erkennungssequenz) |
| EPS | extrazelluläre polymere Substanzen |
| g | Gramm |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| Gm | Gentamycin |
| GZE | Gesamtzellextrakt |
| h | Stunde(n) |
| HAT | Hämagglutinationstest |
| H-Brücke | Wasserstoffbrückenbindung |
| IM | innere Membran |
| IMAC | immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalactosid |
| kbp | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| λ | Wellenlänge |
| lac | Lactose |
| LB | Luria-Bertani <i>broth</i> |
| M | Molar |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> ; Polylinker |
| min | Minute(n) |
| μ | Micro |
| n | nano |
| NB | Nährbouillon |
| Ndk | Nukleosid Diphosphat Kinase |
| NTA | Nitrilo-3-Essigsäure |
| N-Terminus | Aminoterminus |
| O.D. | optische Dichte |
| OM | äußere Membran |
| PBP | periplasmatisches Bindeprotein |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PP | Periplasma |

| | |
|----------|---|
| PVDF | Polyvinylidifluorid |
| Rbs | Ribosomenbindungsstelle |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAG | SDS-Polyacrylamidgel |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Sm | Streptomycin |
| SV | Säulenvolumen |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| Tc | Tetracyclin |
| 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 |
| X-Gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid |
| YFP | <i>yellow fluorescent protein</i> |

1 Einleitung

1.1 Lectine

1.1.1 Geschichte der „Lectinologie“

Der Begriff „Lectin“ wurde 1954 von Boyd & Shapeleigh eingeführt, die ihn von dem lateinischen *legere* (zu Deutsch: auswählen) ableiteten. Er beschrieb damals eine heterogene Gruppe von Proteinen und Glycoproteinen, hauptsächlich pflanzlichen Ursprungs, welche die Eigenschaft besaßen, Erythrozyten zu agglutinieren (Hämagglutination). Lectine waren allerdings schon lange zuvor Gegenstand wissenschaftlicher Studien. So wurde bereits um 1860 die hämagglutinierende Eigenschaft diverser Schlangengifte beschrieben. Im Jahr 1888 führte Hermann Stillmark die erste Isolierung des Lectins Ricin aus den Samen von *Ricinus communis* durch (Stillmark, 1888). Das Ricin weist ebenfalls eine hämagglutinierende Aktivität auf und ist extrem toxisch, was Stillmark zu jener Zeit auf eine intravasale Blutgerinnung zurückführte. Die Kenntnis der hämagglutinierenden Wirkung von Lectinen führte in den folgenden Jahren zunächst zur Entdeckung weiterer pflanzlicher Lectine, die als Phythämagglutinine bezeichnet wurden. Im Jahr 1950 wurde gezeigt, dass die Lectin-vermittelte Erythrozytenagglutination auf der multivalenten Bindung von Oberflächen-exponierten Zuckern bzw. Glycokonjugaten (Glycoproteine, Glycolipide und andere Kohlenhydratstrukturen) beruht. 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 1977a/b). Aufgrund der vermeintlich engen Verwandtschaft von Lectinen und Antikörpern entwickelte sich die Wissenschaft der Lectine anfangs als Teil der Immunologie. Abgesehen von der gemeinsamen Eigenschaft Erythrozyten zu agglutinieren, weisen sie aber grundlegende Unterschiede auf (Uhlenbruck, 1983) (Tab. 1). Später wurden Lectine als Kohlenhydrat-bindende Proteine und Glycoproteine nicht-immunogenen Ursprungs, die Zellen agglutinieren und/oder Glycokonjugate präzipitieren, definiert, um sie von den Antikörpern abzugrenzen (Sharon & Lis, 1972; Goldstein *et al.*, 1980). Da diese Auslegung jedoch die Existenz von mindestens zwei Zuckerbindestellen pro Molekül voraussetzte (Poretz *et al.*, 1974) und man die agglutinierende bzw. die präzipitierende Wirkung *in vivo* als eher unbedeutend ansah (Franz *et al.*, 1979; Kocourek & Horejsi, 1981), wurden die Lectine wenig später von

Barondes (1988) als Kohlenhydrat-bindende, von Antikörpern und Enzymen zu unterscheidende Proteine neu definiert.

Tab. 1 Vergleich von Lectinen und Antikörpern

| Eigenschaft | Lectin | Antikörper |
|---------------------------------|----------------------------------|---|
| antigener Stimulus | nicht erforderlich | erforderlich |
| Vorkommen | ubiquitär | Vertebraten |
| Bindung | Zucker | Antigene und Haptene unterschiedlicher Struktur |
| Struktur | variabel | gemeinsame Grundstruktur |
| Struktur der Bindestelle | bestehend aus einer Proteinkette | bestehend aus leichter und schwerer Kette |
| Bindekonstante | relativ niedrig | relativ hoch |
| Funktion | vielfältig | Erkennen und Eliminieren von Antigenen |

1.1.2 Unterteilung der Kohlenhydrat-bindenden Proteine

Analysen der 3-D-Strukturen diverser Kohlenhydrat-bindender Proteine, wie z. B. pflanzlicher Lectine, Enzyme, Anti-Zucker-Antikörper oder dem bakteriellen periplasmatischen Bindeprotein (PBP), führten zur Unterteilung zuckerbindender Proteine in zwei Hauptgruppen (Quichio *et al.*, 1989; Vyas, 1991). Die Proteine der Gruppe I, die z. B. das PBP, diverse Membrantransportproteine, Kohlenhydrat-spezifische Antikörper sowie einige Enzyme umfasst, zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Kohlenhydrat-Liganden vollständig in tiefe Bindetaschen einschließen, während die Proteine der Gruppe II, einschließlich aller Lectine, ihre Liganden in flachen Bindestellen an der Proteinoberfläche binden, wodurch ein Teil des Zuckers in Kontakt mit dem Lösungsmittel steht (Rini, 1995). Daraus resultiert eine im Verhältnis zu den Proteinen der Gruppe I relativ schwache intrinsische Affinität der Lectine zu Monosacchariden. Konformationsänderungen als Folge der Bindung des Liganden, wie sie bei vielen Enzymen beobachtet werden, treten bei Lectinen nicht oder nur in sehr geringem Maß auf. Im Gegensatz zur enzymatischen Reaktion hydrolytischer Enzyme, wie dem Lysozym oder der Neuraminidase, bei der die Distorsion des Zuckerrings eine Voraussetzung für die Spaltung einer glycosidischen Bindung ist (Strynadka & James, 1991; Janakiraman, 1994), existiert kein Hinweis darauf, dass es in Lectin-Kohlenhydrat-Interaktionen zu einer Distorsion des gebundenen Zuckers kommt (Weis & Drickamer, 1996).

1.1.3 Lectin-Kohlenhydrat-Interaktionen

Die Grundlage für die Interaktion zwischen Zuckern und Lectinen bilden kooperative Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken). Dabei sind die sp^3 -hybridisierten Sauerstoffatome der Hydroxylgruppen des Zuckers zugleich Akzeptor von je zwei und Donor von je einer H-Brücke. 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. Das Sauerstoffatom des Zuckerrings ist ebenfalls sp^3 -hybridisiert und kann mit seinen zwei freien Elektronenpaaren als Akzeptor in H-Brücken auftreten, nicht aber in kooperativen Bindungen. Die Positionen eines Zuckermoleküls, die H-Brücken mit der Bindestelle des Lectins eingehen, sind für den spezifischen Erkennungsprozess und für die Differenzierung der verschiedenen Zucker verantwortlich. Dagegen stehen die Positionen, die nicht am Erkennungsprozess teilnehmen, häufig mit dem Lösungsmittel in Kontakt. Im Gegensatz dazu wird bei vielen Kohlenhydrat-bindenden Proteinen der Gruppe I nach Quioco in den tiefen Bindetaschen häufig jede nur mögliche H-Brücke gebildet, wodurch nanomolare Dissoziationskonstanten erreicht werden (Weis & Drickamer, 1996).

Durch die Beteiligung der 3-, 4- und 6-Hydroxylgruppen des Zuckers an der H-Brückenbildung zwischen Galactose und dem Lectin von *Erythrina corallodendron* wird die Bindung von Mannose und Glucose ausgeschlossen, da diese im Gegensatz zur Galactose eine äquatorial angeordnete 4-Hydroxylgruppe besitzen (sterischer Ausschluss) (Shaanan *et al.*, 1991). Concanavalin A (ConA), das Erbsenlectin und ein Lectin aus *Lathyrus ochrus* binden Mannose und Glucose durch die Bildung spezifischer H-Brücken mit den 3-, 4- und 6-Hydroxylgruppen der Zucker, während die 2-Hydroxylgruppe, welche die beiden Monosaccharide voneinander unterscheidet, unbeteiligt bleibt (Naismith *et al.*, 1994; Rini *et al.*, 1993; Bourne *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu ist die 2-Hydroxylgruppe Teil der Lectin-Zucker-Interaktion des Schneeglöcken-Lectins (*Galanthus nivalis*), welches ausschließlich Mannose bindet (Hester *et al.*, 1995).

Einige der H-Brücken in Lectin-Kohlenhydrat-Komplexen werden direkt durch Wassermoleküle vermittelt, die zum Teil eine tragende Rolle im Erkennungsprozess einnehmen. So sind an der Bindung von Galactose durch das Enterotoxin von *Escherichia coli* sowie durch das Choleratoxin (CT) drei Wassermoleküle beteiligt (Sixma *et al.*, 1992; Merrit *et al.*, 1994). Einige der H-Brücken-vermittelnden Wassermoleküle (z. B. eines der drei Wassermoleküle innerhalb der Bindetasche des CT) sind selbst im ligandenfreien Zustand funktionelle Bestandteil der Bindestelle (Merrit *et al.*, 1994).

Divalente Kationen sind in direkter und indirekter Form an vielen Lectin-Zucker-Interaktionen beteiligt. So enthalten die Bindetaschen vieler Leguminosen-Lectine Ca^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen, um durch die Koordination bestimmter Aminosäuren die Bindetasche zu stabilisieren (indirekte Form). Direkte Interaktionen zwischen Kationen und den gebundenen Zuckern werden z. B. bei den tierischen Lectinen des C-Typs beobachtet. Dort sind Ca^{2+} -Ionen an direkten koordinativen Bindungen zwischen dem Lectin und dem Liganden beteiligt (Weis *et al.*, 1992; Kolatkar & Weis, 1996; Ng *et al.*, 1996).

Auch apolare Interaktionen werden in Lectin-Kohlenhydrat-Komplexen gefunden. Aliphatische Protonen und die Kohlenstoffatome der epimeren Zentren der Zucker bilden zusammen mit dem exocyclischen Kohlenstoff eine apolare Fläche, die in vielen Strukturen gegen den Rest einer aromatischen Aminosäure gerichtet ist. So ist in allen bekannten Lectin-Galactose-Komplexen die apolare Fläche gegen die Seitenkette eines Tryptophans oder eines Phenylalanins gerichtet (Weis & Drickamer, 1996).

Während Monosaccharide von Lectinen im Vergleich zu den Kohlenhydrat-bindenden Proteinen der Gruppe I nach Quioco mit relativ niedrigen Dissoziationskonstanten zwischen 0,1 und 1 mM gebunden werden, wird bei der Bindung verzweigter Kohlenhydrate oft eine Konstante im mikromolaren Bereich erreicht. Dieser Anstieg der Affinität beruht auf der Existenz einer sekundären Bindestelle, die meist in unmittelbarer Nähe der primären Bindestelle lokalisiert ist und dann als *extended site* bezeichnet wird (Loris, 2002). Während der terminale Zucker eines komplexen Kohlenhydrats von der primären Bindestelle gebunden wird, bindet die sekundäre Bindestelle einen verzweigten Zucker. Da in vielen Fällen das Lectin nur zum terminalen Zucker als Monosaccharid eine signifikante Affinität aufweist, wird dieser als primäre Determinante bezeichnet (von der Lieth *et al.*, 2002). Dieser Mechanismus zur Steigerung der Affinität wird *subsite*-Multivalenz genannt.

Ein weiterer Anstieg der Dissoziationskonstante bis in den nanomolaren Bereich wird durch die sog. *subunit*-Multivalenz erreicht, die durch Bindung verzweigter Zucker in einer zweiten, räumlich und thermodynamisch von der primären deutlich zu unterscheidenden Bindestelle zustande kommt (Lundquist *et al.*, 2000). Dabei kann die sekundäre Bindestelle auf demselben Protomer oder auch auf einer zweiten Untereinheit eines Oligomers lokalisiert sein. Durch das Auftreten multipler, voneinander unabhängiger Bindestellen kann die Affinität weiter gesteigert werden (Rini, 1995). In vielen Fällen wird ein Anstieg der Affinität durch das Zusammenlagern mehrerer identischer Bindedomänen erreicht. Von manchen Lectinen, wie z. B. dem CT oder dem Mannose-bindenden Protein der Säuger, wird dieser

Mechanismus auch für die Bindung von Membranrezeptoren und für die Erkennung planarer Oberflächen eingesetzt (Weis & Drickamer, 1996).

1.1.4 Biologische Bedeutung von Lectinen

Die physiologischen Funktionen der verschiedenen Lectine sind sehr vielfältig. Der biologische Nutzen dieser Proteine steht in engem Zusammenhang mit der Funktion des jeweiligen Liganden. Im Gegensatz zu Homopolysacchariden wie der Cellulose, in der die Glucosemoleküle in monotoner Regelmäßigkeit aneinander gereiht vorliegen, sind die an Glycolipide und -proteine gebundenen Oligosaccharide meist stark verzweigt und äußerst reich an struktureller Information (Gabijs *et al.*, 2002). Die Zahl der möglichen Permutationen durch Kombination der verschiedenen Monosaccharide und glycosidischen Bindungen ist im Vergleich zu den linearen Sequenzen von Nukleinsäuren und Proteinen astronomisch hoch (Hughes, 1983; Lehninger *et al.*, 1998). Auf der Ebene eines Trimers ergibt sich für Nukleinsäuren eine Anzahl von $4^3=64$ möglichen Permutationen, für Peptide eine Menge von $20^3=8000$. Dagegen kann ein Trisaccharid etwa 9 Millionen unterschiedliche Isomere ausbilden (Laine, 1997). Durch die Einführung nur eines Substituenten, z. B. einer Sulfatgruppe, an eine freie Hydroxylgruppe eines Zuckers wird diese Anzahl verzehnfacht.

Aufgrund dieser Variabilität bilden Oligosaccharide insbesondere auf der Zellperipherie unverwechselbare Strukturen aus, welche von den Enzymen und Rezeptoren, die mit ihnen in Wechselwirkung treten, erkannt werden (Gabijs, 2000). Lectine, wie auch einige Kohlenhydrat-bindende Proteine der Gruppe I nach Quijcho, sind in der Lage, die von den Oligosaccharidanteilen der Glycoproteine und -lipide kodierte Informationen zu entschlüsseln und dienen so der Zell-Zell-, Zell-Matrix-, und Zell-Protein-Erkennung. Im Folgenden sind diverse Beispiele für biologische Funktionen von Lectinen aus verschiedenen Organismenreihen aufgeführt.

1.1.5 Pflanzliche Lectine

Von den heute bekannten Lectinen sind die pflanzlichen am besten untersucht. In Pflanzen wurden Lectine in verschiedenen Organen und Geweben der unterschiedlichsten Spezies nachgewiesen. Die physiologischen Funktionen pflanzlicher Lectine sind sehr vielfältig (Etzler, 1986). Die meist sekretierten Proteine sind u. a. an der Germination beteiligt. Zu den Proteinen mit dieser Funktion zählen die gut untersuchten Lectine ConA, das Agglutinin der

Sojabohne, das Lectin der Erbse (*Vicia faba*) und das Favin. Diese werden während der Entwicklung der Samen zusammen mit den dort zahlreich vorhandenen Speicherproteinen synthetisiert. Während der Germination werden sowohl die Lectine als auch die Speicherproteine abgebaut und dienen somit der Versorgung des Embryos mit den benötigten Aminosäuren (Rüdiger & Gabius, 2002). Es ist jedoch unklar, ob die Lectine lediglich als Aminosäurequelle dienen oder ob sie vielmehr an der räumlichen Organisation der oft glycosylierten Speicherproteine beteiligt sind.

Auch bei der Initiation und Aufrechterhaltung der Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen scheinen pflanzliche Lectine eine Rolle zu spielen, indem sie durch die Agglutination der Bakterien deren Immobilisation bewirken (Hirsch, 1999; Diaz *et al.*, 1989). Darüber hinaus dienen die Lectine einiger Pflanzen dem Schutz vor Schädlingen (Chrispeels & Raikhel, 1991). So ist die Toxizität roh verzehrter Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) gegenüber Säugern (Pusztai *et al.* 1979; Jaffé & Vega Lette, 1986) und Vögeln (Jayne-Williams & Burgess, 1974) seit langem bekannt. Das in den Vakuolen der Bohnen enthaltene hitzelabile Phytohämagglutinin (PHA) bindet an Rezeptoren des intestinalen Epithels von Ratten und führt so zu Läsionen sowie einer abnormalen Entwicklung der Mikrovilli, wodurch die Resorption von Nährstoffen erheblich gestört wird (Liener, 1986). Die Samen vieler Gramineen enthalten die sog. Chitin-bindenden Lectine, wie z. B. das *wheat germ agglutinin* (WGA), die eine Spezifität für N-Acetylglucosamin aufweisen (Goldstein & Hayes, 1978). WGA hemmt u. a. die Entwicklung der pflanzenpathogenen Larve des Rüsselkäfers (Murdock *et al.*, 1990).

Das Galactose-spezifische Lectin der Mistel *Viscum album* wird aufgrund seiner immunaktiven Wirkung in der adjuvanten Krebstherapie eingesetzt (Beuth *et al.*, 1995).

1.1.6 Lectine in Säugern

Auch in Säugern sind Lectine an einer Vielzahl verschiedener Prozesse beteiligt (Kilpatrick, 2002). Beispiele für Lectine mit bekannter Funktion sind das Calreticulin und das Calnexin, die im endoplasmatischen Retikulum während der Synthese bestimmter Glycoproteine als molekulare *chaperone* fungieren und die Aggregation sowie den Export fehlgefalteter Proteine verhindern (Culina *et al.*, 2004). Die Lectine des P-Typs sind an der Ausbildung von Lysosomen beteiligt, indem sie saure Hydrolasen, die einen Mannose-6-Phosphatrest aufweisen, vom *trans*-Golgi Netzwerk zu den endosomalen Vesikeln transportieren (Reddy *et al.*, 2004). Darüber hinaus sind Lectine an vielen Vorgängen des komplexen

Immungeschehens beteiligt. Das L-Selectin ist u. a. am Austritt der Lymphozyten aus den Lymphknoten beteiligt (Irijala *et al.*, 2001). Andere Lectine, wie die Collectine, die Ficoline (Lu *et al.*, 2002) oder der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (East & Isacke, 2002), vermitteln die Bindung mikrobieller Krankheitserreger an Phagozyten und bewirken so deren Eliminierung. Des Weiteren sind Lectine an der Differenzierung von Tumorzellen sowie an der Metastasierung beteiligt. Die Lectin-vermittelte, selektive Adhäsion von Tumorzellen an das Zielgewebe wird für den Organotropismus der Metastasierung, d. h. für das vom Ursprung des primären Tumors abhängige Auftreten von Metastasen in bestimmten Organen, verantwortlich gemacht (McEver, 1997; Gorelik *et al.*, 2001; Kannagi *et al.*, 2004).

1.1.7 Lectine in Mikroorganismen

Bakterielle Lectine sind auf vielfältige Weise im mikrobiellen Infektionsprozess involviert. Die bakteriellen AB-Toxine, wie das hitzelabile Enterotoxin von *E. coli* (Gyles, 1992), das CT (De Haan & Hirst, 2004), das Diphtherietoxin (Collier, 2001) oder das Botulinum Neurotoxin (Tavallaie *et al.*, 2004) bestehen aus zwei Domänen, die in der Regel über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die lectinoide B-Domäne (*binding domain*) vermittelt die Adhäsion des Toxins an die Zellmembran des Wirts, während die A-Domäne (*activity domain*) im Anschluss an den Eintritt des Holotoxins in die Zelle für die cytotoxischen Effekte verantwortlich ist (Burnette, 1994; Fan *et al.*, 2000).

Darüber hinaus tragen Lectine bereits im ersten Stadium einer Infektion zur Pathogenität eines Bakteriums bei. Die Adhäsion pathogener Mikroorganismen an die Wirtszellmembran stellt einen entscheidenden Schritt bei der Entstehung einer Infektion dar. Sie verleiht den Erregern neben einer verbesserten Akquisition von Nährstoffen auch eine erhöhte Resistenz gegen die Selbstreinigungsmechanismen des Wirtsorganismus sowie gegen Angriffe des Immunsystems (Vierbuchen, 1991; Sharon & Ofek, 2002). Zudem ermöglicht die Adhäsion der Bakterien die Penetration des Gewebes sowie das Einschleusen bakterieller Toxine in die Wirtszellen. Aus diesen Gründen ist die Aufklärung von Adhäsionsmechanismen Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Studien. Die Adhäsion der Mikroorganismen wird teilweise von unspezifischen Faktoren, wie hydrophoben Wechselwirkungen und elektrostatischen Kräften, eingeleitet (Mirelman & Ofek 1986; Richardson & Steiner, 1995). Vor allem aber sind für die Erkennung und Bindung komplementärer Rezeptoren auf der Oberfläche von Wirtszellen Lectin-Kohlenhydrat-Interaktionen verantwortlich. So wird die Bindung von *E. coli* an das Uroepithelium durch das Mannose-spezifische Lectin FimH, das an den Typ 1-

Pili der Bakterien lokalisiert ist, vermittelt (Hung *et al.*, 2002). An der Initiation und Aufrechterhaltung von Infektionen des Gastrointestinaltraktes durch *Helicobacter pylori* sind mehr als zehn verschiedene Lectine beteiligt (Hynes *et al.*, 2003).

Neben den bakteriellen Lectinen tragen auch Kohlenhydrat-bindende Proteine der Zellmembranen des Wirtorganismus zur spezifischen Adhäsion bei (Sharon & Ofek, 2002). Für die Kolonisation des Intestinums durch *Shigella flexneri* sind zum Teil Adhäsine der Mukosa verantwortlich (Sudha *et al.*, 2001). Infektionen des Pharynx mit Gruppe A Streptokokken werden durch die Bindung von Polysacchariden der bakteriellen Kapsel an das Hyaluronsäure-bindende Wirtsprotein CD44 eingeleitet (Cywes *et al.*, 2000).

Diese wechselseitige Interaktion von Lectinen mit komplementären Glycostrukturen, die sowohl auf der bakteriellen Oberfläche als auch auf der Peripherie der Wirtszellen lokalisiert sind (Vierbuchen *et al.*, 1989), führt zu einem dualen Erkennungsmechanismus (Abb. 1), der für den Organotropismus pathogener und symbiotischer Mikroorganismen verantwortlich ist (Beachey, 1980; Liener *et al.*, 1986; Mirelman & Ofek, 1986). Infektionen durch *Vibrio cholerae* treten vor allem im Gastrointestinaltrakt auf, während *Streptococcus pneumoniae* die Lunge und *Staphylococcus saprophyticus* den Urinaltrakt befällt (Ofek *et al.*, 1978; Beuth *et al.*, 1987). Der Organotropismus wird auch bei viralen Infektionen beobachtet (Markwell *et al.*, 1985). Infektionen durch die Influenzaviren A, B und C betreffen ausschließlich den Respirationstrakt (Rogers & Paulsen, 1983). An der spezifischen Adhäsion dieser Viren sind die sog. *virus attachment*-Proteine der viralen Hülle beteiligt.

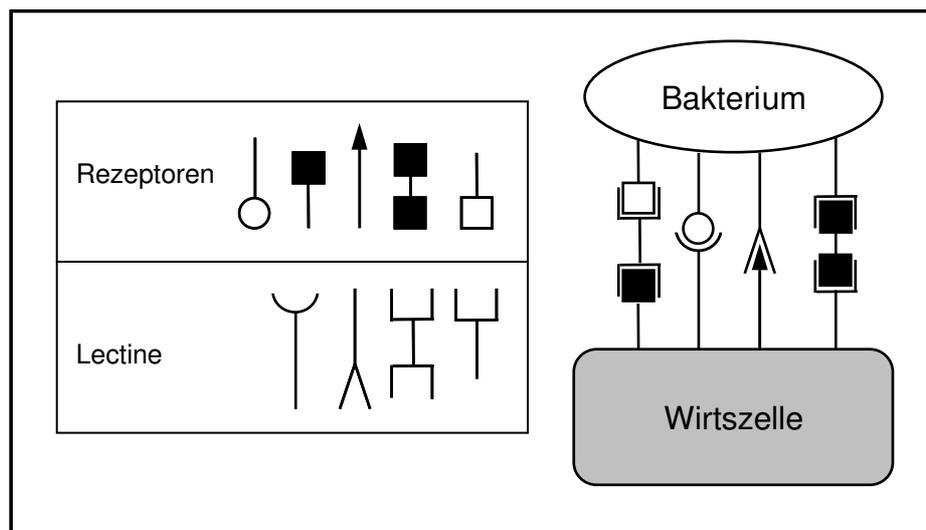


Abb. 1 Schematische Darstellung des Lectin-vermittelten, dualen Erkennungsmechanismus zwischen Bakterien und den Zellen des Wirtorganismus (nach Gabius, 2000).

1.1.8 Anti-Adhäsions-Therapie

Das vermehrte Auftreten pathogener Mikroorganismen, die Resistenzmechanismen gegen eine Vielzahl der herkömmlichen Antibiotika aufweisen, erfordert die Entwicklung neuartiger Medikamente zur Bekämpfung viraler und bakterieller Infektionen (Beuth *et al.*, 1996; Thomas & Brooks, 2004). Die Blockade von Lectin-Kohlenhydrat-Interaktionen durch anti-adhäsive Substanzen wird als hoffnungsvoller, therapeutischer Ansatz für die Behandlung bisher nur unzureichend therapierbarer Infektionen angesehen (Chapleur, 1998; Irvin & Bautista, 1999; Mulvey *et al.*, 2001). Die Entwicklung von Resistenzen gegen solche anti-adhäsiven Therapeutika, welche die Bindung pathogener Mikroorganismen an das Wirtsepithel unterbinden und so eine entstehende Infektion vorzeitig verhindern, ist unwahrscheinlich (Ofek *et al.*, 2003). Der Einsatz dieser Substanzen führt weder zum Absterben der Keime noch haben sie einen direkten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Bakterien. Aufgrund der Spezifität der Blockade werden apathogene Organismen der natürlichen Flora geschont. Diese können mit resistenten Keimen um das vorhandene Nährstoffangebot konkurrieren (Mulvey *et al.*, 2001). Die Selektion resistenter Organismen, die neue Möglichkeiten zur Adhäsion an das Wirtsepithel entwickelt haben, wird dadurch verhindert.

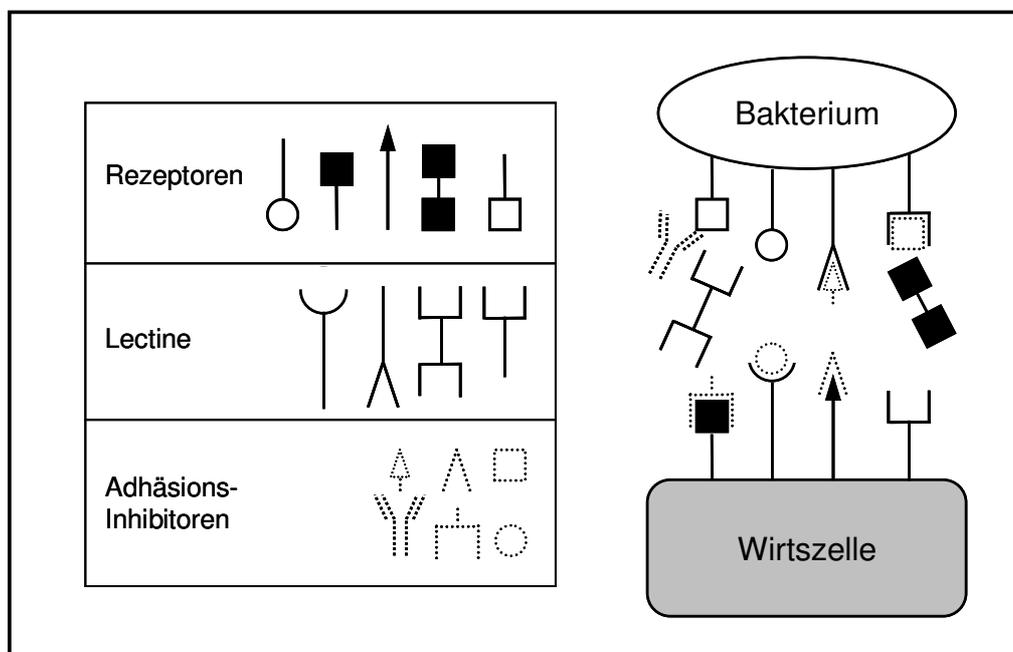


Abb. 2 Schematische Darstellung des Prinzips der Anti-Adhäsions-Therapie. Als anti-adhäsive Substanzen fungieren Rezeptor- und Adhäsion-Analoga sowie Anti-Lectin-Antikörper (nach Gabius, 2000).

Als anti-adhäsive Therapeutika eignen sich Substanzen, die eine Analogie zum Rezeptor oder zum Lectin aufweisen sowie Anti-Lectin-Antikörper, welche die Bindestelle des Lectins blockieren (Irvin & Bautista, 1999). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz einfacher Zucker die Adhäsion einiger Spezies an das entsprechende Wirtsgewebe hemmt. Die Koinjektion uropathogener *E. coli*-Zellen mit Methyl- α -Mannopyranosid in die Blase von Mäusen konnte die Anzahl immobilisierter Bakterien um zweidrittel gegenüber entsprechenden Kontrollen reduzieren (Aronson *et al.*, 1979). Infektionen von Rhesusaffen mit *H. pylori* konnten durch die Behandlung der Tiere mit Sialyl-3'-Lactose, einem Oligosaccharid, das auch in der menschlichen Muttermilch vorkommt, erfolgreich therapiert werden (Mysore *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass der Einsatz von Zuckern die Adhäsion mehrerer Bakterienspezies, darunter *Burkholderia cenocepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* und *Yersinia pestis*, an alveolare Epithelzellen unterbinden kann (Thomas & Brooks, 2004). Die Problematik bei der Hemmung der bakteriellen Adhäsion durch einfache Zucker besteht darin, dass aufgrund der niedrigen Bindekonstante hohe Konzentrationen eingesetzt 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. Auch der Einsatz von Substanzen, die eine Analogie zum Lectin aufweisen, kann die bakterielle Adhäsion verhindern. Es wurde berichtet, dass ein aus 20 Aminosäuren bestehendes Peptid, das die Struktur eines Oberflächenadhäsins von *Streptococcus mutans* nachahmt, die Bindung dieses Bakteriums an im Speichel vorhandene Rezeptoren löst bzw. unterbindet (Kelly *et al.*, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass anti-adhäsive Antikörper die Pili/Fimbrien-vermittelte Bindung von *P. aeruginosa* und *Candida albicans* an Asialo-GM1-Rezeptoren sowie die Adhäsion der Zellen an Rezeptoren des humanen, bukkalen Epithels inhibieren (Lee *et al.*, 1996). Darüber hinaus könnten Medikamente zur Blockade von Lectin-Kohlenhydrat-Interaktionen eingesetzt werden, um die Bindung bakterieller AB-Toxine an das Wirtsepithel zu unterbinden oder die Progression sowie die Metastasierung von Krebszellen aufzuhalten (Osborn *et al.*, 2004).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Bei Bakterien der Gattung *Pseudomonas* handelt es sich um Gram-negative, nicht-sporenbildende, gerade oder leicht gekrümmte Stäbchen. Phylogenetisch werden sie der Familie der *Pseudomonaceae* zugeordnet, einer heterologen Gruppe innerhalb der

Proteobacteria (Olson *et al.*, 1994). Die chemoorganotrophen Pseudomonaden lassen sich durch ihre Oxidase-Aktivität von den Enterobakterien unterscheiden (Madigan *et al.*, 2000). Aufgrund der Fähigkeit dieser anspruchslosen Bakterien eine Vielzahl organischer Substrate zu metabolisieren, darunter auch heterozyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe (Palleroni, 1986), sind Pseudomonaden ubiquitär in Böden und Gewässern verbreitet. Einige Arten dieser Gattung zeichnen sich durch ihr pathogenes Potential gegenüber Pflanzen (Gross & Cody, 1985), Tieren und Menschen (Palleroni, 1984) aus.

P. aeruginosa, der als einer der zahlreichsten Organismen überhaupt gilt (Costeron & Anwar, 1994), wird dem γ -Zweig der Proteobakterien zugeordnet, die anhand von 16S-rRNA-Homologievergleichen in fünf Gruppen eingeteilt werden (Palleroni, 1993). Charakteristika von *P. aeruginosa* sind neben der einzelnen polaren Flagelle die Fähigkeit zur Denitrifikation, die Produktion fluoreszierender Pigmente, wie dem Pyocyanin, sowie das Wachstum bei 43 °C (Palleroni, 1993; Madigan *et al.*, 2000). Die vollständige Sequenzierung des 6,3 mbp großen Genoms wurde im Jahr 2000 abgeschlossen und veröffentlicht (Stover *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* ist aufgrund der Vielzahl sekretierter Enzyme von großem biotechnologischem Interesse (Jaeger *et al.*, 1996a/b; 1997; 1999; Jaeger & Reetz, 2000). Das Hauptinteresse allerdings gilt dem außergewöhnlich pathogenen Potential dieses ausgesprochenen Opportunisten, der für einen erheblichen Teil nosokomialer Infektionen verantwortlich ist (Picard *et al.* 1994; Wagner *et al.*, 2004). Infektionen mit *P. aeruginosa* treten vor allem bei immunsupprimierten und immundefizienten Patienten auf, die z. B. an Krebs, AIDS oder der Cystischen Fibrose (CF), einer autosomal rezessiven Erbkrankheit, leiden (Bodey *et al.* 1983; Winkler *et al.*, 1985). Dazu gehören 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). Infektionen des bronchopulmonalen Traktes durch *P. aeruginosa* gelten bei CF-Patienten als Haupttodesursache (Jaeger *et al.*, 1992b; Elkin & Geddes, 2003). 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). Grund für die außerordentliche Pathogenität ist die Produktion eines weiten Spektrums an extrazellulären Virulenzfaktoren. Dazu zählen das Exopolysaccharid Alginate, das Lipopolysaccharid, die Exotoxine A und S sowie mehrere Proteasen, drei Phospholipasen und zwei Lipasen (Liu, 1979; Ohman & Chakrabarty, 1981; Cryz *et al.*, 1984; Nicas & Iglewski, 1986; Jaeger *et al.*, 1992a/b; König *et al.*, 1996; Bitter, 2003; Barker *et al.*, 2004). Als weitere

Virulenzfaktoren werden die beiden Lectine LecA und LecB angesehen (Gilboa-Garber, 1997), die sowohl für die Adhäsion der Bakterien an das Wirtsgewebe (Wentworth *et al.*, 1991), als auch für diverse cytotoxische Effekte gegenüber Epithelzellen des Respirationstraktes verantwortlich gemacht werden (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994; Adam *et al.*, 1997a/b).

Mit Ausnahme des Typ IV-Weges wurden alle in Gram-negativen Bakterien derzeit bekannten Sekretionsapparate in *P. aeruginosa* identifiziert (Ma *et al.*, 2003; Filloux, 2004). Diese Transportwege können in Ein-Schritt- und in Zwei-Schritt-Wege unterteilt werden (Koster *et al.*, 2000; Rosenau & Jaeger, 2000; Ma *et al.*, 2003). Beim Ein-Schritt-Weg wird der Transport entweder durch Proteine ähnlich den ABC-Transportern (Typ I-Weg) (Schmidt & Tampe, 2002) oder durch Typ III-Exporterproteine, die eine strukturelle Homologie zu den Proteinen des Flagellen-Export-Apparats aufweisen (Blocker *et al.*, 2003), vorgenommen. Die Sekretion des Substrats erfolgt unter ATP-Verbrauch direkt über die innere und äußere Membran. Bei den Zwei-Schritt-Wege dagegen werden die Proteine zunächst über die Cytoplasmamembran ins Periplasma transportiert, um anschließend über die äußere Membran exportiert zu werden. Zum Transport über die innere Membran sind zwei Sekretionsapparate bekannt, die als Sec- und als Tat-Weg bezeichnet werden (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). Der anschließende Proteintransport über die äußere Membran wird mittels der Typ II-Sekretionsmaschinerie bewerkstelligt, der in *P. aeruginosa* aus den 12 Xcp-Proteinen gebildet wird (Filloux, 2004). Die Faltung der Proteine, die mit Hilfe des Xcp-Apparats sekretiert werden, erfolgt im Periplasma und kann auf spezifische periplasmatische Faltungshilfen angewiesen sein (Rosenau & Jaeger, 2000; Urban *et al.*, 2001). Darüber hinaus vermitteln die Proteine der sog. Typ V-Sekretionsfamilie ihren eigenen Transport über die äußere Membran, weshalb sie als Autotransporterproteine bezeichnet werden (Henderson *et al.*, 2004).

Neben dem pathogenem Potential stellt *P. aeruginosa* durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf einer Vielzahl verschiedener Oberflächen auch ein industrielles Problem dar (Costeron, 1995; Pratt & Kolter, 1998; Korstgens *et al.*, 2003).

1.2.1 Die Lectine von *P. aeruginosa*

Infektionen mit *P. aeruginosa* werden durch die Bindung des Bakteriums an die Epithelzellen des Respirations- oder des Gastrointestinaltraktes sowie anderer Organe initiiert (Prince, 1992). Neben unspezifischen Wechselwirkungen sind an der bakteriellen Adhäsion das Flagellin und das FliD-Protein (Scharfman *et al.*, 2001), die Kohlenhydrate im Muzin erkennen, sowie die Typ IV-Pili (Hahn, 1997), die an Asialo-GM1- und -GM2-Glycosphingolipide binden, beteiligt. Darüber hinaus wird angenommen, dass die Bindung der Bakterien an das Wirtsgewebe durch bakterielle Lectine vermittelt wird (Gilboa-Garber & Garber, 1989; Gilboa-Garber & Garber, 1992; Imberty *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* synthetisiert neben einigen Oberflächen-gebundenen Adhäsinen zwei Lectine, die zunächst als PA-IL (Gilboa-Garber, 1972) und PA-IIL (Gilboa-Garber *et al.*, 1977) bezeichnet wurden. Das für das PA-IL kodierende Gen wurde in *lecA* (kodiert für das LecA-Protein), das für das PA-IIL kodierende Gen in *lecB* (kodiert für das LecB-Protein) umbenannt, um der heute üblichen Nomenklatur gerecht zu werden (Winzer *et al.*, 2000). Im Genom von *P. aeruginosa* liegen sie relativ weit auseinander (Gilboa-Garber *et al.*, 2000).

Das D-Galactose-spezifische LecA und das L-Fucose-spezifische LecB ähneln in vielen Eigenschaften, wie der relativ hohen Resistenz gegenüber Proteolyse, Säuren und hohen Temperaturen, den klassischen Ca^{2+} -abhängigen pflanzlichen Lectinen (Imberty *et al.*, 2004). Trotz potentieller Glycosylierungsstellen in LecA und LecB 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). Da sie die Agglutination von Erythrozyten verschiedener Tiere, wie Ratten, Kaninchen, Hunde, Mäuse und Schafe bewirken, werden sie als Breitspektrumagglutinine bezeichnet (Gilboa-Garber, 1972). Die Hämagglutination durch LecA beruht auf der Bindung des Lectins an das P^{K} -, das P_1 - und das B-Antigen (Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Lanne *et al.*, 1994; Sudakevitz *et al.*, 1996a) der Erythrozytenoberfläche, in Abhängigkeit von der Präsenz des I-Antigens (Sudakevitz *et al.*, 1996b). LecB 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). Die Temperaturprofile der Agglutinationsreaktion humaner Erythrozyten durch die beiden Lectine zeigen gegensätzliche Verläufe. Während LecA ein Agglutinationsoptimum bei etwa 4 °C aufweist, ist die Hämagglutination durch LecB bei 42 °C maximal (Gilboa-Garber & Sudakevitz, 1999).

LecA ist ein tetrameres Protein bestehend aus vier gleichen 12,76 kDa großen Untereinheiten (Avichever *et al.*, 1991, 1992, 1994) mit je einer Zuckerbindestelle, von denen jede ein Ca^{2+} -

Ion enthält, das für die Zuckerbindung erforderlich ist (Cioci *et al.*, 2003). Die Ca^{2+} -vermittelte Erkennung von D-Galactose wurde bereits bei Lectinen des C-Typs beobachtet (Kolatkar & Weis, 1996; Poget *et al.*, 1999). Das LecA-Protein weist eine Zuckerspezifität von Melibiose > Methyl- α -D-Galactose > D-Galactose > Methyl- β -D-Galactose > N-Acetylgalactosamin auf (Chen *et al.*, 1998). Die 121 Aminosäuren des LecA-Proteins werden von dem 366 bp großen *lecA*-Gen kodiert (Avichezer *et al.*, 1994). Den zwei konsekutiven Stoppkodons von *lecA* folgt eine Region, welche die Ausbildung einer *hairpin*-Struktur und somit eine Rho-unabhängige Transkriptionstermination ermöglicht (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Das LecA-Protein ist reich an Asparagin, Asparaginsäure, Alanin und Glycin, während Arginin, Histidin und Methionin 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). Neben der Bindung spezifischer Zucker weist das LecA-Protein eine hohe Affinität für Adenin sowie für N-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL) auf (Stoitsova *et al.*, 2003; Boteva *et al.*, 2005). Die Bindung dieser Substanzen ist von der Zuckerbindung unabhängig und daher auf eine weitere Bindestelle für hydrophobe Liganden zurückzuführen. Die Bindung von Adenin wurde bereits beim Ricin sowie beim Shigella-Toxin beobachtet (Watanabe *et al.*, 1992; Pallanca *et al.*, 1998). Trotz der beschriebenen Gemeinsamkeiten zwischen LecA und anderen bekannten Lectinen sind keine ausgeprägten Sequenzhomologien bekannt (Avichezer *et al.*, 1994).

Das LecB-Protein bildet ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 11,73 kDa pro Untereinheit (Gilboa-Garber *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2002; Loris *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2005). Die 114 Aminosäuren von LecB werden von einem 345 bp großen Gen (*lecB*) kodiert (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Dem Stoppkodon des *lecB*-Gens folgt eine GC-reiche Region, die auf eine Rho-unabhängige Transkriptionstermination hindeutet. Das LecB-Protein besitzt eine Zuckerspezifität von *p*-Nitrophenyl- α -L-Fucose > L-Fucose > Fucosylamin = L-Galactose > D-Mannose > D-Fructose (Garber *et al.*, 1987). Im Vergleich zu anderen Lectinen weist das Protein mit einer Bindekonstante von $K_A = 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ eine enorm hohe Affinität zu L-Fucose auf. Der Gehalt an Alanin, Arginin, Glutamin und Glutaminsäure ist ähnlich hoch 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 des LecB-Proteins liegt bei 3.88.

Im Gegensatz zu LecA besitzt LecB am C-Terminus eine hydrophobe Domäne. Weder das reife LecA- noch das LecB-Protein enthalten die Initiatoraminosäure Methionin (Gilboa-Garber *et al.*, 2000).

Die Aminosäuresequenz des LecB-Proteins weist starke Homologien zu einem Protein aus *Ralstonia solanacearum* sowie zu drei Proteinen aus *Photorapsus luminescens* auf. Für das Protein aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *R. solanacearum* wurde eine Spezifität für Mannose und Fructose nachgewiesen (Sudakevitz *et al.*, 2004). Bei den Proteinen aus dem insektenpathogenen Bakterium *P. luminisescens* handelt es sich um zwei Photopexine und ein Protein mit unbekannter Aktivität (Imberty *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurden in den Organismen *Burkholderia cenocepacia* und *Chromobacterium violaceum* drei Gene bzw. ein Gen entdeckt, die für Proteine kodieren, deren C-terminale Bereiche LecB-homologe Sequenzen aufweisen. Abgesehen von *P. luminisescens* sind alle diese Organismen ubiquitär in Böden verbreitet und fakultativ pathogen und können daher ernste Infektionen in immunsupprimierten Patienten auslösen (Mitchell *et al.*, 2005).

In früheren Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von LecA und LecB wurden die Lectine fast ausschließlich im Cytoplasma nachgewiesen (Glick & Garber, 1983). Geringe Mengen beider Lectine wurden ebenfalls in der inneren und äußeren Membran sowie im Periplasma detektiert, wobei die Höhe des extracytoplasmatischen Anteils der Lectine von den Kulturbedingungen abhängig war. Die spezifische Aggregation von *P. aeruginosa*-Zellen durch die Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem L-Fucose-Chitosan weist ebenfalls auf die Exposition des LecB-Proteins auf der Zelloberfläche hin (Morimoto *et al.*, 2001). Weder im LecA- noch im LecB-Protein ist ein Signal für die derzeit 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.

1.2.2 Toxizität der Lectine

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). Des Weiteren führt oral verabreichtes LecA in Ratten zu ähnlichen Veränderungen des Metabolismus von Dünndarmzellen, wie sie nach der Verabreichung von PHA beobachtet werden (Grant *et al.*, 1995). Die Mortalitätsrate immunsupprimierter Mäuse durch eine vom Darm ausgehende

Sepsis in Folge der intestinalen Injektion einer Kombination aus LecA und dem Exotoxin A von *P. aeruginosa* entspricht der Rate nach der Injektion lebender *P. aeruginosa*-Zellen, während einzeln injiziertes LecA bzw. Exotoxin A keine Effekte hervorruft (Laughlin *et al.*, 2000). Die Koinkubation von *P. aeruginosa*-Zellen und dem Hormon Norepinephrin führt zu einem Anstieg der *lecA*-Expression sowie des extracytoplasmatischen Anteils dieses Lectins. Die Ausschüttung von Norepinephrin ins Lumen des intestinalen Traktes von Mäusen wurde als Folge chirurgischer Eingriffe beobachtet (Alverdy *et al.*, 2000). Zudem wird die Expression des *lecA*-Gens durch Zell-Zell-Kontakt mit Epithelzellen des Intestinums sowie mit Zellen der eigenen Spezies induziert (Wu *et al.*, 2003).

Zur Toxizität des LecB-Proteins sind im Vergleich zu LecA bislang nur wenige Studien durchgeführt worden. Das LecB-Protein bindet spezifisch an die Schleimhautzellen des Respirationstraktes und vermindert die Schlagfrequenz der dort ansässigen Zilien (Adam *et al.*, 1997a/b).

Die Beteiligung der Lectine am Infektionsprozess konnte in klinischen Studien belegt werden. So ist es gelungen, sowohl eine *P. aeruginosa*-induzierte Otitis externa diffusa (Steuer *et al.*, 1993) als auch eine Entzündung des Respirationstraktes (von Bismarck *et al.*, 2001) durch die Behandlung der Patienten mit einer Lösung aus den LecA- und LecB-spezifischen Zuckern erfolgreich zu therapieren.

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung der Lectine am Infektionsprozess liefert die Regulation der Genexpression von *lecA* und *lecB*. In *P. aeruginosa* konnten bislang die zwei *quorum sensing*-Systeme LasR/LasI und RhIR/RhII identifiziert werden, womit jeweils der Transkriptionsaktivator und die Synthese des *autoinducers* N-Acyl-Homoserinlacton (AHL) bezeichnet sind (Gambello *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1992; Passador *et al.*, 1993; Ochsner *et al.*, 1994; Brint & Ohman, 1995; Latifi *et al.*, 1995; Ochsner & Reiser, 1995). Die Zelldichte-abhängige Expression der Gene *lecA* und *lecB* wird durch diese beiden Systeme sowie den Stationärphasen-Sigma-Faktors RpoS (Preston *et al.*, 1995; Latifi *et al.*, 1996) reguliert (Winzer *et al.*, 2000). Damit ist die Synthese der beiden Lectine gekoppelt mit der anderer Virulenzfaktoren, wie der Elastase, alkalische Protease, LasA Protease, Exotoxin A, Pyocyanin, Pyoverdin und Hämolyisin (Whitley *et al.*, 1999).

Zudem stimulieren beide Lectine humane T-Lymphozyten und murine Splenozyten (Avichezer & Gilboa-Garber, 1987) und rufen *in vitro* antitumorgene Effekte hervor (Avichezer & Gilboa-Garber, 1991).

1.2.3 Biofilmbildung bei *P. aeruginosa*

Der größte Teil aller in der Natur, der Industrie und der medizinischen Umgebung vorkommenden Bakterien existiert in Form von Biofilmen (Costerton *et al.*, 1995, 1999, 2001; Stickler, 1999). Als Biofilm wird eine Bakterienpopulation bezeichnet, die an einer festen Oberfläche angeheftet und in einer Matrix selbst produzierter extrazellulärer Substanzen eingebettet ist (Wingender & Flemming, 1999). Aufgrund der strukturellen Heterogenität natürlicher Biofilme, ausgelöst durch Sauerstoff-, Nährstoff- und pH-Gradienten, entstehen diverse ökologische Nischen, die von verschiedenen Mikroorganismen besetzt werden (Xu *et al.*, 1998; Wimpney *et al.*, 2000). Biofilme weisen eine äußerst komplexe Struktur auf. Ein Netz aus wasserführenden Kanälen vermittelt den Transport von Nähr- und Abfallstoffen (Costerton *et al.*, 1995, 1999; Flemming & Wingender, 2001). Neben den immobilisierten Mikroorganismen bestehen bakterielle Biofilme hauptsächlich aus Wasser und extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die sich aus Proteinen, Polysacchariden und Nukleinsäuren zusammensetzen (Wingender & Flemming, 1999). Bakterielle Biofilme in Rohren und Leitungen sowie auf medizinischen Geräten und epithelialen Oberflächen stellen ein enormes industrielles und medizinisches Problem dar. Sie 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 widerstandsfähiger gegenüber herkömmlichen Antibiotika und der Immunantwort des Wirts sind (Brown *et al.*, 1988; Stewart & Costerton, 2001; Mah & O'Toole, 2001; Mah *et al.*, 2003).

P. aeruginosa ist in der Lage auf einer Vielzahl verschiedener Oberflächen, insbesondere in den Lungen von CF-Patienten, den Schläuchen von Kathetern und auf Kontaktlinsen persistierende Biofilme zu bilden (Govan & Deretic, 1996; O'Toole & Kolter, 1998; O'Toole, 2004, Fux *et al.*, 2005). Die Biofilmbildung durch *P. aeruginosa* ist ein mehrstufiger Prozess, der stark von den gegebenen Bedingungen, z. B. der Zusammensetzung und Strömungsgeschwindigkeit des Mediums, abhängt (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2003a; Reisner *et al.*, 2005). Die Bewegung planktonischer *P. aeruginosa*-Zellen wird durch die einzelne, polare Flagelle angetrieben. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Flagelle der Bakterien auch für die reversible Adhäsion der Zellen an das Substratum verantwortlich ist (O'Toole & Kolter, 1998; Sauer *et al.*, 2002). Daneben verfügen sie über eine weitere Bewegungsform, die als *twitching motility* bezeichnet wird und durch die Streckung und Retraktion der sog. Typ IV-Pili generiert wird

(Bradley, 1980; Merz *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003). In Folge dieser Bewegung aggregieren die angehefteten Zellen zu Mikrokolonien, welche die Basiseinheit eines Biofilms bilden (Costeron *et al.*, 1995; O'Toole & Kolter, 1998; Chiang & Burrows, 2003). Darüber hinaus zeigen neuere Studien, dass die Entstehung von Mikrokolonien auch Typ IV-Pili-unabhängig durch aufeinander folgende Teilungszyklen einzelner Bakterienzellen erfolgen kann (Singh *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2003a/b). Die anschließende Formation des reifen Biofilms ist durch die Produktion der EPS gekennzeichnet. Die Zusammensetzung der EPS variiert von Organismus zu Organismus. Neben Wasser wird das Alginat, ein Polymer aus Mannuron- und Guluronsäure, als Hauptkomponente der EPS in Biofilmen mucoider *P. aeruginosa*-Stämmen angesehen (Evans & Linker, 1973). In Biofilmen nicht-mucoider Stämmen dagegen sind Glucose, Mannose und Rhamnose die primären Zuckerbestandteile der EPS (Wozniak *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2004; Matsukawa & Greenberg, 2004; Frieman & Kolter, 2004a/b). Für die Bildung und Aufrechterhaltung des Netzwerks aus wasserführenden Kanälen, die im späten Stadium einen Biofilm durchziehen, ist die Synthese von Rhamnolipiden verantwortlich (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003).

Die Formation einer komplexen Biofilmarchitektur wird durch externe Umweltsignale und durch die bakterielle Zell-Zell-Kommunikation gesteuert (Davies *et al.*, 1998). Wie bei vielen anderen Gram-negativen Bakterienspezies beruht diese Zell-Zell-Kommunikation bei *P. aeruginosa* auf der Produktion von AHL. Diese niedermolekularen organischen Signalmoleküle bestehen aus einem Homoserinlactonrest und einer variablen Acyl-Seitenkette (Swift *et al.*, 1999). Darüber hinaus wird dieses Kommunikationssystem aus einer AHL-Synthase, häufig einem Protein mit Homologie zu LuxI, und einem AHL-Rezeptorprotein mit Homologie zu LuxR gebildet. Bei niedrigen Populationsdichten produzieren die Zellen eine geringe Grundmenge an AHL. Mit ansteigender Zelldichte diffundieren die Signalmoleküle ins Medium und reichern sich dort an. Ab einer kritischen Konzentration binden die AHL an das jeweilige Rezeptorprotein, das die Expression bzw. die Repression bestimmter Gene einleitet. In *P. aeruginosa* konnten bislang die beiden *quorum sensing*-Systeme LasR/LasI und RhIR/RhII identifiziert werden (Davies *et al.*, 1998; De Kievit *et al.*, 2001). Durch die positive Regulation der Gene *rhIR* und *rhII* durch das *las*-System sind beide Systeme eng miteinander verknüpft. In komplexen Interaktionen mit zusätzlichen Regulatoren, wie GacA, Vfr, RsaL, RpoS und MvaT, reguliert diese *quorum sensing*-Kaskade die Synthese von etwa 5 % der Gene in *P. aeruginosa* (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Hentzer *et al.*, 2003). Das *las*-System kontrolliert die Produktion vieler Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*, wie Elastase, LasA Protease, alkalische Protease und

Exotoxin A (De Kievit & Iglewski, 2000). Dies ermöglicht eine koordinierte Expression der Pathogenitätsfaktoren nachdem eine ausreichend hohe Zelldichte erreicht wurde und vermeidet so eine vorzeitige und unökonomische Synthese dieser Substanzen (Pesci & Iglewski, 1999). Darüber hinaus kontrolliert das *las*-System die Expression der Gene *xcpP* und *xcpR*, welche die Regulation des Typ II-Sekretionswegs beeinflussen. Zudem reguliert das *rhl*-System die Produktion von Rhamnolipiden, die für die Organisation und Aufrechterhaltung der komplexen Biofilmarchitektur verantwortlich sind (Espinosa-Urgel, 2003; Davey *et al.*, 2003) sowie die Synthese des Pyocyanins, der Siderophore und der beiden Lectine LecA und LecB (Winson *et al.*, 1995; Winzer *et al.*, 2000; Diggie *et al.*, 2002). Des Weiteren sekretiert *P. aeruginosa* das *Pseudomonas quinolone*-Signal (PQS) ins extrazelluläre Medium, dessen Produktion und Aktivität ebenfalls vom *las* und vom *rhl*-System abhängt. PQS wiederum reguliert die Expression der Gene *lasB*, *rhlI* und *rhlR* und scheint somit als regulatorische Element zwischen dem *las* und dem *rhl*-System zu fungieren (Pesci *et al.*, 1999; McKnight *et al.*, 2000). Aufgrund der im Vergleich zu planktonischen Kulturen höheren Populationsdichte in Biofilmen und der großen Anzahl *quorum sensing*-regulierter Gene weisen Bakterien innerhalb von Biofilmen einen von nicht-sessilen Zellen abweichenden Phänotyp auf (Swift *et al.*, 1999; Whiteley *et al.*, 2001).

Möglicherweise als Folge eines auftretenden Nährstoffmangels lösen sich zeitweise einzelne Zellen oder ganze Teile eines Biofilms aus dem sessilen Zellverbund, um an abgelegenen Standorten neue Kolonien zu bilden (Costeron *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004; Reisner *et al.*, 2005).

1.3 Biotechnologische Nutzung von Lectinen als Affinitäts-tag

Die Produktion rekombinanter Proteine in hochreiner Form ist für die verschiedensten biotechnologische Anwendungen, z. B. die Charakterisierung und Kristallisierung von Enzymen oder die Gewinnung von Antikörpern, eine unumgängliche Maßnahme. Konventionelle Methoden zur Reinigung nativer Proteine enthalten meist eine Abfolge chromatographischer Schritte, die zum Teil von erheblichen Verlusten des gewünschten Proteins begleitet werden. Die Nutzung verschiedener affinitätschromatographischer Verfahren ermöglicht es, einzelne chromatographische Schritte aus dem Reinigungsprotokoll zu eliminieren. Im idealen Fall können dann durch einen einzigen hochselektiven Schritt große Proteinmengen mit hohem Reinheitsgrad gewonnen werden. Dies ermöglicht neben einer erheblichen Zeitersparnis die Optimierung des Ertrags. Die Affinitätschromatographie

beruht auf der spezifischen, reversiblen Bindung eines Adsorbenten (Affinitäts-*tag*), der mit dem rekombinanten Protein fusioniert ist, an einen individuellen, matrixgebundenen Liganden. Effiziente Affinitäts-*tags* weisen folgende Eigenschaften auf: (1) Sie ermöglichen die Isolierung des rekombinanten Proteins aus einer komplexen Lösung in nur einem Schritt. (2) Sie üben keinen bzw. nur einen minimalen Einfluss auf die Tertiärstruktur und die biologische Aktivität des Zielproteins aus. (3) Sie lassen sich einfach und spezifisch nachweisen. (4) Sie sind einfach und spezifisch zu entfernen. (5) Sie sind für eine Vielzahl von Proteinen anwendbar (Terpe, 2003). Im Allgemeinen hat die Nutzung kleiner Peptid-*tags*, z. B. dem Poly-Arginin-, FLAG-, Poly-Histidin-, c-myc-, S- oder Strep-*tag*, den Vorteil, dass diese die Konformation und die Aktivität des Zielproteins nicht beeinflussen und daher für viele Anwendungen nicht entfernt werden müssen. Dagegen können große Fusionspartner, wie das Maltose-bindende Protein, die β -Galactosidase oder das Protein A, die Löslichkeit und Stabilität des Zielproteins erhöhen. Aufgrund ihrer individuellen Eigenschaften müssen bei der Wahl des optimalen Affinitäts-*tags* letztendlich auch Faktoren wie Stabilität und Hydrophobizität des rekombinanten Proteins, das jeweils verwendete Expressionssystem und die sich anschließende Anwendung berücksichtigt werden. Im Folgenden werden einige der derzeit gängigsten Affinitäts-*tags*, darunter auch zwei Zuckerbindeproteine, vorgestellt.

1.3.1 Poly-Histidin-*tag*

Bei diesem weit verbreiteten System werden die Zielproteine mit einem kurzen Poly-Histidin-*tag* fusioniert und nach erfolgter Synthese mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt (Porath *et al.*, 1975). Die IMAC basiert auf der Interaktion zwischen immobilisierten, divalenten Kationen (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) und den Seitenketten bestimmter Aminosäuren, üblicherweise Histidinen. Nitrilo-3-Essigsäure (NTA) stellt heute die gebräuchlichste Chelatgruppe für die Reinigung von Proteinen mit Histidinresten dar (Hochuli *et al.*, 1987). NTA kann vier der sechs Bindungsstellen eines Ni^{2+} -Ions belegen, wodurch dieses sehr stabil an die Matrix gebunden wird und selbst unter stringenten Reinigungsbedingungen nicht von der Matrix gewaschen wird. Zur Elution der gebundenen Poly-Histidin-Fusionsproteine bestehen zwei Möglichkeiten. Durch Senkung des pH-Werts werden die Seitenketten der Histidine protoniert (pH 4,5-5,3) und können nicht mehr als Elektronendonator mit der Ni-NTA-Matrix interagieren. Darüber hinaus können die Histidinreste der Fusionsproteine durch Waschen mit Imidazol-haltigen Puffern von der Ni^{2+} -NTA-Matrix verdrängt werden.

Mit Hilfe des Poly-Histidin-*tags* wurden bereits zahlreiche Proteine mit einer Ausbeute von über 90 % isoliert, wobei viele verschiedene Expressionssysteme, darunter Bakterien- (Chen & Hai; 1994; Rank *et al.*, 2001), Hefe- (Kaslow & Shiloach, 1994; Borsing *et al.*, 1997), Säuger- (Janknecht & Nordheim, 1992) und Insektenzellen (Kuusinen *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1998) zum Einsatz kamen. Die Verwendung des Poly-Histidin-*tags* ist auch unter denaturierenden Bedingungen möglich. Dank seiner geringen Größe und Ladung hat der Poly-Histidin-*tag* in den meisten Fällen keinen Einfluss auf Struktur und Aktivität des Zielproteins, auch wenn dies im Vorfeld nicht ausgeschlossen werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Poly-Histidin-*tag* sowohl mit dem N- wie auch mit dem C-Terminus des Proteins fusioniert werden kann (Halliwell *et al.*, 2001).

Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung des Poly-Histidin-*tags* entsteht, wenn Metallionen funktionelle Bestandteile des Zielproteins sind, da diese vom NTA adsorbiert werden können. Darüber hinaus wird die Reinigung von Proteinen unter anaeroben Bedingungen nicht empfohlen, da die Ni²⁺-Ionen dann reduziert werden. Der Nachteil bei der Verwendung von Imidazol ist dessen Einfluss in NMR-Experimenten und in der Kristallographie. Zudem führt die Gegenwart von Imidazol häufig zur Aggregation der rekombinanten Proteine (Hefti *et al.*, 2001).

1.3.2 Strep-*tag*

Der Strep-*tag*, ein Peptid zur Isolierung korrespondierender Fusionsproteine unter Verwendung einer Streptavidin-Matrix, kommt in den letzten Jahren immer häufiger zum Einsatz (Schmidt & Skerra, 1993). Durch die Entwicklung einer Streptavidin-Mutante (Strep-Tactin) konnte die Affinität des aus acht Aminosäuren bestehenden Strep-*tags* II zum Streptavidin weiter gesteigert werden. Die Bindekonstante liegt im Bereich von 1 μ M (Schmidt *et al.*, 1996; Voss & Skerra, 1997; Korndörfer & Skerra, 2002). Die Fusionsproteine werden unter physiologischen Bedingungen sehr spezifisch in der Biotin-Bindetasche gebunden und üblicherweise mit Desthiobiotin eluiert. Die Bindung biotinylierter Wirtsproteine von *E. coli* an die Streptavidin-Matrix kann durch Avidin verhindert werden. Ein Vorteil des Systems ist die große Toleranz der Bindung gegenüber Chelatoren, hohen Salzkonzentrationen, schwachen Detergenzien und Reduktionsmitteln. Unter denaturierenden Bedingungen wird die Strep-*tag*/Strep-Tactin-Interaktion zerstört. Die Detektion des Strep-*tags* erfolgt mittels Strep-Tactin-Konjugaten und spezifischen Antikörpern. Wie beim Poly-Histidin-*tag* ist eine Fusion mit beiden Termini des Zielproteins möglich. Die Produktion

rekombinanter Strep-*tag*-Proteine konnte bereits in Bakterien (Fontaine *et al.*, 2002), Hefen (Murphy & Lagarias, 1997), Säugerzellen (Sárdy *et al.*, 2002), Pflanzen (Drucker *et al.*, 2002) und Insektenzellen sowie unter anaeroben Bedingungen (Hans & Buckel, 2000; Juda *et al.*, 2001) erfolgreich durchgeführt werden. Zudem ist auch die Reinigung von integralen Membran- (Groß *et al.*, 2002) sowie metallhaltigen Proteinen möglich. Eine besondere Anwendung des Strep-*tags* ist die Exposition von Proteinen auf der eukaryotischen Zelloberfläche (Ernst *et al.*, 2000). Auch die Kristallisation eines mittels Strep-*tags* isolierten Proteins sowie dessen Einsatz in NMR-Studien wurden bereits durchgeführt (Ostermeier *et al.*, 1997).

1.3.3 Cellulose-bindendes Protein

Eines der Systeme, die auf der Interaktion eines Affinitäts-*tags* mit einem Polysaccharid beruhen, basiert auf der Fusion des Zielproteins mit einer der 13 bekannten Cellulose-bindenden Domänen (CBD), die eine Größe von 4-20 kDa aufweisen. Einige dieser CBD wurden aufgrund der irreversiblen Bindung an Cellulose zur Immobilisierung von Enzymen eingesetzt (Xu *et al.*, 2002). Dagegen binden CBD der Familie I über H-Brücken und van der Waals-Interaktionen spezifisch und reversibel an kristalline Cellulose und sind daher für die affinitätschromatographische Proteinreinigung geeignet (Tomme *et al.*, 1998). Aufgrund der enorm hohen Bindekonstante allerdings muss die Elution des rekombinanten Proteins unter denaturierenden Bedingungen erfolgen. Eine anschließende Rückfaltung des Proteins ist daher unumgänglich. Fusionsproteine, die CBD der Familie I und II enthalten, können dagegen mit Ethylenglycol eluiert werden (McCormick & Berg, 1997). Die Interaktion der CBD mit der Cellulose bleibt über einen weiten pH-Bereich stabil. Ein weiterer Vorteil dieses Systems besteht darin, dass der CBD-*tag* sowohl am C- wie auch am N-Terminus angefügt werden kann. Die Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine mittels CBD-*tag* konnte bisher in Bakterien, Säuger-, Hefe- und Insektenzellen durchgeführt werden (Tomme *et al.*, 1998).

1.3.4 Maltose-bindendes Protein

Ein weiteres Zuckerbindeprotein, das als Affinitäts-*tag* in der Proteinreinigung Verwendung findet, ist das Maltose-bindende Protein (MBP) aus *E. coli* K12 (Duplay *et al.*, 1988; Di Guan *et al.*, 1988). Das Protein weist eine Größe von 40 kDa auf und ermöglicht die

affinitätschromatographische Reinigung rekombinanter Fusionsproteine in nur einem Schritt unter Einsatz einer Amylose-Matrix. Die Elution des Proteins erfolgt durch 10 mM Maltose in einem physiologischen Puffer. Die Bindekonstante von MBP zur Amylose liegt im micromolaren Bereich. Ein Vorteil dieses Affinitäts-tags ist, dass er bei heterologer Expression in Bakterien die Löslichkeit, insbesondere von eukaryotischen Proteinen, erhöhen kann (Sachdev & Chirgwin, 1999). Die Fusion des MBP-tags ist mit beiden Termini des Zielproteins möglich (Sachdev & Chirgwin, 2000). Durch die Insertion eines *spacers* bestehend aus 10 Asparaginen zwischen dem MBP und dem Zielprotein kann die Bindung an die Amylose optimiert werden. Bei einigen Proteinen hemmen bereits geringe Konzentrationen von Detergenzien, z. B. 0,2 % Triton X-100 und 0,25 % Tween 20, die Interaktion mit der Matrix. Zudem ist die Bindung nur in einem begrenzten pH-Bereich (pH 7-8,5) stabil. Die verwendeten Puffer können Salzkonzentrationen von bis zu 1 M aufweisen, ohne die Interaktion mit der Amylose zu lösen. Nach der Reinigung des Fusionsproteins muss der MBP-tag für die nachfolgende Anwendungen proteolytisch abgespalten werden. MBP wird häufig in Kombination mit kleineren Affinitäts-tags eingesetzt (Hamilton *et al.*, 2002; Podmore & Reynolds, 2002).

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Das LecA-Protein konnte in zahlreichen Studien bereits ausführlich charakterisiert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war die physiologische Charakterisierung des zweiten Lectins LecB von *P. aeruginosa* sowie die Evaluierung des biotechnologischen Potentials des Lectins, als Affinitäts-tag für die Reinigung rekombinanter Fusionsproteine eingesetzt zu werden.

(1) Für die biochemische Charakterisierung, die Aufklärung der Proteinstruktur sowie für verschiedene Studien zur physiologischen Funktion des LecB-Proteins sollte das Lectin nach heterologer Überexpression in *E. coli* in präparativem Maßstab affinitätschromatographisch isoliert werden.

(2) Für die physiologische Charakterisierung der Lectine LecA und LecB sollten Stämme von *P. aeruginosa* erstellt werden, die eine Deletion in jeweils einem bzw. in beiden Lectin-Genen aufweisen. Diese Stämme sollten eingesetzt werden, um die Bedeutung der Lectine für die Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* unter verschiedenen Kulturbedingungen zu untersuchen.

(3) Nach dem bisherigen Kenntnisstand ist nur ein geringer Teil beider Lectine außerhalb des Cytoplasmas von *P. aeruginosa* lokalisiert (Glick & Garber, 1983). Die intrazelluläre Lokalisation steht in Widerspruch zu den in vorherigen Studien beschriebenen cytotoxischen Eigenschaften der Lectine. Daher sollte die subzelluläre Lokalisierung der Lectine in planktonischen und in sessilen Zellen erneut untersucht werden. Der Mechanismus der dabei gefundenen Assoziation des LecB-Proteins mit der äußeren Membran war Gegenstand weiterer Studien.

(4) Das LecB-Protein weist keines der derzeit bekannten N-terminalen Sekretionssignale auf. Am C-Terminus enthält es ein D-A-V-V-Tetrapeptid, das Homologien zu einem Motiv einer Nukleosid Diphosphat Kinase (Ndk) aus *P. aeruginosa* aufweist (Kamath *et al.*, 2000), welches an der Sekretion dieses Proteins beteiligt ist. Durch ortsspezifische Mutagenese dieses putativen Sekretionsmotivs und Untersuchung der Struktur-Funktions-Beziehung sollte der Einfluss des D-A-V-V-Motivs auf die LecB-Sekretion analysiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Gene eines bicistronisches Operon, die benachbart im Genom von *P. aeruginosa* lokalisiert sind und Sequenzhomologien zu bekannten Sekretionsfaktoren aus *E. coli* aufweisen, an der LecB-Translokation beteiligt sind.

(5) Kommerziell sind nur wenige Systeme zur affinitätschromatographischen Aufreinigung erhältlich, die auf der Interaktion eines Lectins mit seinem Liganden basieren. Es sollte geprüft werden, ob der Einsatz des LecB-Proteins als Affinitäts-*tag* eine effiziente Reinigung von fusionierten Fremdproteinen in nur einem chromatographischen Schritt ermöglicht. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob das Lectin als *linker* zur Immobilisierung von Enzymen an eine L-Fucose-Matrix eingesetzt werden kann.

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

Enzyme: MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Schwalbach)

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

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Vektoren und rekombinante Plasmide sind in Tab. 2, Tab. 3 und Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 2 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> ⁺ , <i>Tp</i> ^r , <i>Sm</i> ^r | Simon <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) | <i>F 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>Escherichia coli</i> Tuner (DE3) | <i>F ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (λ <i>cIts857</i> <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>) | Novagen, Madison, USA |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PAO1 | Wildtyp | Holloway <i>et al.</i> , 1979 |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> SG81 | Isolat aus einem technischen Abwassersystem | Grobe <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PATI1 | Δ <i>lecA</i> :: Ω Gm ^r | Tielker, 2001 |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PATI2 | Δ <i>lecB</i> :: Ω Gm ^r | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PATI3 | Δ <i>lecA</i> | diese Arbeit |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PATI4 | Δ <i>lecB</i> | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PATI5 | Δ <i>lecB</i> , Δ <i>lecA</i> :: Ω Gm ^r | diese Arbeit |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PAO1gfp | WT mit chromosomalem <i>gfpmut3</i> -Marker | diese Arbeit |

Fortsetzung Tab. 2

| | | |
|--|--|--------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PATI3gfp | $\Delta lecA$ mit chromosomalem <i>gfp</i> mut3-Marker | diese Arbeit |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PATI4gfp | $\Delta lecB$ mit chromosomalem <i>gfp</i> mut3-Marker | diese Arbeit |

Tab. 3 Übersicht der verwendeten Vektoren

| Vektor für <i>E. coli</i> | Genetische Marken | Referenz/Bezugsquelle |
|---|---|---------------------------------|
| pBCSK | P ₃₇ P _{T3} P _{lac} <i>lacZ'</i> Cm ^r ColE1 | Stratagene, Heidelberg |
| pBSL141 | ColE1 Ap ^r Gm ^r | Alexeyev <i>et al.</i> , 1995 |
| pSUP202 | pBR325, Ap ^r Cm ^r Tc ^r <i>mob</i> | Simon <i>et al.</i> , 1983 |
| pRK600 | Cm ^r <i>ori</i> -ColE1 RK2- <i>mob</i> ⁺ RK2- <i>tra</i> ⁺ Helferplasmid in Konjugationen | Kessler <i>et al.</i> (1992) |
| 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 | | |
| pFF19-eYFP | pflanzlicher Expressionsvektor, enthält <i>yfp</i> -Gen | Timmermans <i>et al.</i> , 1990 |
| pFF19-eCFP | pflanzlicher Expressionsvektor, enthält <i>cfp</i> -Gen | Timmermans <i>et al.</i> , 1990 |
| pSWGFP | pTZ110 zur Konstruktion von Reporterfusionen mit <i>gfp</i> | Wilhelm, unveröffentlicht |
| pPHU231 | incP <i>oriV oriT mob Tc</i> ^r | Reyes <i>et al.</i> , 1996 |
| pBBR1MCS | <i>lacZα</i> Cm ^r <i>rep mob</i> | Kovach <i>et al.</i> , 1994 |
| pUCPKS | ColE1 P _{T7} P _{T3} P _{lac} <i>lacZα</i> Ap ^r | Stratagene, Heidelberg |

Tab. 4 Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Referenz |
|---------|---|------------------------------|
| pEC2 | 345 bp <i>NdeI</i> / <i>Bam</i> HI-PCR-Produkt in pET22b (<i>lecB</i> -Gen P _{T7Φ10} -kontrolliert) | Loris <i>et al.</i> , 2003 |
| pEXCH2 | 345 bp <i>NdeI</i> / <i>Bam</i> HI-PCR-Produkt in pET22b (<i>lecB*</i> -Gen P _{T7Φ10} -kontrolliert) | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pBBC2 | 398 bp <i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I-Fragment aus pEC2 in pBBR1MCS (<i>lecB</i> P _{lac} -kontrolliert) | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pBBXCH2 | 398 bp <i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I-Fragment aus pEXCH2 in pBBR1MCS (<i>lecB*</i> P _{lac} -kontrolliert) | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pL1US | 493 bp <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI-PCR-Fragment (stromaufwärts-Bereich von <i>lecA</i>) in pBCSK | Tielker, 2001 |
| pL2US | 515 bp <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI-PCR-Fragment (stromaufwärts-Bereich von <i>lecB</i>) in pBCSK | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |

Fortsetzung Tab. 4

| | | |
|---------------------------|---|--------------------------------|
| pL1DS | 582 bp <i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III-PCR-Fragment (stromabwärts-Bereich von <i>lecA</i>) in pBCSK | Tielker, 2001 |
| pL2DS | 616 bp <i>Bam</i> HI / <i>Hind</i> III-PCR-Fragment (stromabwärts-Bereich von <i>lecB</i>) in pBCSK | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pL1UG | ca. 1,6 kbp <i>Mlu</i> I-Fragment aus pBSL141 (Ω Gm ^r) in pL1US | Tielker, 2001 |
| pL2UG | ca. 1,6 kbp <i>Mlu</i> I-Fragment aus pBSL141 (Ω Gm ^r) in pL2US | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pUGD1 | ca 2,1 kbp <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI aus pL1UG in pL1DS | Tielker, 2001 |
| pUGD2 | ca 2,1 kbp <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI aus pL2UG in pL2DS | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pSUGD1 | ca. 2,6 kbp Fragment <i>Xba</i> I / <i>Hind</i> III aus pUGD1 (Δ <i>lecA</i> :: Ω Gm ^r) in pSUP202 | Tielker, 2001 |
| pSUGD2 | ca. 2,6 kbp Fragment <i>Xba</i> I / <i>Hind</i> III aus pUGD2 (Δ <i>lecB</i> :: Ω Gm ^r) in pSUP202 | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pSUD1 | pSUGD1 ohne Ω Gm ^r -Kassette | diese Arbeit |
| pSUD2 | pSUGD2 ohne Ω Gm ^r -Kassette | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pEYL2 | 765 bp <i>Xba</i> I / <i>Nde</i> I-PCR-Fragment mit <i>yfp</i> in pEC2 (<i>yfp</i> :: <i>lecB</i> -Gen P _{T7Φ10} -kontrolliert) | Tielker <i>et al.</i> , 2005 |
| pECL2 | 765 bp <i>Xba</i> I / <i>Nde</i> I-PCR-Fragment mit <i>cfp</i> in pEC2 (<i>cfp</i> :: <i>lecB</i> -Gen P _{T7Φ10} -kontrolliert) | diese Arbeit |
| pSWL1PG | 493 bp <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI-PCR-Fragment (stromaufwärts-Bereich von <i>lecA</i>) in pSWGFP | diese Arbeit |
| pSWL2PG | 515 bp <i>Xba</i> I / <i>Bam</i> HI-PCR-Fragment (stromaufwärts-Bereich von <i>lecB</i>) in pSWGFP | diese Arbeit |
| pPHUL1PG | <i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I-Fragment aus pSWL1PG (<i>gfp</i> -Gen P _{<i>lecA</i>} kontrolliert) in pPHU231 | diese Arbeit |
| pPHUL2PG | <i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I-Fragment aus pSWL1PG (<i>gfp</i> -Gen P _{<i>lecB</i>} kontrolliert) in pPHU231 | diese Arbeit |
| pUX-BF13 | Ap ^r <i>mob</i> ⁺ <i>ori</i> -R6K; Helferplasmid; Tn7-Transpositionsfunktion <i>in trans</i> | Bao <i>et al.</i> (1991) |
| pBK-mini-Tn7- <i>gfp2</i> | pUC19-Derivat mit mini-Tn7-Gm ^r -P _{A1/04/03} - <i>egfp</i> Cm ^r Km ^r Ap ^r <i>mob</i> ⁺ | Koch <i>et al.</i> (2001) |
| pBK-mini-Tn7- <i>gfp3</i> | pUC19-Derivat mit mini-Tn7-Sm ^r -P _{A1/04/03} - <i>egfp</i> Cm ^r Km ^r Ap ^r <i>mob</i> ⁺ | Koch <i>et al.</i> (2001) |
| pURE | pET19b mit synthetischem Polylinker und 345 bp <i>Nde</i> I / <i>Bam</i> HI PCR-Produkt mit <i>lecB</i> -Gen | Bartels, 2004 |
| pURE-cutA | 647 bp <i>Nco</i> I / <i>Xho</i> I-PCR-Fragment in pURE (<i>cutA</i> :: <i>lecB</i> P _{T7Φ10} -kontrolliert) | diese Arbeit |
| pURE-lipB | 551 bp <i>Nco</i> I / <i>Xho</i> I-PCR-Fragment in pURE (<i>lipB</i> :: <i>lecB</i> P _{T7Φ10} -kontrolliert) | diese Arbeit |
| pET22lipB | pET22b mit 561 bp <i>Nco</i> I / <i>Sac</i> I <i>lipB</i> -PCR-Fragment (<i>lipB</i> ohne Signalsequenz) | Eggert <i>et al.</i> , 2000 |
| pMAC58 | <i>cutA</i> in pMAC | Lauwereys <i>et al.</i> , 1991 |
| pUCP59 | 1048 bp <i>Hind</i> III / <i>Bam</i> HI-PCR-Fragment in pUCPKS (PA3359 P _{<i>lac</i>} -kontrolliert) | diese Arbeit |

Fortsetzung Tab. 4

| | | |
|----------|--|--------------|
| pUCP60 | 1094 bp <i>Xho</i> I / <i>Hind</i> III-PCR-Fragment in pUCPKS (PA3360 P_{lac} -kontrolliert) | diese Arbeit |
| pUCP6059 | 1078 bp <i>Sph</i> I / <i>Xho</i> I-Fragment aus pUCP60 in pUCP59 (bicistronisches Operon aus PA3360 und PA3359 P_{lac} -kontrolliert) | diese Arbeit |

2.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron GmbH (Ulm) bezogen und sind im Detail in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

| Bezeichnung | Nukleotidsequenz (5'→3') | Merkmal |
|-------------|--|----------------------------------|
| L1USA | GGG <u>GTC TAG AGA</u> CGC AAG GGA CTT AAA ATC | <i>Xba</i> I |
| L1USB | GGG GAT CCA <u>CGC GTG</u> ATT GAT CTC CGA TAT ATG AAT TC | <i>Bam</i> HI, <i>Mlu</i> I |
| L1DSA | GGG GAT CCA <u>CGC GTT</u> AAC TTG TCT CGG AAA AAA AAA G | <i>Bam</i> HI, <i>Mlu</i> I |
| L1DSB | GGG <u>GAA GCT TTC</u> GCG ATA GGA GCC GGA AAC | <i>Hind</i> III |
| L2USA | GGG <u>GTC TAG ATT</u> GAA CCC AAC GGG CAA ATC | <i>Xba</i> I |
| L2USB | GGG GAT CCA <u>CGC GTG</u> GTG TAT CTC CAC TGA ATA C | <i>Bam</i> HI, <i>Mlu</i> I |
| L2DSA | GGG GAT CCA <u>CGC GTG</u> AGT TCG GAA GGG ACG GGA TG | <i>Bam</i> HI, <i>Mlu</i> I |
| L2DSB | GGG <u>GAA GCT TCC</u> GAC CAG AAC AAT AAC AAG | <i>Hind</i> III |
| YFPFusFW | GCT CTA GAA <u>AGA AGG AGA</u> TAT ATA TAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA GCT | <i>Xba</i> I, RBS |
| YFPFusRV | GGA ATT <u>CCA TAT GCC</u> ATG <u>GCT TGT</u> ACA GCT CGT CCA TGC | <i>Nde</i> I, <i>Nco</i> I |
| CutFW | CAT <u>GCC ATG GCG</u> CCT ACT AGT AAC CCT GC | <i>Nco</i> I |
| CutRV | CCG <u>CTC GAG AGC</u> AGA ACC ACG GAC AGC CC | <i>Xho</i> I |
| BSLB3 | TAT <u>ACC ATG GAG</u> TCA GTA CAT AAT CCT GTC GTT CTT | <i>Nco</i> I |
| downA22 | ATA <u>TCT CGA GAT</u> TCG TAT TCT GGC CCC CGC CG | <i>Xho</i> I |
| 3360Up | CG <u>CTCGAGTCGAGGCTCGTACCATATGACTC</u> | <i>Xho</i> I, <i>Nde</i> I |
| 3360Dwn | GCA <u>AGCTTGGCCGGCATGCCGTCAGTAG</u> | <i>Hind</i> III, <i>Sph</i> I |
| 3359Up | CGA <u>AGCTTGACGGCATGCCGGCCAAGCTCGCGATG</u> | <i>Hind</i> III, <i>Sph</i> I |
| 3359Dwn | GGGGATCCTCAGGCCTCAGTGG | <i>Bam</i> HI |

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 U_pM 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. 6) kultiviert. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine O.D._{580 nm} = 0,05 beimpft. 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

ABTG-Medium: 1 mM MgCl₂; 0,1 mM CaCl₂; 0,01 mM FeCl₃; 15 mM NH₄SO₄; 34 mM Na₂HPO₄; 22 mM KH₂PO₄; 0,05 M NaCl; 0,3 mM Glucose

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.

Für den qualitativen Nachweis von Enzymen wurden folgende Indikatorplatten verwendet: α-Komplementationsagar (β-Galactosidase-Aktivität) nach Sambrook *et al.* (1989); Tributyrin-agar (Lipase- und Cutinase-Aktivität) nach Kok *et al.* (1993).

Tab. 6 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 |
| Tetracyclin (Tc) | 25 | 50 |
| Chloramphenicol (Cm) | 50 | 450 |
| Cycloserin (Cs) | - | 2500 |
| Streptomycin (Sm) | 50 | 250 |

2.5 Kultivierung von Biofilmen

2.5.1 Kultivierung von Biofilmen auf Membranfiltern

Die Anzucht von Biofilmen auf Membranfilter erfolgte nach Strathmann *et al.* (2002). Als Nährmedium wurde „*Pseudomonas* Isolation Agar“ (PIA, Difco) verwendet, dem 2 % (v/v) Glycerin sowie 0,1 M CaCl₂ hinzugefügt wurde. Die Bakterien wurden zunächst für 24 h bei 37 °C auf PIA kultiviert und anschließend in 0,14 M NaCl suspendiert. 10 ml dieser Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml wurden auf 25 mm Polycarbonat-Membranfilter (Milipore, Eschborn) vakuum-filtriert. Diese wurden für 24 h bei 37 °C auf der Oberfläche einer Agarplatte inkubiert. Unter diesen Bedingungen entstanden ungesättigte Biofilme, die anschließend mit der Lectinlösung (2.6) sowie mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYTO 62 (Molecular Probes, Eugene, USA) nach Angaben des Herstellers angefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) (2.28) analysiert wurden.

2.5.2 Kultivierung von Biofilmen auf Glasobjektträgern

Fettfreie, hitzesterilisierte Glasobjektträger wurden in sterilen Petrischalen mit 15 ml NB-Medium überschichtet und von einer ÜK auf eine Zelldichte von O.D._{580 nm} = 0,05 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 37 °C für 48 h sowie 72 h. Anschließend wurden die Glasobjektträger mit 2 × 1 ml 0,14 M NaCl gewaschen und die Zellen mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYTO 9 (Molecular Probes, Eugene, USA) nach Angaben des Herstellers angefärbt und mittels CLSM (2.28) analysiert.

2.5.3 Kultivierung von Biofilmen in Durchflusszellen

Die Kultivierung von Biofilmen in Durchflusszellen (1 × 4 × 40 mm) auf Glasdeckgläsern (Knittel 24 × 50 mm st1, Knittel Gläser, Braunschweig) erfolgte nach Klausen *et al.* (2003b) unter Verwendung von *gfp*-markierten Bakterienstämmen (Koch *et al.*, 2001) (2.5.4) in ABTG-Medium bei 30 °C über einen Zeitraum von 7 Tagen. Die Durchflusszellen wurden mit 350 µl einer Zellsuspension beimpft, die eine Zelldichte von O.D.₅₈₀ = 0,001 aufwies und aus einer ÜK in 0,14 M NaCl erstellt wurde. Nach der Beimpfung wurden die Durchflusszellen für 1 h stehen gelassen, um die Adhäsion der Zellen an das Substratum zu ermöglichen. Anschließend wurden die Durchflusszellen gewendet und der Medienstrom unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe (0,2 mm × s⁻¹; Watson Marlow 250S, Watson-Marlow Bredel, Wilmington, USA) gestartet. Die Analyse der Biofilme erfolgte in regelmäßigen Abständen mittels CLSM (2.28).

2.5.4 Chromosomale GFP-Markierung von *P. aeruginosa*

Die ortsspezifische Insertion des *gfp*-Gens in eine neutrale, intergenische Region im Genom von *P. aeruginosa* stromabwärts des *glmS*-Gens erfolgte mit Hilfe des mini-Tn7-Systems nach Koch *et al.* (2001). Dazu wurden die Plasmide pBK-mini-Tn7-*gfp2* bzw. pBK-mini-Tn7-*gfp3* und pUX-BF13 mit Hilfe des Helferplasmids pRK600 durch tetra-parentalen, konjugativen Transfer nach *P. aeruginosa* mobilisiert. Die *gfp*-markierten Bakterien wurden durch Selektion auf Gm- bzw. Sm-haltigem PIA isoliert.

2.6 Lectinfärbung von Biofilmzellen (modifiziert nach Strathmann *et al.*, 2002)

Auf Membranfiltern kultivierte Biofilme wurden mit 50 µl einer Lösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml YFP_{LecB} und 75 µM des DNA-bindenden Farbstoffs SYTO 62 (Molecular Probes, Eugene, USA) in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7 überschichtet, 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 3 × 1 ml Phosphatpuffer gewaschen. Zur kompetitiven Hemmung der Zuckerbindung wurde die YFP_{LecB}-Färbelösung mit 100 mg/ml L-Fucose für 15 min bei RT vorinkubiert. Die Analyse der Biofilme erfolgte anschließend mittels CLSM (2.28).

2.7 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 Midiprep-Kits der Firmen Invitex (Berlin) und 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.

2.8 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 × TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurde die „1kb-ladder“ der Firma Gibco-BRL (Eggenstein) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems 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.

2.9 *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.

2.10 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

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

2.11 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).

2.12 Polymerase-Kettenreaktion (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 *Taq*- oder *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 × (2 min: 95 °C); 30 × (1 min: 95 °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. Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

2.14 Konstruktion Lectin-defizienter Stämme von *P. aeruginosa*

Zur Erstellung der Insertions-/Deletionsmutanten der Gene *lecA* und *lecB* wurden Mutagenesevektoren konstruiert, die auf dem mobilisierbaren Suizidvektor pSUP202 beruhen. Zunächst wurden die stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Gensequenzen mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe der Oligonukleotide L1USA/L1USB, L1DSA/L1DSB (*lecA*) sowie L2USA/L2USB, L2DSA/L2DSB (*lecB*) wurden an den 5'-Enden der stromaufwärts liegenden, amplifizierten Fragmente Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonuklease *Xba*I inseriert, während an den 3'-Enden Erkennungssequenzen für die Enzyme *Mlu*I und *Bam*HI eingefügt wurden. An den 5'-Enden der stromabwärts liegenden, amplifizierten Fragmente wurden ebenfalls Erkennungssequenzen für die Enzyme *Bam*HI und *Mlu*I inseriert, während an deren 3'-Enden Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *Hind*III eingefügt wurden. Die Klonierung der Mutagenesevektoren erfolgte wie im Anhang dargestellt (Abb. 37-39). Die resultierenden Mutagenesevektoren wurden im Weiteren als pSUGD1 ($\Delta lecA::\Omega Gm^r$ in pSUP202) und pSUGD2 ($\Delta lecB::\Omega Gm^r$ in pSUP202) bezeichnet. Nach der Transformation des *E. coli*-Stamms S17-1 mit den Mutagenesevektoren wurden diese durch konjugativen Transfer nach *P. aeruginosa* PAO1

überführt. Die Transkonjuganden, die auf Selektivagarplatten mit den Antibiotika Gm, Tc und dem zur Gegenselektion verwendeten Detergenz Irgasan (25 µg/ml) wachsen konnten, enthielten die Mutagenesevektoren durch homologe Rekombination ins Genom integriert, da diese als pSUP202-Derivate in *P. aeruginosa* nicht replizieren konnten. Für das zweite Rekombinationsereignis, das im Verlust des Vektoranteils aus dem Genom resultierte, wurden Tc-sensitive Transkonjuganden angereichert. Zur Anreicherung der Zellen ohne chromosomal integriertem Vektoranteil wurden die Tc-resistenten Transkonjuganden zweimal ü.N. in 5 ml LB-Medium mit Gm kultiviert. 10 ml LB-Medium wurden mit der Menge der zweiten ÜK beimpft, dass die Zelldichte einer O.D._{580 nm} = 0,01 entsprach und die Kultur bei 37 °C und 200 UpM bis zu einer O.D._{580 nm} = 0,1 bebrütet. Nach anschließender Zugabe von Tc wurde die Kultur weitere 1,5 h bebrütet. Tc ist ein bakteriostatisch wirkendes Antibiotikum, das die Bindung der Aminoacyl-tRNAs durch Bindung an die 30S-Untereinheit hemmt und so die Proteinbiosynthese inhibiert. Darauf folgte die Zugabe von Cs und weitere 3 h Bebrütung bei 37 °C, um die teilungsfähigen Tc-resistenten Zellen zu lysieren, während die Tc-sensitiven Zellen aufgrund der bakteriostatischen Wirkung im Wachstum gehemmt wurden. Anschließend wurden 2 ml der Kultur zentrifugiert (2 min, 8000 UpM, EZ, RT), das Pellet mit 2 × 1 ml 0,14 M NaCl gewaschen, um Antibiotikareste zu entfernen und 100 µl dieser Bakteriensuspension in den Verdünnungen 10⁻¹-10⁻⁴ auf LB-Agarplatten mit Gm ausplattiert. Durch paralleles Überimpfen von Einzelkolonien auf Selektivagar mit und ohne Tc wurden die erhaltenen Klone auf den Verlust des pSUP202-Vektoranteils hin untersucht. Die zur Identifizierung der *lecA*- bzw. *lecB*-defizienten Mutanten durchgeführte PCR erfolgte bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C. Als Matrizen-DNA wurden jeweils 500 ng chromosomale DNA des Wildtyps oder der potentiellen Mutanten eingesetzt. Als Startermoleküle wurden die schon zur Amplifizierung der flankierenden Genbereiche verwendeten Oligonukleotide L1USA/L1DSB (*lecA*) bzw. L2USA/L2DSB (*lecB*) eingesetzt. Durch die Inserierung der ΩGm^r-Kassette mit gleichzeitiger Deletion des jeweiligen Gens waren die PCR-Produkte der Mutanten im Vergleich zu den amplifizierten Fragmenten des Wildtyps ca. 1,2 kb größer. Die erzeugten *lecA*- und *lecB*-negativen Stämme wurden als PATI1 bzw. PATI2 bezeichnet. Um polare Effekte der ΩGm^r-Kassette sowie störende Sekundäreffekte durch die Zugabe des Antibiotikums zu vermeiden, sollte eine Exzision der ΩGm^r-Kassette aus dem Genom vorgenommen werden. Dazu wurden die Mutagenesevektoren pSUGD1 und pSUGD2 mit *Mlu*I restringiert und religiert, um die ΩGm^r-Kassette zu entfernen. Die resultierenden Konstrukte pSUD1 und pSUD2 wurden durch di-parentale Konjugation in die Lectin-defizienten Stämme PATI1 und PATI2 überführt und Tc-resistente Transkonjuganden selektiert. Diese wurden für das zweite Rekombinationsereignis ohne die Zugabe eines Antibiotikums mehrere Zyklen ü.N. kultiviert. Anschließend folgte die Anreicherung Gm- und Tc-sensitiver Klone und die Identifizierung der Deletionsmutanten mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide L1USA/L1DSB (*lecA*) bzw. L2USA/L2DSB (*lecB*). Durch die Exzision der ΩGm^r-Kassette waren die PCR-Produkte der Mutanten im Vergleich zu den amplifizierten Fragmenten des Wildtyps ca. 0,4 kb kleiner. Die resultierenden *lecA*- und *lecB*-negativen Stämme wurden als PATI3 bzw. PATI4 bezeichnet. Als Parentalstamm zur Erzeugung der Lectin-Doppelmutante wurde der Stamm PATI4 verwendet, dessen *lecA*-Gen unter Verwendung des Mutagenesevektors pSUGD1 durch die ΩGm^r-Kassette ersetzt wurde. Die Identifizierung der Lectin-Doppelmutante erfolgte erneut durch PCR unter Verwendung der flankierenden Oligonukleotide L1USA/L1DSB (*lecA*) und L2USA/L2DSB (*lecB*). Die so erzeugte *lecA*- und *lecB*-negative Doppelmutante wurde als PATI5 bezeichnet.

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

Zellen der *P. aeruginosa*-Stämme PATI2 und PATI4, die das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 bzw. pBBXCH2 enthielten, 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 (30 W, 4 min, 50 %, „SONOPULS HD60“, Bandelin, Berlin) aufgeschlossen. 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.

2.16 Präparation der inneren und äußeren Membranfraktion (Wilhelm *et al.*, 1999)

Zellen des *P. aeruginosa*-Stamms PATI4, die das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielten, wurden für 48 h bei 37 °C auf NB-Agar kultiviert. 50 mg (Trockengewicht) der Bakterien wurden anschließend in 0,14 M NaCl resuspendiert und nach Zugabe von 1 mg Lysozym für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an den Zellaufschluss unter Verwendung einer Glasmühle und 3 Zyklen Einfrieren/Auftauen 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. Diese wurden in 1 ml Auftragspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8; 1 mM EDTA; 20 % (w/v) Saccharose) aufgenommen und auf einen diskontinuierlichen Dichtegradienten, der sich aus Saccharoselösungen der folgenden Konzentrationen zusammensetzte, aufgetragen: 0,5 ml 60 %, 2,1 ml 55 %, 2,1 ml 50 %, 2,1 ml 45 %, 2,1 ml 40 % und 2,1 ml 35 % (w/v) Saccharose in 10 mM Tris/HCl, pH 8 und 1 mM EDTA. Der Gradient wurde unter Verwendung eines SW41 Rotors in einer Ultrazentrifuge (L8-70, Beckmann) für 36 h bei 36.000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 24 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 0,5 ml abgenommen und zur Identifizierung der Fraktionen der inneren und äußeren Membran in die Enzymtests eingesetzt.

2.17 Bestimmung der NADH-Oxidase- und Esterase-Aktivität (Wilhelm *et al.*, 1999)

Die NADH-Oxidase und die Esterase dienten als Markerenzyme für die innere und die äußere Membran. Die Aktivität dieser Enzyme in den einzelnen Fraktionen (2.16) wurde durch spektrophotometrische Messung der Extinktionsabnahme bei 340 nm für die NADH-Oxidase sowie der Extinktionszunahme bei 410 nm für die Esterase bestimmt. Zur Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität wurden 900 µl des Reaktionsansatzes (50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,2 mM DTT; 0,12 mM NADH) zusammen mit 100 µl der jeweiligen Fraktion für 5 min bei 25 °C inkubiert. Für die Messung der Esterase-Aktivität wurden 23,7 mg *p*-Nitrophenyl-

caproat (*pNPC*) (Endkonzentration = 1 mM) in 5 ml Ethanol gelöst und zu 95 ml eines 100 mM Kaliumpuffers, pH 7 gegeben, der zusätzlich 10 mM MgSO₄ enthält. Nach Zugabe von 20 µl der jeweiligen Fraktion zu 180 µl der Substratlösung und Inkubation der Ansätze für 10 min bei 25 °C wurde die O.D.₄₁₀ bestimmt. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden als Fraktionen der inneren (NADH-Oxidase) bzw. der äußeren (Esterase) Membran weiterverwendet. 100 µl dieser Fraktionen wurden mit 1,9 ml 10 mM Tris/HCl, pH 8 versetzt und die enthaltenen Proteine mittels TCA-Fällung nach Sivaraman *et al.* (1997) präzipitiert.

Die Aktivität der Cutinase wurde ebenfalls durch Messung der Hydrolyse des *pNPC*-Substrats bestimmt.

2.18 Bestimmung der Lipase-Aktivität

Zum spektrophotometrischen Nachweis der Lipase-Aktivität wurden 30 mg *p*-Nitrophenylpalmitat (*pNPP*) in 10 ml Isopropanol gelöst und mit 90 ml Sørensen-Phosphatpuffer (85 ml 50 mM Na₂HPO₄; 5 ml 50 mM KH₂PO₄; 207 mg NaDOC; 100 mg Gummi Arabicum; pH 8) gemischt. Kulturüberstände oder gereinigtes Protein wurde mit 2,5 ml der Substratemulsion 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der Extinktionszunahme bei $\lambda = 410$ nm.

2.19 Waschen der äußeren Membranfraktion mit verschiedenen Zuckerlösungen

Die Proteine der äußeren Membran wurden durch Zentrifugation (1 h, 13.000 g) von 100 µl dieser Fraktion sedimentiert und anschließend in 100 µl 100 mM Tris/HCl, pH 8 aufgenommen. Der Puffer enthielt zusätzlich *p*-Nitrophenyl- α -L-Fucose (*pNPF*) bzw. D-Galactose in einer Konzentration von 20 mM. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die Ansätze erneut zentrifugiert (1 h, 13.000 g). Die Proteine des Überstands wurden zunächst mittels TCA-Fällung nach Sivaraman *et al.* (1997) präzipitiert, während das Pellet direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen wurde.

2.20 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; YFP_{LecB} = 0,979 M⁻¹ · cm⁻¹; CFP_{LecB} = 0,944 M⁻¹ · cm⁻¹; CutA_{LecB} = 0,586 M⁻¹ · cm⁻¹; LipB_{LecB} = 0,866 M⁻¹ · cm⁻¹, wobei gilt: O.D.₂₈₀ = 1 \equiv 1 g/l des jeweiligen Proteins.

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 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 Merril (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 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 Elektroblot 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 LecA- und LecB-Protein erfolgte unter Verwendung eines LecA- bzw. LecB-spezifischen polyklonalen Antiserums (Tielker, 2001) in einer Verdünnung von 1:50.000 bzw. 1:20.000. 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.

2.23 Reinigung des LecB-Proteins

Die Überexpression des *lecB*-Gens erfolgte im Stamm *E. coli* BL21 (DE3), der zunächst mit dem Überexpressionsplasmid pEC2 transformiert wurde. Die Hauptkultur wurde unter Selektionsdruck bis zu einer O.D.₅₈₀ = 0,6 bei 30 °C kultiviert und anschließend die Genexpression mit 0,5 mM IPTG induziert. Nach weiteren 16 h Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 8.000 g, RT) sedimentiert, in 20 ml Equilibrierungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8) aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (30 W, 4 min, 70 %, „SONOPULS HD60“, Bandelin, Berlin). Der GZE wurde zentrifugiert (30 min, 10.000 g, RT) und der Überstand in die Reinigung eingesetzt, die entsprechend dem Temperaturprofil der Hämagglutinationsreaktion des LecB-Proteins bei 37 °C durchgeführt wurde. Nach der Equilibrierung des Säulenmaterials (25 ml D-Mannose-Agarose, Sigma, Deisenhofen) und dem Beladen der Säule wurde diese mit 250 ml Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8; 0,14 M NaCl) gewaschen und das LecB-Protein anschließend mit 35 ml 20 mM D-Mannose in 100 mM Tris/HCl, pH 8 eluiert. Das Entfernen der zur Elution benötigten D-Mannose 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.

Um immunologisch nachzuweisen, ob der *P. aeruginosa*-Stamm SG 81 ebenfalls das LecB-Protein produziert, wurden die Bakterien dieses Stamms als konfluenter Bakterienrasen auf PIA für 24 h bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden in 30 ml 0,14 M NaCl suspendiert und durch Zentrifugation (30 min, 40.000 g, 10 °C) sedimentiert. Nach Aufnahme der Bakterien

in 30 ml 100 mM Tris/HCL, pH 8 und erneuter Zentrifugation (30 min, 40.000 g, 10 °C) wurde das Zellpellet in 6 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8 suspendiert und die Bakterien durch Ultraschallbehandlung (15 × 30 s, ca. 90 W; „Ultraschall Desintegrator W-250“, Branson, Danbury, USA) aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 20.000 g, RT) erfolgte die Sterilfiltration des Überstands (Schleicher & Schuell Einmalfilter, Porendurchmesser = 0,2 µm), der damit für die Reinigung des LecB-Proteins vorbereitet war. Das Eluat nach Auftrag des 20 mM D-Mannose-haltigen Puffers wurde mittels Immunoblotting unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums auf die Präsenz des Lectins hin untersucht.

2.24 Aminoterninale Sequenzierung des LecB-Proteins

Die Identifizierung des gereinigten Proteins durch N-terminale Sequenzierung erfolgte am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie in der AG Proteinanalytik der Universität Münster.

2.25 Reinigung der LecB-Fusionsproteine

Die Überexpression der mit dem *lecB*-Gen fusionierten Gene (*cfp*, *yfp*, *lipB*, *cutA*) erfolgte im Stamm *E. coli* Tuner (DE3), der zuvor mit dem entsprechenden Expressionsplasmid (pECL2, pEYL2, pURE-lipB, pURE-cutA) transformiert wurde. Die Reinigung der LecB-Fusionsproteine erfolgte nach dem Protokoll für die Gewinnung des nativen LecB-Proteins (2.23).

2.26 Immobilisierung des LipB-Proteins mittels LecB-tag

Zur Immobilisierung des LipB_{LecB}-Fusionsproteins bei 37 °C wurden 7 ml einer Lösung mit 200 µg des gereinigten Proteins auf 2,5 ml L-Fucose-Agarose (EY Laboratories, San Mateo, USA), die zuvor mit 10 Säulenvolumen (SV) 100 mM Tris/HCl, pH 8 eingestellt wurde, in eine Chromatographie-Säule (Econo-Column Chromatography Column, 1,0 × 5 cm, 4 ml, Bio-Rad, München) gegeben und die Säule mit 10 SV Sørensen-Phosphatpuffer (2.18) gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurden 2,5 ml pNPP-Substratlösung (2.18) auf die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Dieser Zyklus wurde 4-mal wiederholt und die Menge des in den gesammelten Eluaten umgesetzten Substrats durch Messung der O.D.₄₁₀ bestimmt (2.18). Als Negativkontrolle wurde der Versuchsablauf mit 200 µg nativem LecB-Protein durchgeführt.

2.27 Hämagglutinationstest (HAT)

Die hämagglutinierende Aktivität vom LecB- und YFP_{LecB}-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-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 D-Mannose oder D-Galactose in einer Konzentration von 20 mM zugegeben.

2.28 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Biofilme wurden in jeweils zwei unabhängigen Experimenten kultiviert und es wurden mindestens drei verschiedene Stellen eines Biofilms mittels CLSM analysiert. Die Färbung von Biofilmen, die auf Glasobjektträgern kultiviert wurden (2.5.2), erfolgte durch den Nukleinsäure-bindenden Farbstoff SYTO 9 (Molecular Probes, Eugene, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Visualisierung der Biofilme wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM 510; Carl Zeiss, Jena) unter Verwendung einer Achromplan 40 × 0,60-NA-Linse durchgeführt. Die Aufnahme der 3-D-Bildstapel erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm unter Einsatz eines LP 505 nm Langpassfilters, wobei die Größe des *pinhole* 1,0 Airy unit betrug.

Die Visualisierung von Biofilmen, die auf Polycarbonat-Filtern kultiviert wurden (2.5.1), erfolgte wie beschrieben mittels CLSM bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm unter Einsatz eines 505-550 nm Breitbandfilters für das YFP_{LecB}-Protein sowie bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm unter Verwendung eines 650 nm Langpassfilters zur Detektion des für die Gegenfärbung der Zellen verwendeten SYTO 62 (Molecular Probes, Eugene, USA).

Die CLSM-Visualisierung der Biofilme, die in Durchflusszellen kultiviert wurden (2.5.3), erfolgte nach Klausen *et al.* (2003b).

Für die Aufnahme der Biofilme wurde die Zeiss LSM Software (Version 2.8) verwendet. Die 3D-Darstellung von Biofilmen wurde mittels des Programmes „IMARIS“ (Bitplane AG) durchgeführt. Die mittlere Dicke und die Biomasse der Biofilme sowie das Ausmaß der Oberflächenbesiedlung wurden mit Hilfe des Programmes „COMSTAT“ (Heydorn *et al.*, 2000) ermittelt.

2.29 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“-Programm (Lasergen) und diversen Anwendungen des „Expert Protein Analysis“-Systems (<http://us.expasy.org/>) unterstützt.

Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit den Programmen „RasMol 2.7“ (University of Edinburgh, UK), „MOLSCRIPT“ (Kraulis, 1991) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt. 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 3D-Darstellung und Quantifizierung von Biofilmen wurde mit den Programmen „IMARIS“ (Bitplane AG) bzw. „COMSTAT“ (Heydorn *et al.*, 2000) durchgeführt.

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 Agarosegelelektrophorese, der Immunoblots und der Tributyrin-Indikatorplatten. Im Verlauf der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Veränderungen der Abbildungen vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung und Strukturaufklärung des Lectins LecB aus *P. aeruginosa*

Das *lecB*-Gen sollte zunächst im heterologen Wirt *E. coli* überexprimiert werden, um das LecB-Protein anschließend in nativer Form mittels Affinitätschromatographie zu isolieren. Das gereinigte Lectin wurde u. a. zur Aufklärung der Proteinstruktur eingesetzt.

3.1.1 Heterologe Überexpression des *lecB*-Gens und Reinigung des LecB-Proteins mittels Affinitätschromatographie

Die Überexpression des *lecB*-Gens wurde in Zellen des *E. coli*-Stamms BL21 (DE3) durchgeführt, die zunächst mit dem *lecB*-Expressionsplasmid pEC2 transformiert wurden. Dieses enthält den 345 bp großen Leserahmen *lecB* unter der transkriptionellen Kontrolle des T7-Promotors. Nach der Amplifikation des Gens mittels PCR wurde das resultierende Fragment über die singulären Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI*/*BamHI* in den *E. coli*-Expressionsvektor pET22b (Novagen, Madison, USA) eingefügt. Die Klonierung des Plasmids ist im Anhang detailliert dargestellt (Abb. 41). Die Kultivierung des Überexpressionsstamms erfolgte in LB-Medium bei 30 °C für 16 h nach Induktion der Genexpression in der logarithmischen Wachstumsphase durch 0,5 mM IPTG. Die Reinigung des LecB-Proteins wurde aus dem Rohextrakt der Überexpressionskultur mittels D-Mannose-Agarose durchgeführt, wobei die natürliche Affinität des Lectins zu D-Mannose ausgenutzt wurde. In der eingesetzten Säulenmatrix ist der Zucker über einen *spacer* von 12 Hydroxylgruppen an epoxyaktivierte Agarose gekoppelt. Die Elution des LecB-Proteins erfolgte durch Waschen der Säule mit D-Mannose-haltigem Elutionspuffer in einem Gradienten ansteigender Mannosekonzentration von 0–100 mM (Abb. 3A). Das LecB-Protein eluierte bereits bei einer Konzentration von 5 mM D-Mannose. Laut der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 3B), in der vergleichbare Mengen des Rohextrakts, des Durchlaufs sowie einiger ausgewählter Fraktionen aufgetragen wurden, konnte das Lectin bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden. Anhand des Chromatogramms (Abb. 3A) lässt sich errechnen, dass etwa 20 % des Gesamtproteins des Rohextrakts auf das heterolog exprimierte LecB-Protein zurückzuführen war.

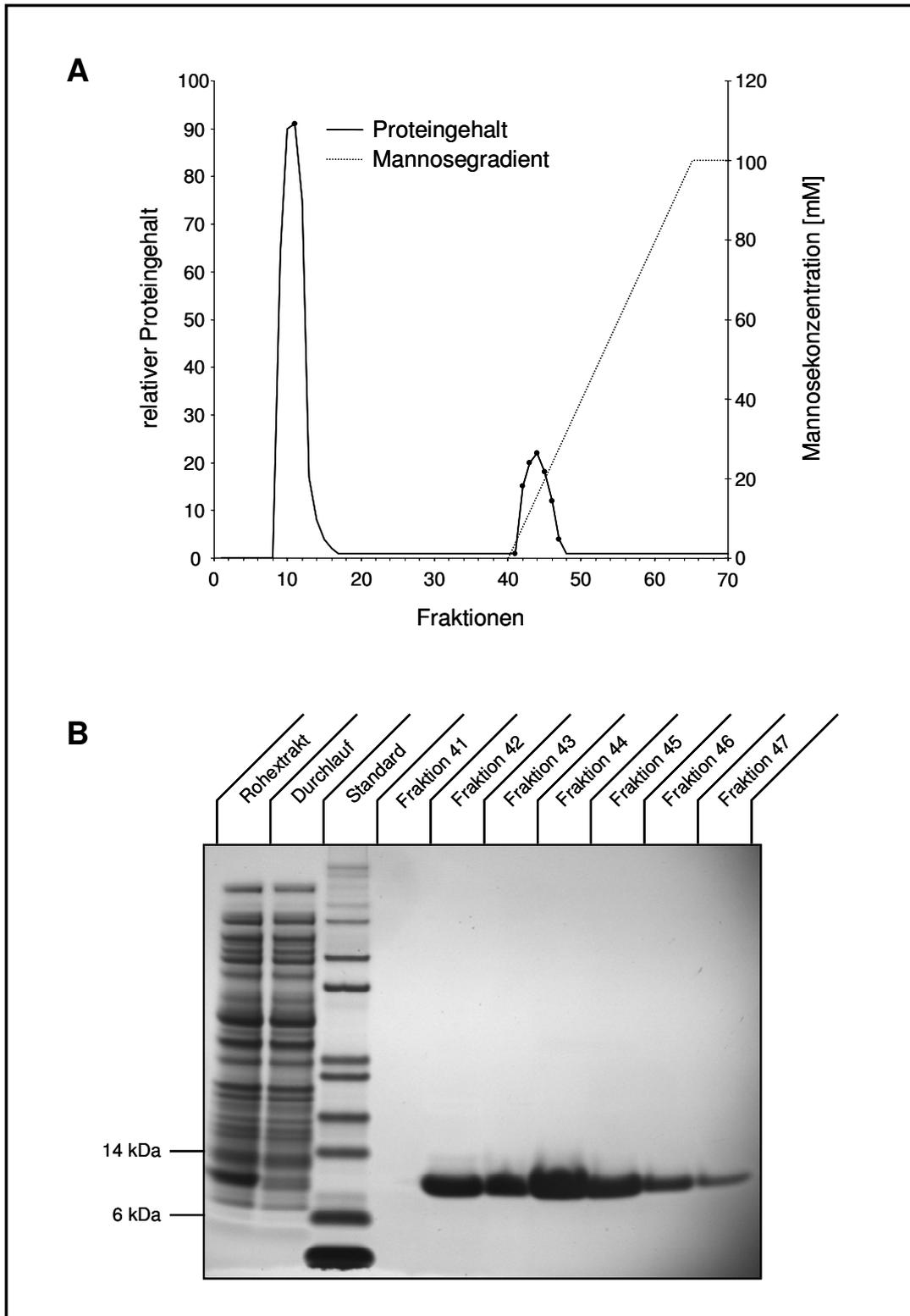


Abb. 3 Dokumentation der affinitätschromatographischen Reinigung des LecB-Proteins. **A.** Chromatogramm der Proteinreinigung mittels D-Mannose-Agarose. Jede der aufgefangenen Fraktionen hatte ein Volumen von 2 ml. Der Proteingehalt wurde durch Messung der O.D.₂₈₀ bestimmt. **B.** SDS-PAGE-Analyse ausgewählter Fraktionen. Es wurden 3 μ l des Rohextrakts und des Durchlaufs sowie 200 μ l der übrigen Fraktionen eingesetzt. Es wurde der „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Nach der Entfernung der zur Elution verwendeten D-Mannose unter Einsatz von Zentrifugationskonzentratoren betrug die erzielte Proteinausbeute 70 mg LecB pro Liter Expressionskultur. Die Identität des LecB-Proteins wurde durch die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz verifiziert.

3.1.2 Hämagglutinationstest des isolierten LecB-Proteins

Um die Konformation des gereinigten Lectins zu überprüfen, wurde die Eigenschaft des LecB-Proteins Erythrozyten zu agglutinieren, in einem Hämagglutinationstest (HAT) überprüft. Die Hämagglutination beruht auf der Interaktion des LecB-Proteins mit Fucosemolekülen der ABO(H)-Antigene auf der Oberfläche der Erythrozyten (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. Die präparierte LecB-Lösung wurde in verschiedenen Konzentrationen zu Papain-behandelten Kaninchen-Erythrozyten in die *wells* einer Rundboden-Mikrotiterplatte gegeben und die hämagglutinierende Aktivität nach Inkubation für 1 h und kurzer Zentrifugation der Mikrotiterplatte optisch ausgewertet. 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. Das ebenfalls Mannose-spezifische Lectin ConA aus der Schwertbohne *Canavalia ensiformis* diente dabei als Positivkontrolle. Anhand der Ergebnisse in den *wells* B1-B12 wird die Abhängigkeit der Hämagglutinationsreaktion von der ConA-Konzentration deutlich (Abb. 4). Die Ergebnisse in den *wells* D1-D12 zeigen, dass auch das gereinigte LecB-Protein die hämagglutinierende Aktivität aufweist. Diese konnte, der Spezifität des Lectins entsprechend, durch die Zugabe von D-Mannose, nicht aber durch D-Galactose, vollständig gehemmt werden (*wells* E3-4 und F3-4). Die geringste Konzentration des LecB-Proteins, die erforderlich war, um die Hämagglutination auszulösen, lag bei etwa 6 µg/ml bzw. 0,5 µM.

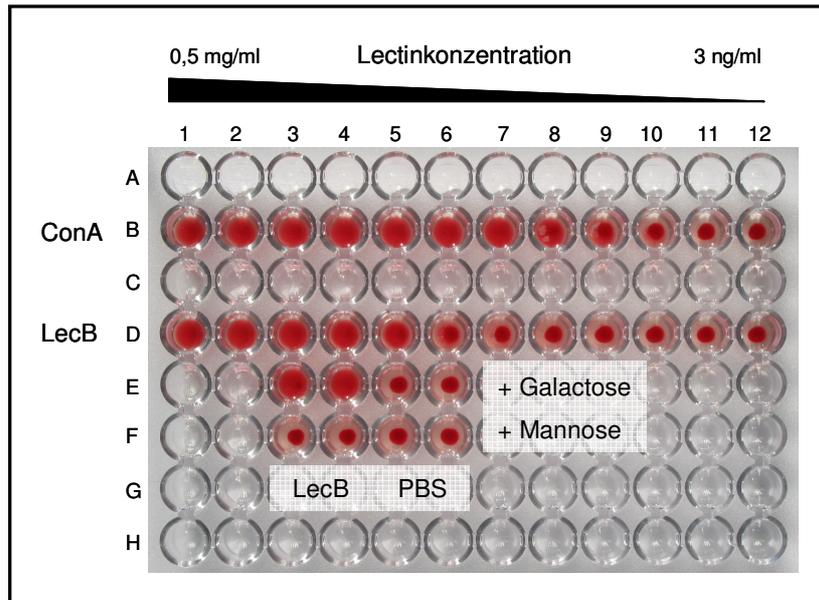


Abb. 4 Hämagglutinationstest des gereinigten LecB-Proteins. 50 μ l einer dreifachen Verdünnungsreihe des LecB-Proteins wurden zu 50 μ l Papain-behandelte Kaninchen-Erythrozyten in die *wells* einer Rundboden-Mikrotiterplatte gegeben und für 1 h inkubiert. Positive Hämagglutinationsreaktion resultierte in einem vollständig mit Erythrozyten bedeckten Boden. ConA diente als Positivkontrolle. Die Reaktion wurde, entsprechend der Spezifität des LecB-Proteins, durch Zugabe von D-Mannose (20 mM), nicht aber durch D-Galactose (20 mM), gehemmt.

3.1.3 Strukturaufklärung des gereinigten LecB-Proteins

Die Aufklärung der Quartärstruktur des LecB-Proteins erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Loris (*Laboratorium voor Ultrastructuur, Instituut voor Moleculaire Biologie, Vrije Universiteit Brussel*, Belgien). Dabei wurde das LecB-Protein in Ca^{2+} -haltiger und in Ca^{2+} -freier Form sowie im Komplex mit Fucose, Mannose und Fructopyranose eingesetzt.

Das LecB-Protein liegt in Lösung und in kristallisierter Form als Homotetramer bestehend aus 4 unabhängigen Untereinheiten vor, die in 222 Punktgruppensymmetrie angeordnet sind (Abb. 5). Das Grundgerüst des Proteins besteht aus einem 9-strängigen, antiparallelen β -sandwich. In jeder Untereinheit bilden die Stränge 1–5 ein *greek-key*-Strukturmotiv, das durch die Stränge 6–8 verlängert wird. In Interaktion mit den Strängen 1 und 4 formen diese ein 5-strängiges, gewundenes β -Faltblatt. Die N-terminale Region des Proteins bildet einen β -Strang (Strang 0), der zwischen den Strängen 5 und 6 inseriert.

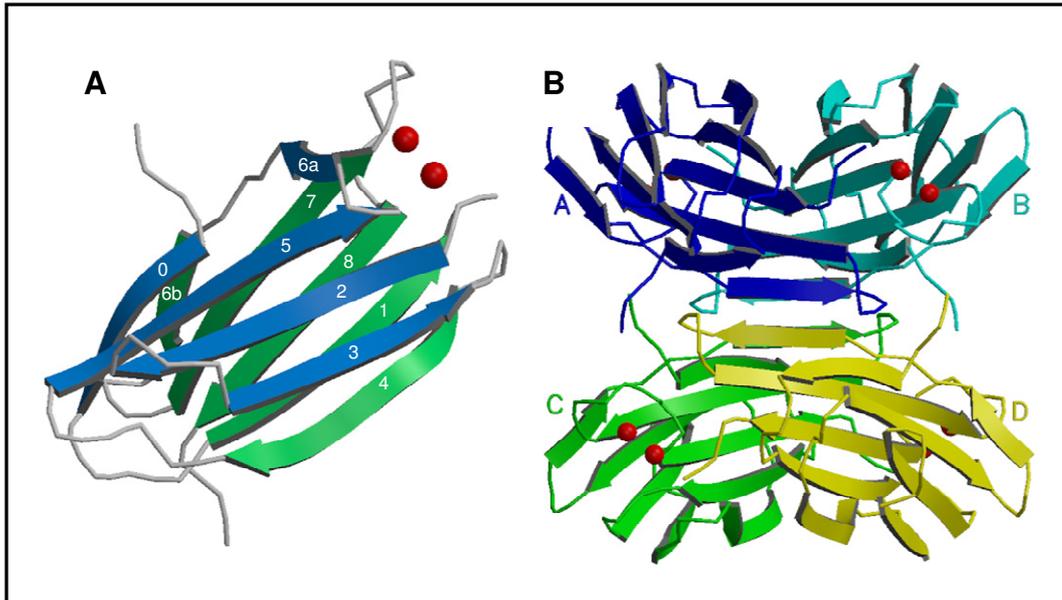


Abb. 5 Gesamtstruktur des LecB-Proteins. A. Das LecB-Monomer mit jeweils einem Falblatt in blau und einem in grün. Die Ca^{2+} -Ionen sind als rote Kugeln dargestellt. B. Das LecB-Tetramer mit jedem Monomer (A-D) in einer anderen Farbe.

Durch die *head-to-tail* Interaktion der 5-strängigen β -Faltblätter zweier Monomere bildet sich das Dimer, wofür vor allem hydrophobe Wechselwirkungen außerhalb des *greek-key*-Motivs 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 (Strang 6) kommt es zur Ausbildung des Tetramers. 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.

Die meisten der 168 konservierten Wassermoleküle, die in den verschiedenen Strukturen detektiert wurden, bilden einen Gürtel um die ringförmige Rinne des LecB-Tetramers, zwei befinden sich nahe der Zuckerbindestelle und zwei weitere verdeckt in jedem LecB-Monomer (Abb. 6).

Die Zuckerbindestelle des LecB-Proteins ist in Abbildung 7 dargestellt. 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. Diese Ca^{2+} -Ionen werden hauptsächlich durch einen *loop* bestehend aus den Aminosäuren Asn95–Asp104 koordiniert, wobei Asp104 in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zukommt. Diese Aminosäure wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese gegen ein Alanin ausgetauscht, resultierend in einer LecB-Mutante, die eine defekte Zuckerbindestelle aufweist (3.6).

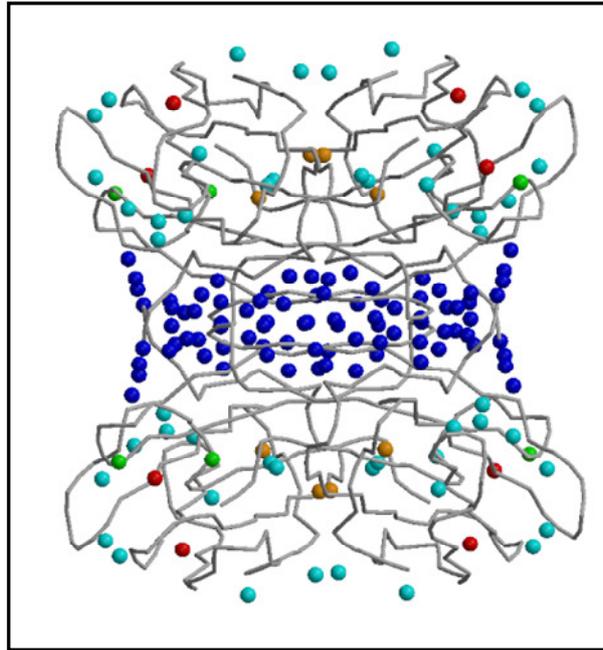


Abb. 6 Konservierte Wassermoleküle des LecB-Tetramers. Die Darstellung des Proteins entspricht der aus Abbildung 5. Wassermoleküle, die in einem Gürtel die ringförmige Rinne des LecB-Tetramers umgeben, sind in blau dargestellt. Zwei verborgene Wassermoleküle sind in rot gezeichnet. Die grünen Wassermoleküle befinden sich nahe der Bindestelle und die orangenen an der AB-Interphase. Die übrigen, über das Protein verteilten Wassermoleküle, sind in hellblau dargestellt.

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. Im zuckerfreien Zustand ersetzen konservierte Wassermoleküle die Sauerstoffatome eines Fucosemoleküls, die an der Interaktion mit der Bindestelle des LecB-Proteins beteiligt sind (Abb. 7A).

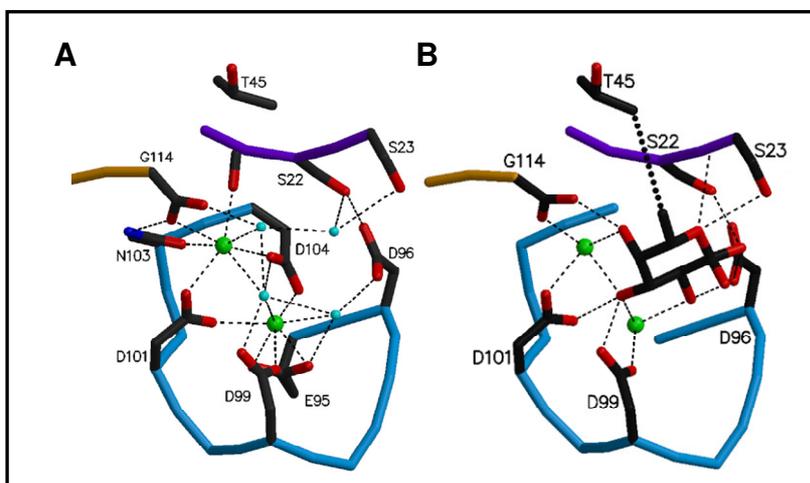


Abb. 7 Zuckerbindestelle des LecB-Proteins. A. Darstellung der Bindestelle ohne Liganden. Der Ca^{2+} -bindende *loop* ist in blau gezeichnet, der C-Terminus des korrespondierenden Monomers in orange, die beiden Ca^{2+} -Ionen in grün. Vier Wassermoleküle sind als blaue Kugeln dargestellt. B. Bindestelle mit gebundener Fucose. H-Brücken und Interaktionen mit den Ca^{2+} -Ionen sind als dünne Linien, van der Waals Kontakte als dicke Linien dargestellt.

3.2 Erzeugung von Lectin-defizienten Mutanten von *P. aeruginosa*

Die Bedeutung der Gene *lecA* und *lecB* *in vivo* sollte durch die physiologische Charakterisierung von Lectin-defizienten Stämmen von *P. aeruginosa* PAO1 untersucht werden. Dazu wurden Insertions-/Deletionsmutanten erzeugt, indem die gesamte Gensequenz durch homologe Rekombination gegen eine Gentamycin-Resistenz-Kassette (ΩGm^r) ausgetauscht wurde. Um polare Effekte der ΩGm^r -Kassette sowie Sekundäreffekte durch die Zugabe des Antibiotikums zu vermeiden, wurde diese anschließend entfernt, so dass reine Deletionsmutanten entstanden. Ausgehend von diesen Stämmen wurde eine Doppelmutante erzeugt, die sowohl im *lecA*-Gen als auch im *lecB*-Gen defizient ist.

3.2.1 Erzeugung und Nachweis *lecA*- und *lecB*-defizienter Mutanten von *P. aeruginosa*

Als Parentalstamm für die Mutagenese, die im Anhang schematisch dargestellt ist (Abb. 37, 38), wurde der Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 verwendet. Durch den Austausch des *lecA*- bzw. *lecB*-Gens gegen die ΩGm^r -Kassette wurden zunächst die Stämme PATI1 bzw. PATI2 konstruiert. Anschließend erfolgte die Exzision der Kassette, resultierend in den reinen Deletionsmutanten PATI3 (ΔlecA) und PATI4 (ΔlecB).

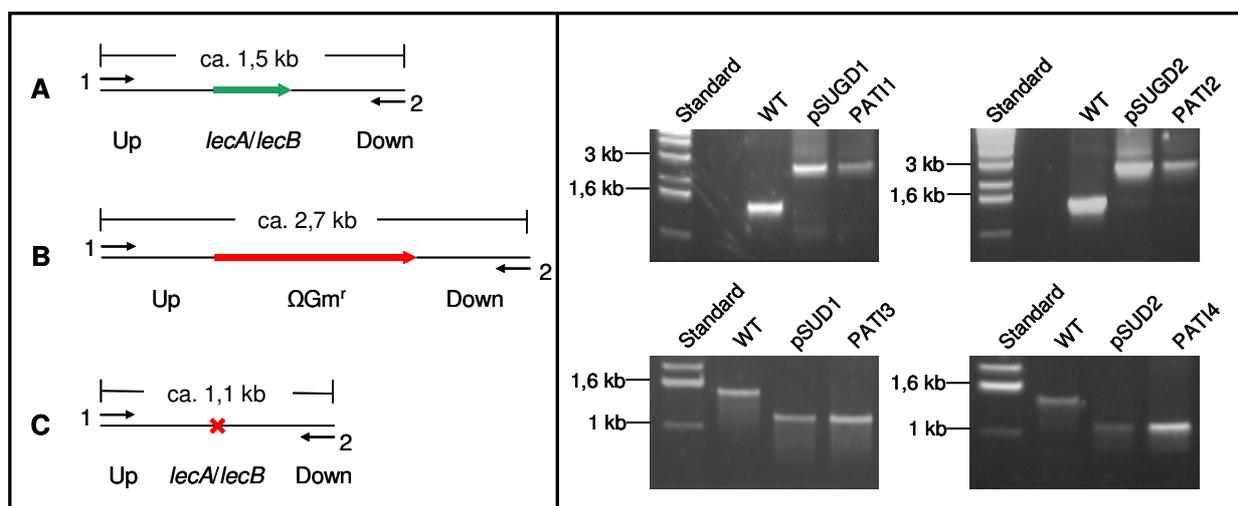


Abb. 8 Nachweis der *lecA/B*-Deletion mittels PCR. Links: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der mit 1 und 2 bezeichneten Startermoleküle sowie Längenangabe der erwarteten Produkte. **A.** Wildtyp, **B.** PATI1/2, **C.** PATI3/4. **Rechts:** Gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte auf einem 1 % Agarosegel zum Nachweis der Gendeletionen. Als Matrizen-DNA wurden 10 ng der genomischen DNA des Wildtyps bzw. der jeweiligen Mutante eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde 1 ng des jeweiligen Mutagenesekonstrukt als Matrizen-DNA verwendet.

Der Nachweis des Austausches der Lectin-Gene gegen die $\Omega\text{Gm}^{\text{r}}$ -Kassette und der darauf folgenden Exzision der Kassette erfolgte mittels PCR (Abb. 8). Demnach entstanden bei den Stämmen PATI1 und PATI2 durch die Insertion der $\Omega\text{Gm}^{\text{r}}$ -Kassette PCR-Fragmente, die im Vergleich zur Situation im Wildtyp etwa 1,2 kb größer waren. Durch die anschließende Entfernung der Kassette wurden PCR-Fragmente amplifiziert, die im Vergleich zum Wildtyp um ca. 0,4 kb, also um die Länge des jeweiligen Lectin-Gens, kürzer waren. Zusätzlich zur PCR-Analyse wurde ein immunologischer Nachweis der Mutationen unter Verwendung der LecA- bzw. LecB-spezifischen Antiseren durchgeführt (Abb. 9).

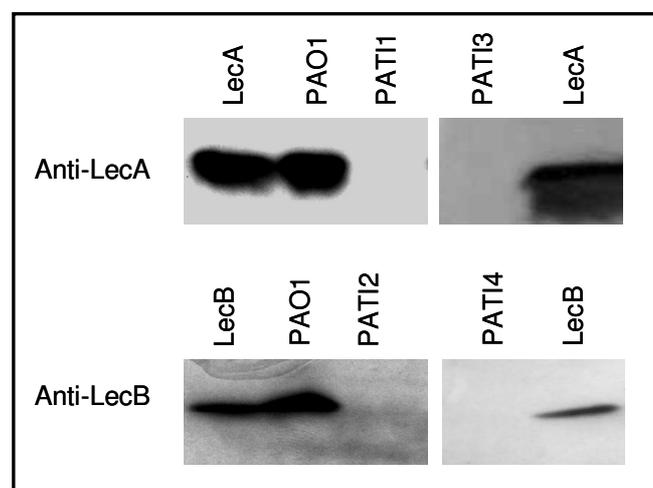


Abb. 9 Immunologischer Nachweis der *lecA/B*-Deletion. Die eingesetzten Volumina der ÜK entsprachen einer $\text{O.D.}_{580} = 0,5$. Als Positivkontrolle wurden 25 ng LecA-Protein sowie 50 ng LecB-Protein eingesetzt.

3.2.2 Erzeugung und Nachweis einer Lectin-Doppelmutante

Zusätzlich zu den Lectin-Einzelmutanten sollte ein Stamm von *P. aeruginosa* PAO1 erzeugt werden, der eine Defizienz in beiden Lectin-Genen aufweist. Als Parentalstamm für die Erzeugung der Lectin-Doppelmutante, die im Anhang schematisch dargestellt ist (Abb. 39), wurde der Stamm PATI4 verwendet, in dessen Genom das *lecB*-Gen zuvor deletiert wurde (3.2.1). Durch die Mobilisierung des Mutagenesevektors pSUGD1 wurde das *lecA*-Gen im Genom dieses Stamms durch homologe Rekombination gegen die $\Omega\text{Gm}^{\text{r}}$ -Kassette ausgetauscht. Der Nachweis der Mutation erfolgte, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, durch PCR unter Einsatz der flankierenden Oligonukleotide sowie durch Immunoblotting unter Verwendung der LecA- und LecB-spezifischen Antiseren (Abb. 10).

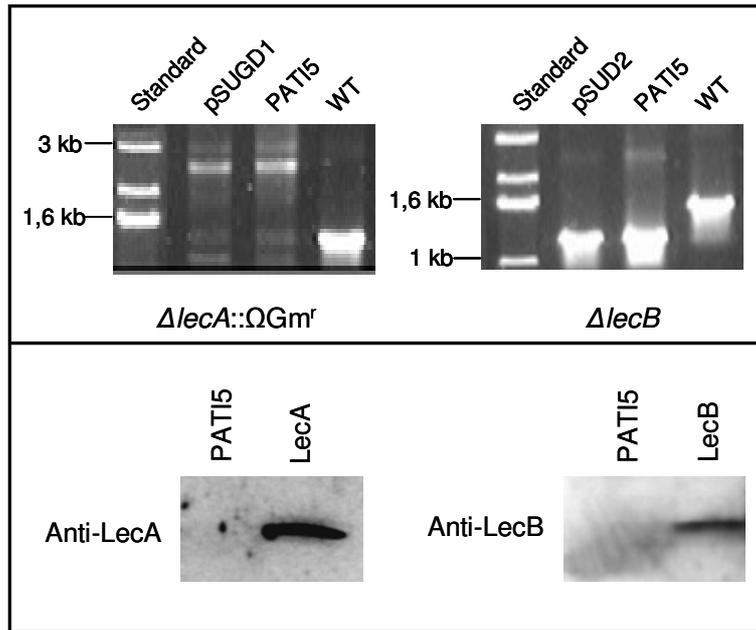


Abb. 10 Nachweis der Lectin-Doppelmutante durch PCR und Immunoblotting. Oben: Gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte auf einem 1% Agarosegel zum Nachweis der Gendelektionen. Als Matrizen-DNA wurden 10 ng der genomischen DNA des Wildtyps bzw. der Mutante eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde 1 ng des jeweiligen Mutageneseonstruktes verwendet. **Unten:** Immunologischer Nachweis der *lecA/B*-Deletion. Die eingesetzten Volumina der ÜK entsprachen einer $O.D._{580} = 0,5$. Als Positivkontrolle wurden 25 ng LecA-Protein sowie 50 ng LecB-Protein eingesetzt.

3.3 Einfluss der Lectine LecA und LecB auf den Prozess der Biofilmbildung

Anhand der zuvor erzeugten *lecA*- und *lecB*-negativen Stämme von *P. aeruginosa* sollte der Einfluss der Lectine auf die Biofilmbildung untersucht werden. Um verschiedene Wuchsbedingungen zu erzeugen, kamen dabei sowohl ein statisches als auch ein dynamisches Modell zur Kultivierung von Biofilmen zum Einsatz. Da der *P. aeruginosa*-Stamm PATI5 zur Zeit der Durchführung dieser Untersuchungen noch nicht vorlag, können in Bezug auf die Biofilmbildung der Lectin-Doppelmutante derzeit keine Ergebnisse präsentiert werden.

3.3.1 Biofilmbildung unter statischen Kulturbedingungen

Die Kultivierung und CLSM-Analyse von Biofilmen unter statischen Bedingungen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Wingender (*Biofilm Centre*, Abteilung Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt.

Um auszuschließen, dass eventuelle Unterschiede in der Biofilmbildung darauf zurückzuführen waren, dass sich die Deletion der Lectin-Gene auf das Wuchsverhalten der Bakterien auswirkte, wurden zunächst über 24 h Wuchskurven aller Stämme in NB-Medium aufgenommen. Dabei wurde ermittelt, dass die Defizienz in den Genen *lecA* und *lecB* keinen Einfluss auf das Wuchsverhalten der Zellen zur Folge hat (ohne Abbildung). Um die Bedeutung der Lectine für den Prozess der Biofilmbildung zu untersuchen, wurden Biofilme des Wildtyp-Stamms sowie der *LecA*- und *LecB*-defizienten *P. aeruginosa*-Stämme PATI1 und PATI2 unter statischen Kulturbedingungen über 48 h und 72 h bei 30 °C bzw. 37 °C in NB-Medium kultiviert und mittels CLSM analysiert. Als Substratum wurden Glasobjektträger verwendet. Anschließend wurden Höhe, Biomasse und Struktur der gebildeten Biofilme sowie der Grad der Oberflächenbesiedlung optisch und mit Hilfe des Programmes „COMSTAT“ (Heydorn *et al.*, 2000) ausgewertet und miteinander verglichen. Der *LecA*-negative Stamm bildete unter allen Bedingungen Biofilme, die keine Unterschiede zu denen des Wildtyps aufwiesen (ohne Abbildung). Dagegen war der *LecB*-defiziente Stamm PATI2 in allen gemessenen Parametern beeinträchtigt (Tab. 7). Die Biofilme dieses Stamms setzten sich im Vergleich zum Wildtyp aus erheblich weniger Biomasse zusammen und wiesen eine geringere mittlere Dicke auf. Zudem war der *LecB*-negative Stamm nicht in der Lage die Glasoberfläche ebenso effizient zu besiedeln wie der Wildtyp PAO1.

Tab. 7 Biomasse, mittlere Dicke und Grad der Oberflächenbesiedlung der Biofilme des Wildtyps PAO1 und der LecB-negativen Mutante PATI2. Aufgeführt sind die Ergebnisse nach Kultivierung über 48 h und 72 h bei 30 °C und 37 °C.

| | | | Biomasse [$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$] | mittlere Dicke [μm] | Oberflächenabdeckung [%] |
|-------------------|------|-------|---|-------------------------------------|-----------------------------|
| Wildtyp | 48 h | 30 °C | 4,14 | 8,19 | 36,3 |
| | | 37 °C | 9,15 | 13,94 | 51,9 |
| | 72 h | 30 °C | 18,35 | 27,38 | 55,5 |
| | | 37 °C | 10,81 | 24,26 | 35,1 |
| LecB ⁻ | 48 h | 30 °C | 0,02 | 0,06 | 0,3 |
| | | 37 °C | 0,02 | 0,03 | 0,2 |
| | 72 h | 30 °C | 0,12 | 0,33 | 0,9 |
| | | 37 °C | 0,02 | 0,03 | 0,3 |

Exemplarisch sind in Abbildung 11 3-D-CLSM-Aufnahmen der Biofilme des Wildtyps sowie des LecB-negativen Stamms PATI2 nach Kultivierung bei 30 °C über 48 h dargestellt. Die Aufnahmen verdeutlichen den Verlust der Fähigkeit zur Biofilmbildung der LecB-negativen Mutante unter statischen Bedingungen.

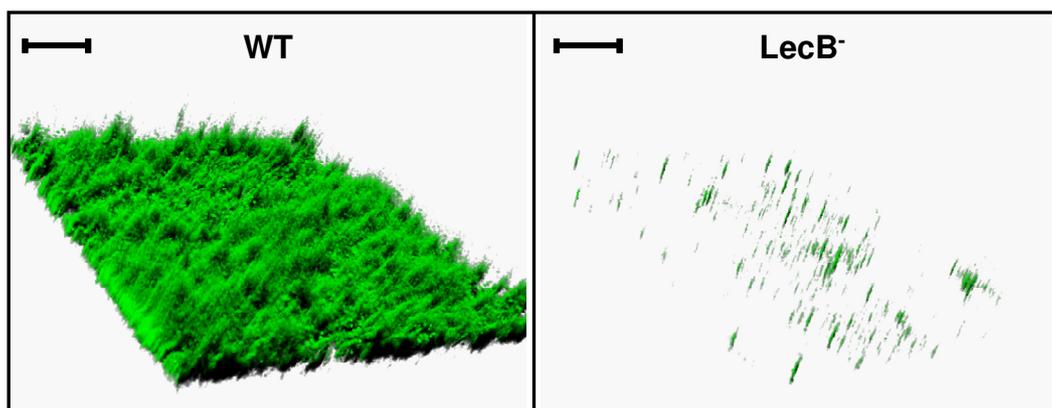


Abb. 11 CLSM-Aufnahmen von Biofilmen des Wildtyps und der LecB-negativen Mutante unter statischen Kulturbedingungen. Die Kultivierung der Biofilme des *P. aeruginosa*-Wildtyps PAO1 sowie der LecB-negativen Mutante PATI2 erfolgte für 48 h bei 30 °C unter statischen Bedingungen in NB-Medium auf Glasobjektträgern. Die Zellen wurden mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYTO 9 gefärbt und mittels CLSM visualisiert. Die Erstellung der 3D-Abbildungen erfolgte mit Hilfe des Programms „IMARIS“. Skala = 50 μm .

3.3.2 Biofilmbildung unter dynamischen Kulturbedingungen

Die Analyse der Biofilmstruktur der LecB-negativen Mutante ergab, dass das LecB-Protein unter statischen Bedingungen einen wesentlichen Einfluss auf die Biofilmbildung hat (3.3.1). Um zu prüfen, ob dieser Einfluss auch unter dynamischen Kulturbedingungen besteht, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Molin (*Molecular Microbial Ecology Group, BioCentrum-DTU*, Technische Universität Dänemark) Biofilme des Wildtyps und der Lectin-negativen Mutanten in einem Durchflussmodell kultiviert. Dieses Modell besteht im Wesentlichen aus Durchflusszellen, durch die mit Hilfe von peristaltischen Pumpen ein kontinuierlicher Medienstrom geleitet wird. Als Substratum wurden Glasdeckgläser verwendet. Zur anschließenden Detektion der Zellen mittels CLSM wurden die verwendeten Stämme vor der Kultivierung der Biofilme mit einem genomischen GFP-Marker versehen, um eine kontinuierliche Analyse der Biofilme zu ermöglichen. Dazu wurde das *gfp*-Gen, das für das *green fluorescent protein* (GFP) aus *Aequorea victoria* kodiert, mittels Tn7-Transposon spezifisch in eine neutrale, intergenische Region des bakteriellen Genoms eingefügt (Koch *et al.* 2001). Zusätzlich zur optischen Beurteilung der Biofilmarchitektur wurden das Ausmaß der Oberflächenanheftung sowie die erhaltene Biomasse mit Hilfe des Computerprogramms „COMSTAT“ (Heydorn *et al.*, 2000) erfasst (Abb. 12).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem statischen Modell war die Biomasse des unter dynamischen Kulturbedingungen gewachsenen Biofilms der LecB-defizienten Mutante PATI4 mit der des Wildtyps vergleichbar. Darüber hinaus war die Fähigkeit der Zellen, die Glasoberfläche zu besiedeln, trotz der Defizienz im *lecB*-Gen unter dynamischen Bedingungen nicht eingeschränkt.

Aus den CLSM-Aufnahmen geht hervor, dass die Unterschiede in den Biofilmstrukturen der LecB-negativen Mutante und des Wildtyps im Vergleich zum statischen Modell schwächer ausgeprägt waren (Abb. 12). Die Biofilme des Wildtyp-Stamms wiesen eine wellenförmige Oberflächenarchitektur auf, wohingegen die LecB-negative Mutante Biofilme mit einer ebenen Oberfläche entwickelte.

Beim Vergleich der Biofilmstruktur des Wildtyp-Stamms PAO1 mit der des LecA-negativen Stamms PATI3 ergaben sich, wie bereits unter statischen Kulturbedingungen beobachtet, keine signifikanten Unterschiede (ohne Abbildung).

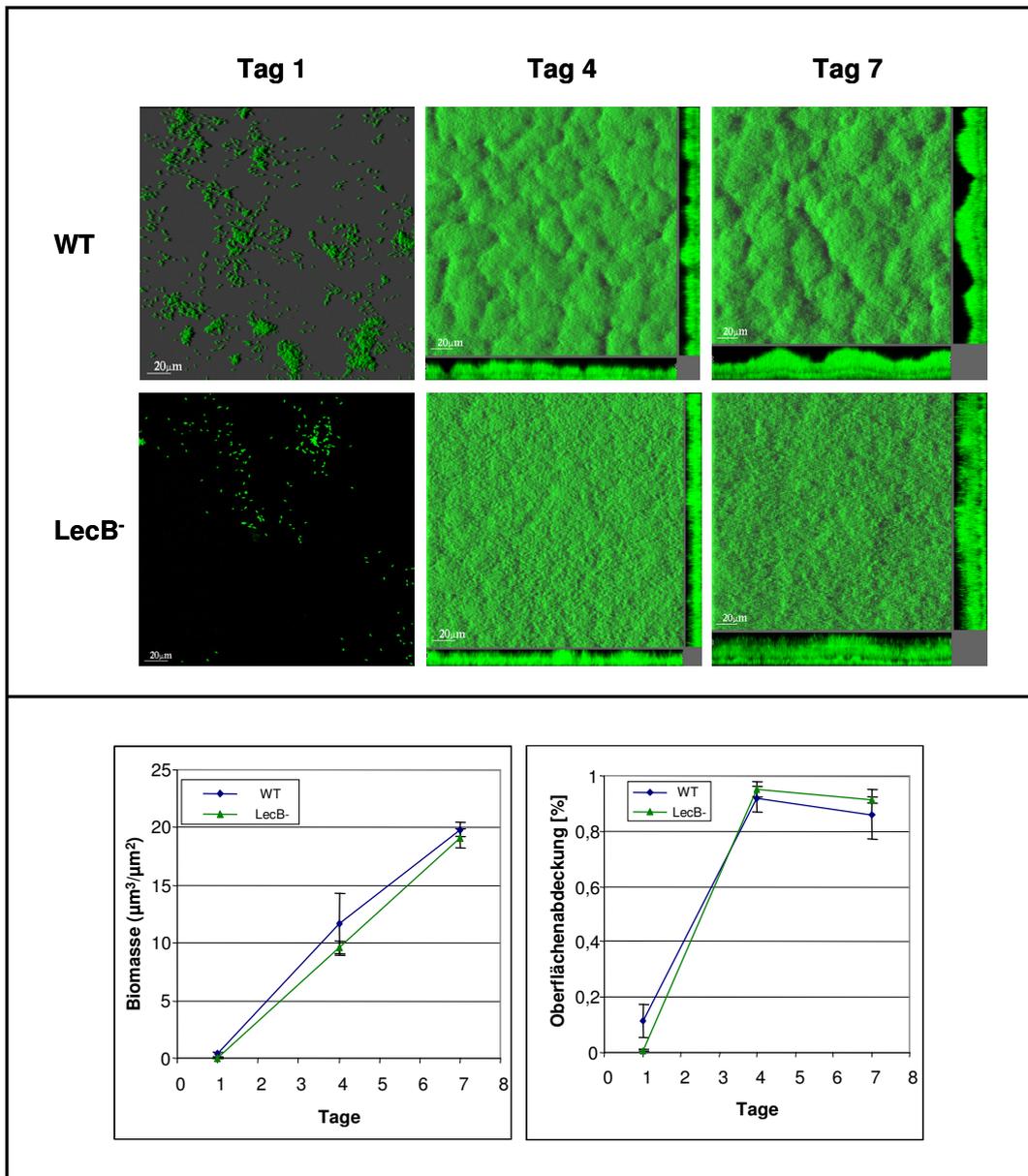


Abb. 12 CLSM-Aufnahmen und Quantifizierung von Biofilmen unter dynamischen Kulturbedingungen. Die Kultivierung der Biofilme des *P. aeruginosa*-Wildtyps PAO1 und der LecB-negativen Mutante PATI4 erfolgte in Durchflusszellen auf Glasdeckgläsern für 7 Tage in ABTG-Medium bei 30 °C. Die Stämme wurden zuvor chromosomal mit dem *gfp*-Gen markiert, um die Biofilme kontinuierlich mittels CLSM visualisieren zu können. Die Berechnung der Biomasse und der Oberflächenabdeckung erfolgte mit dem Programm „COMSTAT“. Skala = 20 μm.

3.4 Aufklärung der subzellulären Lokalisation des LecB-Proteins

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass die Lectine LecA und LecB in planktonischen Zellen von *P. aeruginosa* fast ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert sind (Glick & Garber, 1983). Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die cytotoxischen Eigenschaften der beiden Lectine widersprechen einem intrazellulären Wirkort. Darüber hinaus stellt sich die Frage, wie das LecB-Protein bei einer vorwiegend cytoplasmatischen Lokalisation Einfluss auf die Biofilmstruktur nehmen kann. Aus diesen Gründen sollte die Lokalisierung des LecB-Proteins in planktonischen und in sessilen Zellen von *P. aeruginosa* durchgeführt werden. Dazu wurden die Zellen sowohl als konfluenter Bakterienrasen auf NB-Agarplatten in Form eines ungesättigten Biofilms als auch in Flüssigkultur kultiviert und die einzelnen Zellfraktionen präpariert. Anschließend konnte das Lectin durch Immunoblotting unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums in den verschiedenen Zellfraktionen detektiert werden.

3.4.1 LecB ist mit der äußeren Zellmembran assoziiert

Zu Beginn der Versuche zur subzellulären Lokalisierung des LecB-Proteins wurde der Wildtyp-Stamm PAO1 verwendet. Da die Menge des von den Zellen produzierten Lectins dabei an der immunologischen Nachweisgrenze lag, wurde für die weiteren Untersuchungen das Expressionsplasmid pBBC2 verwendet, welches das *lecB*-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiven *lacUV*-Promotors enthält, um die Syntheserate des Lectins zu erhöhen. Zur Konstruktion des Plasmids, die im Anhang detailliert dargestellt ist (Abb. 41), wurde das Gen des Lectins durch Restriktionsverdau des *lecB*-Expressionsplasmids pEC2 mit den Enzymen *Xba*I/*Sac*I zusammen mit der Ribosomenbindungsstelle dieses Plasmids isoliert und in den Vektor pBBR1MCS kloniert, der zuvor mit denselben Enzymen hydrolysiert wurde. Das resultierende Plasmid pBBC2 wurde anschließend durch Konjugation in den *lecB*-negativen *P. aeruginosa* Stamm PATI2 mobilisiert. Die Kultivierung der planktonischen Zellen erfolgte für 48 h bei 37 °C in NB-Medium. Für die Lokalisierung des LecB-Proteins in sessilen Bakterien wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C auf NB-Agar kultiviert. 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. Der Nachweis des LecB-Proteins erfolgte durch Immunoblotting unter Einsatz

des LecB-spezifischen Antiserums. Laut der in Abbildung 13 dargestellten Signale ist das LecB-Protein in planktonischen und in sessilen Zellen sowohl in der Fraktion des Cytoplasmas als auch in der Fraktion der Gesamtmembran enthalten. Da die physiologische Charakterisierung des LecB-Proteins insbesondere die Aufklärung der Bedeutung des Lectins für den Prozess der Biofilmbildung umfassen sollte, wurden für die weiteren Studien sessile Zellen verwendet, die in Form von ungesättigten Biofilmen auf Agarplatten kultiviert wurden.

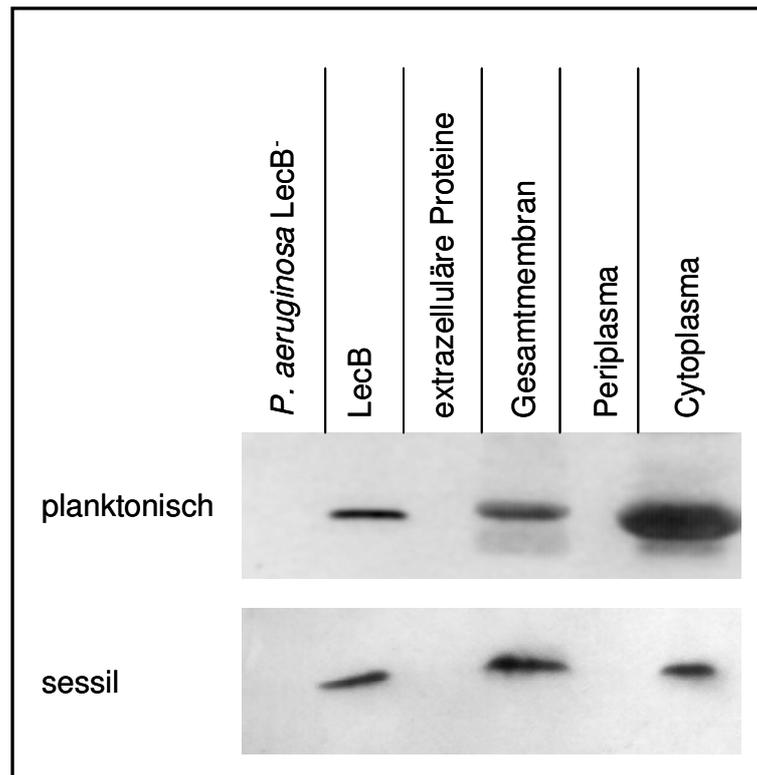


Abb. 13 Subzelluläre Lokalisierung des LecB-Proteins in planktonischen und in sessilen Zellen. Bakterien des *P. aeruginosa*-Stamms PATI2, die das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielten, wurden für 48 h bei 37 °C auf NB-Agar als konfluente Bakterienrasen sowie in NB-Medium kultiviert und anschließend fraktioniert. Durch Immunoblotting unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums wurden die einzelnen Fraktionen auf die Präsenz des LecB-Proteins hin untersucht. Die eingesetzten Volumina der Fraktionen entsprachen einer $O.D._{580} = 0,5$. 50 ng natives LecB-Protein wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GZE der Lectin-Doppelmutante PATI2.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten konnten die innere (IM) und die äußere Membran (OM) mittels Ultrazentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten aus der Fraktion der Gesamtmembran getrennt isoliert werden. Die Fraktionen, welche die höchsten Aktivitäten der beiden Markerenzyme NADH-Oxidase und Esterase aufwiesen, wurden zusammengeführt und als IM bzw. OM weiterverwendet (Abb. 14).

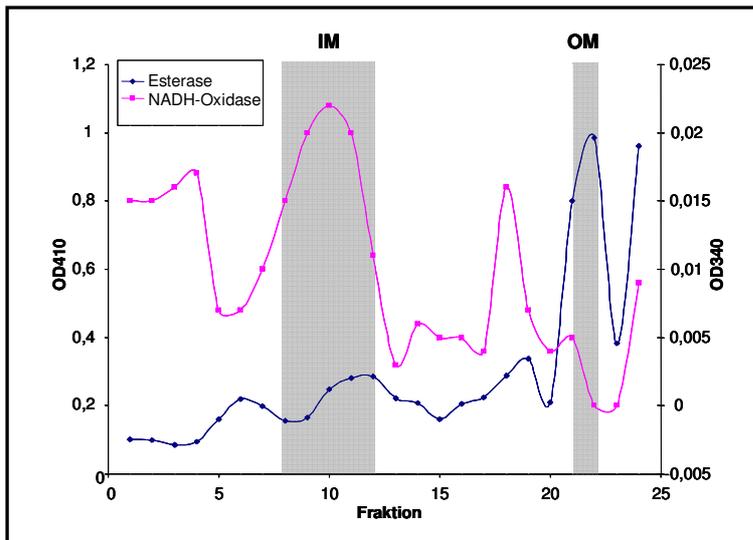


Abb. 14 Enzymaktivitäten der durch Ultrazentrifugation gewonnenen Fraktionen. Es wurden 24 Fraktionen unterschiedlicher Saccharose-Konzentration erhalten, deren Esterase- (O.D.₄₁₀) und NADH-Oxidase-Aktivität (O.D.₃₄₀) bestimmt wurden. Diese dienen als Markerenzyme für die äußere (OM) bzw. innere Membran (IM). Die Fraktionen 8-12 sowie 21-22 wurden als Fraktionen der IM bzw. der OM zusammengeführt.

Die anschließende Immunodetektion unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums ergab, dass das LecB-Protein in der äußeren Membran vorhanden ist, während in der inneren Membranfraktion kein solches Signal detektiert wurde (Abb. 15).

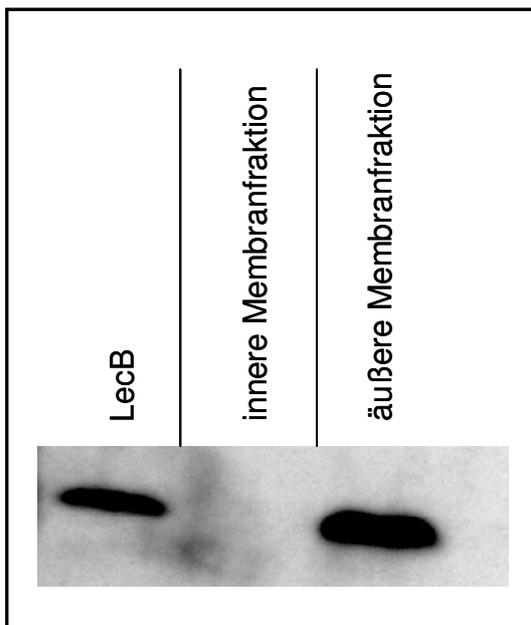


Abb. 15 Immunologischer Nachweis des LecB-Proteins in der äußeren Membran von sessilen *P. aeruginosa*-Zellen. Die in 100 µl der Fraktionen der inneren und äußeren Membran enthaltenen Proteine wurden präzipitiert und gelelektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis des LecB-Proteins in den einzelnen Fraktionen unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums. Die eingesetzten Volumina der Fraktionen entsprachen einer O.D.₅₈₀ = 0,5. 50 ng natives LecB-Protein wurden als Positivkontrolle eingesetzt.

3.4.2 LecB interagiert mit Zuckerrezeptoren der äußeren Membran

Das LecB-Protein konnte in der Fraktion der OM sessiler *P. aeruginosa*-Zellen nachgewiesen werden, obwohl das Lectin keine strukturellen Merkmale von Membranproteinen aufweist (3.1.3). Um zu prüfen, ob das LecB-Protein mit zuckerhaltigen Rezeptoren der OM interagiert, wurden die Proteine dieser Fraktion, die zuvor durch Ultrazentrifugation in einem

diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten isoliert wurden (3.4.1), durch Zentrifugation sedimentiert und in PBS-Puffer suspendiert, der zusätzlich 20 mM *p*NP-Fucose bzw. D-Galactose enthielt. Die Interaktion des LecB-Proteins mit *p*NP-Fucose weist eine außergewöhnlich hohe Bindekonstante auf, während die Affinität zu D-Galactose gleich null ist (Garber *et al.*, 1987). Letztere konnte daher als Referenz eingesetzt werden. Nach der Inkubation der in 100 µl enthaltenen Proteine der OM mit den Zuckern wurden die Proteine erneut sedimentiert und die Anwesenheit des LecB-Proteins immunologisch überprüft (Abb. 16). Das LecB-Protein konnte im Überstand, der im Anschluss an die *p*NP-Fucose-Behandlung der OM durch Zentrifugation gewonnen wurde, nachgewiesen werden. Die immunologische Analyse des entsprechenden Pellets wies kein Signal auf. Im Gegensatz dazu wurde die Interaktion des LecB-Proteins mit der OM durch die Behandlung mit der D-Galactose nicht inhibiert, da das Lectin ausschließlich im entsprechenden Pellet lokalisiert wurde.

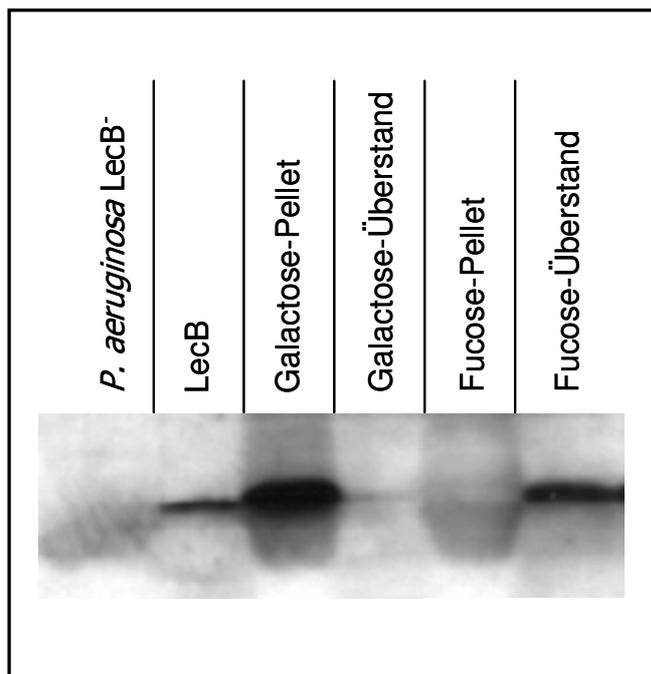


Abb. 16 Hemmung der LecB-OM-Interaktion durch *p*NP-Fucose. Die in 100 µl der OM-Fraktion enthaltenen Proteine wurden durch Zentrifugation sedimentiert und in 100 µl PBS-Puffer, der zusätzlich 20 mM *p*NP-Fucose bzw. D-Galactose enthielt, suspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. D-Galactose wurde als Referenz eingesetzt. Nach anschließender Zentrifugation wurde das LecB-Protein in den erhaltenen Überständen und den entsprechenden Pellets unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums lokalisiert. Die eingesetzten Volumina der Fraktionen entsprachen einer O.D.₅₈₀ = 0,5. 50 ng natives LecB-Protein wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GZE der Lectin-Doppelmutante PATI2.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Interaktion des LecB-Proteins mit der OM sessiler *P. aeruginosa*-Zellen auf der Bindung des Lectins an LecB-spezifische Liganden in der Membran beruht.

3.5 Nachweis LecB-spezifischer Rezeptoren auf der Oberfläche von sessilen *P. aeruginosa*-Zellen

Wie gezeigt wurde, ist das LecB-Protein über die Interaktion mit Rezeptoren, die LecB-spezifische Zucker enthalten, mit der äußeren Membran von *P. aeruginosa* assoziiert. Zum Nachweis dieser Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche wurde das LecB-Protein durch die Fusion mit dem *yellow fluorescent protein* (YFP, Clontech, Palo Alto, USA), einer gelb-fluoreszierenden Variante des GFP aus *Aequorea victoria*, fluoreszenzmarkiert. Das resultierende Fusionsprotein YFP_{LecB} wurde affinitätschromatographisch gereinigt (3.7) und zur Anfärbung von Biofilmzellen benutzt. Die Visualisierung der potentiellen Liganden erfolgte anschließend mittels CLSM.

3.5.1 LecB bindet spezifisch an die Oberfläche von Biofilmzellen

Die Anfärbung von Biofilmzellen unter Verwendung des YFP_{LecB}-Proteins zum Nachweis potentieller Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Wingender (*Biofilm Centre*, Abteilung Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Dazu wurden auf Membranfiltern, die sich auf der Oberfläche von PIA-Platten befanden, Biofilme des *P. aeruginosa*-Wildtyps PAO1 für 24 h bei 37 °C kultiviert. Im Vergleich zu NB-Agar, der zur Kultivierung der Bakterien für die subzelluläre Lokalisierung des LecB-Proteins verwendet wurde (3.4), sind auf PIA kultivierte Biofilme robuster und daher besser für die Anfärbung geeignet. Nach der Behandlung für 1 h mit einer Färbelösung, die sowohl das YFP_{LecB}-Protein als auch den DNA-bindenden Farbstoff SYTO 62 (Molecular Probes, Karlsruhe) enthielt, wurden die Biofilme mit 0,14 M NaCl gewaschen, um überschüssige Färbelösung zu entfernen. Die CLSM-Aufnahmen der rot gefärbten Biofilmzellen zeigen ein intensiv fluoreszierendes Signal, das die Zellperipherie umgibt (Abb. 17A, C). Durch die Vorinkubation des YFP_{LecB}-Proteins mit L-Fucose wurde die Färbung unterbunden, was die Spezifität der Interaktion des Lectins mit der Zelloberfläche demonstriert (Abb. 17E). Die dargestellten Ergebnisse weisen eindeutig auf die Anwesenheit potentieller, LecB-spezifischer Liganden auf der Oberfläche sessiler Zellen des *P. aeruginosa*-Stamms PAO1 hin. Zusätzlich wurde die Lectinfärbung an Biofilmzellen des *P. aeruginosa*-Stamms SG81 vorgenommen. Dabei handelt es sich um ein mucoides Isolat aus einem technischen Abwassersystem (Grobe *et al.*, 1995). Im Vergleich zu PAO1 zeichnet sich dieser Stamm durch eine erhöhte Sekretion von Kohlenhydraten und Alginat aus. Die

Existenz der Lectine LecA und LecB in Zellen des *P. aeruginosa*-Stamms SG81 wurde immunologisch nachgewiesen (Abb. 17G). Auch auf der Zelloberfläche des mucoiden Stamms konnte die Präsenz LecB-spezifischer Rezeptoren dokumentiert werden (Abb. 17B, D, F).

Die spezifische Anfärbung der Zelloberfläche konnte mit nativem LecB-Protein, das zuvor mit Hilfe des „Alexa Fluor 488 Protein Labeling“ Kits (Molecular Probes, Karlsruhe) markiert wurde, reproduziert werden. Dadurch wurde nochmals ausgeschlossen, dass die Lectinfärbung mit Hilfe der YFP_{LecB}-Fusion durch unspezifische Wechselwirkungen des YFP mit der Zelloberfläche verursacht wurde (ohne Abbildung).

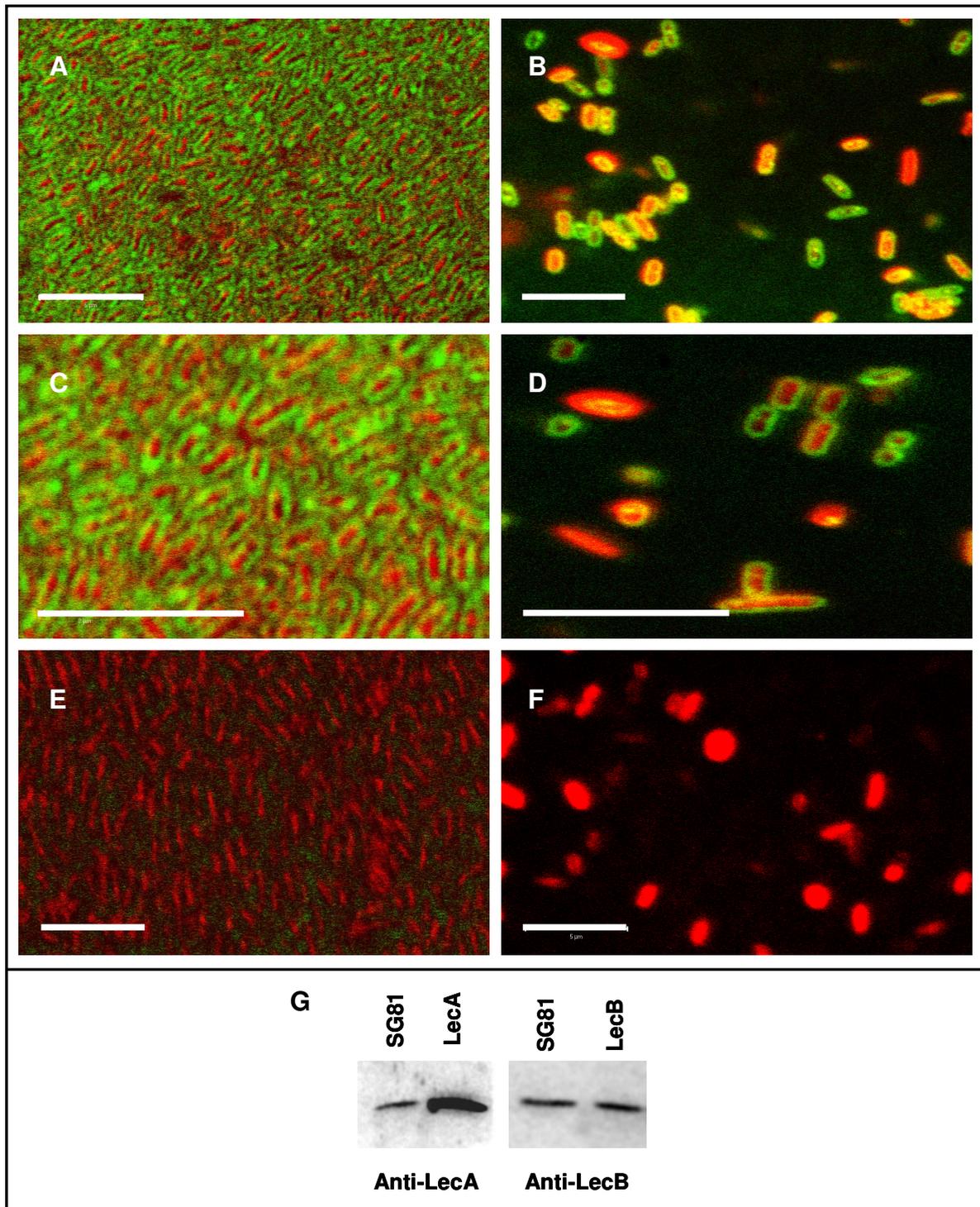


Abb. 17 Selektive Bindung von LecB an die Zelloberfläche von *P. aeruginosa*. Biofilme des Stamms *P. aeruginosa* PAO1 (A, C) sowie des mucoiden Stamms *P. aeruginosa* SG81 (B, D) wurden auf Membranfiltern für 24 h bei 37 °C auf PIA kultiviert, anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten LecB-Protein (YFP_{LecB}) (grün) behandelt und mit 0,14 M NaCl gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellen erfolgte mit dem DNA-bindenden Farbstoff SYTO 62 (rot). Die spezifische Hemmung der Lectinbindung an die Zelloberfläche von *P. aeruginosa* PAO1 (E) und SG81 (F) erfolgte durch L-Fucose. Dazu wurde das YFP_{LecB}-Protein vor der Zellfärbung in 100 mg/ml L-Fucose für 15 min bei RT vorinkubiert. Die Visualisierung der Zellen erfolgte mittels CLSM bei einer Vergrößerung von 1:4.000 (A, B, E, F) bzw. 1:8.000 (C, D). Skala = 5 µm. G. Nachweis der Lectine LecA und LecB in Biofilmzellen des *P. aeruginosa*-Stamms SG81 durch Immunoblotting unter Verwendung des LecA- bzw. LecB-spezifischen Antiserums. Die Bakterien wurden für 24 h bei 37 °C auf PIA kultiviert. Für den Nachweis des LecA-Proteins wurde die Menge an GZE eingesetzt, die einer O.D.₅₈₀ = 0,5 entspricht. Für den immunologischen Nachweis des LecB-Proteins wurde das Lectin aus dem GZE der Zellen mittels Affinitätschromatographie über D-Mannose-Agarose gereinigt.

3.6 Untersuchungen zur Sekretion des LecB-Proteins

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, ist ein erheblicher Anteil des zellulären LecB-Proteins mit der äußeren Membran von *P. aeruginosa* assoziiert. Dabei weist das Lectin keines der derzeit bekannten N-terminalen Sekretionssignale auf. In Homologie zum Sekretionssignal einer Nukleosid Diphosphat Kinase (Ndk) aus *P. aeruginosa* (Kamath *et al.*, 2000) beinhaltet das LecB-Protein in der Nähe des C-Terminus ein Tetrapeptid bestehend aus den Aminosäuren D-A-V-V (Asp104-Val107). Durch die immunologische, subzelluläre Lokalisierung einer mutierten LecB-Variante, in der die Sequenz des putativen Sekretionsmotivs gegen vier Alanine ausgetauscht wurde, sollte der Einfluss des Tetrapeptids auf die LecB-Sekretion untersucht werden.

Darüber hinaus sollte die Bedeutung zweier Gene (PA3359 und PA3360), die im Genom von *P. aeruginosa* benachbart zum *lecB*-Gen lokalisiert sind, für die LecB-Sekretion aufgeklärt werden. Aufgrund der vorhergesagten Proteinstrukturen der entsprechenden Genprodukte sowie der Sequenzhomologie zu bekannten Sekretionsfaktoren aus *E. coli* sollten diese Gene in *P. aeruginosa* überexprimiert werden, um deren Einfluss auf die LecB-Sekretion analysieren zu können.

3.6.1 Charakterisierung eines putativen Sekretionssignals im LecB-Protein

Um zu prüfen, ob das D-A-V-V-Motiv des Lectins für die Translokation in die äußere Membran verantwortlich ist, sollte mittels ortsspezifischer Mutagenese eine mutierte Variante des LecB-Proteins (LecB*) konstruiert werden, in der die Sequenz des putativen Sekretionsmotivs gegen 4 Alanine ausgetauscht wurde (Abb. 18).

| | |
|------------------|---|
| LecB (WT) | 80 QVILTNELNFALVGSEDGTDNDYND DAVV VINWPLG C-Terminus |
| LecB* | 80 QVILTNELNFALVGSEDGTDNDYND AAAA VINWPLG C-Terminus |

Abb. 18 Modifikation des putativen Sekretionsmotivs im LecB-Protein. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurde die Sequenz des *lecB*-Gens, die für das D-A-V-V-Motiv kodiert, so modifiziert, dass es im resultierenden Protein (LecB*) gegen 4 Alanine ausgetauscht wurde. WT: Wildtyp

Zunächst wurde das *lecB*-Gen unter Verwendung der Oligonukleotidprimer LIINdeI und LIIXch PCR-amplifiziert, wobei LIIXch die modifizierte DNA-Sequenz enthielt. Über die

insetierten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NdeI* / *BamHI* wurde das erhaltene PCR-Fragment (*lecB**) in den Vektor pET22b kloniert, woraus das Plasmid pEXCH2 resultierte. Um eine Expression in *P. aeruginosa* zu ermöglichen, wurde das *lecB**-Gen zusammen mit der Ribosomenbindungsstelle des Plasmids pET22b durch Hydrolyse des Plasmids pEXCH2 mit den Restriktionsendonukleasen *XbaI* / *SacI* isoliert und über dieselben Erkennungssequenzen in den Vektor pBBR1MCS eingefügt. Die Klonierung ist im Anhang dargestellt (Abb. 42). Das resultierende *lecB**-Expressionsplasmid pBBXCH2 wurde durch konjugativen Transfer in den LecB-negativen Stamm PATI4 mobilisiert.

Um die subzelluläre Lokalisation des mutierten LecB*-Proteins in sessilen Zellen mit der des nativen Lectins zu vergleichen, wurden die entsprechenden Stämme für 48 h bei 37 °C als konfluente Bakterienrasen auf NB-Agarplatten kultiviert. Nach der anschließenden Zellfraktionierung erfolgte die Immunodetektion der Lectine unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums. Wie in Abbildung 19 dargestellt, wurde sowohl das native Lectin als auch das mutierte LecB*-Protein im Cytoplasma der Bakterien detektiert. Dagegen konnte das LecB*-Protein im Gegensatz zum nativen Lectin in der Fraktion der Gesamtmembran nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das D-A-V-V-Tetrapeptid die Translokation des Lectins in die äußere Membran beeinflusst.

Zusätzlich zur Anzucht über 48 h wurden Biofilme über einen Zeitraum von 8, 12, und 24 h kultiviert, um anschließend die subzelluläre LecB-Lokalisation wie beschrieben aufzuklären. Beide Lectin-Varianten wurden bereits nach einem Zeitraum von 8 h im Cytoplasma nachgewiesen. Sowohl das native als auch das mutierte LecB*-Protein wurden nach 24 h im Periplasma der Bakterien detektiert. Nach einem Zeitraum von 48 h konnte das native LecB-Protein in der Fraktion der äußeren Membran nachgewiesen werden, während die mutierte LecB*-Variante im Periplasma degradiert wurde (ohne Abbildung).

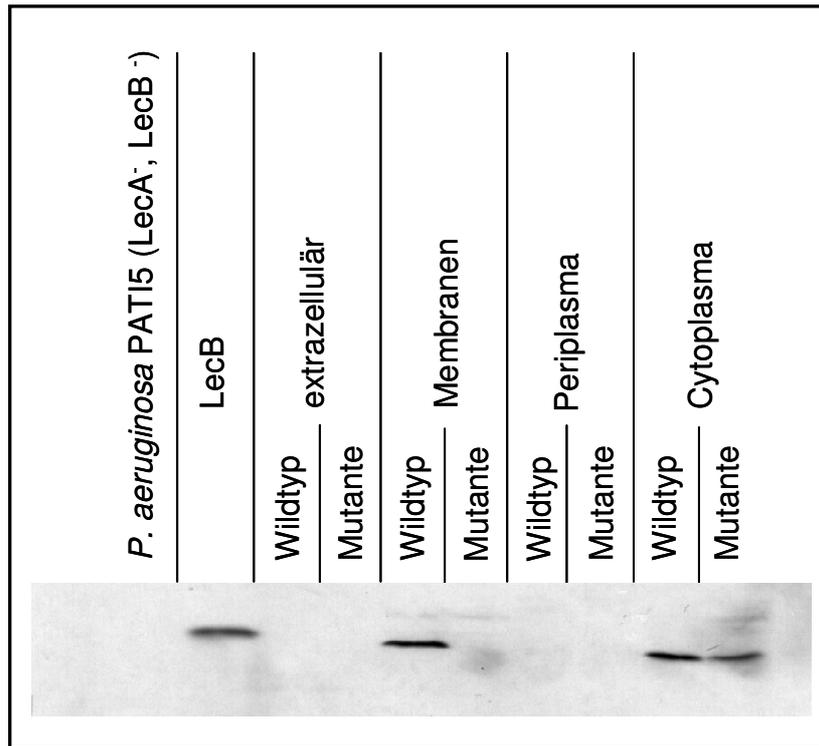


Abb. 19 Immunologische, subzelluläre Lokalisierung der mutierten LecB*-Variante. *P. aeruginosa*-Biofilmzellen, die das LecB- (Wildtyp) oder das LecB*-Protein (Mutante) synthetisierten, wurden nach Kultivierung auf NB-Agarplatten für 48 h fraktioniert. Die präparierten Zellfraktionen wurden durch Immunoblotting unter Verwendung des 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 entsprachen. 50 ng natives LecB-Protein wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle diente GZE der Lectin-Doppelmutante PATI5.

3.6.2 Struktur-Funktions-Beziehung des D-A-V-V-Tetrapeptids

Unter Berücksichtigung der Strukturdaten des nativen LecB-Proteins sollte der Einfluss der Mutation des D-A-V-V-Tetrapeptids auf die Proteinstruktur analysiert werden. Wie in Abbildung 20 dargestellt, befindet sich das D-A-V-V-Tetrapeptid in unmittelbarer Nähe zur Zuckerbindestelle des Lectins. Darüber hinaus ist Asp104, die erste Aminosäure des putativen Sekretionsmotivs, über die Koordination der beiden Ca^{2+} -Ionen indirekt an der Bindung des Liganden beteiligt. Der Austausch dieser Aminosäure gegen ein Alanin resultiert daher im Verlust der Zuckerbindefähigkeit des Proteins. Dies konnte experimentell nachgewiesen werden, indem das LecB*-Protein mit der modifizierten A-A-A-A-Sequenz als Poly-Histidin-Fusionsprotein mittels IMAC isoliert und in einen Hämagglutinationstest eingesetzt wurde. Die Zugabe dieser mutierten LecB-Variante zu Kaninchen-Erythrozyten bewirkte keine positive Hämagglutinationsreaktion (ohne Abbildung).

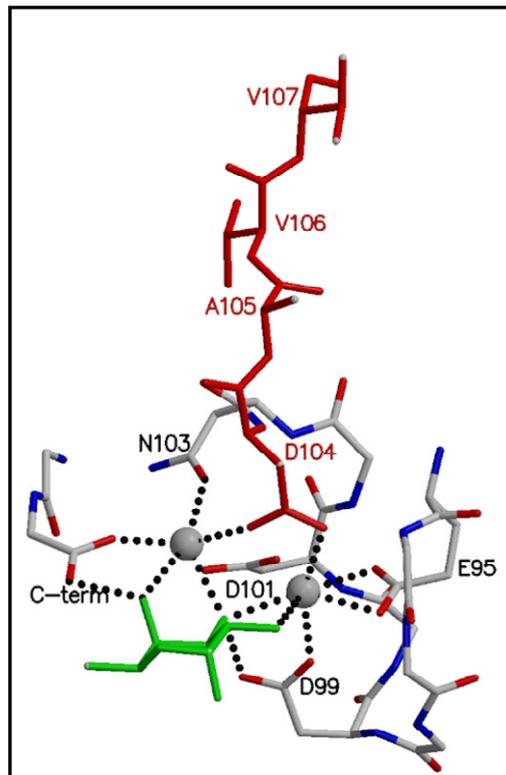


Abb. 20 Kugel-Stab-Darstellung der Zuckerbindestelle des LecB-Proteins. Asp104 ist durch die Koordination der beiden Ca^{2+} -Ionen indirekt an der Zuckerbindung beteiligt ist. Die in rot dargestellten Aminosäuren Asp104, Ala105, Val106 und Val107 wurden im LecB*-Protein gegen vier Alanine ausgetauscht, so dass die Fähigkeit zur Zuckerbindung verloren ging.

Zudem sollte anhand der Strukturdaten die sterische Zugänglichkeit des D-A-V-V-Tetrapeptids für potentielle, kooperierende Sekretionsfaktoren untersucht werden. Abbildung 21 zeigt ein Corey-Pauling-Koltun-Modell (CPK), das die Lokalisation des Tetrapeptids im LecB-Monomer und -Dimer veranschaulicht. Diese Darstellungsmethode ist besonders geeignet, um die Raumfüllung eines Proteins zu beschreiben. Dabei wird deutlich, dass der größte Teil des Tetrapeptids bereits im Monomer durch die van der Waals Radien der Atome benachbarter Aminosäuren verdeckt wird und damit für kooperierende Sekretionsfaktoren unzugänglich ist. Im LecB-Dimer wird das Tetrapeptid fast vollständig vom korrespondierenden Monomer abgeschirmt. Zudem wird der kleine Teil des Tetrapeptids, der im Dimer noch in Kontakt mit dem Lösungsmittel steht, im aktiven LecB-Protein durch eines der beiden Ca^{2+} -Ionen verdeckt (ohne Abbildung).

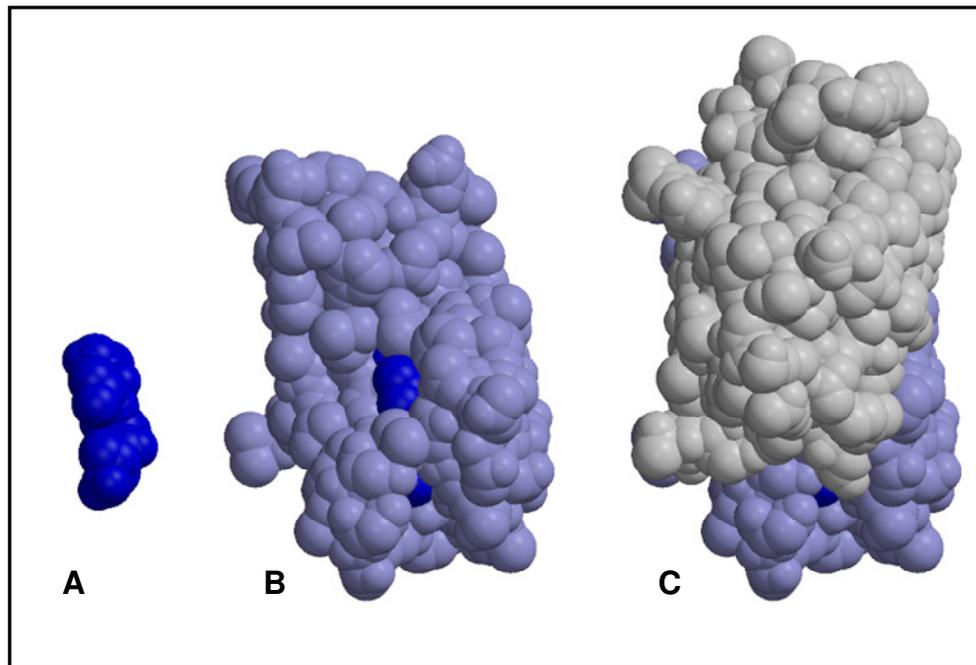


Abb. 21 CPK-Modell zur Einschätzung der sterischen Zugänglichkeit des D-A-V-V-Tetrapeptids. A. Isoliertes Tetrapeptid. B. LecB-Monomer in grau-blau mit dem Tetrapeptid in dunkelblau. C. LecB-Dimer mit einem Monomer in grau und einem in blau-grau. Das in dunkelblau dargestellte Tetrapeptid wird vom korrespondierenden Monomer fast vollständig verdeckt.

3.6.3 Untersuchungen zum Einfluss der ORF PA3359 und PA3360 auf die LecB-Translokation

Im Genom von *P. aeruginosa* befinden sich in direkter Nachbarschaft zum *lecB*-Gen die beiden ORF PA3359 und PA3360 (Abb. 22). Aufgrund der kurzen intergenischen Region von 22 bp zwischen den beiden ORF, die keine Terminatorsequenz aufweist, ist es wahrscheinlich, dass die Transkription der beiden Gene von einem gemeinsamen Promotor kontrolliert wird. Zudem werden beide ORF in entgegengesetzter Richtung zu den benachbarten Genen transkribiert. Das Protein, das vom ORF PA3360 kodiert wird, weist wesentliche Homologien zum α -Hämolysin-Transporterprotein HlyD aus *E. coli* auf und ist daher als putatives Sekretionsprotein annotiert. Der ORF PA3359 kodiert laut Vorhersage für ein Membranprotein mit 10–11 transmembranen Domänen (www.pseudomonas.com). Aufgrund der vorhergesagten Strukturen dieser Proteine und der Homologie zu bekannten Sekretionsfaktoren aus *E. coli* sollte untersucht werden, ob sie an der Translokation des LecB-Proteins in die äußere Membran beteiligt sind.

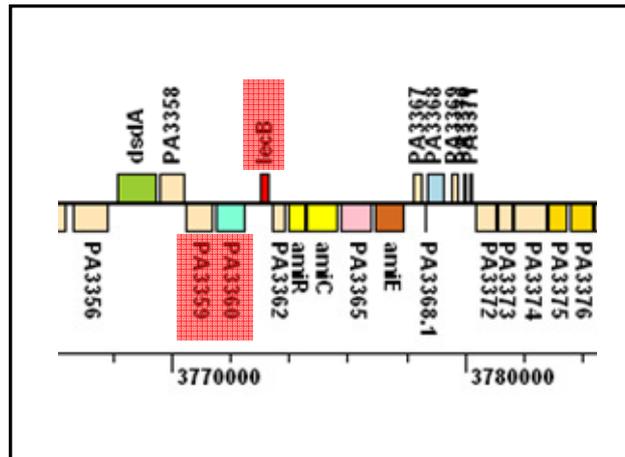


Abb. 22 Lage des *lecB*-Gens im Genom von *P. aeruginosa*. Das bicistronische Operon, bestehend aus den beiden ORF PA3359 und PA3360, befindet sich in direkter Nähe zum *lecB*-Gen und wird in entgegengesetzter Richtung transkribiert.

Dazu wurden die Gene der beiden ORF mittels PCR amplifiziert und so in den Vektor pUCPKS kloniert, dass sie gemeinsam unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors standen. Die Klonierung ist im Anhang detailliert dargestellt (Abb. 40). Das resultierende Plasmid pUCP6059 wurde in den *P. aeruginosa*-Stamm PATI4 mobilisiert, der zusätzlich das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielt, das bereits für die Untersuchungen der zellulären Lokalisation des LecB-Proteins (3.4) verwendet wurde. Als Referenz wurde das Plasmid pUCPKS in *P. aeruginosa* PATI4 eingebracht. Die Zellen wurden als konfluente Bakterienrasen auf NB-Agar in Form eines ungesättigten Biofilms für 48 h bei 37 °C kultiviert und anschließend fraktioniert. Die erhaltenen Zellfraktionen wurden durch Immunoblotting unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums auf die Präsenz des Lectins hin analysiert. Wie in Abbildung 23 dargestellt, wurde das LecB-Protein im Cytoplasma und in der Fraktion der Gesamtmembran der Zellen des Stamms, der das Plasmid pUCPKS als Negativkontrolle enthielt sowie in den Zellen, die das bicistronische Operon überexprimierten, nachgewiesen. Dabei wiesen die Signale in den Fraktionen beider Stämme vergleichbare Intensitäten auf. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das bicistronische Operon aus den beiden ORF PA3359 und PA3360 keinen Einfluss auf die LecB-Sekretion hat. Parallel zu den beschriebenen Versuchen wurden die Gene einzeln in den Vektor pUCPKS kloniert und die Versuchsdurchführung unter den beschriebenen Bedingungen wiederholt. Auch hierbei ergaben sich keine Hinweise auf eine Beteiligung der Proteine an der LecB-Translokation (ohne Abbildung).

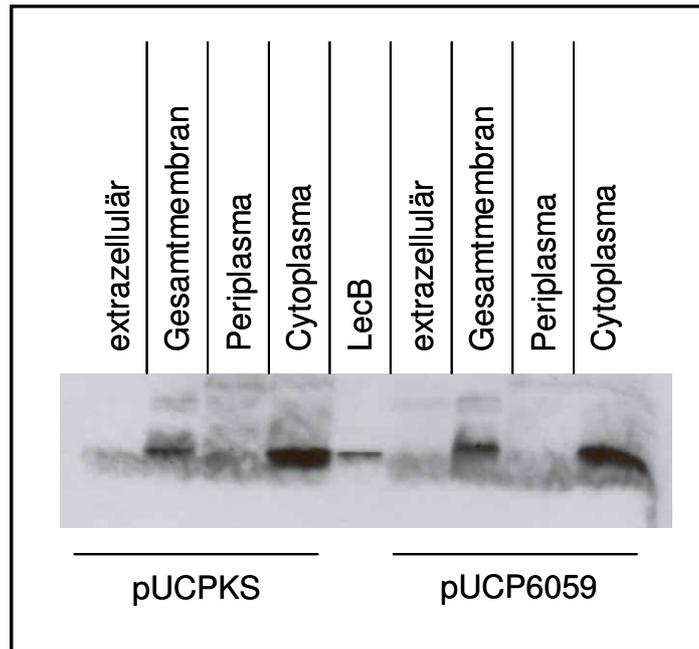


Abb. 23 Immunologische, subzelluläre Lokalisierung des LecB-Proteins nach Überexpression der ORF PA3360 und PA3359. *P. aeruginosa*-Biofilmzellen des Stamms PATI4, die neben dem *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 die Gene der ORF PA3360 und PA3359 als bicistronisches Operon im Plasmid pUCPKS enthielten, wurden fraktioniert. Durch Immunoblotting unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums wurde das Lectin in den einzelnen Fraktionen detektiert und mit der Menge an LecB-Protein verglichen, die in den entsprechenden Fraktionen des *P. aeruginosa*-Stamms PATI4 nachgewiesen wurden, der den Vektor pUCPKS als Referenz enthielt. Es wurden Volumina der Fraktionen eingesetzt, die einer $O.D._{580} = 0,5$ entsprachen. 50 ng reines LecB-Protein wurden als Positivkontrolle eingesetzt.

3.7 Biotechnologische Anwendung des LecB-Proteins: Der LecB-tag

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, konnte das LecB-Protein in einem Ein-Schritt-Verfahren mittels Affinitätschromatographie über D-Mannose-Agarose gereinigt werden, wobei eine Ausbeute von 70 mg elektrophoretisch homogenen Proteins pro Liter Expressionskultur erreicht wurde. Aufgrund dessen sollte geprüft werden, ob der Einsatz des Lectins als Affinitäts-tag (LecB-tag) eine ebenso effiziente Reinigung von fusionierten Fremdproteinen ermöglicht. Bei der Betrachtung der Strukturdaten des LecB-Proteins wird deutlich, dass der N-Terminus des Lectins frei zugänglich ist und daher für die Fusion mit einem Fremdprotein zur Verfügung steht. Als Fusionspartner für den LecB-tag wurde das YFP ausgewählt, da dessen fluoreszierende Eigenschaft die Detektion des Fusionsproteins vereinfacht. Darüber hinaus sollte das isolierte Protein in physiologische Studien, wie der Visualisierung potentieller Liganden für das LecB-Protein auf der bakteriellen Zelloberfläche (3.5), eingesetzt werden. Zusätzlich wurde der Einfluss des LecB-tags auf die Konformation und Aktivität des Zielproteins durch die Konstruktion einer Fusion mit einer Lipase und einer Cutinase untersucht. Darüber hinaus wurde überprüft, ob der LecB-tag eine nicht-kovalente Immobilisierung der fusionierten Enzyme an eine L-Fucose-Agarosematrix ermöglicht.

3.7.1 Konstruktion und Reinigung eines YFP_{LecB}-Fusionsproteins

Um zu prüfen, ob sich das LecB-Protein als Affinitäts-tag für die chromatographische Proteinreinigung eignet, sollte das *yfp*-Gen unter Verlust des Stoppcodons am 3'-Ende mit dem Lectin-Gen *lecB* fusioniert werden (Abb. 24). Dadurch wurde das YFP C-terminal mit dem LecB-Protein fusioniert, wobei das reife Protein aus 366 Aminosäuren bestand und ein Molekulargewicht von 40,36 kDa aufwies.

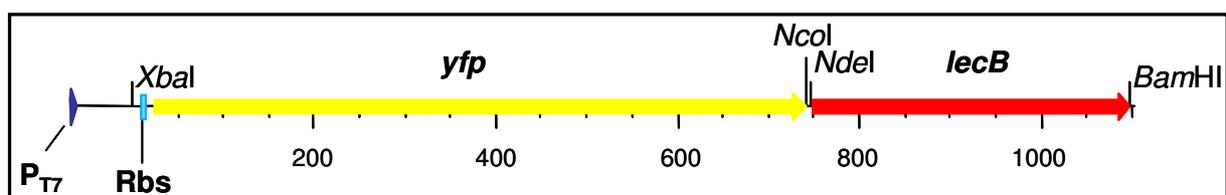


Abb. 24 Schematische Darstellung der Genfusion aus *yfp* und *lecB*. Um das YFP C-terminal mit dem LecB-Protein zu fusionieren, wurde das *yfp*-Gen ohne Stoppcodon amplifiziert und an das 3'-Ende des *lecB*-Gens kloniert. Das resultierende DNA-Fragment hatte eine Größe von 1.103 bp und stand im Vektor pET22b unter der transkriptionellen Kontrolle des T7-Promotors (P_{T7}). Rbs: Ribosomenbindungsstelle

Das Fusionsprotein wurde im Weiteren als YFP_{LecB} bezeichnet. Eine Fusion mit dem N-Terminus des YFP konnte nicht realisiert werden, da das daraus resultierende Protein aufgrund der Beteiligung der C-terminal endständigen Aminosäure des Lectins (Gly114) an der Zuckerbindung, diese Eigenschaft verlieren würde (3.1.3). Zunächst wurde das *yfp*-Gen mit Hilfe der Oligonukleotide YFPFusFW / YFPFusRV unter Verlust des Stoppcodons PCR-amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass am 5'- und am 3'-Ende des Gens Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Xba*I bzw. *Nde*I angefügt wurden. Darüber hinaus enthielt das Oligonukleotid YFPFusFW die Sequenz der Ribosomenbindungsstelle, die am 5'-Ende eingefügt wurde. Das Plasmid pFF19-eYFP diente als Matrizen-DNA. Das resultierende PCR-Fragment wurde über die Erkennungssequenzen für die Enzyme *Xba*I / *Nde*I in das *lecB*-Expressionsplasmid pEC2 kloniert. Die Klonierung des Plasmids ist im Anhang dargestellt (Abb. 45). Nach Transformation von *E. coli* Tuner (DE3) mit dem resultierenden Plasmid pEYL2 wurden die Zellen auf LB-Selektionsagar, der zur Induktion der Genexpression zusätzlich 0,5 mM IPTG enthielt, ausgestrichen und nach Kultivierung für 24 h bei 37 °C mikroskopisch untersucht. Durch die Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzlicht konnte die fluoreszierende Aktivität des Fusionsproteins nachgewiesen werden (Abb. 25A).

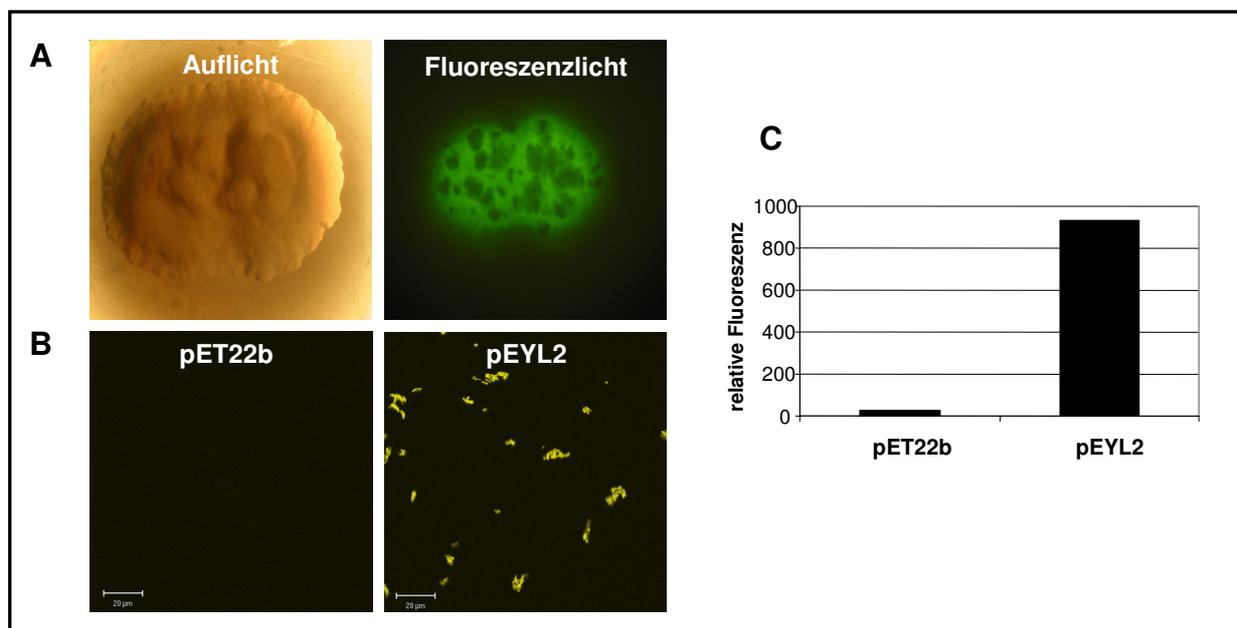


Abb. 25 Nachweis der Fluoreszenz des YFP_{LecB}-Fusionsproteins. **A.** Mikroskopische Aufnahmen einer Bakterienkolonie des *E. coli*-Stamms Tuner (DE3), der das *yfp::lecB*-Expressionsplasmid pEYL2 enthielt, bei Auflicht und in Fluoreszenzlicht nach Kultivierung für 24 h. Vergrößerung: $\times 100$ **B.** CLSM-Aufnahmen der Zellen des Expressionsstamms *E. coli* Tuner (DE3) mit dem Plasmid pEYL2 sowie mit der Leervektorkontrolle (pET22b) 3 h nach Induktion durch IPTG. **C.** Intrazelluläre Fluoreszenz des Stamms *E. coli* Tuner (DE3) mit dem Expressionsplasmid pEYL2 bzw. der Leervektorkontrolle gemessen 3 h nach Induktion der Genexpression.

Um das YFP_{LecB} -Protein im präparativen Maßstab zu reinigen, erfolgte zunächst die Überexpression der Genfusion in 1 l LB-Medium bei 30 °C für 16 h nach Induktion durch 0,5 mM IPTG. Die Synthese des YFP_{LecB} -Fusionsproteins konnte durch die Bestimmung der intrazellulären Fluoreszenz der Bakterien verfolgt werden (Abb. 25B und 25C).

Die Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie erfolgte, wie für das native LecB-Protein angegeben, unter Verwendung von D-Mannose-Agarose. Einige der bei der Reinigung aufgefangenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 26A). In den Eluaten ist eine Proteinbande zu erkennen, die aufgrund der Laufhöhe auf das YFP_{LecB} -Protein zurückzuführen ist. Zudem korreliert das Verhältnis der Fluoreszenz in den einzelnen Eluaten mit der Intensität der jeweiligen Proteinbande in der SDS-PAGE (Abb. 26A). Es wurde eine Ausbeute von 18 mg elektrophoretisch homogenem YFP_{LecB} -Protein pro Liter Expressionskultur erreicht. Im Anschluss an die Reinigung wurde die YFP_{LecB} -Lösung zur Entfernung der D-Mannose aus dem Elutionspuffer unter Verwendung von Zentrifugationskonzentratoren gegen A. dest. umgepuffert.

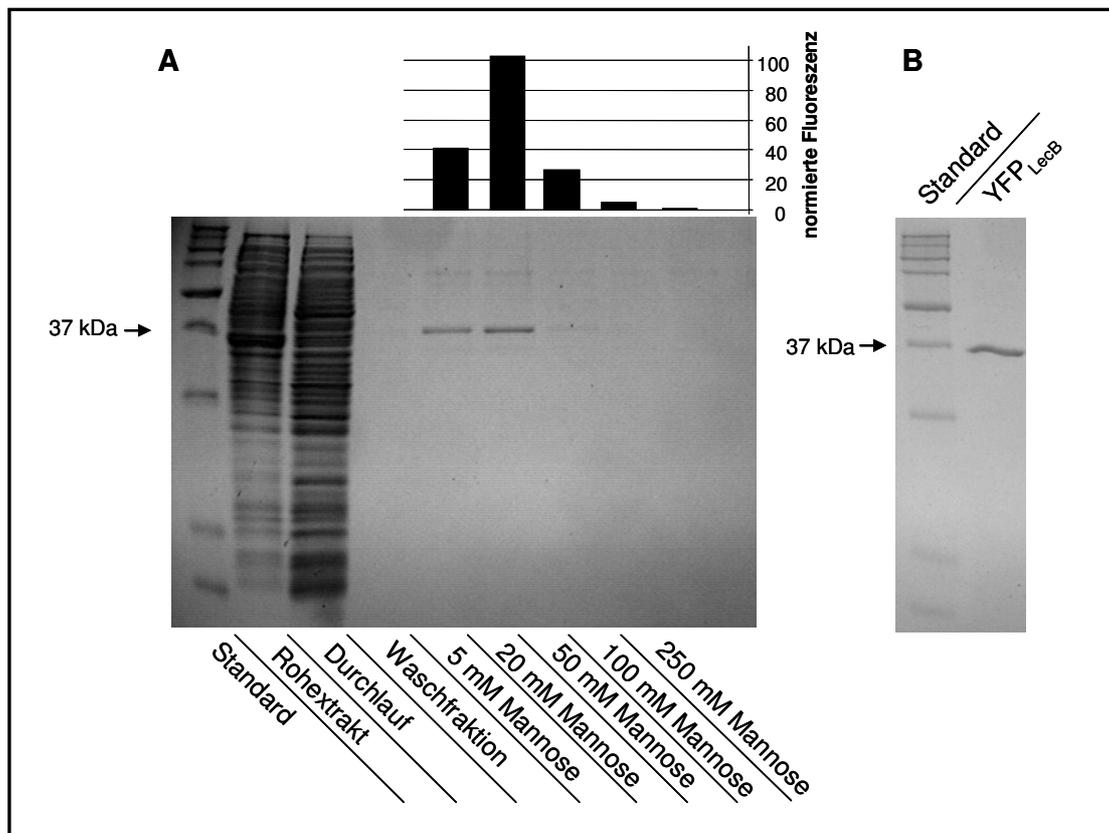


Abb. 26 Dokumentation der affinitätschromatographischen Reinigung des YFP_{LecB} -Proteins. **A.** SDS-PAGE-Analyse ausgewählter Fraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung des YFP_{LecB} -Proteins, sowie die relative Fluoreszenz der Eluate. **B.** SDS-PAGE von 5 µg des aufgereinigten YFP_{LecB} -Proteins. Es wurde der „Prestained Broad Range SDS-PAGE Standard“ (Bio-Rad, München) verwendet.

Parallel zum YFP_{LecB}-Protein wurde eine weitere Variante des GFP, das *cyan fluorescent protein* (CFP), mit dem LecB-Protein fusioniert. Die Klonierung der Genfusion *cfp::lecB* erfolgte wie für die *yfp::lecB*-Fusion beschrieben, mit der Ausnahme, dass das Plasmid pFF19-eCFP als Matrizen-DNA zur Amplifizierung des *cfp*-Gens zum Einsatz kam. Das entstandene Produkt wurde als CFP_{LecB} bezeichnet. Die Kultivierung des Überexpressionsstamms und die Reinigung des CFP_{LecB}-Proteins erfolgten wie für das YFP_{LecB}-Protein beschrieben. Es wurde eine Ausbeute von 20 mg elektrophoretisch homogenen CFP_{LecB}-Proteins pro Liter Expressionskultur erreicht (Abb. 27).

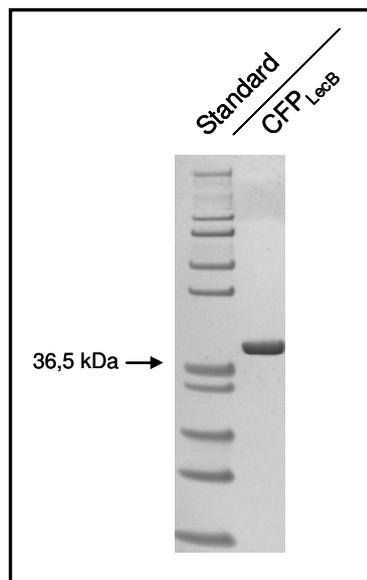


Abb. 27 SDS-PAGE-Analyse des gereinigten CFP_{LecB}-Proteins. Die Reinigung des CFP_{LecB}-Proteins erfolgte wie für das YFP_{LecB}-Protein beschrieben. Es wurden 5 µg des gereinigten CFP_{LecB}-Proteins eingesetzt. Es wurde der „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

3.7.2 Aufnahme der Fluoreszenzspektren der Fusionsproteine

Um den Einfluss des fusionierten Lectins auf die Konformation und somit auf die Fluoreszenz des YFP bzw. des CFP genauer zu überprüfen, wurden Fluoreszenzspektren der Fusionsproteine aufgenommen und mit Literaturdaten für das native YFP bzw. CFP (Clontech, San Jose, USA) verglichen (Abb. 28). Das für das native YFP angegebene Absorptionsmaximum liegt bei 514 nm, das vom YFP_{LecB}-Protein bei 515 nm. Das native YFP emittiert maximal bei 527 nm, das Fusionsprotein bei 527,5 nm. Das native CFP besitzt sein Absorptionsmaximum bei 434 nm, die Absorption des CFP_{LecB}-Proteins ist bei 434,5 nm maximal. Sowohl das native CFP als auch das Fusionsprotein CFP_{LecB} emittieren maximal bei einer Wellenlänge von 477 nm. Darüber hinaus entsprechen die Gesamtprofile der Fluoreszenzspektren der Fusionsproteine denen der nativen Proteine. Die nahezu identischen Fluoreszenzspektren der nativen Proteine und der entsprechenden Fusionsproteine weisen

darauf hin, dass die Fusion des LecB-tags mit dem YFP bzw. dem CFP keinen Einfluss auf die Konformationen der Proteine ausübt.

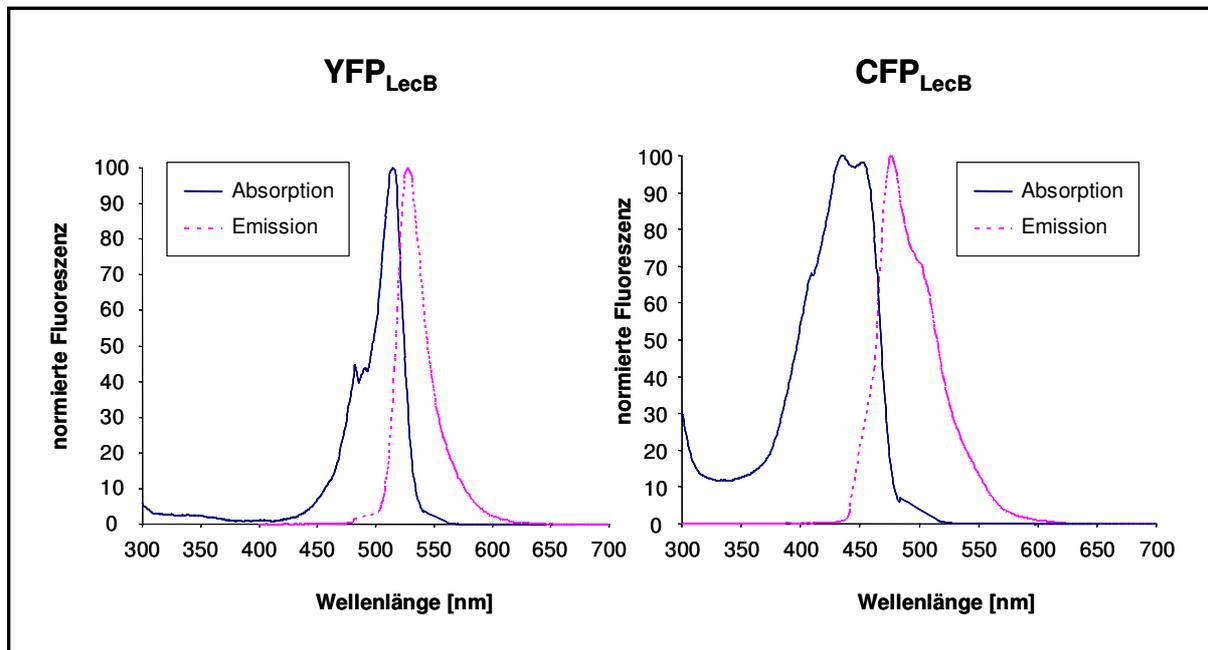


Abb. 28 Fluoreszenzspektren der gereinigten Fusionsproteine. Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurden die Fusionsproteine in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. **YFP_{LecB}**: Absorptionsspektrum: Maximum bei 515 nm, Emissionsspektrum: Maximum bei 527,5 nm. **CFP_{LecB}**: Absorptionsspektrum: Maximum bei 434,5 nm, Emissionsspektrum: Maximum bei 477 nm.

3.7.3 Hämagglutinationstest des gereinigten YFP_{LecB}-Fusionsproteins

Die fluoreszenzmarkierte Variante des LecB-Proteins YFP_{LecB} sollte u. a. zur Visualisierung potentieller Liganden auf der bakteriellen Zelloberfläche (3.5) und in histochemischen Studien eingesetzt werden. Um zu prüfen, ob die hämagglutinierende Aktivität des Lectins trotz der Fusion mit dem YFP erhalten blieb, sollte unter Verwendung von Kaninchen-Erythrozyten ein HAT durchgeführt werden. Zudem konnte so festgestellt werden, ob die bei der affinitätschromatographischen Reinigung verwendete D-Mannose durch das anschließende Umpuffern aus der Bindetasche des Lectins entfernt wurde. Wie in Abbildung 29 dargestellt, konnte die hämagglutinierende Aktivität des YFP_{LecB}-Proteins nachgewiesen werden. Die geringste Konzentration des YFP_{LecB}-Proteins, die zum Auslösen der Hämagglutination nötig war, lag bei 28 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,7 μM . Für das native LecB-Protein wurde eine Mindestkonzentration von 0,6 μM ermittelt (3.1.2). Damit ist die hämagglutinierende Aktivität des YFP-markierten LecB-Proteins mit der des nativen Lectins vergleichbar.

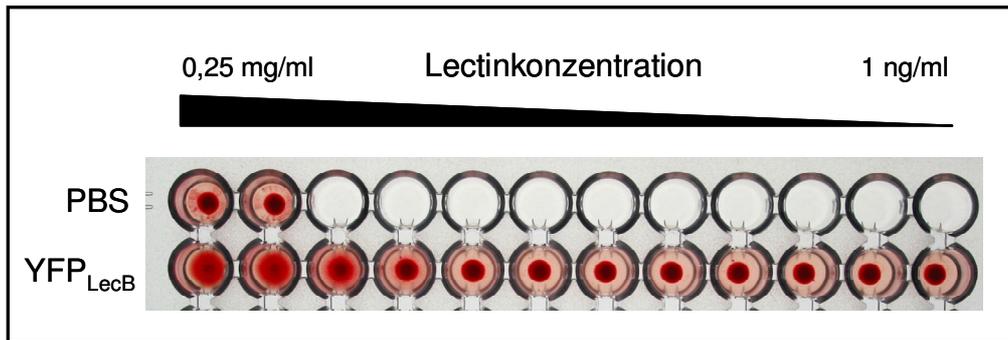


Abb. 29 Hämagglutinationstest des isolierten YFP_{LecB}-Proteins. 50 μ l einer dreifachen Verdünnungsreihe des YFP_{LecB}-Proteins wurden zu 50 μ l Papain-behandelte Kaninchen-Erythrozyten in die *wells* einer Rundboden-Mikrotiterplatte gegeben und für 1 h inkubiert. Positive Hämagglutination wurde durch einen vollständig mit Erythrozyten bedeckten Boden angezeigt.

3.7.4 Reinigung und Immobilisierung lipolytischer Enzyme mittels LecB-tag

Es konnte gezeigt werden, dass die affinitätschromatographische Reinigung eines LecB-Fusionsproteins unter Ausnutzung der Affinität des Lectins zu D-Mannose möglich ist (3.7.1). Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob das Lectin als *linker* zur Immobilisierung von Enzymen an eine mit einem LecB-spezifischen Liganden beschichtete Matrix eingesetzt werden kann. Dazu sollte das Lectin zunächst mit einem Modellenzym fusioniert und mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von D-Mannose-Agarose gereinigt werden. Zur Immobilisierung des Enzym-Lectin-Fusionsproteins sollte dann L-Fucose-Agarose eingesetzt werden, da das Lectin eine außergewöhnlich hohe Affinität zu L-Fucose ($K_A = 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) aufweist, während D-Mannose, die zuvor bei der Isolierung der Fusionsproteine eingesetzt wurde, lediglich mit einer K_A von $3,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ gebunden wird. Als Modellproteine wurden die beiden lipolytischen Enzyme Lipase B (LipB) aus *Bacillus subtilis* (Eggert *et al.*, 2000) und Cutinase A (CutA) aus *Fusarium solani pisi* (Martinez *et al.*, 1992) verwendet. Zunächst wurden die Gene der Enzyme *lipB* bzw. *cutA* mittels PCR amplifiziert und durch Insertion in das Plasmid pURE (Bartels, 2004) mit dem *lecB*-Gen fusioniert. Die Klonierung ist im Anhang dargestellt (Abb. 44). Die Genfusion *lipB::lecB* weist eine Größe von 921 bp auf und kodiert für ein Fusionsprotein (LipB_{LecB}) aus 306 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 32,4 kDa. Die Genfusion aus *cutA* und *lecB* (*cutA::lecB*) besteht aus 1017 bp und kodiert für das Fusionsprotein CutA_{LecB} bestehend aus 338 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 35,1 kDa. Die Überexpression der Genfusionen erfolgte in *E. coli* Tuner (DE3). Um zu prüfen, ob die lipolytische Aktivität der Enzyme trotz der Fusion mit dem Lectin erhalten blieb, wurden die Stämme auf LB-Tributyrin-Agarplatten

ausgestrichen und für 2 Tage bei 30 °C kultiviert. Im Gegensatz zu Bakterien, die das Plasmid pURE als Referenz enthielten, waren die Kolonien der Expressionsstämme, welche die Fusionsproteine produzierten, von klaren Höfen umgeben, die auf die Hydrolyse des Triglycerids Tributyrin und somit auf die lipolytische Aktivität der Fusionsproteine zurückzuführen sind (Abb. 30).

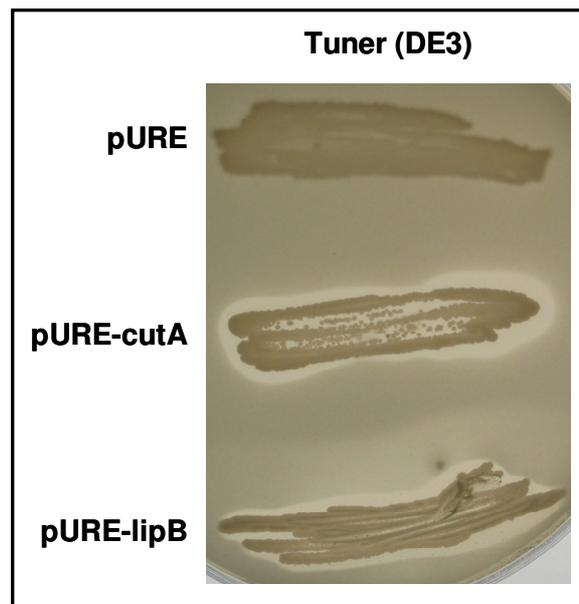


Abb. 30 Tributyrin-Agarplatte zum Nachweis der lipolytischen Aktivität der Fusionsproteine. ÜK der $CutA_{LecB}$ (pURE-cutA) und $LecB_{LipB}$ (pURE-lipB) produzierenden *E. coli* Tuner (DE3)-Stämme wurden auf LB-Tributyrin-Agarplatten, die zur Induktion der Genexpression 0,5 mM IPTG enthielten, ausgestrichen und 48 h bei 30 °C kultiviert. Die klaren Höfe um die ausgestrichenen Bakterien weisen auf die lipolytische Aktivität der Fusionsproteine hin. Als Negativkontrolle wurde der *E. coli*-Stamm Tuner (DE3)/pURE verwendet.

Die Reinigung mittels Affinitätschromatographie über D-Mannose-Agarose wird hier exemplarisch für das $CutA_{LecB}$ -Protein beschrieben. Die Überexpression der $cutA::lecB$ -Genfusion sowie die anschließende Reinigung des Fusionsproteins erfolgten wie bereits für das YFP_{LecB} -Protein beschrieben (3.7.1). Einige der bei der Reinigung aufgefangenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 31). In den Eluatn ist bei etwa 38 kDa eine prominente Proteinbande sichtbar, die aufgrund der Laufhöhe auf das $CutA_{LecB}$ -Protein zurückzuführen ist. Daneben sind zusätzliche Banden mit schwächerer Intensität zu erkennen, die aufgrund der niedrigeren Laufhöhe wahrscheinlich von Degradationsprodukten stammen. Die Fraktionen, die das eluierte Fusionsprotein enthielten, wurden zusammengeführt. Die Gesamtmenge an isoliertem $CutA_{LecB}$ -Protein betrug 3 mg pro Liter Expressionskultur. Anhand der lipolytischen Aktivität im Rohextrakt, im Durchlauf und im

Eluat, die mittels *p*NPC-Test bestimmt wurde, ergab sich eine Proteinausbeute von 11,25 % (ohne Abbildung).

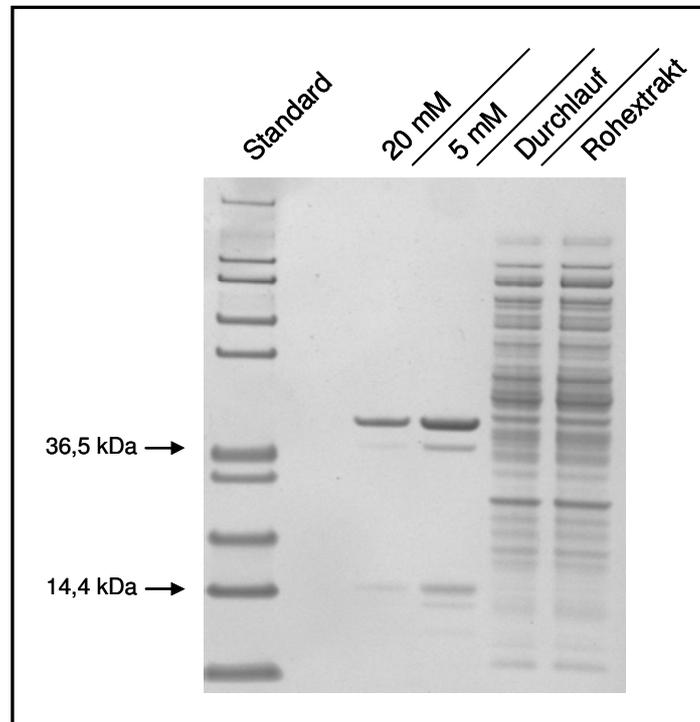


Abb. 31 SDS-PAGE-Analyse der Reinigung des CutA_{LecB}-Proteins. Die Reinigung des CutA_{LecB}-Proteins erfolgte durch Affinitätschromatographie mittels D-Mannose-Agarose aus dem Rohextrakt der Überexpressionskultur. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte in einem Stufengradienten mit 5 und 20 mM D-Mannose. Es wurden 5 μ l des Rohextrakts und des Durchlaufs sowie 200 μ l der Eluate in die SDS-PAGE-Analyse eingesetzt. Es wurde der „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Für die Enzym-Immobilisierung mittels *LecB*-tag wurde das LipB_{LecB}-Protein als Modellenzym verwendet. Die Reinigung des LipB_{LecB}-Proteins erfolgte wie zuvor für das CutA_{LecB}-Protein beschrieben. Hierbei wurde eine Ausbeute von nur 0,5 mg Fusionsprotein pro Liter Expressionskultur erreicht (ohne Abbildung). Die Menge an reinem Fusionsprotein war jedoch ausreichend, um zu überprüfen, ob das Lectin als *linker* zur Immobilisierung der Lipase an eine L-Fucose-Agarosematrix geeignet ist. Eine Säule mit 2,5 ml L-Fucose-Agarose (EY Labs, San Mateo, USA) wurde mit 7,5 ml der LipB_{LecB}-Lösung, die 200 μ g des Fusionsproteins enthielt, beladen. Durch Waschen der Säule mit 10 SV Sørensen-Phosphatpuffer wurde sichergestellt, dass das Protein, falls es keine Interaktion mit der L-Fucose einging, von der Säule entfernt wurde. Anschließend wurden 2 ml der *p*NPP-Substratlösung auf die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Durch die Messung der

O.D.₄₁₀ wurde die Lipase-Aktivität photometrisch bestimmt. Dieser Ablauf wurde insgesamt 5-mal durchgeführt, um zu überprüfen, ob die lipolytische Aktivität des immobilisierten Enzyms über die Zeit abnimmt.

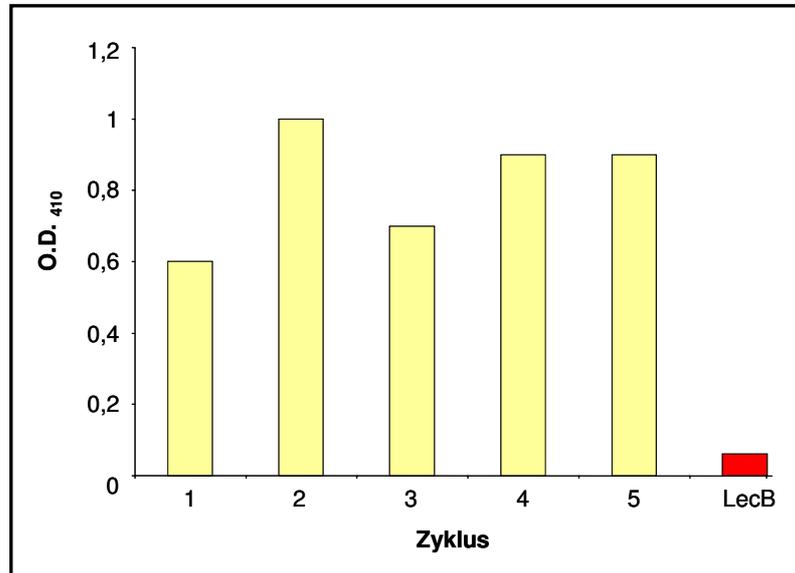


Abb. 32 Immobilisierung des LipB_{LecB}-Proteins an L-Fucose-Agarose. 2,5 ml L-Fucose-Agarose wurden mit 200 µg gereinigtem LipB_{LecB}-Protein beladen. Die Säule wurde mit 10 SV Sørensen-Phosphatpuffer gewaschen. In 5 aufeinander folgenden Zyklen wurden jeweils 2 ml *p*NPP-Substratlösung auf die Säule gegeben, die Lipase-Aktivität des Eluats durch Messung der O.D.₄₁₀ bestimmt und die Säule erneut gewaschen. Als Referenz wurden 200 µg des nativen LecB-Proteins eingesetzt.

Wie in Abbildung 32 dargestellt, kam es auch nach fünf Zyklen zu keiner Abnahme der Lipase-Aktivität. Als Negativkontrolle wurde die L-Fucose-Matrix mit 200 µg nativem LecB-Protein beladen und der Versuchsvorgang wiederholt (Abb. 32). Die geringe Menge an photometrisch detektiertem *p*-Nitrophenol im Eluat der Negativkontrolle ist auf die Autohydrolyse des Substrats zurückzuführen.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Physiologie des LecB-Proteins

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. Neben einer Reihe anderer Virulenzfaktoren lösen die beiden Lectine LecA und LecB von *P. aeruginosa* *in vitro* diverse cytotoxische Effekte gegenüber den Zellen des respiratorischen Epithels aus. Das LecB-Protein bindet spezifisch an die Schleimhautzellen des Respirationstraktes und vermindert die Schlagfrequenz der dort ansässigen Zilien (Adam *et al.*, 1997a/b). Zudem konnten in klinischen Studien weitere Hinweise auf die Beteiligung der Lectine am Infektionsprozess gewonnen werden. Sowohl eine *P. aeruginosa*-induzierte Otitis externa diffusa (Steuer *et al.*, 1993), eine Entzündung der Ohrmuschel und des Gehörganges, als auch eine Infektion des Respirationstraktes (von Bismarck *et al.*, 2001) konnten durch die Behandlung der Patienten mit einer Lösung aus den LecA- und LecB-spezifischen Zuckern erfolgreich behandelt werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Isolierung sowie die physiologische Charakterisierung des LecB-Proteins, das im Vergleich zu LecA zum Beginn der Arbeiten noch weitgehend unerforscht war. Erstmals sollte auch der Einfluss der Lectine auf die Biofilmbildung untersucht werden, da die Formation von Biofilmen auf dem Lungengewebe zur Abnahme der Sensitivität der Bakterien gegenüber antimikrobiellen Therapeutika führt.

4.1.1 Überexpression des *lecB*-Gens und Reinigung des nativen Lectins

Bisher erfolgte die Isolierung des LecB-Proteins aus dem homologen Wirt *P. aeruginosa*, wobei der chromatographischen Reinigung zunächst die Hitzedenaturierung thermolabiler Wirtsproteine sowie die Präzipitation des Lectins mittels Ammoniumsulfat vorausging und das Endprodukt mit Spuren des ersten Lectins LecA von *P. aeruginosa* verunreinigt war (Gilboa-Garber, 1982). Um die Effizienz der Isolierung des LecB-Proteins zu erhöhen, konnte das *lecB*-Gen bereits erfolgreich kloniert und im heterologen Wirt *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert werden (Tielker, 2001). Dafür wurde das *lecB*-Gen in das Expressionsplasmid pET22b eingebracht, wo es unter der transkriptionellen Kontrolle des T7-Promotors steht. Durch die hohe Selektivität gegenüber dem Promotor T7 Φ 10 und die große Prozessivität der

T7-RNA-Polymerase können mit diesem Expressionssystem Ausbeuten an rekombinanten Protein erreicht werden, die bis zu 50 % der Gesamtproteinmenge ausmachen (Studier *et al.*, 1990; Baneyx, 1999). Nach der Überexpression des *lecB*-Gens in dem T7-Expressionssystem bei 30 °C war eine Menge von etwa 20 % des Gesamtproteins des Rohextrakts auf das heterolog exprimierte LecB-Protein zurückzuführen. Die Kultivierung der Überexpressionskultur bei 37 °C führte zur Reduktion der *lecB*-Expression (ohne Abbildung). Dies könnte in Zusammenhang mit dem Temperaturoptimum der Hämagglutinationsreaktion des LecB-Proteins bei 40 °C stehen, so dass bei höheren Kultivierungstemperaturen in Kombination mit einer starken Promotoraktivität ein negativer Einfluss des Lectins auf den Zellstoffwechsel des heterologen Wirts zu erwarten ist. Die Reinigung des LecB-Proteins in nur einem chromatographischen Schritt unter Ausnutzung der natürlichen Affinität des Lectins zu D-Mannose konnte im analytischen Maßstab bereits etabliert werden (Tielker, 2001). Durch die Optimierung der Reinigungsprozedur ist es gelungen, die Ausbeute an elektrophoretisch homogenem LecB-Protein von 5 mg/l auf 70 mg/l zu steigern (Abb. 3). Durch die Überprüfung der Agglutinationsreaktion von Kaninchen-Erythrozyten, die auf der Bindung L-Fucose-haltiger Liganden auf der Erythrozytenoberfläche beruht, konnte die korrekte Konformation des rekombinanten Proteins sowie die vollständige Entfernung der D-Mannose des Elutionspuffers aus der Bindetasche des Lectins nachgewiesen werden (Abb. 4). Dabei war die geringste Konzentration des LecB-Proteins, die eine positive Hämagglutinationsreaktion auslöste, vergleichbar mit Literaturwerten, die für die Hämagglutination von humanen Erythrozyten durch das aus dem homologen Wirt gewonnene Lectin beschrieben wurden (Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Gilboa-Garber & Sudakevitz, 1999). Die Reaktion wurde entsprechend der Spezifität des LecB-Proteins durch Zugabe von D-Mannose, nicht aber durch D-Galactose, vollständig gehemmt.

Das gereinigte LecB-Protein wurde für die Aufklärung der Proteinstruktur des Lectins eingesetzt. Darüber hinaus findet es in der Entwicklung von Hemmstoffen gegen die Interaktion des Lectins mit Wirtszellrezeptoren, in Studien zu den cytotoxischen Effekten gegenüber Zilien des respiratorischen Traktes, in der Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie, in histochemischen Untersuchungen sowie in NMR-Studien zur Aufklärung des Zuckerbindemechanismus Verwendung.

Ebenfalls nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie unter Ausnutzung der intrinsischen Affinität von Lectinen zu Kohlenhydraten konnte das erste Lectin LecA von *P. aeruginosa* isoliert werden, wobei eine Ausbeute von 19 mg Protein pro Liter Überexpressionskultur erreicht wurde (ohne Abbildung.)

4.1.2 Strukturaufklärung des LecB-Proteins

Die Aufklärung und Veröffentlichung der Quartärstruktur des LecB-Proteins erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Loris (*Laboratorium voor Ultrastructuur, Instituut voor Moleculaire Biologie, Vrije Universiteit Brussel*, Belgien). Dabei wurde die Proteinstruktur sowohl in Komplex mit den Zuckern Mannose, Mannotriose, Fucose und Fructose sowie in der zucker- und Ca^{2+} -freien Form gelöst. Alle erhaltenen Strukturen weisen eine hohe Auflösung sowie einen kleinen R-Faktor auf (Loris *et al.*, 2003).

Eine der strukturellen Besonderheiten des LecB-Proteins besteht darin, dass zwei Ca^{2+} -Ionen innerhalb der Zuckerbindestelle über Interaktionen mit je drei Hydroxylgruppen direkt an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Die Lectine des C-Typs, wie das Mannose-bindende Protein (MBP-A) aus der Rattenleber, binden ihre Liganden über direkte Interaktionen zwischen den Hydroxylgruppen der Zucker und einem Ca^{2+} -Ion, das bei Überlagerung der Proteinstrukturen die Position eines Ca^{2+} -Ions im LecB-Protein einnimmt. Für das zweite Ca^{2+} -Ion dagegen existiert kein Äquivalent in der Bindetasche der Lectine des C-Typs.

In der zuckerfreien Form des LecB-Proteins ersetzen konservierte Wassermoleküle alle Sauerstoffatome eines Fucosemoleküls, die an der Interaktion mit der Bindestelle des Lectins beteiligt sind. Das vollständige Ersetzen aller Hydroxylgruppen sowie des endozyklischen Sauerstoffatoms des Zuckers durch Wassermoleküle ist ungewöhnlich. Zudem stabilisieren die beiden Ca^{2+} -Ionen die Konformation des *loops* Asn95-Asp104, der den Kern der Zuckerbindestelle bildet. Dies stellt eine Gemeinsamkeit mit den Lectinen ConA und GSI-B4 sowie dem Mannose-bindenden Protein der Rattenleber dar (Bouckaert *et al.*, 1995; Ng *et al.*, 1998; Bouckaert *et al.*, 2000; Lescar *et al.*, 2002).

4.1.3 Konstruktion Lectin-defizienter Stämme von *P. aeruginosa*

Für die physiologische Charakterisierung der Lectine LecA und LecB wurden Lectindefiziente Mutanten erstellt. Dazu wurde zunächst jeweils eines der Gene unter Verwendung der Mutagenesekonstrukte pSUGD1 und pSUGD2 durch eine Ω -Gentamycin-Resistenz-Kassette (ΩGm^r) vollständig ersetzt. Die resultierenden Stämme wurden als PATI1 ($\Delta\text{lecA}::\Omega\text{Gm}^r$) und PATI2 ($\Delta\text{lecB}::\Omega\text{Gm}^r$) bezeichnet. Um polare Effekte auf die flankierenden Gene zu vermeiden, erfolgte anschließend die Exzision der ΩGm^r -Kassette mittels der Plasmide pSUD1 und pSUD2. Die resultierenden Stämme PATI3 (ΔlecA) und PATI4 (ΔlecB) wiesen reine chromosomale Deletionen des jeweiligen Lectin-Gens auf. Als

Parentalstamm für die Konstruktion der Lectin-Doppelmutante wurde der Stamm PATI4 eingesetzt. Unter Verwendung des Plasmids pSUGD1 wurde das *lecA*-Gen wie zuvor im Genom des Stamms PATI1 durch die ΩGm^r -Kassette ersetzt. Der daraus resultierende Stamm wies Deletionen in beiden Lectin-Genen auf und wurde als PATI5 (ΔlecB , $\Delta\text{lecA}::\Omega\text{Gm}^r$) bezeichnet. Die Exzision der ΩGm^r -Kassette wurde zwar angestrebt, führte jedoch auch nach mehrfachen Versuchen nicht zum Erfolg. Der Nachweis der ΩGm^r -Kassetten-Insertion in das Genom der Mutanten sowie der anschließenden Exzision der Kassette erfolgte durch PCR unter Einsatz der Oligonukleotide, die an die stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Sequenzen der Gene hybridisieren und auch schon für die Konstruktion der Mutagenesevektoren verwendet wurden. Die Insertion der ΩGm^r -Kassetten in das Genom der Mutanten resultierte in einer Größenzunahme der amplifizierten Fragmente um ca. 1,2 kb im Vergleich zum Wildtyp, wogegen die Exzision der Kassette eine Größenabnahme um etwa 0,4 kb bewirkte. Dadurch konnten die Mutanten auf genomischer Ebene identifiziert werden (Abb. 8 und 10). Zusätzlich wurde die Defizienz der Lectine in den entsprechenden Stämmen immunologisch unter Verwendung der LecA- bzw. LecB-spezifischen Antisera (Tielker, 2001) nachgewiesen (Abb. 9 und 10).

4.1.4 Einfluss der Lectine auf die Biofilmbildung

Die Ausbildung von Biofilmen auf menschlichen Epithelien sowie medizinischen Geräten verleiht *P. aeruginosa* eine hohe Resistenz gegenüber antibiotischen Substanzen und den Angriffen der Immunabwehr (Costerton *et al.*, 1999; Stewart & Costerton, 2001; Costerton, 2001). Die Hemmung der Biofilmbildung ist daher ein wichtiger Ansatz zur Bekämpfung *P. aeruginosa*-induzierter Infektionen, insbesondere in den Lungen von CF-Patienten. Die Aufklärung der Mechanismen der Biofilmformation ist seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Studien, in denen einige der beteiligten Proteine identifiziert werden konnten (O'Toole & Kolter, 1998; Vallet *et al.*, 2001; Klausen *et al.*, 2003a/b). Biofilme von *P. aeruginosa* bestehen neben Wasser aus den EPS, die sich zu einem großen Teil aus Exopolysacchariden zusammensetzen, welche für die strukturelle und die funktionelle Integrität eines Biofilms von großer Bedeutung sind (Wingender *et al.*, 2001). Darüber hinaus vermitteln Exopolysaccharide die Kohäsion von Biofilmzellen sowie die Adhäsion der Bakterien an das Substratum. Daher wird angenommen, dass zuckerbindende Proteine, wie die beiden Lectine LecA und LecB aus *P. aeruginosa*, an der Biofilmbildung beteiligt sind.

Der Einfluss der Lectine auf die Biofilmbildung wurde untersucht, indem Biofilme des Wildtyps und der Lectin-negativen Mutanten unter verschiedenen Kulturbedingungen angezogen und miteinander verglichen wurden. Für die Kultivierung der Biofilme wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Die Kultivierung unter statischen Bedingungen erfolgte auf Glasobjektträgern, die in Petrischalen mit Medium überschichtet wurden. In diesem Modell wachsen die Biofilme an der Grenzfläche fest/flüssig und werden aus dem umgebenden Medium mit Nährstoffen versorgt. Im Gegensatz zum dynamischen Biofilmmodell sind sie dabei keinen Scherkräften ausgesetzt. Nach Kultivierung für 48 h und 72 h bei 30 °C sowie 37 °C wurden die Biofilme gefärbt und mittels CLSM untersucht. Die erhaltenen Daten wurden optisch analysiert und die erhaltene Biomasse, die Schichtdicke sowie der Grad der Oberflächenbesiedlung quantifiziert. Nach 48 h bildete der Wildtyp-Stamm PAO1 Biofilme mit einer durchschnittlichen Höhe von 4 und 9 µm bei 30 °C bzw. 37 °C aus. In den folgenden 24 h nahm die Schichtdicke weiter zu. Während der LecA-negative Stamm keine Unterschiede zum Wildtyp aufwies (ohne Abbildung), war der LecB-defiziente Stamm, unabhängig von der Temperatur bei der die Kultivierung durchgeführt wurde, in allen Parametern stark beeinträchtigt. Ausgehend von einer geringeren Anzahl angehefteter Zellen wiesen die Biofilme des Stamms PATI2 eine geringere Höhe und Biomasse auf (Tab. 7). Unterschiede im Wuchsverhalten wurden zuvor durch die Aufnahme von Wuchskurven der verschiedenen Stämme ausgeschlossen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das LecB-Protein unter den gegebenen Bedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Biofilmbildung hat.

Im zweiten Modell wurden die Biofilme unter dynamischen Bedingungen in Durchflusszellen auf Glasdeckgläsern kultiviert, wobei die immobilisierten Zellen kontinuierlich vom Nährmedium umströmt wurden (Klausen *et al.*, 2003b). Aufgrund der Beobachtung, dass unter dynamischen Kulturbedingungen die Verwendung von komplexen Medien, wie NB-Medium, zu einem Überwachsen der Durchflusszellen führt, wurden die Zellen im Gegensatz zum statischen Modell in Minimalmedium kultiviert. Das Medium wurde mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle supplementiert. Die Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle führt zur Ausbildung differenzierter, 3-D-Biofilmstrukturen (Klausen *et al.*, 2003a). Die Biofilme des Wildtyps und der Lectin-negativen Mutanten wurden in regelmäßigen Abständen mittels CLSM analysiert. Da die Zellen zuvor chromosomal mit dem *gfp*-Gen markiert wurden, konnte auf eine nachträgliche Zellfärbung verzichtet werden (Koch *et al.* 2001). Wie unter statischen Bedingungen beobachtet, bildete der Wildtyp-Stamm und die LecA-defiziente Mutante Biofilme mit vergleichbarer Struktur aus (ohne Abbildung).

Zudem konnten anhand der Quantifizierung der Biomasse und der Oberflächenabdeckung keine Unterschiede zwischen Wildtyp und der LecB-negativen Mutante ausgemacht werden (Abb. 12). Bei der optischen Analyse der Biofilme dagegen zeigten sich signifikante Differenzen in den Biofilmstrukturen dieser beiden Stämmen. Während die Biofilme des Wildtyps eine heterogene Struktur aufwiesen, die von einer wellenförmigen Architektur geprägt war, bildete der LecB-negative Stamm Biofilme mit einer ebenen Oberflächenstruktur aus (Abb. 12). Im Gegensatz zur Biofilmkultivierung unter statischen Bedingungen waren die Unterschiede zwischen Wildtyp und LecB-negativer Mutante jedoch weniger stark ausgeprägt.

Auch wenn dies aufgrund der Abwesenheit LecB-spezifischer Liganden auf der Glasoberfläche zunächst unwahrscheinlich erscheint, kann spekuliert werden, dass das LecB-Protein an der Zelladhäsion an die Glasoberfläche beteiligt ist, da der LecB-negative Stamm im statischen Modell die Fähigkeit zur effizienten Oberflächenbesiedlung verloren hatte. Pratt & Kolter (1998) zeigten, dass das ebenfalls Mannose-spezifische Lectin FimH, welches mit den Typ 1-Pili uropathogener *E. coli*-Zellen assoziiert ist, nicht nur für die bakterielle Bindung an eukaryotische Zelloberflächen (Old, 1972; Hanson & Brinton, 1988; Low *et al.*, 1988), sondern auch für die Adhäsion an abiotische Oberflächen verantwortlich ist und so eine wichtige Rolle im Prozess der Biofilmbildung einnimmt. Sie vermuteten, dass die Lectin-vermittelte Oberflächenadhäsion von Bakterienzellen ein verbreiteter Mechanismus ist und FimH-analoge Lectine an der Biofilmbildung anderer Bakterienspezies beteiligt sein könnten. Die Bedeutung des FimH-Proteins für die Biofilmbildung konnte in weiteren Studien belegt werden (Schembri & Klemm, 2001; Orndorff *et al.*, 2004). Aufgrund der Analogie zu FimH liegt die Vermutung nahe, dass auch das LecB-Protein, zumindest unter statischen Kulturbedingungen, an der Adhäsion der Zellen an abiotische Oberflächen beteiligt ist.

Wie beschrieben bestehen Biofilme von *P. aeruginosa* vor allem aus Wasser und den EPS, die sich zu einem großen Teil aus Polysacchariden zusammensetzen. Neben Glucose und Rhamnose ist in Biofilmen der nicht-mucoiden Stämme PAO1 und PA14 auch Mannose Bestandteil der Exopolysaccharide, wobei diese auch an endständiger Position der Polysaccharidketten nachgewiesen werden konnte (Wozniak *et al.*, 2003). Terminale Mannosemoleküle stellen potentielle Liganden für das LecB-Protein dar. In verschiedenen Stämmen von *P. aeruginosa* wurden kürzlich die beiden Gencluster *psl* und *pel* identifiziert, die in der Synthese von bisher unbekanntem Exopolysacchariden involviert sind, wobei das vom *psl*-cluster produzierte Polysaccharid hauptsächlich aus Mannose besteht (Friedmann & Kolter, 2004a/b; Jackson *et al.*, 2004; Matsukawa & Greenberg, 2004; Vasseur *et al.*, 2005).

Stämme mit inaktiviertem *psl-cluster* bilden flache, unstrukturierte Biofilme aus und sind kaum in der Lage, das Substratum zu besiedeln. Daher wird eine entscheidende Rolle des *psl-clusters* in der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen postuliert. In Biofilmen könnte das LecB-Protein durch die multivalente Bindung an die Mannose-Einheiten zur Vernetzung dieser Exopolysaccharide und damit zur Organisation der Biofilmmatrix beitragen.

In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass Alginat eine Hauptkomponente der EPS in Biofilmen mucoider Stämme von *P. aeruginosa* darstellt und die Biofilmstruktur entscheidend beeinflusst (Nivens *et al.*, 2001; Hentzer *et al.*, 2001; Wingender *et al.*, 2001). Strathmann *et al.* (2002) zeigten, dass ConA, ein Mannose-spezifisches Lectin aus *Canavalia ensiformis*, an das Alginat der Biofilm-EPS des mucoiden *P. aeruginosa* Stamms SG81 bindet. Darüber hinaus kann die Interaktion von ConA mit der Biofilmmatrix spezifisch durch D-Mannose gehemmt werden (Goldstein & Hayes, 1978). Da das LecB-Protein ebenfalls eine Spezifität für D-Mannose aufweist, ist eine Interaktion dieses Lectins mit dem Alginat nicht auszuschließen. Das LecB-Protein könnte durch die Vernetzung der Alginatketten an der Organisation der Biofilmmatrix beteiligt sein.

Darüber hinaus sind auf der bakteriellen Zelloberfläche eine Vielzahl von Glycostrukturen exponiert, die potentielle Liganden für das LecB-Protein darstellen. Die Interaktion des LecB-Proteins mit putativen Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche und deren möglicher Beitrag zur Biofilmbildung werden in Kapitel 4.1.6 ausführlich diskutiert.

Wie beschrieben wurde im Verhältnis zum dynamischen Modell unter statischen Kulturbedingungen ein weitaus größerer Einfluss der Deletion des *lecB*-Gens auf den Prozess der Biofilmbildung beobachtet. Schon mehrfach wurde berichtet, dass Faktoren, die unter statischen Bedingungen die Biofilmbildung beeinflussen, unter dynamischen Bedingungen eine untergeordnete Rolle spielen. O'Toole & Kolter (1998) konnten zeigen, dass die Ausbildung von Mikrokolonien von *P. aeruginosa*-Zellen in einem statischen Biofilmmodell auf die Typ IV-Pili-vermittelte *twitching motility* zurückzuführen ist. Eine *pil*-negative Mutante bildete lediglich einschichtige Biofilme aus, während Wildtyp-Zellen nach der initialen Adhäsion an das Substratum Zellcluster formierten. Dagegen sind Typ IV-Pili-negative Stämme von *P. aeruginosa* im Durchflussmodell sehr wohl in der Lage Zellcluster auszubilden, da unter diesen Bedingungen die Teilung einzelner Zellen für die Formation von Mikrokolonien verantwortlich ist (Heydorn *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002; Klausen *et al.*, 2003 a/b). Des Weiteren wurde für *Staphylococcus epidermis* berichtet, dass das Umstellen

der Kulturbedingungen von statisch zu dynamisch im Verlust der Fähigkeit zur Biofilmbildung resultiert (Stepanović *et al.*, 2001).

Darüber hinaus kamen in den unterschiedlichen Systemen verschiedene Medien zum Einsatz. Während die Kultivierung der Zellen im statischen Modell in einem komplexen Medium durchgeführt wurde, musste unter dynamischen Bedingungen ein Minimalmedium verwendet werden. Es wurde berichtet, dass die Zusammensetzung des Mediums einen erheblichen Einfluss auf den Prozess der Biofilmbildung (Klausen *et al.*, 2003a) sowie auf die Syntheserate der Lectine von *P. aeruginosa* ausübt (Sudakevitz *et al.*, 1979; Gilboa-Garber, 1982).

Im statischen Biofilmmodell wurde der LecB-negative Stamm PATI2, dessen Kopie des *lecB*-Gens im Genom gegen die ΩGm^f -Kassette ausgetauscht wurde, verwendet, während im dynamischen Modell der Stamm PATI4 eingesetzt wurde, bei dem die ΩGm^f -Kassette zur Vermeidung polarer Effekte wieder entfernt wurde. An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass der Stamm PATI2 als Ausgangsstamm für die Konstruktion des Stamms PATI4 diene. Durch die Aufnahme und den Vergleich von Wuchskurven wurde sichergestellt, dass beide Stämme ein identisches Wuchsverhalten aufwiesen (ohne Abbildung).

4.1.5 Aufklärung der subzellulären Lokalisation des LecB-Proteins

Während manche bakterielle Lectine, wie die AB-Toxine, ins extrazelluläre Medium sekretiert werden (Merrit & Hol, 1995), sind andere, wie das DltA-Protein von *Haemophilus ducreyi* (Leduc *et al.*, 2004), auf der Zellhülle exponiert oder befinden sich im Periplasma (Rüdiger *et al.*, 2000). In einer früheren Untersuchung zum zellulären Wirkort der Lectine LecA und LecB von *P. aeruginosa* wurden beide Proteine fast ausschließlich im Cytoplasma planktonischer Bakterien nachgewiesen (Glick & Garber, 1983). In den Fraktionen der inneren und der äußeren Membran sowie im Periplasma wurden dagegen nur geringe Mengen beider Lectine detektiert. Die cytotoxischen Effekte der Lectine gegenüber Zellen des gastrointestinalen und respiratorischen Traktes sowie der nachgewiesene Einfluss des LecB-Proteins auf den Prozess der Biofilmbildung sind mit einer intrazellulären Lokalisation der Proteine nur schwer zu vereinbaren. Zudem wurde berichtet, dass die Behandlung von *P. aeruginosa*-Zellen mit fluoreszenzmarkiertem L-Fucose-Chitosan die spezifische Aggregation sessiler Bakterien verursacht, was ebenfalls auf die Exposition des LecB-Proteins auf der Zelloberfläche hinweist (Morimoto *et al.*, 2001). Aus diesem Grund sollte die subzelluläre Lokalisation des LecB-Proteins erneut untersucht werden. Da Biofilmzellen sich

in verschiedenen physiologischen Aspekten erheblich von planktonischen Bakterien unterscheiden (Costerton *et al.*, 1999), wurde die Lokalisierung des Lectins, den Bedingungen von Morimoto *et al.* (2001) entsprechend, zusätzlich in sessilen Zellen durchgeführt. Daher wurden die Bakterien sowohl in NB-Medium als auch auf NB-Agarplatten kultiviert. Die Kultivierung von *P. aeruginosa* auf Agarplatten resultiert in der Ausbildung ungesättigter Biofilme an der Grenzfläche fest/gasförmig (Steinberger *et al.*, 2002), die den Biofilmen in Lungen von CF-Patienten, die von einer *P. aeruginosa*-induzierten Infektion betroffen sind, entsprechen (Lyczak *et al.*, 2002).

Die Fraktionierung der Zellen erfolgte nach Witholt *et al.* (1976). Diese Methode wurde bereits erfolgreich für die Lokalisierung der Esterase EstA aus *P. aeruginosa* angewandt (Wilhelm *et al.*, 1999). Der Nachweis des LecB-Proteins in den einzelnen Zellfraktionen erfolgte immunologisch unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums. Zunächst wurde die Lokalisierung des LecB-Proteins in Zellen des Wildtyp-Stamms *P. aeruginosa* PAO1 durchgeführt. Dabei wurde das Lectin sowohl im Cytoplasma als auch in der Fraktion der Gesamtmembran detektiert (Abb. 33). Allerdings lag die Menge an LecB-Protein dabei an der immunologischen Nachweisgrenze, was eine Überladung des SDS-PAG erforderlich machte. Daher wurden für die weiteren Versuche Zellen des LecB-negativen Stamms PATI2 bzw. PATI4 verwendet, die das *lecB*-Expressionsplasmid pBBC2 enthielten, um so die Syntheserate des Lectins zu erhöhen.

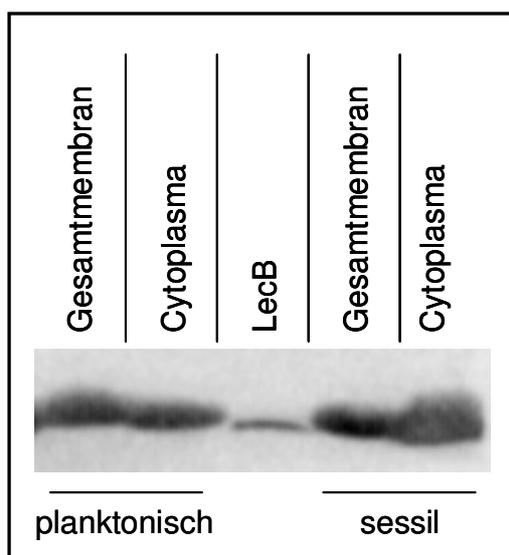


Abb. 33 Immunologische, subzelluläre Lokalisierung des LecB-Proteins in planktonischen und in Biofilmzellen des *P. aeruginosa*-Wildtyps PAO1. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte für 48 h bei 37 °C in NB-Medium sowie auf NB-Agar als konfluenter Bakterienrasen. Anschließend wurden die Zellen fraktioniert und das LecB-Protein durch Immunoblotting in den einzelnen Fraktionen detektiert.

Auch bei der Verwendung dieser Stämme wurde das LecB-Protein sowohl in planktonischen als auch in Biofilmzellen in den Fraktionen der Gesamtmembran und des Cytoplasmas detektiert, während die Fraktionen des Periplasmas und der extrazellulären Proteine keine

Signale aufwiesen (Abb. 13). Für eine detaillierte Lokalisierung wurden die Fraktionen der inneren und äußeren Membran mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation aus der Fraktion der Gesamtmembran präpariert. Das LecB-Protein konnte anschließend eindeutig in der äußeren Membranfraktion nachgewiesen werden (Abb. 15). Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen von Glick & Garber (1983), die den Hauptteil des Proteins im Cytoplasma planktonischer Bakterien nachweisen konnten. Dabei wurden die Lectine durch Hämagglutinationstests in den einzelnen Zellfraktionen detektiert. Während das LecB-Protein in der vorliegenden Arbeit in dem Laborstamm PAO1 lokalisiert wurde, verwendeten Glick & Garber den Stamm ATCC 3347, den sie über 72 h in NBC-Medium (NB-Medium mit Zusatz von 0,2 % (w/v) Cholinchlorid) kultivierten. Die Syntheserate der Lectine und deren zelluläre Lokalisation wird von den Kulturbedingungen enorm beeinflusst und variiert in verschiedenen Stämmen von *P. aeruginosa* (Sudakevitz *et al.*, 1979; Gilboa-Garber, 1988). Die unterschiedliche zelluläre Verteilung des LecB-Proteins, die in den beiden Arbeiten beobachtet wurde, könnte daher auf die verschiedenen Kulturbedingungen, vor allem aber auf die unterschiedlichen Stämme, die in den Studien zum Einsatz kamen, zurückzuführen sein. Die Exposition bakterieller Adhäsine auf der Zelloberfläche wurde bereits für Lectine anderer Spezies beschrieben. Während das Mannose-spezifische FimH-Protein von *E. coli* an der Spitze der Typ 1-Pili lokalisiert ist, wurde das N-Acetyl-D-Galactosamin-spezifische Lectin EcLS aus *Eikenella corrodens*, ein Gram-negatives Bakterium, das an zahlreichen humanen Infektionskrankheiten beteiligt ist, auf der Zelloberfläche nachgewiesen, ohne mit Zellfortsätzen assoziiert zu sein (Nakae *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass das EcLS-Protein in Analogie zu FimH aus *E. coli* die Adhäsion des Bakteriums an verschiedene Wirtsepithelien vermittelt. 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).

4.1.6 LecB interagiert mit Zuckerrezeptoren der äußeren Membran

Das LecB-Protein wurde in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* nachgewiesen, obwohl es keine strukturellen Charakteristika von Membranproteinen, wie ein C-terminales Phenylalanin und β -barrel-bildende Strukturen, aufweist (Mitchell *et al.*, 2002; Loris *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Interaktion des Lectins mit der äußeren Membran auf der Bindung LecB-spezifischer Zuckerrezeptoren

beruht. Für die Bindung des LecB-Proteins von L-Fucose wird eine Bindekonstante von $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ angegeben (Garber *et al.*, 1987). Das Lectin weist eine noch höhere Affinität für *p*NP-Fucose auf, während es mit D-Galactose keine Interaktion eingeht. Durch die Inkubation in einem *p*NP-Fucose-haltigen Puffer wurde das Lectin spezifisch aus der äußeren Membranfraktion verdrängt, da die Behandlung mit D-Galactose keinen Effekt bewirkte (Abb. 16). Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf eine Assoziation des LecB-Proteins mit Glycostrukturen der äußeren Membran hin.

Darüber hinaus konnte die Präsenz potentieller Liganden des LecB-Proteins auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, indem Biofilmzellen von *P. aeruginosa* mit einer fluoreszenzmarkierten Variante des Lectins behandelt wurden (Abb. 17). Dazu wurden auf Membranfiltern kultivierte Biofilme mit einem YFP::LecB-Konjugat gefärbt und mittels CLSM analysiert. Die Kultivierung der Bakterien auf Membranfiltern (Strathmann, 2003) resultiert in der Ausbildung ungesättigter Biofilme, wie sie auch schon zur Lokalisierung des LecB-Proteins innerhalb sessiler Zellen verwendet wurden. Als Nährmedium wurde in diesen Versuchen ein Minimalmedium eingesetzt, da zuvor beobachtet wurde, dass die Verwendung von komplexen Medien im Membranfilter-Modell zur Ausbildung von Biofilmen führt, die durch die Behandlung mit der Färbelösung dispergieren (ohne Abbildung). Zusätzlich zum *P. aeruginosa*-Stamm PAO1 wurden auch Biofilme des mucoiden Stamms SG81, ein Isolat aus einem technischen Abwassersystem, angefärbt. Zuvor konnte die Präsenz der beiden Lectine LecA und LecB in Zellextrakten des mucoiden Stamms immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 17G). Die Aufnahmen der CLSM-Analyse zeigen, dass die Zellen beider Stämme, die zur Gegenfärbung mit dem Nukleinsäure-bindenden Farbstoff SYTO 62 behandelt wurden, von einer Schicht des YFP::LecB-Konjugats umgeben sind (Abb. 17). Die Interaktion des fluoreszenzmarkierten LecB-Proteins mit der Zelloberfläche konnte durch Präinkubation des Lectins mit L-Fucose unterbunden werden. Zusätzlich zur Verwendung des YFP-markierten Lectins wurden die Versuche mit nativem LecB-Protein, das mit Hilfe des „Alexa Fluor 488 Protein Labeling“ Kits (Molecular Probes, Karlsruhe) markiert wurde, wiederholt (ohne Abbildung). Diese Beobachtungen bestätigen die Annahme, dass das Lectin mit Rezeptoren der äußeren Membran, die LecB-spezifische Zucker beinhalten, interagiert. Diese LecB-spezifischen Rezeptoren auf der Zellperipherie könnten z. B. in den Lipopolysacchariden (LPS), einem wesentlichen Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Zellen, lokalisiert sein. Die Interaktion der Lectine von *P. aeruginosa* mit den LPS der äußeren Zellmembran wurde bereits in einer früheren Arbeit diskutiert, da in Lectin-Präparationen, die aus dem homologen Wirt isoliert wurden, Spuren von LPS nachweisbar

sind (Gilboa-Garber, 1997). Zudem sind auf der Zellperipherie von *P. aeruginosa* glycosylierte Zelloberflächenproteine vorhanden, zu denen auch die Proteinuntereinheiten zählen, aus denen sich Pili und Typ A-Flagellen zusammensetzen (Brimer & Montie, 1998; Castric *et al.*, 2001). Oligosaccharide des O-Antigens verschiedener Serotypen von *P. aeruginosa* enthalten das α -L-Fucose-Derivat α -L-N-Acetylfucosamin, das auch Bestandteil des Trisaccharids ist, mit dem die *pilA*-Untereinheiten der Pili des klinischen Isolats *P. aeruginosa* 1244 glycosyliert sind (DiGiandomenico *et al.*, 2002). Das Vorkommen von glycosylierten Zelloberflächenproteinen ist unter pathogenen Bakterien, wie den Gram-positiven Organismen *Streptococcus sanguis* (Erickson & Herzberg, 1993) und *Mycobacterium tuberculosis* (Dobos *et al.*, 1995) sowie den Gram-negativen Spezies *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* und *Helicobacter pylori* (Power & Jennings, 2003), weit verbreitet. Bei den meisten der Organismen jedoch ist sowohl die Zusammensetzung der Glycane als auch deren physiologische Bedeutung unbekannt.

Darüber hinaus fällt bei der Betrachtung der CLSM-Aufnahmen auf, dass die Biofilme des nicht-mucoiden Stamms PAO1 im Verhältnis zum mucoiden Stamm SG81 eine höhere Zelldichte aufweisen. Dies lässt sich auf die erhöhte EPS-Produktion des mucoiden Stamms zurückführen (Grobe *et al.*, 1995). Es wurde vermutet, dass das LecB-Protein durch die multivalente Bindung an Alginatketten, aus denen sich die Biofilm-EPS des mucoiden Stamms SG81 hauptsächlich zusammensetzen, zur Vernetzung und Organisation der Biofilmmatrix beiträgt (Imberty *et al.*, 2004). Aus den CLSM-Aufnahmen der Biofilme des mucoiden Stamms geht hervor, dass keine Interaktion des Lectins mit den EPS stattgefunden hat, da die interzelluläre Matrix kein fluoreszierendes Signal aufweist. Dies führt zu dem Schluss, dass das LecB-Protein im Gegensatz zum ebenfalls Mannose-spezifischen ConA (Strathmann *et al.*, 2002) keine Bindung mit dem Alginat eingeht. Die Interaktion des LecB-Proteins mit der EPS-Matrix des nicht-mucoiden *P. aeruginosa*-Stamms PAO1, die zu einem erheblichen Anteil aus Mannose besteht (Wozniak *et al.*, 2003; Friedmann & Kolter, 2004a/b; Jackson *et al.*, 2004; Matsukawa & Greenberg, 2004; Vasseur *et al.*, 2005), kann anhand der gewonnenen Daten nicht ausgeschlossen werden, da die analysierten Biofilme eine so hohe Zelldichte aufwiesen, dass nicht beurteilt werden kann, ob neben der Zelloberfläche auch Polysaccharide der interzellulären Matrix angefärbt wurden. Die Aufklärung dieser Fragestellung ist Teil aktueller Studien, in denen EPS-Material isoliert und getrennt von den Zellen mit Lectin behandelt wird.

4.1.7 Ein D-A-V-V-Motiv beeinflusst den zellulären Transport des LecB-Proteins

Bei den Studien zur zellulären Lokalisation wurde ein erheblicher Anteil des LecB-Proteins in der äußeren Zellmembran von *P. aeruginosa* nachgewiesen. Analysen der Aminosäuresequenz ergaben, dass das Lectin keine der derzeit bekannten N-terminalen Signalsequenzen aufweist. Indessen enthält das LecB-Protein nahe dem C-Terminus ein D-X-X-X-Motiv (X: hydrophobe Aminosäure), das auch Proteine aufweisen, die über den Typ I-Transportweg Gram-negativer Bakterien sekretiert werden (Ma *et al.*, 2003). Typ I-Substrate, die im Allgemeinen über einen Signalpeptid-unabhängigen Transportweg sekretiert werden, enthalten ebenfalls keine N-terminale Signalsequenz. Zudem enthalten viele der Typ I-Substrate einen Glycin-reichen Bereich, dessen Bedeutung für den Proteintransport jedoch umstritten ist. Proteine, die über den Typ I-Sekretionsweg transportiert werden, teilen folgende Eigenschaften: (1) Die Sekretion erfolgt über zwei spezifische Transportproteine der inneren sowie eine multifunktionelle Pore der äußeren Membran. (2) Im Gegensatz zu den sekretierten Proteinen weisen die Transportproteine verschiedener Substrate signifikante Homologien auf und sind teilweise gegeneinander austauschbar (Letoffe *et al.*, 1990). (3) Beim Transport in das extrazelluläre Medium kommt es nicht zur Ausbildung eines periplasmatischen Intermediats. (4) In den meisten Fällen wird während bzw. nach der Sekretion die Signalsequenz nicht abgespalten (Gentshev *et al.*, 2002). (5) Die Gene, die für die Komponenten des Sekretionsapparats kodieren, befinden sich häufig, aber nicht zwingend, in einem Operon mit dem Gen des sekretierten Proteins (Zhang *et al.*, 1999).

Aufgrund der Beobachtungen von Ghigo & Wanderman (1994) wurde zunächst angenommen, dass das D-X-X-X-Motiv in Typ I-Substraten am extremen C-Terminus lokalisiert sein muss. Sie berichteten, dass ein C-terminales Tetrapeptid, bestehend aus einem Aspartat und drei hydrophoben Aminosäuren, für den Transport der Metalloprotease PrtG aus *Erwinia chrysanthemi* verantwortlich ist, wobei schon das Anfügen nur einer weiteren Aminosäure am C-Terminus zum Abbruch des Proteintransports führte. Laut Kamath *et al.* (2000) dagegen ist ein Tetrapeptid mit der Sequenz D-E-T-V an der Sekretion einer Nukleosid Diphosphat Kinase (Ndk) aus *P. aeruginosa* 8821M, ein weit verbreitetes Enzym, das die intrazelluläre Verteilung von Nukleotiden regelt, beteiligt, obwohl es sich 8 Aminosäuren vor dem eigentlichen C-Terminus des 12 kDa großen Proteins befindet. Der Austausch dieses Motivs gegen vier Alanine führte zum Abbruch der Ndk-Sekretion. In dem verwendeten Stamm *P. aeruginosa* 8821M wurde das native Ndk-Protein sowohl im Cytoplasma als auch im extrazellulären Medium und in der Membranfraktion nachgewiesen (Shankar *et al.*, 1996). Die Beobachtung, dass das Ndk-Protein beim nicht-mucoiden

P. aeruginosa-Stamm PAO1, in dem das Aspartat des Motivs gegen ein Alanin ausgetauscht ist (A-E-T-V), nicht sekretiert wird (Zaborina *et al.*, 1999), unterstützt die Hypothese zum Einfluss des D-E-T-V-Tetrapeptids auf den Proteintransport (A.M. Chakrabarty, University of Illinois, Chicago, USA, persönliche Mitteilung). Es wird daher spekuliert, dass das Ndk-Protein über den Typ I-Transportweg sekretiert wird, obwohl das *ndk*-Gen nicht mit den Genen putativer Sekretionsfaktoren in einem Operon organisiert ist und das D-X-X-X-Motiv nicht am extremen C-Terminus des Proteins lokalisiert ist (Kamath *et al.*, 2000).

Das LecB-Protein beinhaltet ein Aspartat (Asp104), das die erste Aminosäure eines D-A-V-V-Tetrapeptids darstellt, welches sich 10 Aminosäuren vor dem eigentlichen C-Terminus befindet (Abb. 18). Die Ergebnisse der Studie zur Sekretion des Ndk-Proteins aus *P. aeruginosa* (Ghigo & Wandersman, 1994; Kamath *et al.*, 2000) waren der Anstoß, den Einfluss des D-A-V-V-Motivs auf den zellulären LecB-Transport zu untersuchen. Entsprechend dem Vorgehen von Kamath *et al.* (2000) wurde dieses Motiv zunächst mittels ortsspezifischer Mutagenese durch vier Alanine ausgetauscht. Bakterien des LecB-negativen Stamms PATI4, die das resultierende LecB*-Protein synthetisierten, wurden 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 nativen LecB-Proteins (Abb. 19). Sowohl das native wie auch das mutierte LecB-Protein konnten nach 48 h im Cytoplasma der Zellen detektiert werden. Wie erwartet wurde das native Lectin zusätzlich in der Fraktion der Gesamtmembran nachgewiesen, während das LecB*-Protein dort abwesend war. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen zum Einfluss des D-E-T-V-Motivs aus der Ndk von *P. aeruginosa* und weist eindeutig auf eine Beteiligung des D-A-V-V-Tetrapeptids am LecB-Transport in die äußere Membran hin. In weiterführenden Studien, in denen die Lokalisierung des LecB-Proteins in unterschiedlichen Wachstumsphasen durchgeführt wurde, waren beide Lectin-Varianten nach einer Wachstumsperiode von 8 h ausschließlich im Cytoplasma nachweisbar. Nach weiteren 16 h Kultivierung konnten beide Proteine im Periplasma nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Nach Kultivierung für insgesamt 48 h wurde nur das native LecB-Protein in der Membranfraktion detektiert, während die mutierte Variante im Periplasma degradiert wurde. Diese Beobachtungen weisen auf eine Beteiligung des Tetrapeptids an der Translokation des LecB-Proteins vom Periplasma in die äußere Membran hin.

Zusätzlich wurde unter Begutachtung der Strukturdaten des LecB-Proteins die sterische Zugänglichkeit des D-A-V-V-Tetrapeptids für potentielle, kooperierende Sekretionsfaktoren

untersucht. Dabei ergab sich, dass das putative Sekretionsmotiv mit der Ca^{2+} -abhängige Zuckerbindestelle des Lectins überlappt, indem Asp104 einen der Liganden für die beiden Ca^{2+} -Ionen darstellt (Abb. 20). Darüber hinaus bilden die drei Aminosäuren Ala105, Val106 und Val107 des Tetrapeptids den Beginn des C-terminalen β -Stranges. Dadurch ergibt sich, dass durch den Austausch des Tetrapeptids gegen die vier Alanine eine inaktive LecB-Variante mit defekter Zuckerbindestelle resultierte. Durch die Reinigung des LecB*-Proteins als Poly-Histidin-Fusionsprotein (Bartels, 2004) und anschließende Hämagglutininests konnte dies bestätigt werden (ohne Abbildung). Darüber hinaus ist nicht zu erwarten, dass die Modifikation des Tetrapeptids einen Einfluss auf die Gesamtstruktur des LecB-Proteins ausübt (R. Loris, *Laboratorium voor Ultrastructuur, Instituut voor Moleculaire Biologie, Vrije Universiteit Brussel*, Belgien, persönliche Mitteilung).

Anhand des CPK-Modells des nativen LecB-Proteins (Abb. 21) wird deutlich, dass bereits im Monomer des Lectins der größte Teil des Tetrapeptids sterisch unzugänglich ist. Im LecB-Dimer wird es fast vollständig vom korrespondierenden Monomer verdeckt. Ferner wird der kleine Teil des Tetrapeptids, der im Dimer noch in Kontakt mit dem Lösungsmittel steht, im aktiven LecB-Protein durch ein Ca^{2+} -Ion abgeschirmt (ohne Abbildung).

Derzeit ist nur wenig über die Sekretionsmechanismen von Proteinen mit einem C-terminalen D-X-X-X-Motiv bekannt. Da die Struktur des Ndk-Proteins aus *P. aeruginosa* derzeit unbekannt ist, musste zum Strukturvergleich das Ndk-Protein aus *Myxococcus xanthus* herangezogen werden, das 62 % Sequenzhomologie zum *P. aeruginosa* Ndk aufweist (Williams *et al.*, 1993). Dabei ergaben sich keine Hinweise auf strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen dem D-A-V-V-Motiv des LecB-Proteins und dem D-E-T-V-Tetrapeptid der *P. aeruginosa* Ndk (R. Loris, *Laboratorium voor Ultrastructuur, Instituut voor Moleculaire Biologie, Vrije Universiteit Brussel*, Belgien, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend können aus den Untersuchungen zur Bedeutung des D-A-V-V-Tetrapeptids für den Transport des LecB-Proteins in die äußere Membran folgende Schlüsse gezogen werden: (1) Das Tetrapeptid hat einen Einfluss auf die LecB-Sekretion, da die konstruierte LecB*-Mutante in der Membran nicht nachweisbar war. (2) Anhand der Analyse zur Struktur-Funktions-Beziehung wird deutlich, dass eine Interaktion des Tetrapeptids mit kooperierenden Sekretionsfaktoren unwahrscheinlich ist. Es bleibt daher ungelöst, ob das Tetrapeptid ein Sekretionsmotiv ähnlich dem C-terminalen Signal von Typ I-Substraten darstellt oder ob die Fähigkeit zur Zuckerbindung eine notwendige Voraussetzung für die Translokation des Proteins in die äußere Membran ist. Möglich ist auch, dass das Lectin als Komplex mit einem interagierenden Liganden transportiert wird. Unter dieser Annahme

verbleibt die inaktive LecB*-Variante im Periplasma, wo sie der Degradation der dort anwesenden Proteasen unterliegt.

In einer früheren Arbeit wurde als Alternative zum aktiven Transport des Lectins die Vermutung aufgestellt, dass ein Teil der Bakterienpopulation lysiert und das cytoplasmatische LecB-Protein so in den extrazellulären Raum freigesetzt wird, wodurch die cytotoxischen Effekte des Lectins ermöglicht werden (Wentworth *et al.*, 1991). Die Beobachtungen zum Einfluss des putativen Sekretionsmotivs in LecB widerlegen diese Hypothese, da das mutierte LecB*-Protein nach Kultivierung für 48 h weder in der Fraktion der Gesamtmembran noch im extrazellulären Medium nachgewiesen werden konnte (Abb. 19).

4.1.8 Studien zum Einfluss putativer Sekretionsfaktoren auf die LecB-Sekretion

Häufig sind die Gene der Proteine, die über den Typ I-Transportweg sekretiert werden, in einem Operon mit den Genen ihrer Sekretionsfaktoren organisiert. Weder das Ndk- noch das LecB-Protein sind Bestandteil eines solchen Operons. Benachbart zum *lecB*-Gen dagegen befinden sich die beiden ORF PA3359 und PA3360 (Abb. 22), deren Transkription aufgrund der kurzen intergenischen Region (22 bp) und der Abwesenheit terminatorischer Sequenzen wahrscheinlich von einem gemeinsamen Promotor kontrolliert wird. Die Gene dieses putativ bicistronischen Operons werden in entgegengesetzter Richtung zum *lecB*-Gen und den anderen benachbarten Genen transkribiert. Das vom ORF PA3360 kodierte Protein weist wesentliche Homologien zum HlyD-Protein aus *E. coli* auf und ist daher als putatives Sekretionsprotein annotiert. Das HlyD-Protein ist Teil des *hlyCABD*-Operons und somit maßgeblich an der Sekretion des α -Hämolytins HlyA, eines der hämolytischen Toxine uropathogener *E. coli*-Stämme, das über den Typ I-Transportweg ins extrazelluläre Medium sekretiert wird, beteiligt (Gentshev *et al.*, 2002). Das HlyA-Sekretionssystem aus *E. coli* setzt sich aus den Komponenten HlyB, HlyD und TolC zusammen und ist das bislang am besten charakterisierte Typ I-Sekretionssystem. Wie alle Proteine, die über diesen Weg sekretiert werden, weist HlyA eine C-terminale Signalsequenz auf, die sich in den letzten 50-60 Aminosäuren des Proteins befindet (Sugamata & Shiba, 2005). Die genaue Funktion und Bedeutung dieser Signalsequenz konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Während die *ATP-binding cassette* HlyB und das HlyD-Protein die spezifischen Komponenten des Transportapparats darstellen und in der inneren Membran lokalisiert sind, bildet TolC in der äußeren Membran eine multifunktionelle Pore. Das ausführlich charakterisierte Membranfusionsprotein HlyD ist mittels einer einzigen N-terminalen transmembranen Helix

in der inneren Membran verankert und besitzt eine aus 100 Aminosäuren bestehende periplasmatische Domäne. Die beiden Proteine HlyB und HlyD bilden einen stabilen Komplex in der inneren Membran. Die Bindung des Hämolytins an den cytoplasmatischen Teil dieses Komplexes induziert den Kontakt eines HlyD-Trimers mit dem trimeren TolC-Protein der äußeren Membran, resultierend in der Ausbildung eines transperiplasmatischen Effluxkanals (Abb. 34). Dies ermöglicht den Export des Hämolytins ohne die Ausbildung eines periplasmatischen Intermediats (Gentschev *et al.*, 2002).

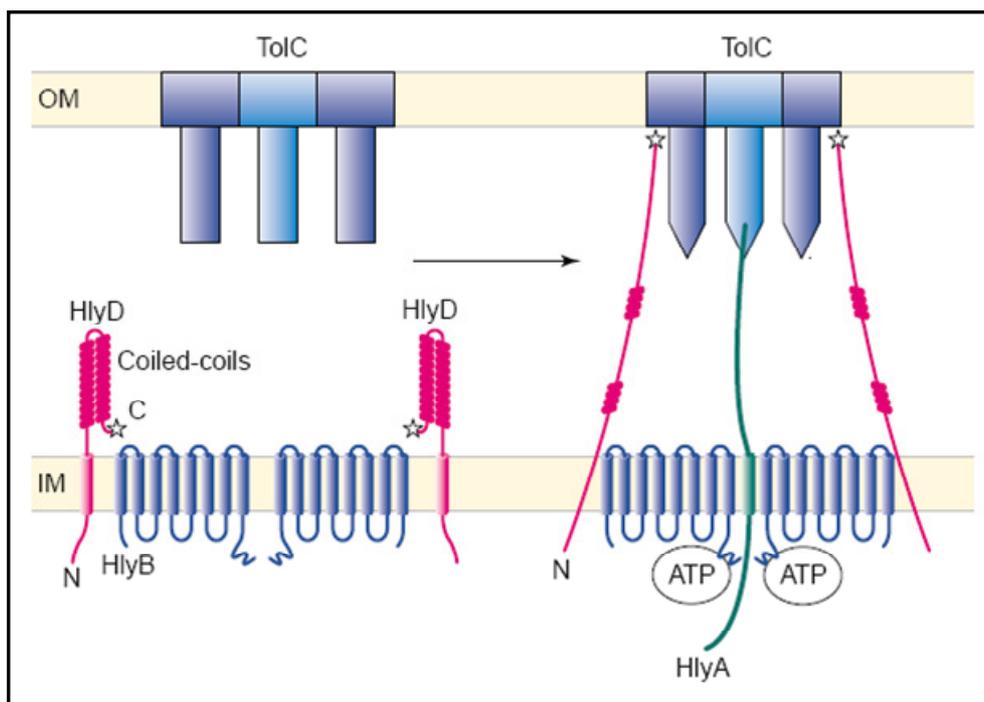


Abb. 34 Topologisches Modell der Hämolytine-Sekretion aus *E. coli*. In Reaktion auf die Bindung des Hämolytins HlyA an die cytoplasmatische Seite des HlyB-HlyD-Komplexes kommt es zur Ausbildung eines trans-periplasmatischen Effluxkanals, gebildet aus einem HlyD-Trimer und dem trimeren TolC-Protein. OM: äußere Membran, IM: innere Membran (aus Gentschev *et al.*, 2002).

Das zweite Gen des bicistronischen Operons ORF PA3359 aus *P. aeruginosa* kodiert laut Vorhersage für ein Membranprotein mit 10–11 transmembranen Domänen (www.pseudomonas.com). Aufgrund der Homologien zu bereits bekannten Sekretionsfaktoren aus *E. coli* sowie der strukturellen Vorhersagen der beiden Proteine wurde untersucht, ob die Proteine am Transport des LecB-Proteins in die äußere Membran beteiligt sind. Dazu wurden die Gene der beiden ORF so in den Vektor pUCPKS kloniert, dass sie einzeln bzw. gemeinsam unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors standen. Zellen des LecB-negativen Stamms PATI4, die neben dem *lecB*-Expressionsplasmid

pBBC2 eines der resultierenden Konstrukte enthielten, wurden als ungesättigter Biofilm auf NB-Agarplatten für 48 h bei 37 °C kultiviert. Im Anschluss an die Präparation der verschiedenen Zellfraktionen wurde mittels Immunodetektion unter Verwendung des LecB-spezifischen Antiserums festgestellt, dass die Überexpression der Gene der ORF PA3359 und PA3360 einzeln (ohne Abbildung) sowie in Form eines bicistronischen Operons (Abb. 23) keinen Einfluss auf den Transport des LecB-Proteins in die äußere Membran hat. Um eine Beteiligung der beiden Gene an der LecB-Translokation völlig ausschließen zu können, sind weitere Arbeiten geplant, welche u. a. die Erstellung und Fraktionierung von Stämmen umfassen, die Defizienzen in den beiden Genen des bicistronischen Operons aufweisen.

4.1.9 Modell zur physiologischen Rolle des Lectins LecB von *P. aeruginosa*

Trotz mehrerer Studien verschiedener Autoren konnte die physiologische Funktion des LecB-Proteins sowie die Bedeutung des Lectins für die Pathogenität des Bakteriums bislang nicht aufgeklärt werden. Die cytotoxischen Effekte, die das Lectin *in vitro* gegenüber Zellen des respiratorischen Traktes auslöst, sowie die Adhäsion des LecB-Proteins an Epithelien verschiedener Organe standen in Inkongruenz mit der berichteten, intrazellulären Lokalisation. Aufgrund der Beobachtung im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dass ein erheblicher Teil des zellulären LecB-Proteins in der äußeren Membran sowohl planktonischer als auch sessiler Zellen vorhanden ist, konnte dieser Widerspruch beseitigt werden. Darüber hinaus wurden Hinweise zum Mechanismus der Translokation des Proteins in die äußere Membran gewonnen. So wurde ermittelt, dass ein C-terminales D-A-V-V-Tetrapeptid, das in ähnlicher Form auch in Typ I-Substraten gefunden wird, den zellulären LecB-Transport beeinflusst. Aufgrund der Überlagerung dieser Sequenz mit der Zuckerbindestelle des Lectins bleibt derzeit unklar, ob es sich bei dem Tetrapeptid um ein „echtes“ Sekretionsmotiv handelt, oder ob die Fähigkeit zur Zuckerbindung für den Transport in die äußere Membran notwendig ist. Möglicherweise erfolgt der Transport in Komplex mit einem zuckerhaltigen Liganden. Der genaue Mechanismus des LecB-Transports in die äußere Membran bleibt offen. Vorläufige Studien, in denen die intrazelluläre Verteilung einer fluoreszenzmarkierten Variante des Lectins mittels CLSM analysiert wurde, weisen darauf hin, dass die LecB-Translokation durch Transportproteine vermittelt wird, die sich an den Zellpolen befinden (ohne Abbildung). Die Annahme, dass Zellyse für das Auftreten extracytoplasmatischen Lectins verantwortlich ist, kann aufgrund der Beobachtungen zurückgewiesen werden.

Das LecB-Protein weist keine strukturellen Merkmale von integralen Membranproteinen auf. Die in Kapitel 3.4 und 3.5 beschriebenen Untersuchungen ergaben, dass das LecB-Protein mit spezifischen Glycostrukturen der äußeren Membran, z. B. mit LPS-Bestandteilen oder glycosylierten Membranproteinen, interagiert und so mit der Zelloberfläche von *P. aeruginosa* assoziiert ist (Abb. 35). Die tetramere Struktur des Lectins ermöglicht es dem Oberflächen-exponierten LecB-Protein multivalente Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren biotischer Oberflächen einzugehen.

Erstmals wurde auch die Rolle der Lectine von *P. aeruginosa* auf den Prozess der Biofilmbildung unter verschiedenen Kulturbedingungen untersucht. Vor allem bei der Kultivierung von Biofilmen unter stationären Bedingungen konnte ein wesentlicher Einfluss des LecB-Proteins auf die Formation komplexer Biofilmstrukturen nachgewiesen werden. Oberflächen-exponiertes LecB-Protein könnte 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. Schon zuvor wurde berichtet, dass das LecB-Protein neben der Agglutination von Erythrozyten verschiedener Vertebraten auch die Aggregation von *E. coli*-Zellen und mariner Bakterien auslöst (Gilboa-Garber, 1986). Das in dieser Arbeit isolierte YFP-markierte LecB-Protein wird in der AG Wingender (*Biofilm Centre*, Abteilung Aquatische Mikrobiologie, Universität Duisburg-Essen) dazu eingesetzt, LecB-spezifische Liganden in Biofilmen aus Trinkwasserleitungen zu lokalisieren. Es konnte mit Erfolg gezeigt werden, dass auf der Oberfläche dieser Biofilme spezifische Rezeptoren vorhanden sind, die *P. aeruginosa*-Zellen, welche in Trinkwasser-Biofilmen bereits nachgewiesen wurden, die LecB-vermittelte Kolonisation dieser Zellpopulationen ermöglichen könnten. Eine weitere Funktion des LecB-Proteins im Prozess der Biofilmbildung könnte in der Vernetzung der EPS bestehen, um so zusätzlich zur Stabilität eines Biofilms beizutragen.

Die Entstehung einer bakteriellen Infektion wird durch die Adhäsion der Zellen an das Wirtsepithel initiiert. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Lectin *in vitro* an die Oberfläche von Explantaten humaner, nasaler Polypen bindet (Adams *et al.*, 1997). Oberflächen-exponiertes LecB-Protein kann die Adhäsion der Bakterien an Epithelzellen vermitteln und so zur Pathogenität von *P. aeruginosa* beitragen.

Infektionen des respiratorischen Traktes von CF-Patienten durch *P. aeruginosa* stellen ein enormes Problem dar und werden als Haupttodesursache angesehen. Glycoproteine der Zellmembranen des respiratorischen Epithels von CF-Patienten, die eine mutierte Variante des *cftf*-Gens exprimieren, weisen eine stärkere Fucosylierung auf als Membranproteine von

Zellen, die das Wildtyp-Gen exprimieren (Rhim *et al.*, 2001). Aufgrund dessen wird vermutet, dass Oberflächen-exponiertes LecB-Protein eine entscheidende Rolle in der Adhäsion von *P. aeruginosa*-Zellen an die Lungenoberfläche von CF-Patienten einnimmt (Abb. 35). Zudem enthält Muzin von CF-Patienten einen erhöhten Anteil fucosylierter Glycoproteine (Shori *et al.*, 2001; Scanlin & Glick, 2001). Das LecB-Protein könnte die Adhäsion der Bakterien an diese Glycoproteine vermitteln, um sie so zu immobilisieren und vor den pulmonalen Reinigungsmechanismen zu schützen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass auch Muzin aus dem Intestinum von CF-Mäusen durch die gesteigerte Expression einer Fuc(α 1-2)-Fucosyltransferase einen höheren Gehalt an Fucose aufweist (Thomsson *et al.*, 2002). Die erfolgreiche Therapie einer *P. aeruginosa*-induzierten Infektion des respiratorischen Traktes durch die Behandlung eines Patienten mit einer Lösung aus den Lectin-spezifischen Zuckern (von Bismarck *et al.*, 2001) bekräftigt die These, dass das LecB-Protein über die Interaktion mit Wirtszellrezeptoren entscheidend am Pathogenitätsprozess beteiligt ist. Die Befunde aus vorherigen sowie der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass das Lectin ein potentiell Ziel für die Entwicklung anti-adhäsiver Therapeutika darstellt, welche die LecB-vermittelte Bindung der Bakterien an Zellen der eigenen Art, an Epithelzellen des Wirts sowie an Glycostrukturen im Muzin unterbinden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zudem Reporterfusionen konstruiert, die in laufenden Untersuchungen zum Einsatz kommen. Um die Regulation der Expression des Lectin-Gene in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen zu untersuchen, wurde das *gfp*-Gen unter die transkriptionelle Kontrolle der Lectin-Promotoren gestellt. Durch die Kultivierung unter verschiedenen Kulturbedingungen und die anschließende CLSM-Visualisierung von Zellen, die Kopien dieser Konstrukte (pPHUL1PG: *gfp*-Gen P_{lecA} -kontrolliert bzw. pPHUL2PG: *gfp*-Gen P_{lecB} -kontrolliert) tragen, kann zukünftig die Intensität der Genexpression anhand der intrazellulären Fluoreszenz quantifiziert werden, um so die Bedeutung der Lectine, z . B. im Infektionsprozess, näher zu charakterisieren.

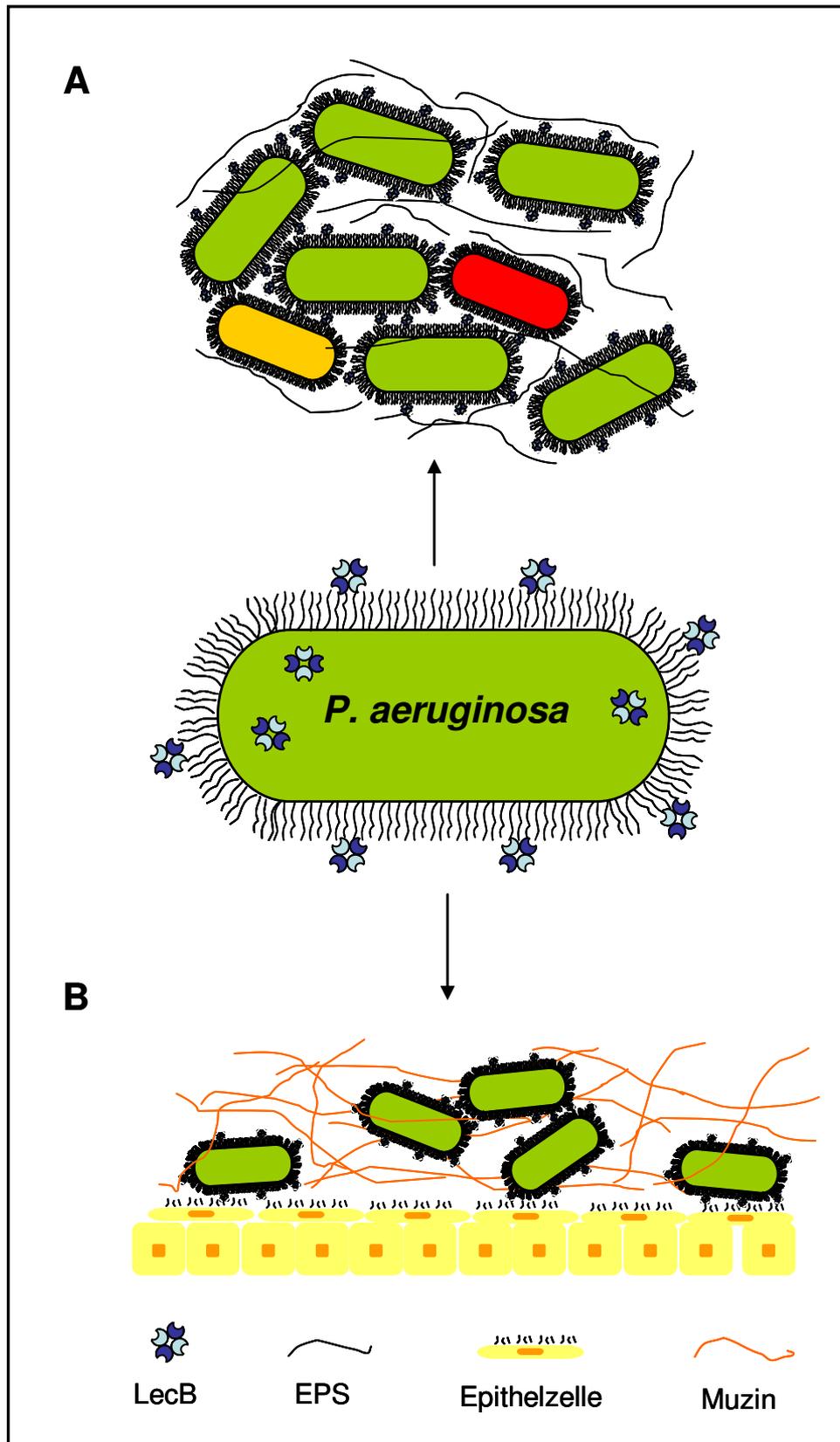


Abb. 35 Hypothetisches Modell zur physiologischen Funktion des Oberflächen-exponierten LecB-Proteins. **A.** Einfluss des LecB-Proteins auf die Struktur von Biofilmen durch die multivalente Bindung an Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche sowie durch die Vernetzung der EPS. **B.** LecB-vermittelte Adhäsion von *P. aeruginosa* an respiratorische Epithelzellen sowie an die Glycoproteine des Muzins.

4.2 Untersuchungen zum biotechnologischen Potential des LecB-Proteins

Mit dem stetigen Wachstum der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie steigt der Bedarf nach praktikablen und ökonomisch effizienten Methoden zur Produktion und Isolierung rekombinanter Proteine. Unter Verwendung der heutigen Fermentationstechniken können Proteine kostengünstig im g/l-Maßstab produziert werden. Aufgrund dessen machen die zur Reinigung der rekombinanten Proteine erforderlichen *downstream*-Prozesse bis zu 70 % der Gesamtkosten aus (Ladisch *et al.*, 2001). Um den geringen Ertrag der konventionellen Reinigungsverfahren, bedingt durch die unspezifischen physio-chemischen Wechselwirkungen zwischen dem Zielprotein und der Säulenmatrix in den aufeinander folgenden chromatographischen Schritten, zu steigern, wurden diverse affinitätschromatographische Systeme entwickelt (Wilchek *et al.*, 2000; Hearn & Acosta, 2001; Lowe *et al.*, 2001). Die Proteintrennung beruht dabei auf der spezifischen, reversiblen Interaktion eines Teils des rekombinanten Fusionsproteins mit einem an der Säulenmatrix immobilisierten Liganden. Mit Hilfe von Affinitäts-*tags* können in nur einem chromatographischen Schritt hohe Ausbeuten des Zielproteins aus einer komplexen Proteinlösung in hochreiner und konzentrierter Form isoliert werden.

Unter den kommerziell erhältlichen Affinitäts-*tag*-Systemen befinden sich das Calmodulin-bindende Protein (Vaillantcourt *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1997), die Gluthation-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (Smith & Johnson, 1988; Guan *et al.*, 1991) und verschiedenen Affinitäts-*tags*, die aus nur wenigen Aminosäuren bestehen, z. B. der Poly-Histidin-*tag* (Porath *et al.*, 1975; Hochuli *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1994) und die damit verbundene immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC). Trotz zahlreicher Anwendungen dieser Systeme im Labormaßstab konnten lediglich der GST und der Poly-Histidin-*tag* den hohen Anforderungen der Großindustrie gerecht werden. Dies liegt zum Teil an den komplexen, chemischen Modifizierungen, die zur Immobilisierung der spezifischen Rezeptoren an die Säulenmatrix erforderlich sind sowie an der Instabilität vieler Affinitätsmatrizes, was eine mehrmalige Verwendung verhindert und zu hohen Kosten führt. Daher ist die Entwicklung neuer Reinigungssysteme, die auf der Interaktion effizienter Affinitäts-*tags* mit kostengünstigen, chemisch und hydrodynamisch stabilen Matrizes basieren, weiterhin von großer Bedeutung (Kavoosi *et al.*, 2004).

Effektive Affinitäts-*tags* weisen folgende Eigenschaften auf: (1) Sie ermöglichen die Isolierung des rekombinanten Proteins aus einer komplexen Lösung in nur einem Schritt. (2) Sie üben keinen bzw. nur einen minimalen Einfluss auf die Tertiärstruktur und die biologische

Aktivität des Zielproteins aus. (3) Sie lassen sich einfach und spezifisch nachweisen. (4) Sie sind einfach und spezifisch zu entfernen. (5) Sie sind für eine Vielzahl von Proteinen anwendbar (Terpe, 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob das LecB-Protein aus *P. aeruginosa* unter Ausnutzung der intrinsischen Affinität zu L-Fucose bzw. D-Mannose als Affinitäts-tag eingesetzt werden kann. Bereits im Vorfeld der Studien konnten einige der allgemeinen Kriterien für Affinitäts-tags beantwortet werden. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, kann das native LecB-Protein in einem einzigen chromatographischen Schritt über D-Mannose-Agarose mit hohem Reinheitsgrad isoliert werden, wobei eine Proteinausbeute von 70 mg pro Liter Überexpressionskultur erreicht wurde. Zudem ist es aufgrund der hohen Immunogenität des Lectins unter Verwendung eines LecB-spezifischen Antiserums möglich, das rekombinante Fusionsprotein immunologisch nachzuweisen, ohne dass unspezifische Kreuzreaktionen mit Wirtsproteinen auftreten. Darüber hinaus weist das LecB-Protein weitere interessante Eigenschaften auf, die für eine erfolgreiche Nutzung des Lectins als Affinitäts-tag sprechen. Die Stabilität des Proteins gegenüber Proteolyse sowie extreme pH-Werte und Temperaturen (bis zu +80 ° C) ist seit langem bekannt (Gilboa-Garber, 1982). Dies könnte die Isolierung von Zielproteinen, für deren Stabilität unkonventionelle Bedingungen eingehalten werden müssen, ermöglichen.

4.2.1 Überexpression der *yfp::lecB*-Genfusion

Um zu überprüfen, ob die Affinität des Lectins zu den LecB-spezifischen Zuckern die Isolierung eines fusionierten Zielproteins ermöglicht, wurde zunächst das YFP als Modellprotein eingesetzt. Die Verwendung dieser gelb-fluoreszierenden Variante des GFP aus *Aequorea victoria* hatte den Vorteil, dass die Synthese sowie die Präsenz des Fusionsproteins während des gesamten Produktions- und Reinigungsprozesses über die natürliche Fluoreszenz dokumentiert werden konnte (Prasher *et al.*, 1992; Heim *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1995). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde ein Affinitäts-tag-System vorgestellt, das auf der intrinsischen Affinität eines Kohlenhydrat-bindenden Moduls der Xylanase 10A aus *Thermotoga maritima* (CBM9) zu Cellulose beruht (Kavoosi *et al.*, 2004). Dabei konnte das Anwendungspotential dieses Systems erfolgreich anhand einer Proteinfusion aus dem GFP und dem CBM9-tag evaluiert werden. Darüber hinaus sollte das YFP_{LecB}-Protein im Falle einer erfolgreichen Isolierung in physiologischen Studien, z. B. zur Visualisierung von LecB-spezifischen Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche, zum

Einsatz kommen. Die Fusion des YFP mit dem C-Terminus des Lectins resultiert im Verlust der Fähigkeit zur Zuckerbindung, da die letzte Aminosäure eines LecB-Monomers (Gly114) H-Brücken mit dem Liganden eingeht und so für die Aktivität des Lectins erforderlich ist. Dies wird durch die Beobachtungen einer früheren Arbeit bestätigt, in der das LecB-Protein C-terminal mit einem Poly-Histidin-*tag* fusioniert wurde (Tielker, 2001). Das resultierende Protein konnte erfolgreich mittels IMAC isoliert werden. Der Einsatz des Proteins in Hämagglutinationstests und in Bindestudien ergab, dass diese LecB-Variante keine zuckerbindende Eigenschaft aufwies. Unter Berücksichtigung der Struktur des LecB-Proteins wurde erwartet, dass die Fusion mit dem frei zugänglichen N-Terminus keine Konformationsänderung des Lectins hervorruft, die den Verlust der Zuckerbindeaktivität zur Folge hat. Daher wurde das *yfp*-Gen inklusive Stoppcodon amplifiziert und im *lecB*-Überexpressionsplasmid pEC2, das bereits erfolgreich für die Gewinnung des nativen LecB-Proteins eingesetzt wurde, mit dem 5'-Ende des *lecB*-Gens fusioniert. Die Überexpression erfolgte im *E. coli*-Stamm Tuner (DE3). Die Expression der Genfusion *yfp::lecB* stand somit unter transkriptioneller Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotors. Die Synthese des Fusionsproteins YFP_{LecB} konnte anhand der Fluoreszenz des YFP durch die Betrachtung der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und CLSM sowie durch die Bestimmung der intrazellulären Fluoreszenz im Fluoreszenz-Spektralphotometer verfolgt werden. Damit wurde ein erster Hinweis darauf gewonnen, dass die Fusion mit dem *LecB-tag* die Aktivität des YFP nicht beeinflusst.

4.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung des YFP_{LecB}-Proteins

Die Bindung des LecB-Proteins an L-Fucose weist eine für Lectin-Kohlenhydrat-Interaktionen außergewöhnlich hohe Bindekonstante auf ($K_A = 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (Mitchell *et al.*, 2005). Die Interaktion mit D-Mannose erreicht eine Assoziationskonstante von $K_A = 3,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$. Obwohl für die Durchführung einer effektiven Affinitätschromatographie die K_A des Liganden-Rezeptor-Komplexes in Lösung zwischen $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ und $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ liegen sollte (Amersham Biosciences: *Affinity Chromatography - Principles and Methods*, 2002), wurde die Reinigung des YFP_{LecB}-Proteins unter Verwendung von D-Mannose-Agarose durchgeführt, da diese bereits für die Isolierung des nativen LecB-Proteins erfolgreich eingesetzt wurde (3.1). Bedingt durch die Tetravalenz des Lectins übersteigt die Aviditätskonstante der Interaktion eines LecB-Tetramers mit der Säulenmatrix die K_A der Wechselwirkung einer einzelnen Zuckerbindestelle mit unsubstituierten Monosacchariden um

ein Vielfaches (Mitchell *et al.*, 2005). Wie beim nativen LecB-Protein war es möglich, das Fusionsprotein unter milden Bedingungen mit einer Konzentration von 5 mM D-Mannose von der Säule zu eluieren. Diese Konzentration ist vergleichbar mit der Maltosekonzentration von 10 mM, die laut Herstellerangaben (New England Biolabs, Beverly, USA) für die Elution von Proteinen notwendig ist, die mit dem MBP-*tag* ausgestattet sind. Für die Interaktion zwischen MBP und der Maltose wird eine K_A von $3,5 \times 10^6 M^{-1}$ angegeben (Miller *et al.*, 1983), wobei es sich beim MBP um ein monomeres Protein handelt und daher keine Steigerung der Affinität zur Matrix durch Multivalenz auftritt. Aufgrund der Beobachtung, dass sich die Konzentrationen des jeweiligen Zuckers zur Verdrängung der gebundenen Fusionsproteine von der Säulenmatrix ähneln, wird geschlossen, dass die Interaktion zwischen dem tetrameren LecB-Protein mit der D-Mannose-Agarose ähnlich stark ausgeprägt ist, wie zwischen dem MBP und der bei diesem System verwendeten Amylose-Matrix.

Anhand der SDS-PAGE-Analyse zeigte sich, dass das isolierte Fusionsprotein einen hohen Reinheitsgrad aufweist (Abb. 26), wobei eine Proteinausbeute von 18 mg YFP_{LecB}-Protein pro Liter Überexpressionskultur erreicht wurde. Zusätzlich zum YFP wurde das CFP, eine weitere, cyan-fluoreszierende Variante des GFP, mit dem LecB-*tag* fusioniert und das resultierende Fusionsprotein gereinigt. Hierbei wurde eine ähnlich hohe Ausbeute von 20 mg pro Liter Überexpressionskultur erreicht. An dieser Stelle sei erwähnt, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit lediglich das Prinzip der LecB-vermittelten Affinitätschromatographie evaluiert werden sollte, ohne eine Optimierung der Proteinausbeute vorzunehmen.

Anschließend wurden Fluoreszenzspektren der isolierten Fusionsproteine YFP_{LecB} und CFP_{LecB} aufgenommen und die dabei ermittelten Absorptions- und Emissionsmaxima mit den Herstellerangaben (Clontech, San Jose, USA) für die nativen Proteine verglichen. Aufgrund der nur minimalen Abweichungen (≤ 1 nm) wurde deutlich, dass der C-terminal fusionierte LecB-*tag* keinen entscheidenden Einfluss auf die Konformation der Fluoreszenzproteine hat.

4.2.3 Konstruktion des Plasmids pURE

Wie beschrieben konnte gezeigt werden, dass die Reinigung von Fremdproteinen durch die Fusion mit dem LecB-Protein unter Ausnutzung der natürlichen Affinität des Lectins zu D-Mannose mittels Affinitätschromatographie möglich ist. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde das Potential des LecB-Proteins, als Affinitäts-*tag* in der affinitätschromatographischen Proteinreinigung eingesetzt zu werden, im Rahmen einer Diplomarbeit ausführlich evaluiert (Bartels, 2004). Dazu wurde zunächst das Plasmid pURE konstruiert, das die Fusion eines

beliebigen Gens mit dem *lecB*-Gen ermöglicht. Das Plasmid, das im Anhang dargestellt ist (Abb. 43), beruht auf dem Expressionsvektor pET19b (Novagen, San Diego, USA), in den das *lecB*-Gen sowie ein synthetischer Polylinker, der Erkennungssequenzen für einige der gängigsten Restriktionsendonukleasen enthält, eingefügt wurde. Zusätzlich zum C-terminalen LecB-tag können die Zielproteine am N-Terminus mit einem Hexa-Histidin-tag versehen werden (Abb. 36). Die Insertion einer Schnittstelle für die Enterokinase, einer sequenzspezifischen Endopeptidase, zwischen dem zu reinigenden Protein und dem LecB-Protein, ermöglicht im Anschluss an die Isolierung des Fusionsproteins die proteolytische Abspaltung des LecB-tags.

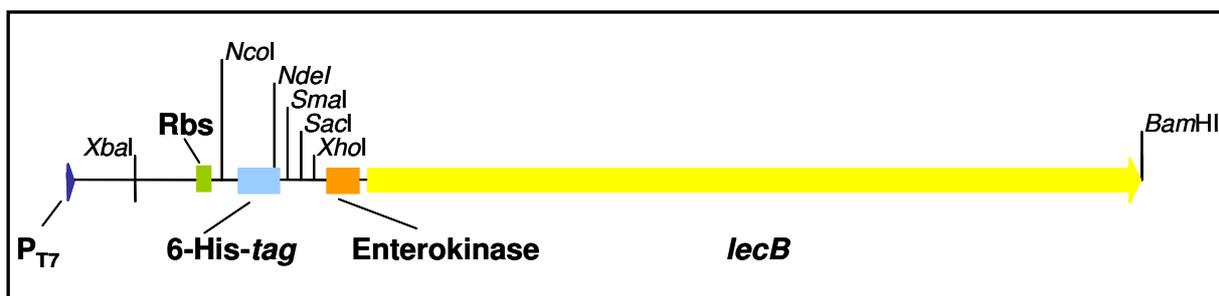


Abb. 36 Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus dem Expressionsplasmid pURE. Das Plasmid enthält eine MCS bestehend aus den Erkennungssequenzen für fünf gängige Restriktionsendonukleasen, die es ermöglicht, das Gen des zu reinigenden Proteins mit dem LecB-tag, mit dem Hexa-Histidin-tag oder mit beiden Affinitäts-tags zu fusionieren. Das entsprechende Fusionsprotein steht unter der transkriptionellen Kontrolle des T7-Promotors (P_{T7}). Zur Abspaltung des LecB-tags wurde die Erkennungssequenz für die Enterokinase inseriert. Rbs: Ribosomenbindungsstelle.

Die Charakterisierung des LecB-tags umfasste die Bestimmung der optimalen Reinigungstemperatur und die Überprüfung der Toleranz der LecB-Matrix-Interaktion gegenüber hohen NaCl-Konzentrationen, verschiedenen pH-Werten sowie Detergenzien. Als Matrix wurde ebenfalls D-Mannose-Agarose eingesetzt. Aus den Untersuchungen ging hervor, dass die höchste Ausbeute an isoliertem Protein erzielt wird, wenn die Affinitätschromatographie dem Temperaturoptimum der Hämagglutinationsreaktion entsprechend (Gilboa-Garber & Sudakevitz, 1999) bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt wird. Unter diesen Bedingungen konnten 24 mg YFP_{LecB} -Protein pro Liter Überexpressionskultur isoliert werden, wobei die Ausbeute 83 % betrug. Die Durchführung der Reinigung bei tieferen Temperaturen führte zu erheblichen Ertragsverlusten. Bei einer Temperatur von 4 °C wurde noch eine Ausbeute von 8 % erreicht.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Interaktion des Lectins mit der D-Mannose-Agarose hohe Konzentrationen von NaCl (< 1,2 M) und Detergenzien (Tween 20: mindestens

1 % (v/v); TritonX-100: 1 % (v/v)) toleriert. Darüber hinaus ergab die Überprüfung der Pufferkompatibilität dieses Reinigungssystems, dass eine effektive Isolierung des Fusionsproteins sowohl in Tris/HCl- als auch in Phosphatpuffer sowie über einen weiten pH-Bereich (pH 4,5-11,5) möglich ist.

Des Weiteren wurde das vom ORF PA1415 kodierte Protein aus *P. aeruginosa* PAO1, von dem bekannt ist, dass es sich in *E. coli* nur in Form von unlöslichen Proteinaggregaten produzieren lässt (S. Heckmann, Institut für molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung), mit dem LecB-tag fusioniert. Das Fusionsprotein konnte nach *in vitro* Denaturierung/Renaturierung affinitätschromatographisch isoliert werden, wobei eine Ausbeute von 125 mg reinen Fusionsproteins pro Liter Überexpressionskultur erreicht wurde.

4.2.4 Reinigung und Immobilisierung lipolytischer Enzyme mittels LecB-tag

Die Nutzung immobilisierter Enzyme bietet im Vergleich zu löslichen Enzymen eine Reihe von Vorteilen (Tischer & Kasche, 1999; Nahalka *et al.*, 2003): (1) Sie erhöht die Produktivität der jeweiligen Anwendung, da in einem kontinuierlichen Prozess dieselben Enzymmoleküle über einen längeren Zeitraum verwendet werden können. (2) Sie vereinfacht die Isolierung des Produkts. (3) Sie erlaubt eine präzisere Kontrolle der Reaktionsrate. (4) Sie vereinfacht die Automatisierung des Reaktionsprozesses. Darüber hinaus kann die Immobilisierung von Enzymen auf der Oberfläche eines geeigneten Trägermaterials sowohl die Reaktionsrate als auch die Lagerbeständigkeit eines Enzyms erhöhen (Křenková & Foret, 2004).

Für die Immobilisierung von Enzymen wurden in den letzten 30 Jahren verschiedene Methoden entwickelt (Liang *et al.*, 2000). Die häufigste Form der Immobilisierung ist die Bildung kovalenter Bindungen zwischen dem Protein und der Matrix, z. B. durch Immobilisierung in Gegenwart von Carbodiimiden, durch Quervernetzung mittels Glutaraldehyd oder durch Aktivierung der Oberfläche mit Cyanogenbromid (Hermanson, 1996). Proteine beinhalten im Allgemeinen verschiedene funktionelle Gruppen, die für diese Form der Immobilisierung genutzt werden können. Darunter befinden sich die ϵ -Aminogruppe von Lysinen und Argininen, der Phenolring von Tyrosinen, die Thiolgruppe von Cysteinen, die Hydroxylgruppe von Serinen und Threoninen, die Imidazolgruppe von Histidinen sowie die Indolgruppe von Tryptophanen. Um eine Inaktivierung des Enzyms zu vermeiden, ist es wichtig, dass die katalytisch funktionellen Gruppen nicht an der kovalenten Bindung an den Träger beteiligt sind.

Die wohl einfachste Technik der nicht-kovalenten Immobilisierung ist die unspezifische, physikalische Adsorption eines Enzyms auf einer soliden Oberfläche (Křenková & Foret, 2004). Diese Methode hat den Nachteil, dass die Stabilität der gebundenen Enzymschicht im Vergleich zur kovalenten Immobilisierung niedriger ist und es daher aufgrund von Veränderungen der Temperatur oder des pH-Werts zur Desorption des Enzyms kommt.

Verglichen mit der unspezifischen, physikalischen Adsorption bietet die spezifische Affinitätsadsorption von Enzymen alle Vorteile einer gerichteten Immobilisierung, insbesondere die gute sterische Zugänglichkeit der aktiven Domäne. Eine Technik zur Immobilisierung eines Enzyms mittels Affinitätsadsorption ist die Ausnutzung der natürlichen Affinität eines fusionierten *linkers* zu seinem Liganden, z. B. von Biotin zu Avidin (Amankwa & Kuhr, 1992; Nouaimi *et al.*, 2001) oder von Protein A aus *Staphylococcus aureus* zu Immunglobulin G (Turková, 1999). Für die spezifische, nicht-kovalente Immobilisierung von Enzymen werden auch Lectine, wie die Cellulose-bindenden Domänen (CBD) aus *Cellulomonas fimi* (Tomme *et al.*, 1996) oder *Clostridium cellulovorans* (Shoseyov *et al.*, 1992), die eine hohe Affinität zu Cellulose oder Chitin aufweisen, eingesetzt (Xu *et al.*, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob die hohe Affinität des LecB-*tags* zu L-Fucose ($K_A = 1,5 \times 10^6$ M) für die Immobilisierung eines fusionierten Enzyms ausgenutzt werden kann. Als Modellenzyme für die Reinigung und die Immobilisierung wurden die beiden lipolytischen Enzyme LipB aus *Bacillus subtilis* (Eggert *et al.*, 2000) sowie CutA aus *Fusarium solani pisi* (Martinez *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1999) eingesetzt.

Der aktive Teil des LipB-Proteins besteht aus 182 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von 19,5 kDa auf. Das Enzym hydrolysiert vor allem Triacylglycerolester sowie *p*NP-Ester von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von ≤ 10 Kohlenstoffatomen.

Der aktive Teil der Cutinase CutA besteht aus 214 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 23 kDa. Die Gene der beiden Enzyme wurden unter Verwendung des Plasmids pURE am 3'-Ende mit der für den LecB-*tag* kodierenden Sequenz fusioniert. Die Überexpression der Genfusionen erfolgte im *E. coli*-Stamm Tuner (DE3), der bereits erfolgreich für die Expression des YFP_{LecB}- sowie CFP_{LecB}-Proteins eingesetzt wurde. Die Synthese sowie die lipolytische Aktivität der Fusionsproteine konnte durch den Einsatz Tributyrin-haltiger Indikatorplatten bestätigt werden (Abb. 30). Wie bereits für das YFP_{LecB}- und CFP_{LecB}-Protein konnte gezeigt werden, dass die Fusion mit dem LecB-*tag* keine Inaktivierung der Enzyme verursacht. Derzeit werden Untersuchungen durchgeführt, die u. a. die Aufnahme der Enzymkinetiken des LipB_{LecB}- sowie CutA_{LecB}-Proteins umfassen, um jeglichen Einfluss des

LecB-tags auf die Enzymaktivität ausschließen zu können. Im Gegensatz zur affinitätschromatographischen Reinigung des YFP_{LecB}- bzw. CFP_{LecB}-Proteins mittels D-Mannose-Agarose konnten bei der Isolierung der lipolytischen Enzyme nur geringe Proteinausbeuten erzielt werden. Während beim CutA_{LecB}-Protein noch etwa 3 mg Protein pro Liter Expressionskultur gewonnen wurden (Abb. 31), betrug die Ausbeute an isoliertem LipB_{LecB}-Protein im selben Kulturvolumen nur etwa 0,5 mg. Die Bestimmung der Enzymaktivität im Rohextrakt, im Durchlauf sowie im Eluat zeigte, dass die geringe Ausbeute nicht durch eine niedrige Syntheserate verursacht wurde. Vielmehr konnte ein Großteil des Fusionsproteins keine Interaktion mit der Säulenmatrix eingehen. In früheren Studien wurde beobachtet, dass konzentriertes LipB-Protein im physiologischen Milieu aggregiert (T. Eggert, Institut für molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, persönliche Mitteilung). Dies könnte die Dimerisierung bzw. Tetramerisierung des fusionierten LecB-Proteins, die für die Interaktion mit der D-Mannose der Säulenmatrix erforderlich ist, behindern. Es werden derzeit verschiedene Ansätze verfolgt, durch veränderte Kulturbedingungen, z. B. Kultivierung bei tiefen Temperaturen oder im alkalischen Milieu, die Enzymausbeuten zu optimieren. Die Menge isolierten LipB_{LecB}-Proteins war dennoch ausreichend, um das Prinzip der LecB-vermittelten Immobilisierung von Enzymen zu überprüfen. Es ist gelungen, das Fusionsprotein spezifisch an der L-Fucose-Matrix zu immobilisieren. Durch intensives Spülen der Säule wurde sichergestellt, dass nicht-immobilisiertes LipB_{LecB}-Protein von der Matrix entfernt wurde. Anschließend wurde die Säule mit der pNPP-Substratlösung beladen und die Menge umgesetzten Substrats im Eluat photometrisch bestimmt. Durch die Bestimmung der Enzymaktivität im Eluat konnte bestätigt werden, dass die Umsetzung des Substrats auf der Säule erfolgte. Um die Stabilität des immobilisierten Enzyms zu überprüfen, wurde der Vorgang insgesamt 5-mal durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität des Enzyms über diesen Zeitraum relativ gleichmäßig erhalten blieb (Abb. 32).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine LecB-vermittelte Immobilisierung von Enzymen unter Ausnutzung der intrinsischen Affinität des Lectins zu L-Fucose möglich ist. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Liese (Institut für Biochemie, Universität Münster) ist die detaillierte Charakterisierung dieses Verfahrens Gegenstand aktueller Studien.

4.2.5 Abschließende Beurteilung des biotechnologischen Potentials des LecB-Proteins

In den bisherigen Studien zur Evaluierung des Anwendungspotentials des LecB-Proteins als Affinitäts-*tag* wurden fünf verschiedene Zielproteine mit dem Lectin fusioniert und in nur einem chromatographischen Schritt in hochreiner Form isoliert. Die Ausbeuten variierten von 0,5-20 mg Zielprotein pro Liter Überexpressionskultur. In keinem der Fälle wurde beobachtet, dass der LecB-*tag* die Konformation des fusionierten Proteins beeinflusst. Außerdem konnten ersten Hinweise darauf erzielt werden, dass der LecB-*tag* als *linker* für die nicht-kovalente Affinitätsadsorption von Enzymen an eine L-Fucose-Matrix eingesetzt werden kann. Ein Nachteil bei der LecB-vermittelten Proteinreinigung stellt sicherlich die Tatsache dar, dass aufgrund des Temperaturoptimums des Lectins die Ausbeute an reinem Protein bei 37 °C maximal ist. Zielproteine mit eingeschränkter Stabilität könnten bei dieser Temperatur durch Proteasen des Wirtsorganismus degradiert werden. Es muss geprüft werden, ob durch den Einsatz von Liganden, für die das LecB-Protein eine höhere Affinität als für die hier verwendete D-Mannose aufweist, der Ertrag auch bei tieferen Temperaturen erhöht werden kann. Darüber hinaus muss untersucht werden, ob der LecB-*tag* auch für die Reinigung multimerer Proteine geeignet ist oder ob unter diesen Bedingungen die für die Bindung an die Säulenmatrix notwendige Dimerisierung/Tetramerisierung des Lectins gestört wird.

5 Zusammenfassung

Das fakultativ pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ist Auslöser einer Vielzahl verschiedenster Infektionen, insbesondere des respiratorischen Traktes von Patienten, die unter Cystischer Fibrose leiden. 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 (alternativ PA-IL) und LecB (alternativ PA-III), die eine natürliche Affinität zu D-Galactose bzw. L-Fucose und D-Mannose aufweisen und diverse cytotoxische Effekte gegenüber Zellen des respiratorischen Epithels auslösen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die physiologische Charakterisierung des LecB-Proteins im Hinblick auf das pathogene sowie biotechnologische Potential dieses Lectins.

- (1) Nach der heterologen Überexpression des *lecB*-Gens in *Escherichia coli* erfolgte die affinitätschromatographische Reinigung des Lectins unter Ausnutzung der intrinsischen Affinität zu D-Mannose. Die Aktivität des rekombinanten LecB-Proteins konnte in Hämagglutinationstests an Kaninchen-Erythrozyten nachgewiesen werden. Das gereinigte Lectin wurde anschließend erfolgreich zur Aufklärung der Proteinstruktur eingesetzt.
- (2) Durch die Deletion der Gene *lecA* und *lecB* wurden Lectin-negative Stämme von *P. aeruginosa* konstruiert, um den Einfluss der Lectine auf den Prozess der Biofilmbildung zu untersuchen. Ausgehend von diesen Stämmen wurde zusätzlich eine Doppelmutante erzeugt, die eine Defizienz in beiden Lectin-Genen aufweist. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung dieser Stämme wurde unter statischen und dynamischen Kulturbedingungen mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) analysiert. Die Untersuchungen ergaben, dass das LecB-Protein zur Ausbildung von Biofilmen beiträgt, da der LecB-negative Stamm im Vergleich zum Wildtyp in diesem Prozess signifikant beeinträchtigt war. Dabei war der Einfluss des Lectins auf die Biofilmbildung unter statischen Bedingungen ausgeprägter als im dynamischen Modell. Aufgrund der Beobachtungen wird angenommen, dass das Lectin durch multivalente Wechselwirkungen mit Polysacchariden der extrazellulären polymeren Substanzen sowie mit Glycostrukturen der Zelloberfläche maßgeblich zur Organisation der Biofilmmatrix beiträgt.

- (3) Aufgrund der Beteiligung des LecB-Proteins am Prozess der Biofilmbildung und der cytotoxischen Effekte des Lectins gegenüber respiratorischen Epithelzellen sollte die subzelluläre Lokalisation des Lectins aufgeklärt werden. Dazu wurden planktonische sowie sessile Zellen von *P. aeruginosa* fraktioniert und das LecB-Protein in den einzelnen Zellkompartimenten immunologisch lokalisiert. Das Lectin konnte sowohl im Cytoplasma als auch in der äußeren Membran der Bakterien nachgewiesen werden. Ferner wurde gezeigt, dass die Assoziation des Lectins mit der äußeren Zellmembran auf der Interaktion mit LecB-spezifischen Glycostrukturen beruht. Die Präsenz potentieller Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche konnte unter Verwendung einer fluoreszenzmarkierten LecB-Variante mittels CLSM dokumentiert werden.
- (4) Wie gezeigt wurde, ist ein erheblicher Anteil des LecB-Proteins mit der äußeren Membran von *P. aeruginosa* assoziiert. Dabei weist das Lectin keines der derzeit bekannten N-terminalen Sekretionssignale auf. In Homologie zum Sekretionsmotiv einer Nukleosid Diphosphat Kinase aus *P. aeruginosa* beinhaltet das LecB-Protein in der Nähe des C-Terminus ein D-A-V-V-Tetrapeptid. Durch die immunologische, subzelluläre Lokalisierung einer mutierten LecB-Variante, in der die Sequenz dieses putativen Sekretionsmotivs gegen vier Alanine ausgetauscht wurde, konnte der Einfluss des Tetrapeptids auf die LecB-Sekretion belegt werden. Analysen der Struktur-Funktions-Beziehung ergaben, dass das Motiv mit der Ca^{2+} -abhängigen Zuckerbindestelle des Lectins überlappt. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob das D-A-V-V-Tetrapeptid, ähnlich dem C-terminalen Signal von Typ I-Substraten, ein „echtes“ Sekretionsmotiv darstellt oder ob vielmehr die Fähigkeit zur Zuckerbindung eine essentielle Voraussetzung für die Translokation des Proteins in die äußere Membran ist.
- (5) Zudem konnte gezeigt werden, dass das LecB-Protein unter Ausnutzung der intrinsischen Affinität zu D-Mannose als Affinitäts-*tag* für die effiziente Ein-Schritt-Reinigung rekombinanter Proteine eingesetzt werden kann. Dazu wurden verschiedene Modellproteine mit dem Lectin fusioniert und nach der Produktion in *E. coli* in einem einzigen chromatographischen Schritt mittels einer D-Mannose-Agarosematrix aus dem Rohextrakt isoliert. Darüber hinaus wurde das LecB-Protein erfolgreich als *linker* für die spezifische, nicht-kovalente Immobilisierung einer Lipase aus *Bacillus subtilis* an eine L-Fucose-Agarosematrix eingesetzt.

6 Literatur

- 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
- Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., Croughan, T.P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67
- 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
- Alverdy, J., Holbrook, C., Rocha, F., Seiden, L., Wu, R.L., Musch, M., Chang, E., Ohman, D., Suh, S. (2000). Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host: evidence for *in vivo* virulence expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Surg* **232**: 480-489
- Amankwa, L.N. & Kuhr, W.G. (1992). Trypsin-modified fused-silica capillary microreactor for peptide-mapping by capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* **64**: 1610-1613
- Avichezer, D. & Gilboa-Garber, N. (1987). PA-II, the L-fucose and D-mannose binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates human peripheral lymphocytes and murine splenocytes. *FEBS Lett* **216**: 62-66
- Avichezer, D. & Gilboa-Garber, N. (1991). Antitumoral effects of *Pseudomonas aeruginosa* lectins on Lewis lung carcinoma cells cultured *in vitro* without and with murine splenocytes. *Toxicon* **29**: 1305-1313
- 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
- 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
- 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
- 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
- Barondes, S.H. (1988). Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem Sci* **13**: 480-482
- Bartels, K. (2004). Lektin B aus *Pseudomonas aeruginosa*. Evaluierung des Anwendungspotentials als Affinitäts-,Tags“. Diplomarbeit, Ruhr-Universität-Bochum
- Bao, Y., Lies, D.P., Fu, H., Roberts, G.P. (1991). An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene* **109**: 167-168
- Beachey, E.H. (1980). 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
- Berks, B.C., Sargent, F., Palmer, T. (2000).** The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**: 260-274
- Beuth, J., Ko, H.L., Pulverer, G. (1987).** Lectin-mediated bacterial adhesion to human tissue. *Europ. J Clin Microbiol* **6**: 591-593
- Beuth, J., Stoffel, B., Ko, H.L., Jeljaszewicz, J., Pulverer, G. (1995).** Mistellektin-1: neue therapeutische Perspektiven in der Onkologie. *Onkologie* **18**: 36-40
- Beuth, J., Stoffel, B., Pulverer G. (1996).** Inhibition of bacterial adhesion and infections by lectin blocking. In: Kahane, I., Ofek, I. (eds.): Toward anti adhesion therapy for microbial disease Plenum Press, New York, pp. 51-56
- 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
- Borsing, L., Berger, E.G., Malissard, M. (1997).** Expression and purification of His-tagged β -1,4 galactosyltransferase in yeast and in COS cells. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 586-590
- 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
- Bouckaert, J., Loris, R., Poortmans, F., Wyns, L. (1995).** Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. *Proteins* **23**: 510-524
- Bouckaert, J., Loris, R., Wyns, L. (2000).** Zinc/calcium- and cadmium/cadmium-substituted concanavalin A: interplay of metal binding, pH and molecular packing. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**: 1569-1576
- Bourne, Y., Roussel, A., Frey, M., Rougé, P., Fontecilla-Camps, J.-C. (1990).** Three dimensional structures of complexes of *Lathyrus ochrus* isolectin I with glucose and mannose: fine specificity of the monosaccharide-binding site. *Proteins* **8**: 365-376
- 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
- Brimer, C.D. & Montie, T.C. (1998).** Cloning and comparison of *fliC* genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *J Bacteriol* **180**: 3209-3217
- Brint, J.M. & Ohman, D. E. (1995).** Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, 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
- Carvalho, C.M., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M. (1999).** Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng* **66**: 17-34
- Castric, P., Cassels, F.J., Carlson, R.W. (2001).** Structural characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycan. *J Biol Chem* **276**: 26479-26485

- Chapleur, Y. (1998).** Carbohydrate Mimics. Wiley-VCH: Weinheim
- Chrispeels, M.J. & Raikhel, N.V. (1991).** Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **3**: 1-9
- Chen, B.P. & Hai, T. (1994).** Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* **139**: 73-75
- 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
- Collier, R.J. (2001).** Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* **39**: 1793-1803
- 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
- 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.W. (1995).** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* **15**: 137-140
- 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. (1999).** Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 217-221
- 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
- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D., Henco, K. (1994).** 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* **31**: 371-387
- 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
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y. (1995).** Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448-455
- Culina, S., Lauvau, G., Gubler, B., van Endert, P.M. (2004).** Calreticulin promotes folding of functional human leukocyte antigen class I molecules *in vitro*. *J Biol Chem* **279**: 54210-54215
- Cywes, C., Stamenkovic, I., Wessels, M.R. (2000).** CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus*. *J Clin Invest* **106**: 995-1002
- 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
- de Kievit, T.R. & Iglewski, B.H. (2000).** Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* **68**: 4839-4849
- de Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B.H. (2001).** Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1865-1873
- DiGiandomenico, A., Matewish, M.J., Bisaillon, A., Stehle, J.R., Lam, J.S., Castric, P. (2002).** Glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin: glycan substrate specificity. *Mol Microbiol* **46**: 519-530

- Diggle, S.P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P., Camara, M. (2002).** Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**: 2576-2586
- Di Guan, C., Li, P., Riggs, P.D., Inouye, H. (1988).** Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**: 21-30
- Dobos, K.M., Swiderek, K., Khoo, K.H., Brennan, P.J., Belisle, J.T. (1995).** Evidence for glycosylation sites on the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **63**: 2846-2853
- Drucker, M., German-Retana, S., Esperandieu, P., LeGall, O., Blanc, S. (2002).** Purification of viral protein from infected plant tissues using the Strep-tag. *Biotechnol Intl June*: 16-18
- Diaz, C., Melcher, L.S., Hookyaas, P.J.J., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W. (1989).** Root lectins as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* **338**, 579-581
- 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. & Hofnung, M. (1988).** Two regions of mature periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* involved in secretion. *J Bacteriol* **170**: 4445-4450
- East, L. & Isacke, C.M. (2002).** The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* **1572**: 364-386
- Economou, A. (1999).** Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* **7**: 315-320
- Elkin, S. & Geddes, D. (2003).** Pseudomonal infection in cystic fibrosis: the battle continues. *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**: 609-618
- 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
- Erickson, P.R. & Herzberg, M.C. (1993).** Evidence for the covalent linkage of carbohydrate polymers to a glycoprotein from *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem* **268**: 23780-23783
- Ernst, W.J., Spenger, A., Toellner, L., Katinger, H., Grabherr, R.M. (2000).** Expanding baculovirus surface display. Modification of the native coat protein gp64 of *Autographa californica* NPV. *Eur J Biochem* **267**: 4033-4039
- Espinosa-Urgel, M. (2003).** Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J Bacteriol* **185**: 699-700
- Etzler, M.E. (1986).** Distribution and function of plant lectins. In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I. J. (eds.): *The Lectins*. Academic Press, San Diego, pp. 371-435
- 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
- Filloux, A. (2004).** The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 163-179
- 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
- Fontaine, L., Meynial-Salles, I., Girbal, L., Yang, X., Croux, C., Soucaille, P. (2002).** Molecular characterization and transcriptional analysis of *adhE2*, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **184**: 821-830
- Franz, H., Bergmann, P., Ziska, P. (1979).** Combination of immunological and lectin reactions in affinity histochemistry: proposition of the term affinitin. *Histochemistry* **56**: 335-342
- Friedman, L. & Kolter, R. (2004a).** Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* **186**: 4457-4465

- Friedman, L. & Kolter, R. (2004b).** Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* **51**: 675-690
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P. (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 34-40
- Gabius, H.J. (2000).** Biological information transfer beyond the genetic code: The sugar code. *Naturwissenschaften* **87**: 108-121
- 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. & Iglewski, B.H. (1991).** Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* **173**: 3000-3009
- 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
- Gentschev, I., Dietrich, G., Goebel, W. (2002).** The *E. coli* α -hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* **10**: 39-45
- Ghigo, J.M. & Wandersman, C. (1994).** A carboxyl-terminal four-amino acid motif is required for secretion of the metalloprotease PrtG through the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion pathway. *J Biol Chem* **269**: 8979-8985
- 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. (1982).** *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Methods Enzymol* **83**: 378-385
- Gilboa-Garber, N. (1986).** Lectins of *Pseudomonas aeruginosa*: properties, biological effects and applications. In: Mirelman, D. (ed.): Microbial lectins and agglutinins. Properties and biological activity. John Wiley & Sons., New York, USA, pp. 255-269
- 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 infections. *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-Garber, 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
- Govan, J.R. & Deretic, V. (1996).** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**: 539-574
- Goldstein, I.J. & Hayes, C.E. (1978).** The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **35**: 127-340

- Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980).** What should be called a lectin? *Nature* **285**: 66
- Gorelik, J.V., Cherepanova, O.A., Voronkina, I.V., Diakonov, I.A., Blinova, M.I., Pinaev, G.P. (2001).** Laminin-2/4 from human placenta is a better adhesion agent for primary keratinocytes than laminin-1 from EHS sarcoma. *Cell Biol Int* **25**: 395-402
- Grant, G., Bardocz, S., Ewen, S.W., Brown, D.S., Duguid, T.J., Pusztai, A., Avichezer, D., Sudakevitz, D., Belz, A., Garber, N.C. (1995).** Purified *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin induces gut growth when orally ingested by rats. *FEMS Immunol Med Microbiol* **11**: 191-196
- Grobe, S., Wingender, J., Truper, H.G. (1995).** Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J Appl Bacteriol* **79**: 94-102
- Gross, D.C. & Cody, Y.S. (1985).** Mechanism of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. *Can J Microbiol* **31**: 403-410
- Groß, R., Pisa, R., Simon, J., Krüger, A. (2002).** Isolierung der trimeren Hydrogenase aus *Wolinella succinogenes* durch StrepTactin-Affinitätschromatographie. *Biospektrum* **1**:101
- Guan, K.L. & Dixon, J.E. (1991).** Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* **192**: 262-267
- Gyles, C.L. (1992).** *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol* **38**: 734-746
- Hahn, H.P. (1997).** The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Gene* **192**: 99-108
- Halliwell, C.M., Morgan, G., Ou, C.P., Cass, A.E. (2001).** Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Anal Biochem* **295**: 257-261
- Hamilton, S.R., O'Donnell, J.B., Jr., Hammet, A., Stapleton, D., Habinowski, S.A., Means, A.R., Kemp, B.E., Witters, L.A. (2002).** AMP-activated protein kinase kinase: detection with recombinant AMPK alpha1 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 892-898
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hans, M. & Buckel, W. (2000)** Purification of recombinant component A of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans* using Strep-Tactin affinity-chromatography. *Biotechnol Intl September*: 12
- Hanson, M.S. & Brinton, C.C., Jr. (1988).** Identification and characterization of *E. coli* type-1 pilus tip adhesion protein. *Nature* **332**: 265-268
- Hearn, M.T. & Acosta, D. (2001).** Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins. *J Mol Recognit* **14**: 323-369
- Heim, R., Prasher, D.C., Tsien, R.Y. (1994).** Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 12501-12504
- Hefti, M.H., Van Vugt-Van der Toorn, C.J., Dixon, R., Vervoort, J. (2001).** A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal Biochem* **295**: 180-185
- 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
- Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M.R. (2001).** Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* **183**: 5395-5401
- Hester, G., Kaku, H., Goldstein, I.J., Whright, C.S. (1995).** Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. *Nat Struct Biol* **2**: 472-479
- 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
- Hermanson, G. T. (1996).** Bioconjugate Techniques. Academic Press, San Diego.

- Heydorn, A., Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S. (2002).** Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2008-2017
- Hirsch, A.M. (1999).** Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 320-326
- Hochuli, E., Dobeli, H., Schnacher, A. (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatog* **411**: 177-184
- Hoiby, N. (2002).** Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros* **1**: 249-254
- 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
- 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
- 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
- Hynes, S.O., Teneberg, S., Roche, N., Wadstrom, T. (2003).** Glycoconjugate binding of gastric and enterohepatic *Helicobacter* spp. *Infect Immun* **71**: 2976-2980
- Imberty, 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
- Irjala, H., Johansson, E.L., Grenman, R., Alanen, K., Salmi, M., Jalkanen, S. (2001).** Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium. *J Exp Med* **194**: 1033-1041
- Irvin, R.T. & Bautista, D.L. (1999).** Hope for the post-antibiotic era? *Nature Biotechnol* **17**: 20-20
- 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/DGDM Workshop on molecular pathogenesis of bacteria - basic and applied aspects. Schierke
- Jaeger, K.-E., Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Reetz, M. T. (1996a).** Biotechnological application of *Pseudomonas aeruginosa* lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**: 99-105
- Jaeger, K.-E., Schneidinger, B., Liebeton, K., Haas, D., Reetz, M.T., Phillipou, S., Gerritse, G., Ransac, S., Dijkstra, B.W. (1996b).** Lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular biology and biotechnical application, In: Nakazawa *et al.* (eds): Molecular biology of *Pseudomonads*. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 319-330
- 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
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. (1999).** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol* **53**: 315-351
- Jaeger, K.-E. & Reetz, M.T. (2000).** Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 68-73

- Jaffé, W.G. & Vega Lette, C. L. (1986).** Heat labile growth inhibiting factors in bean (*Phaseolus vulgaris*). *J Nutr* **94**: 203-210
- Janakiraman, M.N., White, C. L., Laver, W. G., Air, G. M. A., Luo, M. (1994).** Structure of influenza virus neuraminidase B/Lee/40 complexed with sialic acid and a dehydro analog at 1.8-Å resolution: implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* **33**: 8172-8179
- Janknecht, R. & Nordheim, A. (1992).** Affinity purification of histidine-tagged proteins transiently produced in HeLa cells. *Gene* **121**: 321-324
- Jayne-Williams, D.J. & Burgess, C.D. (1974).** Further observation on the toxicity of navy beans (*Phaseolus vulgaris*) for Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Appl Bacteriol* **37**: 149-169
- Juda, G.A., Bollinger, J.A., Dooley, D.M. (2001).** Construction, overexpression, and purification of *Arthrobacter globiformis* amine oxidase-Strep-tag II fusion protein. *Protein Expr Purif* **22**: 455-461
- Kadurugamuwa, J.L. & Beveridge, T.J. (1995).** Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth an exposure to Gentamicin; a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* **177**: 3998-4008
- Kamath, S., Chen, M.L., Chakrabarty, A.M. (2000).** Secretion of nucleoside diphosphate kinase by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* 8821: involvement of a carboxy-terminal motif in secretion. *J Bacteriol* **182**: 3826-3831
- 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
- Kaslow, D.C. & Shiloach, J. (1994).** Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose. *Biotechnology* **12**: 494-499
- Kavoosi, M., Meijer, J., Kwan, E., Creagh, A.L., Kilburn, D.G., Haynes, C.A. (2004).** Inexpensive one-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with the family 9 carbohydrate-binding module of xylanase 10A from *T. maritima*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **807**: 87-94
- Kelly, C.G., Younson, J.S., Hikmat, B.Y., Todryk, S.M., Czisch, M., Haris, P.I., Flindall, I.R., Newby, C., Mallet, A.I., Ma, J.K.C., Lehner, T. (1999).** A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent. *Nat Biotechnol* **17**: 42-47
- Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K.N. (1992).** A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**: 293-301
- Kilpatrick, D.C. (2002).** Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta* **1572**: 187-197
- 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
- Koch, B., Jensen, L.E., Nybroe, O. (2001).** A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* **45**: 187-195
- Kocourek, J. & Horejsi, V. (1981).** Defining a lectin. *Nature* **290**: 188
- Kolatkhar, A.R., Weis, W.I. (1996).** Structural basis of galactose recognition by C-type animal lectins. *J Biol Chem* **271**: 6679-6685
- Kok, R.G., Christoffels, V.M., Vosman, B., Hellingwerf, K.J. (1993).** Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**: 2329-2342
- Korstgens, V., Flemming, H.C., Wingender, J., Borchard, W. (2001).** Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci Technol* **43**: 49-57
- Koenig, B., Jaeger, K.-E., Sage, A.E., Vasil, M.L., Koenig, 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

- 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
- Korndörfer, I.P. & Skerra, A. (2002).** Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein Sci* **11**: 883-893
- Kraulis, P. (1991).** MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Crystallogr* **24**:924-950
- Křenková, J. & Foret, F. (2004).** Immobilized microfluidic enzymatic reactors. *Electrophoresis* **25**: 3550-3563
- Kuusinen, A., Arvola, M., Oker-Blom, C., Keinänen, K. (1995).** Purification of recombinant GluR-D glutamate receptor produced in Sf21 insect cells. *Eur J Biochem* **233**: 720-726
- Ladisch, M.R. (2001).** *Bioseparations Engineering: Principles, Practice, and Economics*, Wiley, New York
- 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
- 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. *Glyconjug J* **11**: 292-298
- Latifi, A., Winson, M.K., Foglino, M., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Lazdunski, A., Williams, P. (1995).** Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **17**: 333-343
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., Lazdunski, A. (1996).** A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**: 1137-1146
- 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
- Lauwereys, M., De Geus, P., De Meutter, J., Stanssens, P., Mathysens, G. (1991).** Cloning, expression and characterization of cutinase, a fungal lipolytic enzyme. In *Lipases-Structure, function and genetic engineering*, L. Alberghina, RD Schmid & R Verger, VCH Weinheim, pp. 243-251
- 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
- Lescar, J., Loris, R., Mitchell, E., Gautier, C., Chazalet, V., Cox, V., Wyns, L., Perez, S., Breton, C., Imberty, A. (2002).** Isolectins I-A and I-B of *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia*. Crystal structure of metal-free GS I-B(4) and molecular basis for metal binding and monosaccharide specificity. *J Biol Chem* **277**: 6608-6614
- Letoffe, S., Delepelaire, P., Wandersman, C. (1990).** Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *Embo J* **9**: 1375-1382
- Liang, J.F., Li, Y.T., Yang, V.C. (2000).** Biomedical application of immobilized enzymes. *J Pharm Sci* **89**: 979-990
- Liener, E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (1986).** *The Lectins*. Academic Press, London
- Liener, I.E. (1986).** Nutritional significance of lectins in the diet. In: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (eds.): *The Lectins*. Academic Press, San Diego, pp. 527-552
- Liu, P.V. (1979).** Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Doggert, R.G. (ed.): *Clinical manifestations of infection and current therapy*. Academic Press, New York, pp. 63-88
- 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
- Low, D., Braaten, B., van der Woude, M. (1996). Fimbriae. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Vol. 1. Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B. et al. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 146-157
- Lowe, C.R., Lowe, A.R., Gupta, G. (2001). New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. *J Biochem Biophys Methods* **49**: 561-574
- 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
- Lu, J.H., Teh, C., Kishore, U., Reid, K.B.M. (2002). Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta* **1572**: 387-400
- 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
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2000). Biology of microorganisms, 9th edition. Prentice Hall, New Jersey
- 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
- Markwell, M.A.K., Portner, A., Schwartz, A.L. (1985). An alternative route of infection for virus entry by means of the asialoglycoprotein receptor of a Sendai virus mutant lacking attachment protein. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 978-982
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthysens, G., Cambillau, C. (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* **356**: 615-618
- Matsukawa, M. & Greenberg, E.P. (2004). Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **186**: 4449-4456
- McEver, R.P. (1997). Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J* **14**: 585-591
- McCormick, M. & Berg, J. (1997). Purification and S-Tag detection of CBD fusion proteins. *Innovations* **7**: 12-15
- McKnight, S.L., Iglewski, B.H., Pesci, E.C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 2702-2708
- 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
- Miller, D.M., 3rd, Olson, J.S., Pflugrath, J.W., Quioco, F.A. (1983). Rates of ligand binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J Biol Chem* **258**: 13665-13672
- 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-IIL: 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
- Morimoto, M., Saimoto, H., Usui, H., Okamoto, Y., Minami, S., Shigemasa, Y. (2001). Biological activities of carbohydrate-branched chitosan derivatives. *Biomacromolecules* **2**: 1133-1136
- Murdock, L.L., Huesing, J.E., Nielsen, S.S., Pratt, R.C., Shade, R.E. (1990). Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* **29**: 85-89
- 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
- Mysore, J.V., Wigginton, T., Simon, P.M., Zopf, D., Heman-Ackah, L.M., Dubois, A. (1999). Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. *Gastroenterology* **117**: 1316-1325
- Murphy, J.T. & Lagarias, J.C. (1997). Purification and characterization of recombinant affinity peptide-tagged oat phytochrome A. *Photochem Photobiol* **65**: 750-758
- Nahalka, J., Liu, Z., Chen, X., Wang, P.G. (2003). Superbeads: immobilization in "sweet" chemistry. *Chemistry* **9**: 372-377
- 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
- Naismith, J.H., Emmerich, C., Habash, J., Harrop, S.J., Helliwell, J.R., Hunter, W.N., Raftery, J., Kalb (Gilboa), A.J., Yariv, J. (1994). Refined structure of concanavalin A complexed with α -methyl-D-mannopyranoside at 2.0 angstroms resolution and comparison with the saccharide free structure. *Acta Crystallog* **D50**: 847-858
- Nicas, T.L. & Iglewski, B.H. (1986). Toxins and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Socatch, J.R. (ed.) The bacteria, Vol X: The biology of *Pseudomonas*. Academic Press, Orlando, pp. 195-213
- Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J., Franklin, M.J. (2001). Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* **183**: 1047-1057
- Ng, K.K., Drickamer, K., Weis, W.I. (1996). Structural analysis of monosaccharide recognition by rat liver mannose-binding protein. *J Biol Chem* **271**: 663-674
- Ng, K.K., Park-Snyder, S., Weis, W.I. (1998). Ca²⁺-dependent structural changes in C-type mannose-binding proteins. *Biochemistry* **37**: 17965-17976
- Nouaimi, M., Moschel, K., Bisswanger, H. (2001). Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers. *Enzyme Microb Technol* **29**: 567-574
- Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A., Reiser, J. (1994). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **176**: 2044-2054
- 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., Beachey, E.H., Sharon, N. (1978). Surface sugars of animal cell as determinants of recognition in bacterial adherence. *Trends Biochem Sci* **3**: 159
- 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
- Old, D.C. (1972). Inhibition of the interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. *J Gen Microbiol* **30**: 149-157
- Olson, G.J., Woese, C.R., Overbeck, R. (1994). The wind of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* **176**: 1-6

- Osborn, H.M.I., Evans, P.G., Gemmell, N., Osborne, S.D. (2004). Carbohydrate-based therapeutics. *J Pharm Pharmacol* **56**: 691-702
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., Michel, H. (1997). Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 10547-10553
- Orndorff, P.E., Devapali, A., Palestrant, S., Wyse, A., Everett, M.L., Bollinger, R.R., Parker, W. (2004). Immunoglobulin-mediated agglutination of and biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 require the type 1 pilus fiber. *Infect Immun* **72**: 1929-1938
- O'Toole, G.A. & Kolter, B. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304
- O'Toole, G.A. (2004). Microbiology: Jekyll or hide? *Nature* **432**: 680-681
- Pallanca, A., Mazzaracchio, R., Brigotti, M., Carnicelli, D., Alvergnà, P., Sperti, S., Montanaro, L. (1998). Uncompetitive inhibition by adenine of the RNA-N-glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins. *Biochim Biophys Acta* **1384**: 277-284
- Palleroni, N.J. (1984). *Pseudomonaceae*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 141-199
- Palleroni, N.J. (1986). Taxonomy of the Pseudomonads. In: Sokatch, J.R. (ed.) *The bacteria*, Vol X: The biology of *Pseudomonas*. Academic Press, Orlando, pp. 3-20
- Palleroni, N.J. (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 231-251
- 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
- Pesci, E.C. & Iglewski, B.H. (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Dunny, G.M., Winans, S.C. (eds.): *Cell-cell signaling in bacteria*. ASM Press, Washington, D. C., pp. 147-155
- Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., Iglewski, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11229-11234
- 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
- Podmore, A.H. & Reynolds, P.E. (2002). Purification and characterization of VanXY(C), a D,D-dipeptidase/D,D-carboxypeptidase in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Eur J Biochem* **269**: 2740-2746
- Poget, S.F., Legge, G.B., Proctor, M.R., Butler, P.J., Bycroft, M., Williams, R.L. (1999). The structure of a tunicate C-type lectin from *Polyandrocarpa misakiensis* complexed with D-galactose. *J Mol Biol* **290**: 867-879
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-599
- Poretz, R.D., Riss, H., Timberlake, J.H., Chien, S.M. (1974). Purification and properties of the hemagglutinin from *Sophorica japonica* seeds. *Biochemistry* **13**: 375-384
- Power, P.M. & Jennings, M.P. (2003). The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 211-222
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233
- Pratt, A. & Kolter, R. (1998). Genetic analyses of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**: 285-293
- Preston, M.J., Fleiszig, S.M., Zaidi, T.S., Goldberg, J.B., Shortridge, 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
- Prince, A. (1992). Adhesins and receptors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with infection of the respiratory tract. *Microb Pathog* **13**: 251-260

- Pusztai, A., Clarke, E.M.W., King, T.P. (1979).** The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc Nutr Soc* **38**: 115-120
- Quichio, F.A. (1989).** Atomic interactions between proteins and carbohydrates. *Am Crystallogr Assoc* **25**: 23-35
- Quinn, J.P. (1992).** Intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Rank, K.B., Mildner, A.M., Leone, J.W., Koeplinger, K.A., Chou, K.C., Tomasselli, A.G., Heinrichson, R.L., Sharma, S.K. (2001).** [W206R]-procaspase 3: an inactivatable substrate for caspase 8. *Protein Expr Purif* **22**: 258-266
- Reddy, S.T., Chai, W.G., Childs, R.A., Page, J.D., Feizi, T., Dahms, N.M. (2004).** Identification of a low affinity mannose 6-phosphate-binding site in domain 5 of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* **279**: 38658-38667
- Reisner, A., Hoiby, N., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2005).** Microbial pathogenesis and biofilm development. *Contrib Microbiol* **12**: 114-131
- Reyes, F., Roldan, M.D., Klipp, W., Castillo, F., Moreno-Vivian, C. (1996).** Isolation of periplasmic nitrate reductase genes from *Rhodobacter sphaeroides* DSM 158: structural and functional differences among prokaryotic nitrate reductases. *Mol Microbiol* **19**: 1307-1318
- Rhim, A.D., Stoykova, L., Glick, M.C., Scanlin, T.F. (2001).** Terminal glycosylation in cystic fibrosis (CF): a review emphasizing the airway epithelial cell. *Glycoconj J* **18**: 649-659
- Richardson, P.D. & Steiner, M. (1995).** Principles of cell adhesion. CRC Press, Boca Raton
- Rini, J.M., Hardman, K.D., Einspahr, H., Suddath, F.L., Carver, J.P. (1993).** X-ray crystal structure of a pea-lectin-trimannosid complex at 2.6 Å resolution. *J Biol Chem* **268**: 10126-10132
- 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
- Rogers, G.N. & Paulson, J.C. (1983).** Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **127**: 361-373
- 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
- Rüdiger, H., Siebert, H.C., Solis, D., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., von der Lieth, C.W., Diaz-Marino, T., Gabius, H.J. (2000).** Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Curr Med Chem* **7**: 389-416
- Rüdiger, H. & Gabius, H.J. (2001).** Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J* **18**: 589-613
- Sachdev, D. & Chirgwin, J.M. (1999).** Properties of soluble fusions between mammalian aspartic proteinases and bacterial maltose-binding protein. *J Protein Chem* **18**: 127-136
- Sachdev, D. & Chirgwin, J.M. (2000).** Fusions to maltose-binding protein: control of folding and solubility in protein purification. *Methods Enzymol* **326**: 312-321
- 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
- 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
- Sárdy, M., Kárpáti, S., Merkl, B., Paulsson, M., Smyth, N. (2002).** Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med* **195**: 747-757
- 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
- Scanlin, T.F. & Glick, M.C. (2001). Glycosylation and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Respir Res* **2**: 276-279
- 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
- Schembri, M.A. & Klemm, P. (2001). Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *Embo J* **20**: 3074-3081
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng* **6**: 109-122
- Schmidt, M., Tuominen, N., Johansson, T., Weiss, S.A., Keinänen, K., Oker-Blom, C. (1998). Baculovirus-mediated large-scale expression and purification of a polyhistidine-tagged rubella virus capsid protein. *Protein Expr Purif* **12**: 323-330
- Schmitt, L. & Tampe, R. (2002). Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 754-760
- 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
- 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
- Shankar, S., Kamath, S., Chakrabarty, A.M. (1996). Two forms of the nucleoside diphosphate kinase of *Pseudomonas aeruginosa* 8830: altered specificity of nucleoside triphosphate synthesis by the cell membrane-associated form of the truncated enzyme. *J Bacteriol* **178**: 1777-1781
- Sharon, N. & Lis, H. (1972). Lectins. Cell agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **177**: 949-959
- Sharon, N. & Ofek, I. (2002). Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues. *Crit Rev Food Sci Nutr* **42**: 267-272
- Shori, D.K., Genter, T., Hansen, J., Koch, C., Wyatt, H., Kariyawasam, H.H., Knight, R.A., Hodson, M.E., Kalogeridis, A., Tsanakas, I. (2001). Altered sialyl- and fucosyl-linkage on mucins in cystic fibrosis patients promotes formation of the sialyl-Lewis X determinant on salivary MUC-5B and MUC-7. *Pflugers Arch* **443**: S55-61
- Shoseyov, O., Takagi, M., Goldstein, M.A., Doi, R.H. (1992). Primary sequence analysis of *Clostridium cellulovorans* cellulose binding protein A. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 3483-3487
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-791
- 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
- 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
- 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
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40
- 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
- Stepanović, S., Vukovic, D., Jezek, P., Pavlovic, M., Svabic-Vlahovic, M. (2001). Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**: 502-504

- 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
- Stewart, P.S. & Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**: 135-138
- Stickler, D. (1999). Biofilms. *Curr Opin Microbiol* **2**: 270-275
- Stillmark, H. (1888). Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Inaug. Diss Dorpat.
- Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H.C. (2002). Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* **50**: 237-248
- Strathmann, M. (2003). Visualisierung und Charakterisierung von extrazellulären polymeren Substanzen in Biofilmen. Dissertation, Universität Duisburg-Essen
- Strynadka, N.C. & James M.N. (1991). Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site. *D Biol* **220**: 401-424
- 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., Gilboa-Garber, N., Mizrahi, L. (1979). Regulation of lectin production in *Pseudomonas aeruginosa* by culture medium composition. *Israel J Med Sci* **15**: 97
- 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. (2005). 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
- Sugamata, Y. & Shiba, T. (2005). Improved secretory production of recombinant proteins by random mutagenesis of *hlyB*, an alpha-hemolysin transporter from *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 656-662
- 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
- Swift, S., Williams, P., Stewart, G.S.A.B. (1999). N-Acylhomoserine lactones and quorum sensing in proteobacteria. In: Dunny, G. M., Winans, S. C. (eds.): Cell-cell signaling in bacteria, ASM Press, Washington, D. C., pp. 291-313
- 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
- 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
- Tischer, W. & Kasche, V. (1999). Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol* **17**: 326-335
- Thomas, R.J. & Brooks, T.J. (2004). Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to human respiratory epithelial cells. *Microb Pathog* **36**: 83-92
- Thomsson, K.A., Hinojosa-Kurtzberg, M., Axelsson, K.A., Domino, S.E., Lowe, J.B., Gendler, S.J., Hansson, G.C. (2002). Intestinal mucins from cystic fibrosis mice show increased fucosylation due to an induced Fuc-alpha1-2 glycosyltransferase. *Biochem J* **367**: 609-616
- 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**: 6482-8489
- Timmermans, M.C., Maliga, P., Vieira, J., Messing, J. (1990). The pFF plasmids: cassettes utilising CaMV sequences for expression of foreign genes in plants. *J Biotechnol* **14**: 333-344
- Tomme, P., Boraston, A., McLean, B., Kormos, J., Creagh, A.L., Sturch, K., Gilkes, N.R., Haynes, C.A., Warren, R.A., Kilburn, D.G. (1998). Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **715**: 283-296
- Tomme, P., Gilkes, N.R., Guarna, M.M., Haynes, C.A., Hasenwinkle, D., Jervis, E., Johnson, P., McIntosh, L., Warren, R.A., Kilburn, D.G. (1996). Cellulose-binding domains. Versatile affinity tags for inexpensive large-scale purification, concentration, and immobilization of fusion proteins. *Ann N Y Acad Sci* **799**: 418-424
- Turková, J. (1999). Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **722**: 11-31
- Uhlenbruck, G. (1983). Die Biologie der Lektine: Eine biologische Lektion. *Funct Biol Med* **2**: 40
- Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T., Jaeger, K.E. (2001). DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 587-596
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 6911-6916
- Vaillancourt, P., Simcox, T.G., Zheng, C.F. (1997). Recovery of polypeptides cleaved from purified calmodulin-binding peptide fusion proteins. *Biotechniques* **22**: 451-453
- Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S., Filloux, A. (2005). The *pel* genes of *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* **151**: 985-997
- Vierbuchen, M., Peters, G., Ortman, M., Fischer, R. (1989). Topography and mechanism of the adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* bacteria in the kidney and renal pelvis. *Verh Dtsch Ges Pathol* **73**: 264-267
- Vierbuchen, M. (1991). Lectin receptors. *Curr Top Pathol* **83**: 271-361
- 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
- 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
- Voss, S. & Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng* **10**: 975-982
- Vyas, N.K. (1991). Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Curr Opin Struct Biol* **1**: 732-740
- 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
- Watanabe, K., Honjo, E., Tsukamoto, T., Funatsu, G. (1992). Fluorescence studies on the interaction of adenine with ricin A-chain. *FEBS Lett* **304**: 249-251
- Watnick, P.I. & Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol* **34**: 586-595
- 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
- Wentworth, J.S., Austin, F. E., Garber, N. C., Gilboa-Garber, N., Paterson, C. A., Doyle, R. J. (1991). Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *P. aeruginosa*. *Biofouling* **4**: 99-104
- 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
- Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864
- Wilchek, M. & Chaiken, I. (2000). An overview of affinity chromatography. *Methods Mol Biol* **147**: 1-6
- 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
- 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
- Williams, R.L., Oren, D.A., Munoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M., Arnold, E. (1993). Crystal structure of *Myxococcus xanthus* nucleoside diphosphate kinase and its interaction with a nucleotide substrate at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **234**: 1230-1247
- Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G.P., Bycroft, B.W., et al. (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 9427-9431
- Wimpney, J., Manz, W., Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 661-671
- Wingender, J. & Flemming, H.-C. (1999). Autoaggregation of microorganisms: flocs and biofilms. In: Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P., (eds.): *Biotechnology, Vol 11a: environmental processes I*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 65-83
- 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
- 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
- Sudha, P.S., Devaraj, H., Devaraj, N. (2001). Adherence of *Shigella dysenteriae* 1 to human colonic mucin. *Curr Microbiol* **42**: 381-387
- Young, N.M., Johnston, R.A., Watson, D.C. (1991). The amino acid sequence of peanut agglutinin. *Eur J Biochem* **196**: 631-637
- Xu, K., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C.-T., McFeters, G. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4035-4039
- Xu, Z., Bae, W., Mulchandani, A., Mehra, R.K., Chen, W. (2002). Heavy metal removal by novel CBD-EC20 sorbents immobilized on cellulose. *Biomacromolecules* **3**: 462-465
- 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
- Zaborina, O., Misra, N., Kostal, J., Kamath, S., Kapatral, V., El-Idrissi, M.E., Prabhakar, B.S., Chakrabarty, A.M. (1999). P2Z-Independent and P2Z receptor-mediated macrophage killing by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Infect Immun* **67**: 5231-5242
- 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

7 Anhang

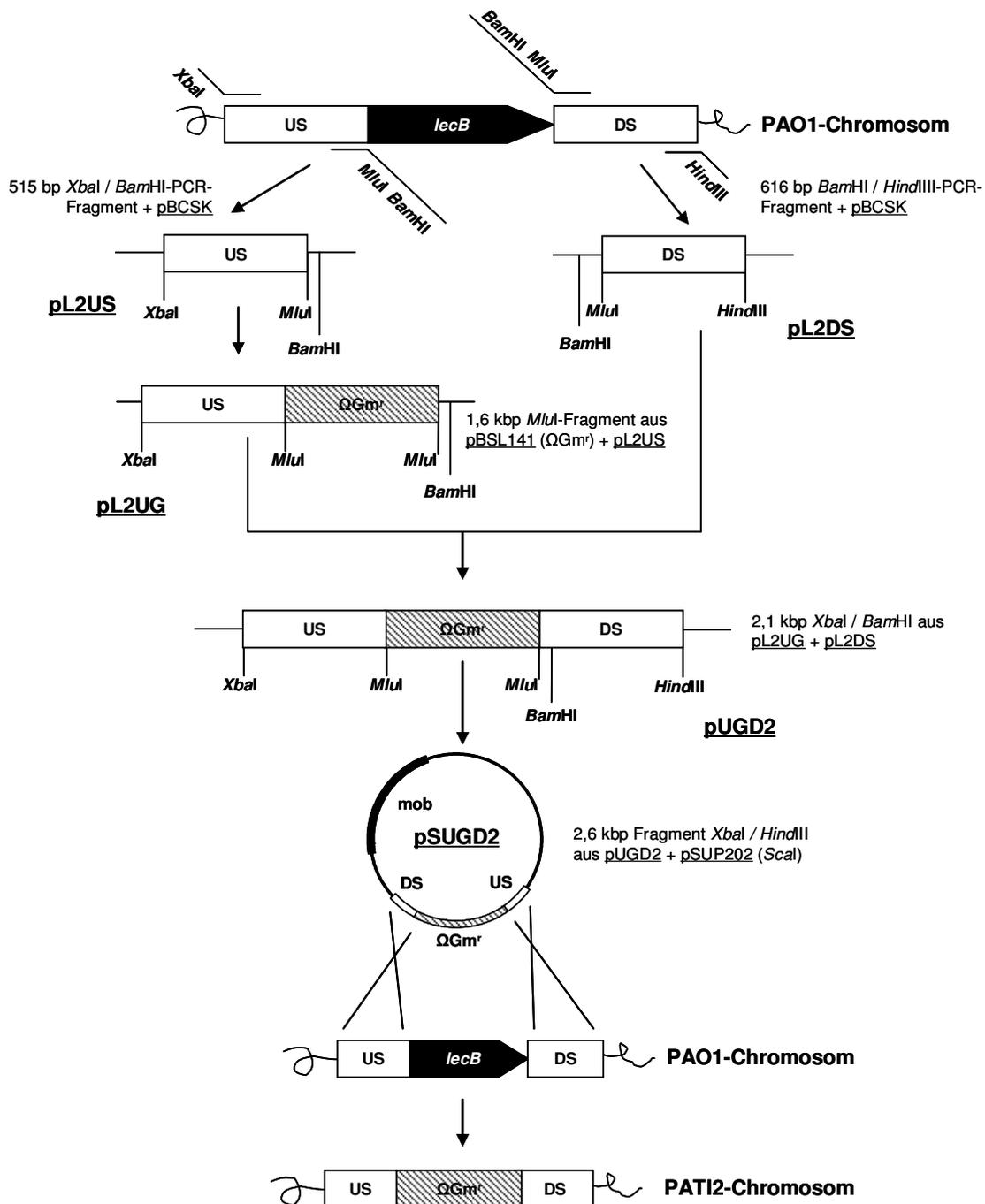


Abb. 37 Konstruktion der *lecB*-defizienten Mutante PATI2 von *P. aeruginosa*. Zunächst wurden die stromaufwärts (US) und stromabwärts (DS) flankierenden Bereiche des *lecB*-Gens amplifiziert und über die jeweils inserierten Erkennungssequenzen in den Vektor pBCSK kloniert. Die aus dem Plasmid pBSL141 isolierte Ω Gm^r-Kassette wurde über die *Mlu*I-Schnittstellen hinter das stromaufwärts-Fragment in das Plasmid pL2US kloniert. Durch die Hydrolyse dieses Konstruktes mit den Enzymen *Xba*I und *Bam*HI und anschließender Klonierung über diese Erkennungssequenzen in das Plasmid pL2DS entstand das zur Deletion des *lecB*-Gens geeignete Fragment. Nach der Isolierung mit den Enzymen *Xba*I und *Hind*III und anschließender Auffüllreaktion wurde dieses über *Sca*I-Schnittstellen in den Suizidvektor pSUGD2 eingefügt. Die Erzeugung der Mutante PATI2 erfolgte über homologe Rekombination. Die Konstruktion der *lecA*-negativen Mutante PATI1 erfolgte entsprechend.

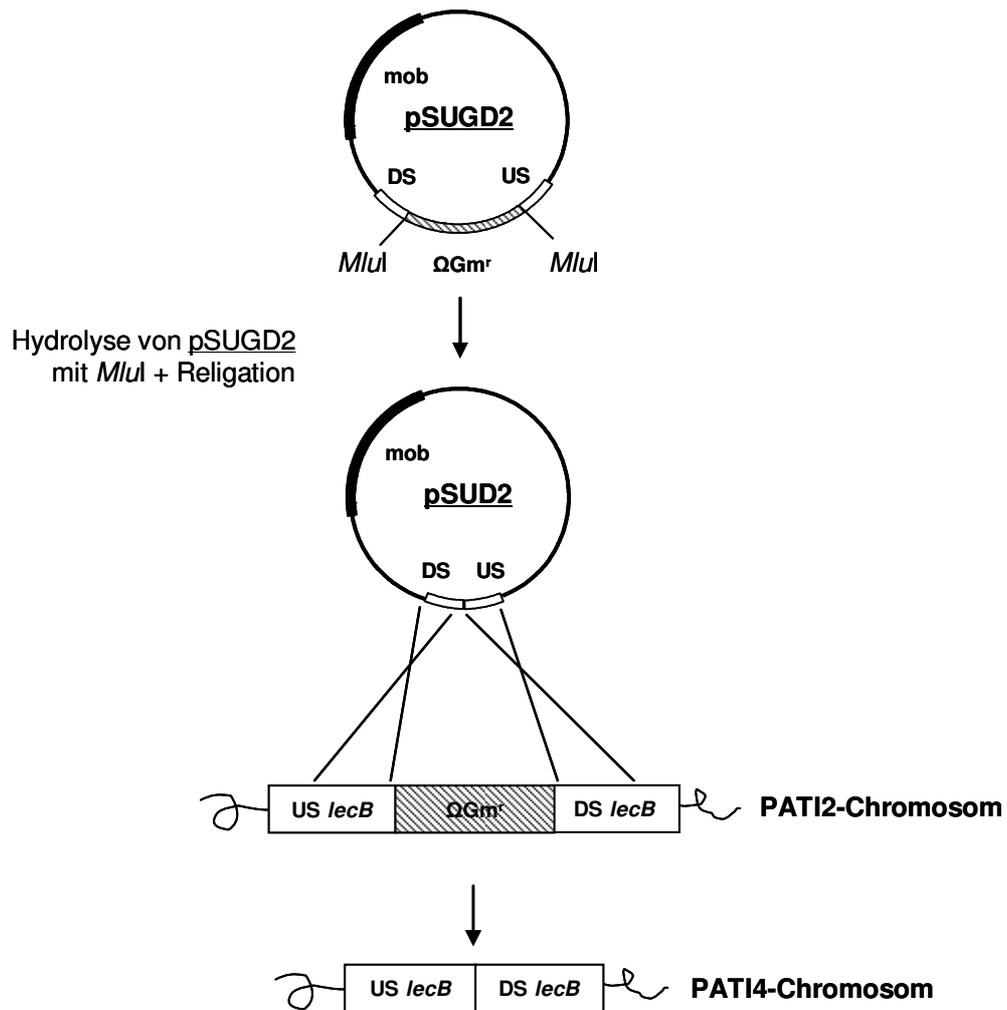


Abb. 38 Konstruktion der *lecB*-defizienten Mutante PATI4 von *P. aeruginosa*. Der Mutagenesevektor zur Konstruktion der Mutante PATI2 wurde mit der Restriktionsendonuklease *MluI* hydrolysiert und anschließend religiert, um die ΩGm^r -Kassette aus dem Plasmid zu entfernen. Die Exzision der Kassette aus dem Genom der *lecB*-negativen Mutante PATI2 erfolgte über homologe Rekombination. Die Konstruktion der *lecA*-defizienten Mutante erfolgte entsprechend.

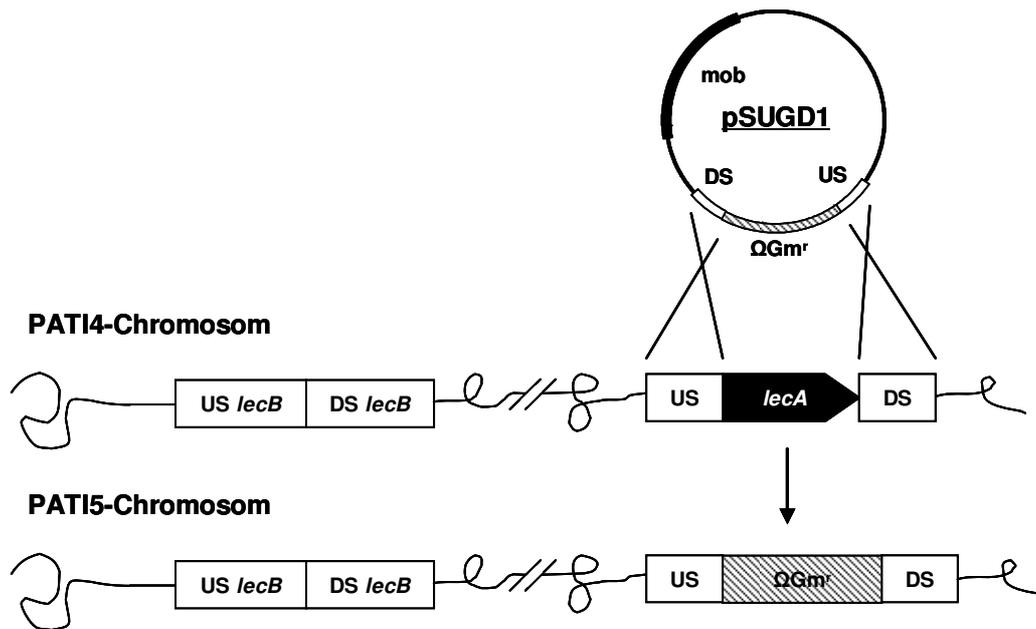


Abb. 39 Konstruktion der *lecA*- und *lecB*-defizienten Mutante PATI5 von *P. aeruginosa*. Als Parentalstamm für die Konstruktion der Mutante PATI5 wurde die *lecB*-negative Mutante PATI4 eingesetzt. Durch homologe Rekombination unter Verwendung des Suizidvektors pSUGD1 wurde das *lecA*-Gen durch die ΔGm^r -Kassette ersetzt.

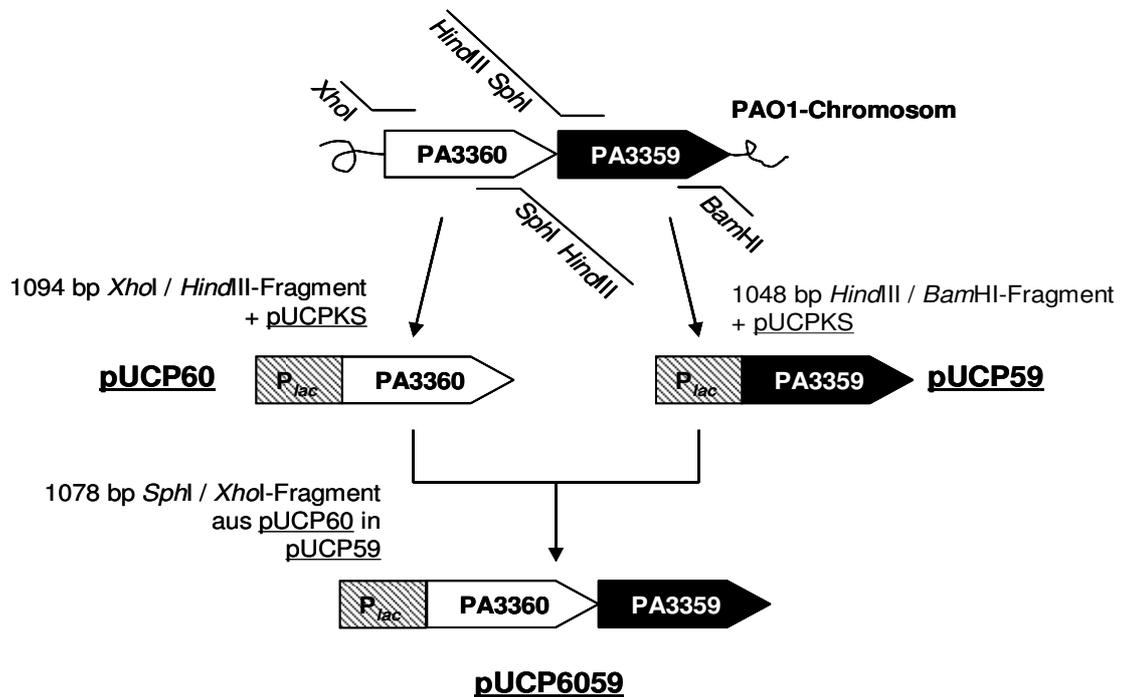


Abb. 40 Klonierung der ORF PA3360 und PA3359. Die Amplifikation des ORF PA3360 erfolgte mit den Oligonukleotiden 3360Up und 3360Dwn aus dem Genom von *P. aeruginosa* PAO1. Über die dabei inserierten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII* konnte das Gen anschließend in das Expressionsplasmid pUCPKS eingefügt werden. Der ORF PA3359 wurde unter Einsatz der Oligonukleotide 3359Up und 3359Dwn amplifiziert und über die Erkennungssequenzen für *HindIII* und *BamHI* in das Plasmid pUCPKS kloniert. Die transkriptionelle Kontrolle der Gene erfolgte durch den konstitutiven *lacUV5*-Promotor (P_{lac}). Das Zusammenfügen des bicistronischen Operons erfolgte, indem der ORF PA3360 durch Hydrolyse des Plasmids pUCP60 mit den Enzymen *SphI* und *XhoI* isoliert und in den ebenso behandelten Vektor pUCP59 eingefügt wurde.

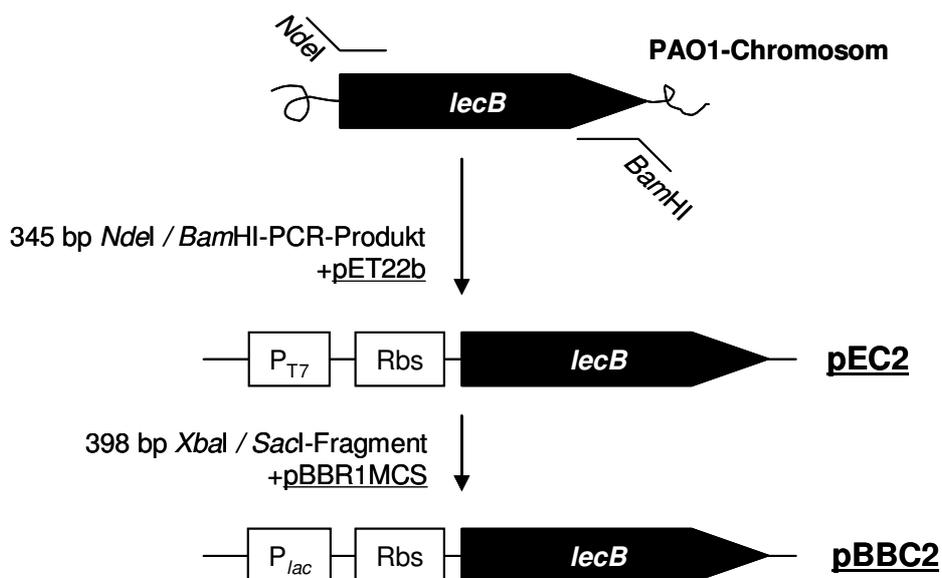


Abb. 41 Klonierung des nativen *lecB*-Gens. Das *lecB*-Gen wurde aus dem Genom von *P. aeruginosa* unter Einsatz der Oligonukleotide LIINdeI und LIIBamHI amplifiziert und zunächst in das Plasmid pET22b eingefügt. Anschließend wurde es durch Hydrolyse des resultierenden Konstruktes pEC2 mit den Restriktionsenzymen *XbaI* / *SacI* mit der Ribosomenbindestelle (Rbs) des Plasmids isoliert und über die Erkennungssequenzen für die Enzyme *XbaI* / *SacI* in das Plasmid pBBR1MCS eingefügt, wo es unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiven *lacUV*-Promotors stand.

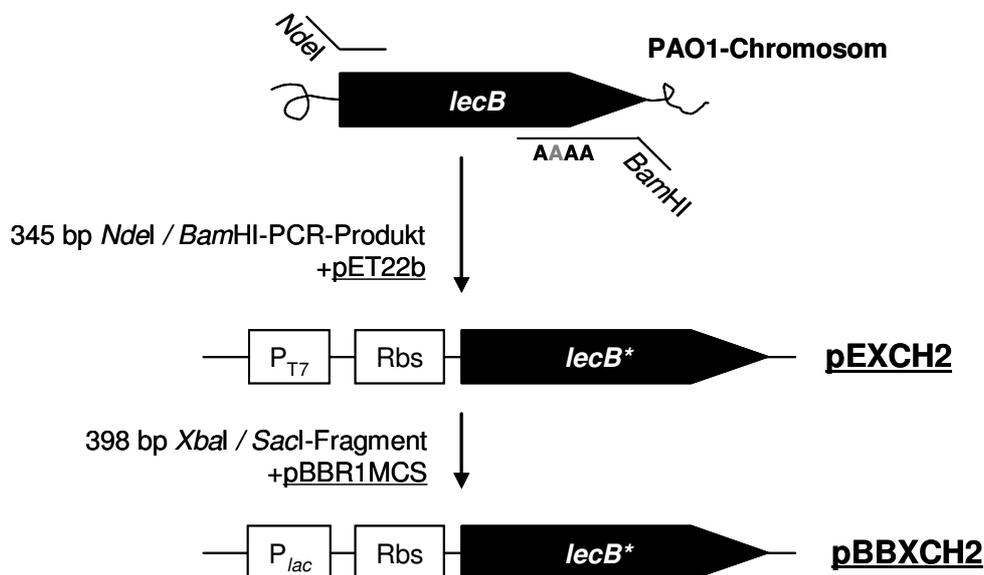


Abb. 42 Konstruktion der mutierten *lecB-Variante mittels ortgerichteter Mutagenese.** Das *lecB**-Gen wurde aus dem Genom von *P. aeruginosa* unter Einsatz der Oligonukleotide LIINdeI und LIIXch, die die modifizierte Sequenz enthielt, amplifiziert und zunächst in das Plasmid pET22b eingefügt. Anschließend wurde es durch Hydrolyse des resultierenden Konstruktes pEXCH2 mit den Restriktionsenzymen *XbaI* / *SacI* mit der Ribosomenbindestelle (Rbs) des Plasmids isoliert und über die Erkennungssequenzen für die Enzyme *XbaI* / *SacI* in das Plasmid pBBR1MCS eingefügt, wo es unter der transkriptionellen Kontrolle des konstitutiven *lacUV*-Promotors stand.

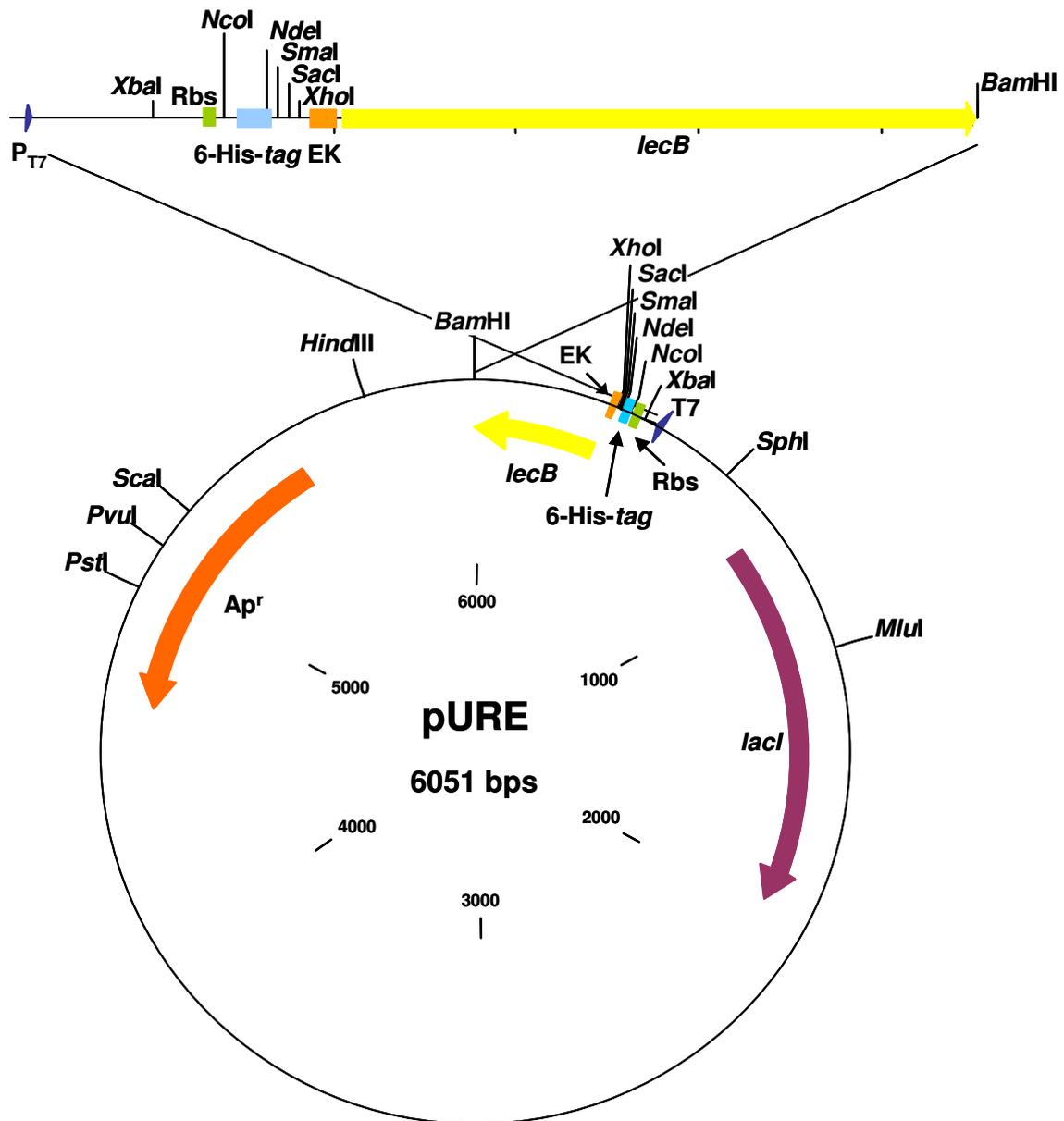


Abb. 43 Plasmidkarte des Expressionsplasmids pURE. Das Plasmid pURE ermöglicht die Fusion eines beliebigen Gens mit dem *lecB*-Gen unter Verwendung der Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* sowie *NdeI*, *SmaI*, *SacI* und *XhoI*. Das Plasmid ermöglicht zudem die Fusion des Zielgens mit einer Sequenz, die für den Hexa-Histin-tag (6-His-tag) kodiert. P_{T7}: T7-Promotor; Rbs: Ribosomenbindungsstelle, EK: Schnittstelle der Enterokinase (aus Bartels, 2004).

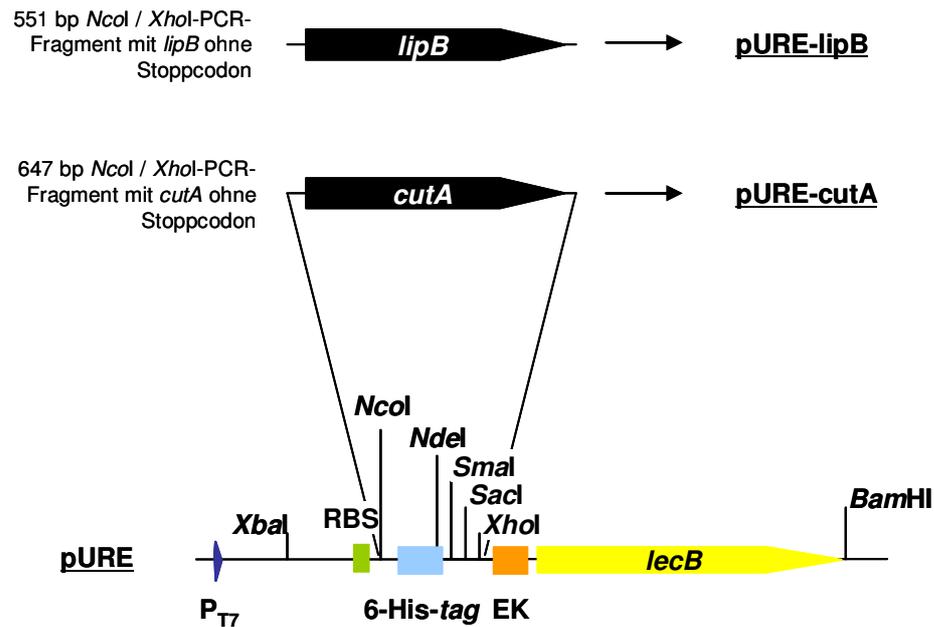


Abb. 44 Klonierung der Plasmide pURE-lipB und pURE-cutA. Für die Klonierung des Plasmids pURE-lipB wurde das *lipB*-Gen aus *B. subtilis* exklusive Stoppcodon und ohne die 84 bp große Signalsequenz unter Verwendung der Oligonukleotide BSLB3 und downA22 PCR-amplifiziert und über die inserierten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NcoI* und *XhoI* in das Expressionsplasmid pURE (Bartels, 2004) kloniert, um es mit dem *lecB*-Gen zu fusionieren. Das *cutA*-Gen aus *Fusarium solani pisi* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide CutFW und CutRV amplifiziert und wie für das *lipB*-Gen beschrieben in das Plasmid pURE eingefügt.

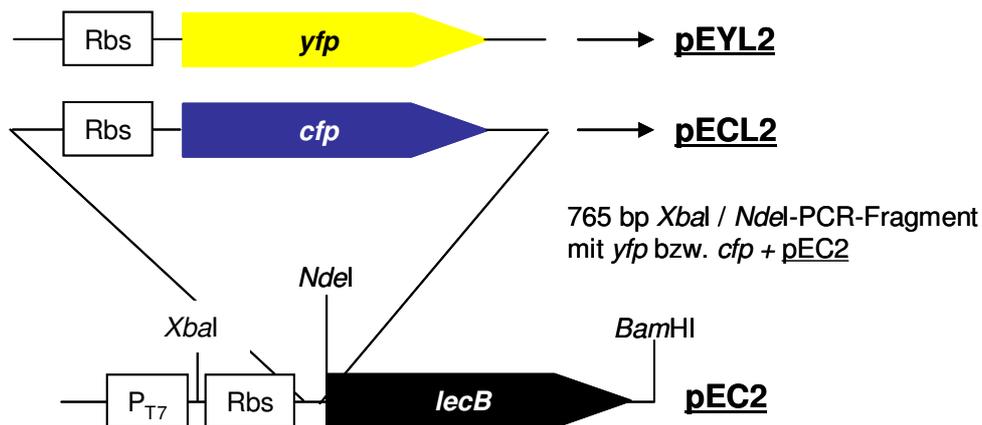


Abb. 45 Klonierung der Plasmide pEYL2 und pECL2. Für die Klonierung der Plasmide wurden die Gene *yfp* und *cfp* exklusive Stoppcodon unter Verwendung der Oligonukleotide YFPFusFW, welcher die Sequenz einer Rbs enthält, und YFPFusRV PCR-amplifiziert und über die inserierten Erkennungssequenzen für die Enzyme *XbaI* und *NdeI* in das *lecB*-Expressionsplasmid pEC2 eingefügt. Rbs: Ribosomenbindungsstelle

