



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Die Rolle des Lektins LecB
in der Physiologie und Pathogenität von
*Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Tobias Schwabroch
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Juni 2017

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Oktober 2017

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

Präsentationen auf internationalen Konferenzen

Schwabroch, T., Kovacic, F., Jaeger, K-E. (2017). Identification of proteins affecting secretion of the carbohydrate binding lectin LecB of *Pseudomonas aeruginosa*. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM) and German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM), Würzburg, 2017. Vortrag.

Kovacic, F., Bleffert, F., Schwabroch, T., Strunk, C., Caliskan, M., Grazin, J., Siebers, M., Dörmann, P., Rahme, L., Batra-Safferling, R., Jaeger, K-E. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* phospholipases and lectins are potential therapeutic targets. 7th Congress of European microbiologists by the Federation of European Microbiological Societies (FEMS) and the Spanish Society for Microbiology (SEM), Valencia, 2017. Posterpräsentation.

Schwabroch, T., Kovacic, F., Funken, H., Jaeger, K-E. (2016). A novel high-throughput method for quantification of lectin-sugar interactions in the culture media. Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Jena, 2016. Posterpräsentation.

Präsentationen im Rahmen der Promotion

Schwabroch, T., Kovacic, F., Jaeger, K-E. (2016). Using a novel high-throughput method for analysis of lectin-sugar interactions in the culture media of *P. aeruginosa*. MOI II-Symposium 2016, Geldern, 2016. Vortrag.

Schwabroch, T., Funken, H., Kovacic, F., Jaeger, K-E. (2015). Carbohydrate-binding protein LecB of *Pseudomonas aeruginosa*. MOI II-Symposium 2015, Düsseldorf, 2015. Vortrag und Poster.

Schwabroch, T., Funken, H., Jaeger, K-E. (2014). Carbohydrate The role of the lectins LecA and LecB in the physiology and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. MOI II-Symposium 2014, Bergisch Gladbach, 2014. Vortrag.

Schwabroch, T., Funken, H., Jaeger, K-E. (2014). Carbohydrate The role of the lectins LecA and LecB in the physiology and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. MOI II-Symposium and the international scientific advisory board (iSAB) 2014, Düsseldorf, 2014. Poster.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Überlassung dieses hochaktuellen und interessanten Themas sowie für die ideale Arbeitsumgebung danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold bedanke ich mich für die freundliche und konstruktive Übernahme des Korreferates.

Der *Molecules of Infection* (MOI) II Graduiertenschule und der Manchot-Stiftung danke ich für die Unterstützung und Finanzierung meines Promotionsthemas im Rahmen des MOI II Stipendiums.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Ernst, insbesondere an Herrn Dr. Lasse van Wijlick für die Kooperation und Durchführung der Biofilmanalysen der co-kultivierten Stämme.

Vielen Dank an Herrn Dr. Filip Kovacic für die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion sowie unserer hervorragenden Arbeitsgruppe (*Bacterial Enzymology*) und den Kolleginnen und Kollegen der Labore 206 und 306. Für den zusätzlichen wissenschaftlichen Input während der Promotionszeit danke ich insbesondere Herrn Dr. Stephan Thies und Herrn Dr. Andreas Knapp.

Bei Frau Andrea Weiler, Herrn Dr. Andreas Domröse, Herrn Dr. Stephan Thies und Herrn Dr. Filip Kovacic bedanke ich mich für die Durchsicht meines Manuskriptes.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern und Praktikanten des IMET, es war eine wirklich schöne Zeit mit euch. Dieser Dank geht insbesondere in Richtung des Großraumbüros sowie an Frau Dr. Martina Holz und Frau Dagmar Müller. Ein extra Dank geht an meine Praktikanten (Daisy, Julia, Ronja, Rebecka) und meine Lab-Rotationpartner (Frau Silke Jankowski, Frau Sandra Peherstorfer, Frau Laura Kukuk und Herrn Dr. Lasse van Wijlick), ihr seid der Beweis, dass Lehre, die Wissenschaft und eine angenehme Arbeitsatmosphäre einfach zusammenpassen.

Meinen Freunden danke ich für die offenen Ohren, die Zuverlässigkeit und die Unterstützung, mit euch habe ich einfach eine schöne Zeit.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, ihr standet stets hinter mir und dass auch in schwierigen Momenten, vielen vielen Dank, das ist nicht selbstverständlich! 😊

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis.....	VI
II	Tabellenverzeichnis.....	VIII
III	Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1	Einleitung.....	1
1.1	Das humanpathogene Bakterium <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2	Der Biofilmlebenszyklus von <i>P. aeruginosa</i>	2
1.2.1	Der initiale Schritt der Infektion ist die Adhäsion	3
1.2.2	Die Biofilmbildung und Zell-Zell-Kommunikation.....	4
1.2.3	Die Freisetzung von <i>P. aeruginosa</i>	8
1.3	Die Bewegungsformen von <i>P. aeruginosa</i>	8
1.3.1	Die Flagellum-vermittelte Schwimmfähigkeit	8
1.3.2	Die Typ-IV-Pili-vermittelte Kriechbewegung	9
1.3.3	Die Flagellum- und Typ-IV-Pili-vermittelte Schwärmbewegung.....	13
1.4	Rolle der Sekretion für die bakterielle Pathogenität	14
1.5	Lektine – Definition	16
1.6	Lektine in Mikroorganismen	17
1.7	Lektine aus <i>P. aeruginosa</i>	18
1.7.1	Struktur und Funktion von LecA.....	19
1.7.2	Die Expression, Funktion und Struktur von LecB.....	22
1.8	Bakterielle und eukaryotische Interaktionspartner von LecB	25
1.9	Der LecB Interaktionspartner der äußeren Membran - OprF	26
1.10	Anti-Adhäsionsstrategien.....	29
1.11	Zielsetzung dieser Arbeit.....	31

2	Material und Methoden	32
2.1	Chemikalien und Enzyme	32
2.2	Bakterienstämme, Hefen und Plasmide.....	32
2.3	Oligonukleotide.....	34
2.4	Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	35
2.5	Isolierung von Nukleinsäuren	36
2.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
2.7	Gelelektrophorese	36
2.8	Präparative Gelelektrophorese und Isolation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	36
2.9	<i>In vitro</i> - Rekombination von DNA	37
2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	37
2.10.1	Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten	37
2.10.2	Kolonie-PCR.....	38
2.10.3	Inverse-PCR	38
2.10.4	Quantitative PCR	38
2.10.5	Reinigung von PCR-Proben.....	39
2.11	Sequenzierung von DNA	39
2.12	Übertragung von Plasmid-DNA.....	39
2.12.1	Übertragung von Plasmid-DNA durch Transformation kompetenter Zellen.....	39
2.12.2	Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation.....	39
2.12.3	Übertragung von (Plasmid-) DNA durch Elektroporation.....	40
2.13	Konstruktion eines <i>P. aeruginosa lecB</i> - und <i>oprF</i> -defizienten Stammes	40
2.14	Konstruktion von Tn5-Transposon-Bibliotheken	43
2.14.1	Erzeugung einer Transposon-Bibliothek mittels pUTminiTn5- <i>luxCDABE</i>	43
2.14.2	Erzeugung einer Transposon-Bibliothek mittels <i>in vitro</i> Tn5-Konstruktes	44
2.14.3	Kultivierung und Lagerung der Transposon-Bibliotheken	44
2.15	Lokalisierung des Transposon-Insertionsortes.....	45
2.15.1	Single-Primer Methode	45

2.15.2	Plasmid-Rescue	45
2.15.3	Inverse-PCR	46
2.16	Entwicklung, Etablierung und Durchführung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von LecB	47
2.16.1	Quantitative Analyse von LecB-haltigen Medien mittels des <i>modified Enzyme-Linked Lectin Assay</i>	47
2.16.2	Quantitative Lumineszenzmessung.....	48
2.16.3	Lumineszenz-Aufnahme von mELLA-Platten.....	48
2.16.4	Analyse der mELLA-Messwerte	49
2.16.5	Nomenklatur von Transposonmutanten	49
2.17	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	49
2.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.19	Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western Blot	50
2.20	Amidoschwarz-Färbung von PVDF-Membranen.....	51
2.21	Sekretomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	52
2.21.1	TCA-Fällung von extrazellulären Proteinen	52
2.21.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von 2D-Gel-Proben	52
2.21.3	Die isoelektrische Fokussierung (Erste Dimension).....	53
2.21.4	Die Auftrennung nach Molekulargewicht (Zweite Dimension)	53
2.21.5	Bioinformatische Analyse des Sekretoms	54
2.22	Identifizierung von Proteinen	54
2.23	Expression und Reinigung von LecB.....	55
2.24	<i>Motility-Assays</i>	56
2.24.1	Schwimm und Schwärmbewegung	56
2.24.2	<i>Twitching motility</i>	56
2.25	Biofilm-Quantifizierung mittels Kristallviolett.....	57
2.26	Biofilm-Quantifizierung mittels XTT-Reduktionstest	58
2.27	Quantifizierung der Lipase-Aktivität	58

3	Ergebnisse.....	59
3.1	Stammverifizierung und physiologischer Einfluss der Deletion von <i>lecB</i>	59
3.2	Konstruktion des <i>P. aeruginosa</i> <i>lecB</i> - und <i>oprF</i> -defizienten Stammes	65
3.3	Expression und Reinigung von LecB.....	71
3.4	Entwicklung, Etablierung und Durchführung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB	72
3.4.1	Fluoreszenz-basierte Quantifizierung von LecB mittels <i>Lumio-Tag</i> TM	72
3.4.2	Entwicklung eines Lumineszenz-basierten Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB	75
3.5	Erzeugung der Transposon-Bibliothek	80
3.5.1	Erzeugung der Transposon-Bibliothek mittels Mutagenesevektor	80
3.5.2	Erzeugung und Validierung der EZ-Tn5 TM -Transposon-Bibliothek	83
3.6	Ergebnisse des mELLA Screenings der Transposon-Bibliothek	84
3.7	Verifizierung und Identifizierung der Mutanten mit reduzierter LecB-Sekretion	85
3.7.1	Verifizierung der Mutanten mit reduzierter LecB-Sekretion.....	85
3.7.2	Identifizierung der Transposon-Integrationsorte	88
3.7.3	Der Einfluss von FgtA und FliC auf die Sekretion von LecB	90
3.8	Der physiologische Einfluss von LecB in <i>P. aeruginosa</i>	91
3.8.1	LecB hat einen physiologischen Einfluss auf das Sekretom	91
3.8.2	Der physiologische Einfluss von LecB auf die Bewegungsfähigkeit von <i>P. aeruginosa</i>	93
3.9	Einfluss von bekannten und putativen Interaktionspartnern auf LecB	95
3.9.1	Der Einfluss von <i>lecA</i> auf <i>lecB</i>	95
3.9.2	Der Einfluss von <i>OprF</i> auf die Expression und Lokalisierung von LecB.....	97
3.9.3	Die regulatorischen Einflüsse von <i>ansB</i> auf <i>lecB</i>	102
3.9.4	Der Einfluss von <i>xcpA</i> und <i>xcpQ</i> auf die Sekretion von LecB.....	103
3.10	Einfluss von LecB auf die Co-Kultivierung von <i>Candida albicans</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	104

4	Diskussion.....	109
4.1	Der Einfluss von LecB auf die Physiologie und Pathogenität	109
4.1.1	Der Einfluss von OprF auf die Expression von <i>lecB</i>	109
4.1.2	Die Lokalisierung des LecB-Proteins an der äußeren Membran	111
4.1.3	Die biologische Funktion von LecB	115
4.1.4	Der mögliche Einfluss von LecA auf LecB	122
4.1.5	Der Einfluss von AnsB auf LecB	123
4.2	Aufklärung der LecB Sekretion.....	125
4.2.1	Erzeugung eines geeigneten Expressionssystems.....	125
4.2.2	Gewinnung von LecB für die Etablierung des Testsystems	127
4.2.3	Entwicklung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB	128
4.3	Die putativen Sekretionspartner von LecB	130
4.3.1	Die verschiedenen putativen Sekretionspartner von LecB	130
4.3.2	Der mögliche Einfluss des Roc-Systems der <i>cup</i> -Gene auf die Sekretion von LecB ..	133
4.3.3	Der Einfluss der Typ-IV-Pili auf die Sekretion von LecB.....	137
4.3.4	Der putative Zucker-vermittelte Co-Transport von LecB	139
5	Zusammenfassung	144
6	Summary.....	146
7	Literaturverzeichnis.....	148
8	Computerprogramme, Onlinedienste und Datenbanken	187
9	Anhang	188
10	Eidesstattliche Erklärung	189

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Bildung von <i>P. aeruginosa</i> Biofilmen mit multizellulären Strukturen.	5
Abbildung 2 Die schematische Darstellung der Struktur von LecB.	23
Abbildung 3 Die Konstruktion des <i>P. aeruginosa</i> $\Delta lecB \Delta oprF$ PATS1 Stammes.	42
Abbildung 4 Schematische Darstellung des Transposonnachweises mittels Inverser-PCR.	46
Abbildung 5 Schematische Darstellung des <i>modified Enzyme-Linked Lectin Assay</i>	47
Abbildung 6 Die Nomenklatur von Transposonmutanten.	49
Abbildung 7 Der Nachweis und die Lokalisierung von LecB.	59
Abbildung 8 Die Quantifizierung von <i>lecB</i> -Transkripten und extrazellulärem LecB.	60
Abbildung 9 Die Deletion von <i>lecB</i> hat keinen Einfluss auf die Gesamtzellzahl.	61
Abbildung 10 Ein <i>lecB</i> -defizienter Stamm weist eine reduzierte Biofilmbildung auf.	62
Abbildung 11 Der Einfluss von LecB auf die <i>twitching motility</i> von <i>P. aeruginosa</i>	64
Abbildung 12 Der Nachweis der <i>oprF</i> -Deletion mittels PCR.	66
Abbildung 13 Der <i>P. aeruginosa</i> PATS1 Stamm weist ein langsames Wachstum auf.	67
Abbildung 14 Die Lokalisierung von LecB in verschiedenen <i>P. aeruginosa</i> Stämmen.	68
Abbildung 15 Die Deletion von <i>lecB</i> und <i>oprF</i> hat einen Einfluss auf die Biofilmbildung.	70
Abbildung 16 Die Reinigung und Identifizierung von LecB.	71
Abbildung 17 Der Einfluss des <i>Lumio</i> -Tags™ auf die Zelldichte, Lokalisierung und Menge von LecB.	73
Abbildung 18 Der Einfluss verschiedener Zucker-PAA-Konjugate auf die Immobilisierung von LecB.	75
Abbildung 19 Der mELLA ist zur Quantifizierung von LecB geeignet.	77
Abbildung 20 Der mELLA ist zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB verschiedener <i>P. aeruginosa</i> Kulturen geeignet.	78
Abbildung 21 Die Transposition des Transposons ins Genom und die Auswirkung auf die Gen-Expression.	80
Abbildung 22 Einige Transposonmutanten weisen eine reduzierte Menge an extrazellulärem LecB auf.	84
Abbildung 23 Die Verifizierung der Transposonmutanten.	85
Abbildung 24 Der Einfluss von <i>FliC</i> und <i>FgtA</i> auf die extrazelluläre Menge an LecB.	90
Abbildung 25 Ein <i>lecB</i> -defizienter Stamm weist ein verändertes Sekretom auf.	91
Abbildung 26 Die Deletion von <i>lecB</i> weist keinen Einfluss auf die Schwimmbewegung auf. .	93

Abbildung 27 Die Deletion von <i>lecB</i> hat keinen Einfluss auf die Schwärmfähigkeit.	94
Abbildung 28 Die Deletion von <i>lecA</i> hat einen negativen Einfluss auf die Zelldichte der stationären Phase.....	95
Abbildung 29 Vergleich von Transkriptmengen und sekretiertem LecB in <i>P. aeruginosa</i> <i>lecA</i> - und <i>lecB</i> -defizienten Stämmen.	96
Abbildung 30 Die Deletion von <i>lecA</i> bzw. <i>lecB</i> hat einen Einfluss auf die Biofilmbildung.....	97
Abbildung 31 Lokalisierung von LecB und Quantifizierung von <i>lecB</i> und <i>oprF</i> -Transkripten..	98
Abbildung 32 Hypothetisches Modell des Aufbaus von Biofilmen durch Interaktion von LecB und OprF.	99
Abbildung 33 OprF hat einen Einfluss auf die extrazelluläre Menge an LecB.	100
Abbildung 34 Der Einfluss von LecB auf die Biofilmbildung von <i>P. aeruginosa</i> PATS1 Stämmen.	101
Abbildung 35 Der mögliche Einfluss von <i>lecB</i> auf <i>ansB</i>	102
Abbildung 36 Die Deletion von <i>xcpA</i> bzw. <i>xcpQ</i> hat einen Einfluss auf die extrazellulärem LecB-Menge.....	103
Abbildung 37 Die Deletion von <i>lecB</i> hat einen Einfluss auf die Biofilmbildung co-kultivierter Stämme.	105
Abbildung 38 Das LecB-Protein hat keinen Einfluss auf die Biofilmbildung co-kultivierter Stämme.	106
Abbildung 39 Die Deletion von <i>lecB</i> hat einen Einfluss auf die Lipase/Esterase-Aktivität von <i>P. aeruginosa</i> Monokulturen.	107
Abbildung 40 Hypothetisches Modell des FliC-vermittelten LecB Co-Transportes.....	142
Abbildung 41 Der Einfluss der Deletion von <i>rocS1</i> auf die Sekretion von LecB und die Biofilmbildung.	188

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Bakterien und Hefestämme.	32
Tabelle 2 Verwendete Vektoren.	33
Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.	34
Tabelle 4 Übersicht der verwendeten qPCR Oligonukleotide.	34
Tabelle 5 Konzentration der eingesetzten Antibiotika.	35
Tabelle 6 Verwendete primäre Antiseren.	51
Tabelle 7 Verwendete HRP-konjugierte Antiseren.	51
Tabelle 8 Programm für die isoelektrische Fokussierung.	53
Tabelle 9 Übersicht der <i>Motility-Assay</i> Medien.	57
Tabelle 10 Übersicht der zur Verifizierung untersuchten Transposonmutanten.	86
Tabelle 11 Übersicht der identifizierten Gene der Transposonmutanten.	89
Tabelle 12 Übersicht der im Sekretom des <i>P. aeruginosa lecB</i> -defizienten Stammes reduziert vorliegenden oder fehlenden Proteine.	92

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. dest.	<i>Aqua destillata</i>
AHL	N-Acyl-Homoserinlactone
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinmonophosphat
CF	zystischer Fibrose
Cm	Chloramphenicol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELLA	<i>Enzyme-Linked Lectin Assay</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskraft
Gm	Gentamycin
GZE	Gesamtzellextrakt
h	Stunde(n)
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IP	Inverse-PCR
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
K _a	Assoziationskonstante
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani (Medium)
M	Molar
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight -</i> Massenspektrometrie
mbp	Millionen Basenpaare
MDR	<i>multidrug resistant</i>
mELLA	<i>modified Enzyme-Linked Lectin Assay</i>
min	Minute(n)

mM	Millimolar
ms	Millisekunde(n)
MWCO	Molekülausschlussgröße
n	Nano
NB	Nährbouillon
N-Terminus	Aminoterminus
O.D.	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p.A.	<i>pro analysi</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pN	Pikonewton
PQS	<i>P. aeruginosa</i> Quinolon Signal
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative PCR
QS	<i>quorum sensing</i>
Ref	Referenzstamm
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	<i>unit</i> (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtskultur
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WT	Wildtyp
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium Hydroxid

1 Einleitung

1.1 Das humanpathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*

Das Gram-negative, stäbchenförmige Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* gehört phylogenetisch zur Familie der *Pseudomonadaceae*, einer heterologen Gruppe der γ -Proteobakterien (Palleroni 1993; Olsen *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Gattung *Pseudomonas* ist *P. aeruginosa* ein vielseitiger opportunistisch pathogener Stamm der Infektionen in Säugern, Pflanzen, Hefen und Insekten verursacht (Mahajan-Miklos *et al.*, 2000). Die Pathogenität von *P. aeruginosa* basiert auf der Fähigkeit, eine Vielzahl von zellassozierten und sekretierten Virulenzfaktoren herzustellen. *P. aeruginosa* steht im Zusammenhang mit zahlreichen krankenhausessoziierten Infektionen und der Infektion von immunsupprimierten Patienten mit (Brand-)wunden, zystischer Fibrose (CF), AIDS sowie Krebserkrankungen (Bodey *et al.*, 1983; Cross *et al.*, 1983; Richard *et al.*, 1994; Pruitt *et al.*, 1998; Speert 2002). Bei Patienten mit zystischer Fibrose (Mukoviszidose), einer autosomal rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung, ist eine *P. aeruginosa* Infektion ab einem Patientenalter von etwa 25 Jahren die Haupttodesursache (CFF 2016). Die Therapie von *P. aeruginosa* Infektionen wird durch die intrinsischen Resistenzen gegen eine Vielzahl verschiedener Antibiotika, multiresistente *P. aeruginosa* Stämme (MDR) und die Bildung von Biofilmen für die Langzeitkolonisierung, welche den Zugang von Antikörpern und Antibiotika verhindern, erschwert (Richard *et al.*, 1994; Gacesa 1998; Hancock & Speert 2000; Conway *et al.*, 2003; Rukholm *et al.*, 2006; Bassetti *et al.*, 2008). Die problematische Biofilmbildung von *P. aeruginosa* ist auf verschiedenen Oberflächen und Geweben zu beobachten, so konnten diese in Lungen von Patienten mit zystischer Fibrose, auf Kontaktlinsen und in Schläuchen von Kathetern beobachtet werden (Nickel *et al.*, 1985; Govan & Deretic 1996; O'Toole & Kolter 1998; O'Toole 2004).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zeigte in einer aktuellen Studie, dass dringender Handlungsbedarf (Priorität 1) in der Erforschung und Entwicklung von Antibiotika gegen die drei kritischsten bakteriellen Pathogene *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacteriaceae* besteht (World-Health-Organization 2017). Zur Analyse des Bakteriums und Entwicklung geeigneter Behandlungstherapien wurde das Genom von *P. aeruginosa* im Jahr 2000 vollständig sequenziert (Stover *et al.*, 2000). Dieses umfasst

6,3 Mbp mit 5.570 vorhergesagten *open reading frames* (ORFs) und ist damit lediglich etwas weniger komplex als ein einfacher Eukaryot wie *Saccharomyces cerevisiae*, der 6.200 ORFs aufweist (Ball *et al.*, 2000; Stover *et al.*, 2000).

Ferner weist *P. aeruginosa* eine hohe Anpassungsfähigkeit an unterschiedlichste Lebensräume und Bedingungen auf. *P. aeruginosa* ist chemoorganotroph und in der Lage unterschiedlichste organische Verbindungen als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Bescheidenheit bezüglich der Kohlenstoffquelle, die metabolische Vielseitigkeit und eine Temperaturtoleranz bis 43°C ermöglichen eine ubiquitäre Verbreitung des Bakteriums und machen es zu einem der häufigsten Organismen überhaupt (Palleroni 1993; Costerton & Anwar 1994). *P. aeruginosa* besiedelt sowohl biotische als auch abiotische Oberflächen. Die Biofilmbildung stellt neben der beschriebenen medizinischen Bedeutung ein industrielles Problem, zum Beispiel durch die Besiedlung von Leitungen, Filtern, Kühlsystemen dar (McCoy *et al.*, 1981; Morton & Surman 1994; Costerton *et al.*, 1995). Daneben sekretiert *P. aeruginosa* aber auch eine Vielzahl verschiedener Enzyme mit für biokatalytische Anwendungen interessanten Eigenschaften, weshalb es neben der medizinischen Bedeutung eine biotechnologische Rolle spielt (Jaeger *et al.*, 1997).

1.2 Der Biofilmlebenszyklus von *P. aeruginosa*

Die Kolonisierung eines Habitats durch Mikroorganismen durchläuft verschiedene Phasen, die in verschiedenen Ausprägungen ubiquitär in allen Lebensräumen zu finden sind. Die effiziente Kolonisierung und Verbreitung von Mikroorganismen ist dabei abhängig von verschiedenen Mechanismen der Fortbewegung wie Schwimmen, Kriechen (engl. *twitching motility*) oder Schwärmen (Jarrell & McBride 2008).

Ein Großteil der in der Natur, der Industrie und in der medizinischen Umgebung vorkommenden Bakterien existiert allerdings in Biofilmen (Costerton *et al.*, 1995; Costerton 1999; Stickler 1999). Demzufolge spielt die Biofilmbildung auch bei der Infektion eines Wirtes durch *P. aeruginosa* eine entscheidende Rolle und erschwert, wie bereits beschrieben, die Behandlung der Patienten, da im Vergleich zu planktonischen Zellen eine sessile Gemeinschaft in einem Biofilm widerstandsfähiger gegenüber der Immunantwort des Wirtes und konventionellen Antibiotika ist (Brown *et al.*, 1988; Mah & O'Toole 2001; Stewart & Costerton 2001). Die Biofilmbildung kann in drei Phasen unterteilt werden: (I) Der

Transport des Bakteriums zu einer Wirtsoberfläche und die initiale Adhäsion (1.2.1), (II) die Bildung von Mikrokolonien und Biofilmbildung (1.2.2) und abschließend (III) die Freisetzung von Mikroorganismen (1.2.3). Die verschiedenen Phasen der Biofilmbildung und Freisetzung von Zellen, welche im Folgenden erklärt wird, geht mit einer komplexen Regulierung und Veränderung des Transkriptoms und Proteoms einher, die die einzelnen phänotypischen Änderungen der Zellen erzeugen (Sauer *et al.*, 2002).

1.2.1 Der initiale Schritt der Infektion ist die Adhäsion

Zunächst gelangen die zu diesem Zeitpunkt freibeweglichen, planktonischen Mikroorganismen in die Wirtszellumgebung. Die in flüssiger Umgebung befindlichen Mikroorganismen bewegen sich durch eine Schwimmbewegung (1.3.1), welche durch das einzelne polare Flagellum von *P. aeruginosa* vermittelt wird. Gelangt der Mikroorganismus an eine feste Grenzfläche, z.B. die Oberfläche des Wirtes, beginnt die initiale Adhäsion als erster Schritt der Infektion. Diese Adhäsion erfolgt teilweise durch unspezifische Faktoren, wie hydrophobe Wechselwirkungen und elektrostatische Kräfte (Mirelman & Ofek 1986; Richardson & Steiner 1995) sowie durch Typ-IV-Pili, Cup-Fimbrien, Flagellen und Adhäsine (O'Toole & Kolter 1998; Vallet *et al.*, 2001; Sauer *et al.*, 2002). Die Typ-IV-Pili assoziierten Adhäsine, spielen eine Rolle bei der Kohlenhydrat-vermittelten Adhäsion von *P. aeruginosa* und binden asialo-GM1 und -GM2 Glykolipide (Sheth *et al.*, 1994; Hahn 1997), während z.B. das Flagellin und das Flagellar-Kopfprotein FliD Mucinoligosaccharide erkennen und binden (Scharfman *et al.*, 2001). Klausen und Kollegen zeigten, dass je nach Kohlenstoffquelle das Flagellum und die Typ-IV-Pili nicht für die initiale Adhäsion benötigt werden (Klausen *et al.*, 2003b). Dies legt nahe, dass weitere nicht Typ-IV-Pili-assoziierte Adhäsine die bakterielle Adhäsion vermitteln. Zu diesen Adhäsinen gehören die *P. aeruginosa* Lektine LecA und LecB, welche die Lektin-vermittelte Adhäsion an spezifische Strukturen der Wirtsoberfläche ermöglichen (Steuer *et al.*, 1995; von Bismarck *et al.*, 2001; Tielker *et al.*, 2005).

Nach der ersten reversiblen Adhäsion an den Wirt beginnt ein Kriechprozess, welcher als *twitching motility* (TM) bezeichnet wird (1.3.2). Die bakterielle TM wird durch die Typ-IV-Pili-vermittelt und ermöglicht dem Bakterium einen geeigneten Infektionsort auf der Wirtsoberfläche auszukundschaften. Die Bewegung basiert auf der Streckung und Retraktion

der Typ-IV-Pili (Bradley 1980; Merz *et al.*, 2000) und wird durch eine Vielzahl Chemotaxis-assoziiierter Gene gesteuert (Darzins 1994).

1.2.2 Die Biofilmbildung und Zell-Zell-Kommunikation

Nach Erreichen eines geeigneten Infektionsortes nimmt die Beweglichkeit der Zellen ab (Sauer *et al.*, 2002) und es beginnt die Formierung von Mikrokolonien sessiler Zellen (Klausen *et al.*, 2003b), welche auf der klonalen Teilung der Zellen basiert (Klausen *et al.*, 2003b). Zudem wird nach der Adhäsion der Zellen die Transkription von Genen aktiviert, welche an der Synthese von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) beteiligt sind (Davies & Geesey 1995). Die Umhüllung von Oberflächen-assoziierten mikrobiellen Gemeinschaften mit dieser EPS-Matrix wird als Biofilmbildung bezeichnet (Wingender *et al.*, 1999; Donlan & Costerton 2002; Allesen-Holm *et al.*, 2006; Ma, L. *et al.*, 2009). Durch die Ausbildung eines Biofilms schützen sich die Bakterien gegen Abwehrmechanismen des Wirtes (Gacesa 1998), zudem stellt die Biofilmbildung eine wichtige Säule in der Pathogenität von *P. aeruginosa* dar (Ramsey & Wozniak 2005). Diese Biofilme stellen eine dreidimensionale Gel-ähnliche und äußerst stark hydratisierte Struktur dar, in denen die Mikroorganismen immobilisiert werden. Die Matrix der Biofilme von *P. aeruginosa* besteht aus extrazellulärer DNA, Proteinen, Vesikeln und Exopolysacchariden (Wingender *et al.*, 1999; Allesen-Holm *et al.*, 2006; Ryder *et al.*, 2007; Gooderham & Hancock 2009; Ma, L. *et al.*, 2009). Im nicht-mukoiden *P. aeruginosa* PA01 und PAK Stamm besteht die Biofilmstruktur primär aus den beiden Exopolysacchariden Pel und Psl (Friedman & Kolter 2004b, a; Matsukawa & Greenberg 2004). Pel ist ein glukosereiches EPS, welches zur Bildung von Pellikeln an der Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche oder in reifen, fest an Oberflächen-assoziierten Biofilmen notwendig ist (Wozniak *et al.*, 2003; Friedman & Kolter 2004b; Ghafoor *et al.*, 2011), während Psl ein Mannose-reiches Pentasaccharid ist (Byrd *et al.*, 2009). Es besteht aus D-Mannose, D-Glukose und L-Rhamnose (Byrd *et al.*, 2009) und ist für die Scherfestigkeit und Stabilität von nicht-mukoiden Biofilmen von Bedeutung (Bazire *et al.*, 2010). Die Regulation der Gencluster beider EPS ist hochkomplex und transkriptionell durch das zyklische di-Guanosinmonophosphat, kurz c-di-GMP (Lee, V. T. *et al.*, 2007; Borlee *et al.*, 2010), einem sekundären Botenstoff der Zelle sowie translational durch das Gac/Rsm Signalnetzwerk reguliert (Brencic & Lory 2009; Irie *et al.*, 2010). Darüber hinaus ist die strukturelle Entwicklung von *P. aeruginosa* Biofilmen von der nutzbaren Kohlenstoffquelle

abhängig (Klausen *et al.*, 2003b). *P. aeruginosa* bildet unter Durchflussbedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle, heterogene pilzähnliche Mikrokolonien (Abb. 1) in den Biofilmen (Stewart *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1998).

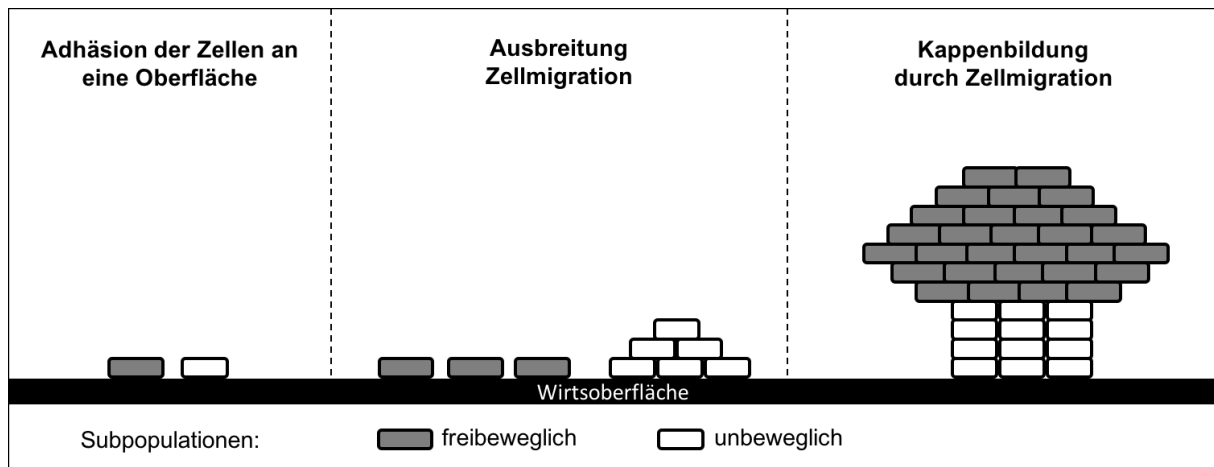


Abbildung 1 Bildung von *P. aeruginosa* Biofilmen mit multizellulären Strukturen. Nach der Adhäsion des Bakteriums an die Wirtsoberfläche zeigen sich freibewegliche und unbewegliche Subpopulationen. Während sich die beweglichen Bakterien an der Oberfläche, Typ-IV-Pili vermittelt und Chemotaxis-gesteuert ausbreiten, bilden die unbeweglichen Bakterien die initialen Mikrokolonien durch Zellteilung. Die beweglichen Bakterien beginnen anschließend, an den Mikrokolonien der unbeweglichen Bakterien zu deren Spitze zu klettern. Die Lokalisierung an der Spitze der Mikrokolonie ermöglicht die Biofilm-typische Kappenbildung. Die Abbildung ist modifiziert nach Klausen und Kollegen (2003).

Semmler zeigte 1999 unter Laborbedingungen, dass nicht alle Subpopulationen die oben beschriebene *twitching motility* (TM) aufweisen (Semmler *et al.*, 1999). Dies begünstigt unter Biofilmbedingungen die Bildung von Mikrokolonien und legt den Grundstein für die Formierung komplexer Biofilmstrukturen (Abb. 1). Die beweglichen Bakterien bewegen sich durch eine Typ-IV-Pili-vermittelte Kletterbewegung (Skerker & Berg 2001) zu der Spitze der Mikrokolonien (Klausen *et al.*, 2003a). Klausen stellte 2003 die Hypothese auf, dass diese Kletterbewegung den Bakterien an der Spitze der Mikrokolonie eine bessere Nährstoffversorgung ermöglichen könnte (Klausen *et al.*, 2003a), da es innerhalb der Biofilme durch den lokalen Konsum von Nährstoffen zu einem Nährstoffgradienten kommt (de Beer *et al.*, 1994; Wimpenny & Colasanti 1997; Picioreanu *et al.*, 1998). Die zielgerichtete Bewegung des Bakteriums entlang eines Nährstoffgradienten ist eine Typ-IV-Pili vermittelte Bewegung, welche durch Chemotaxis-gesteuerte Gene reguliert wird (Darzins 1994).

Während *P. aeruginosa* also unter Bedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle komplexe, heterogene Biofilme bildet (Stewart *et al.*, 1993; Davies *et al.*, 1998), bildet das Bakterium mit Citrat als Kohlenstoffquelle flache, einheitliche und dichtgepackte Biofilme (Heydorn *et al.*, 2000; Heydorn *et al.*, 2002). Dabei bilden einzelne sessile Zellen, welche TM-unabhängig adhären, Mikrokolonien durch Zellteilung (Klausen *et al.*, 2003b). Durch

Nährstofflimitierung ist das Wachstum beschränkt, weshalb einige Zellen der Mikrokolonie mit der Typ-IV-Pili-vermittelten TM und Ausbreitung beginnen, bis ein flacher, einheitlicher und dichtgepackter Biofilm ausgebildet ist (Klausen *et al.*, 2003b).

Bakterien können komplexe, heterogene Biofilme bilden, in denen ein Netz aus wasserführenden Kanälen den Transport von Nähr- und Abfallstoffen ermöglicht (Costerton *et al.*, 1995; Costerton *et al.*, 1999; Flemming & Wingender 2001). Die komplexe Biofilmarchitektur wird durch bakterielle Zell-Zell-Kommunikation und externe Umweltsignale koordiniert (Davies *et al.*, 1998). Die Zell-Zell-Kommunikation von *P. aeruginosa* basiert unter anderem auf der Synthese und Erkennung der niedermolekularen organischen *N*-Acyl-Homoserinlacton (AHL) *Autoinducer* des LasI-LasR und des RhII-RhIR *quorum sensing* (QS-) Systems (Davies *et al.*, 1998; de Kievit, T. R. *et al.*, 2001). Das QS-System ist ein hoch komplexes Zelldichte-abhängiges Regulationssystem, bei dem jede Zelle eine geringe Basismenge an AHLs produziert.

Das Las-System nutzt die LasI-Synthase, welche das *N*-3-oxo-dodecanoyl-Homoserinlacton (3-oxo-C₁₂-HSL) produziert, dass von dem LasR-Transkriptionsregulator erkannt wird und die Expression der Zielgene steuert (Jones, S. *et al.*, 1993; Passador *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1994). Das zweite QS-Regulationsnetzwerk von *P. aeruginosa* stellt das Rhl-System dar, dass durch die RhII-Synthase das *N*-butanoyl-Homoserinlacton (C₄-HSL) produziert (Pearson *et al.*, 1995), welches durch den RhIR-Transkriptionsregulator erkannt wird. Mit ansteigender Zelldichte akkumulieren die *Autoinducer*, bis ein Schwellenwert („*Quorum*“) überschritten ist. Anschließend bindet der *Autoinducer* an einen Transkriptionsaktivator (RhIR bzw. LasR), welcher die Expression von QS-abhängigen Genen induziert (de Kievit, T. R. *et al.*, 2001).

Das *P. aeruginosa* Las-Regulationsnetzwerk kontrolliert die Expression verschiedener Virulenzfaktoren, welche direkt an der akuten Infektion und Wirtszellschädigung beteiligt sind, wie die alkalische Protease (Gambello *et al.*, 1993), LasA-Protease (Toder *et al.*, 1991), LasB-Elastase (Jones, S. *et al.*, 1993), das Exotoxin A (Gambello *et al.*, 1993) und ist an der frühen Phase der komplexen Biofilmbildung beteiligt (Sauer *et al.*, 2002). Das Rhl-System ist an der späten Biofilmbildung beteiligt und kontrolliert die Expression der extrazellulären Enzyme, des stationären Phase Transkriptionsfaktors RpoS, der sekundären Metabolite und die Rhamnolipid-Synthese (Latifi *et al.*, 1996; Davey *et al.*, 2003). Zudem reprimiert dieses die Zusammensetzung und Funktion des Typ-III-Sekretionssystems (Blevess *et al.*, 2005),

welches eine der virulenten Hauptkomponenten gegenüber eukaryotischen Zellen darstellt, da dieses die Sekretion von toxischen Proteinen direkt ins Zytoplasma der Wirtszelle ermöglicht (Roy-Burman *et al.*, 2001). Die durch das Rhl-System induzierte Synthese von rhamnosehaltigen Glykoproteinen (Rhamnolipiden) wird benötigt, um die Bildung und Aufrechterhaltung von wasserführenden Kanälen im späten Stadium der komplexen Biofilme zu gewährleisten (Ochsner & Reiser 1995; Maier, R. M. & Soberon-Chavez 2000; Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel 2003). Daneben reguliert das Rhl-System die Produktion von Pyocyaninen, Siderophoren sowie der beiden Lektine LecA und LecB. (Winson *et al.*, 1995; Winzer *et al.*, 2000; Diggle *et al.*, 2002).

Für die Ausbildung der vollständigen Virulenz von *P. aeruginosa* werden beide QS-Systeme benötigt (Rumbaugh *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2000; Smith, R. S. *et al.*, 2002). Diese sind zudem über die positive Regulation der *rhII*- und *rhIR*-Gene sowie durch posttranslationale Regulation durch das Las-System eng miteinander verknüpft (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997). Dieses komplexe Regulationsnetzwerk kontrolliert mit zusätzlichen Regulatoren, wie GacA (Reimann *et al.*, 1997), MvaT (Diggle *et al.*, 2002), RpoS (Latifi *et al.*, 1996), RsaL (de Kievit, T. *et al.*, 1999) und Vfr (Albus *et al.*, 1997) etwa 5 % der Gene in *P. aeruginosa* (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Durch die enge Verbindung der beiden Netzwerke miteinander kann die Expression bestimmter Gene zu definierten und Zelldichte-abhängigen Zeitpunkten ermöglicht werden, weshalb sessile Zellen innerhalb eines Biofilms einen veränderten Phänotyp gegenüber von planktonischen Zellen aufweisen (Whiteley *et al.*, 2001). Einige QS-regulierte Gene werden dabei von beiden beschriebenen QS-Systemen reguliert, wie z.B. die Elastase LasB und die beiden Regulatoren *xcpP* und *xcpR* des Xcp-Sekretionssystems (Jones, S. *et al.*, 1993; Passador *et al.*, 1993; Chapon-Herve *et al.*, 1997; Jimenez *et al.*, 2012). Darüber hinaus spielen das *P. aeruginosa* Quinolone Signal (PQS)- und IQS-System ebenfalls eine Rolle in der Biofilmbildung und verbindet die beiden QS-Netzwerke miteinander, indem es die negativen Regulatoren MvaT und RsmA inhibiert und das Rhl-System aktiviert, wodurch die Elastase, LecA und Pyocyanin Produktion bereits in der frühen stationären Phase ermöglicht wird und die Biofilmbildung unterstützt (Diggle *et al.*, 2003). Dabei ist das PQS-System zwar nicht von der Zelldichte, wohl aber von der Wachstumsphase abhängig (Diggle *et al.*, 2003).

1.2.3 Die Freisetzung von *P. aeruginosa*

Die Freisetzung von Zellen aus sessilen Biofilmen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Durch physikalische Kräfte, z.B. Scherkräfte, können Teile des Biofilms abgetrennt und freigesetzt werden (Costerton 1999). Zudem kann durch ein Signal die Mobilisierung von planktonischen Zellen initialisiert und damit die Freisetzung von Zellen ermöglicht werden (Costerton 1999). Das Signal kann ein Signalmolekül, z.B. das *N*-Acyl-Homoserinlactone (AHL) des *quorum sensing* (QS-) Systems bei *Rhodobacter sphaeroides* (Puskas *et al.*, 1997) oder bei *P. aeruginosa* ein Enzym, welches das Alginat einiger mukoider *P. aeruginosa* Stämme des Biofilms lysiert (Boyd, A. & Chakrabarty 1994), sein. Darüber hinaus können aufgrund von Nährstoffmangel komplexe Regulationsmechanismen in Gang gesetzt werden, welche die Freisetzung von Zellen zur Besiedlung geeigneterer Standorte ermöglichen (Costerton 1999; Sauer *et al.*, 2004; Reisner *et al.*, 2005). So wird unter nährstofflimitierenden Bedingungen die Expression des Flagellins (*fliC*) erhöht, während die Expression der Hauptkomponente der Typ-IV-Pili (*pilA*) reduziert wird (Sauer *et al.*, 2004). Dies ermöglicht den Wechsel aus der sessilen Phase in den planktonischen, freischwimmenden *P. aeruginosa* Phänotyp.

1.3 Die Bewegungsformen von *P. aeruginosa*

1.3.1 Die Flagellum-vermittelte Schwimmfähigkeit

Die Schwimmbewegung ermöglicht dem Mikroorganismus zunächst eine geeignete Adhäsionsoberfläche für die Besiedlung, Verbreitung und Infektion über größere Strecken in flüssiger Umgebung zu erreichen (O'Toole & Kolter 1998). Die Schwimmfähigkeit von *P. aeruginosa* wird durch die Rotation des polaren Flagellums und die daraus resultierende Propellerbewegung vermittelt. Das Flagellum ist evolutionär mit dem Typ-III-Sekretionsapparat verwandt und in der Morphologie ähnlich (Abby & Rocha 2012; Bergeron *et al.*, 2016). Beide Systeme bestehen aus einem basalen Teil, welcher in die Membranen eingebettet ist, einen zytoplasmatischen Exportapparat, welcher beim Flagellum zusätzlich für die Rotation verantwortlich ist sowie der Nadelstruktur (Typ-III) bzw. dem Filament des Flagellums (Büttner 2012; Kawamoto *et al.*, 2013). Der Zusammenbau des Typ-III-Sekretionssystems und des Flagellums erfolgt einem ähnlich streng regulierten Programm (Minamino *et al.*, 2008; Büttner 2012; Burkinshaw & Strynadka 2014). Dazu

werden zunächst die inneren Membrankomponenten des Exportsystems und der basale Teil, welcher in die innere Membran eingebettet wird, zusammengesetzt. Anschließend folgt die Rekrutierung der äußeren Membranproteine und die Sekretion der Nadelstruktur (Typ-III) bzw. des Filaments des Flagellums (Bergeron *et al.*, 2016). Die Komponenten für den distalen, wachsenden Teil des Flagellums wie das Flagellin FliC werden über den Flagellar-Typ-III-Proteinsekretionsapparat durch den Zentralkanal des Flagellums transportiert (Minamino *et al.*, 2008). Durch die Rotation des Flagellums gegen oder mit dem Uhrzeigersinn erfolgt die bakterielle Schwimmbewegung. Die *P. aeruginosa* Biogenese des Flagellums ist ein komplexer hierarchischer Prozess, in dem verschiedene Transkriptionsaktivatoren (FleQ, FleR) und alternative Sigmafaktoren (RpoN/ σ 54, RpoF/ σ 28) an der Regulation der Flagellargene und -operons involviert sind (Totten *et al.*, 1990; Starnbach & Lory 1992; Ritchings *et al.*, 1995; Arora *et al.*, 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der FleQ-Transkriptionsaktivator, welcher den stärksten positiv-Regulator der Flagellar-Biogenese darstellt, durch den Virulenzfaktor-Regulator (Vfr) mittels Bindung innerhalb der *fleQ*-Promotor-Region inhibiert wird (Dasgupta *et al.*, 2002). Der Vfr fungiert hingegen als positiv-Regulator für die Produktion des Exotoxin A, den Typ-IV-Pili, dem Typ-III-Sekretionssystem und des Las-QS-Systems (Albus *et al.*, 1997; Beatson *et al.*, 2002; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003), indem es innerhalb der Promotoren von *toxA*, *lasR*, *fleQ*, *cpdA*, *regA* und *ptxR* bindet (Albus *et al.*, 1997; Dasgupta *et al.*, 2002; Kanack *et al.*, 2006; Ferrell *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2010b). Neben der Schwimmbewegung ist das bakterielle Flagellum an zahlreichen weiteren Prozessen wie der Biofilmbildung, Chemotaxis, Proteinexport und der reversiblen Adhäsion an Oberflächen beteiligt (Sauer *et al.*, 2002).

1.3.2 Die Typ-IV-Pili-vermittelte Kriechbewegung

Die Typ-IV-Pili stellen neben dem Flagellum eine weitere wichtige Struktur des Bakteriums dar, welche die bereits angesprochene Kriechbewegung des Bakteriums auf biotischen und abiotischen Oberflächen ermöglicht. Diese Kriechbewegung, bekannt als *twitching motility* (TM), basiert auf der Streckung und Retraktion der polarlokalisierten Typ-IV-Pili (Bradley 1980; Skerker & Berg 2001), welche eine Kraft von bis zu 100 pN pro Filament erzeugen (Merz *et al.*, 2000; Maier, B. *et al.*, 2002).

Die Expression der Typ-IV-Pili wird durch den Sigmafaktor RpoN sowie dem zusätzlichen Transkriptionsregulator PilR und dessen Sensor PilS reguliert (Hobbs *et al.*, 1993). Der Pilus von *P. aeruginosa* ist zudem für die Adhäsion verantwortlich; die Bewegungskraft für die Kriechbewegung wird durch zytoplasmatische ATPasen erzeugt. Diese hexameren ATPasen sind die Proteine PilB, PilT und PilU (Whitchurch *et al.*, 1991; Whitchurch & Mattick 1994; Mattick 2002; Chiang *et al.*, 2005; Chiang *et al.*, 2008), welche ATP hydrolysieren und die freiwerdende Energie für die Pilus Streckung und Retraktion zur Verfügung stellen. Zudem ist davon auszugehen, dass diese ATPasen an der Assemblierung und dem Abbau der Pili-Untereinheiten unter anderem durch Wechselwirkungen mit den inneren Membranproteinen PilMNOP(+C) beteiligt sind (Misic *et al.*, 2010). Diese Pilus-vermittelte Bewegung wird von einem komplexen chemosensitiven Signalweg kontrolliert, welcher durch die Proteine PilG, PilH, PilI, PilJ, PilK, ChpA, ChpB und ChpC realisiert wird (Darzins 1994; Whitchurch *et al.*, 2004). Zudem fungiert PilY1 als Calcium-abhängiger Regulator der bakteriellen TM (Orans *et al.*, 2010). Die Calciumbindung erfolgt durch einen konservierten Loop, welcher auch in PilY1-Homologen PilC1 und PilC2 von *Neisseria meningitidis* und *N. gonorrhoeae* beobachtet wurde (Orans *et al.*, 2010). Für die Kontrolle der TM von *P. aeruginosa* ist die Freisetzung von Calcium durch PilY1 für die PilT-abhängige Pili-Retraktion notwendig (Orans *et al.*, 2010).

Die Typ-IV-Pili sind mehrere μm lange, 5-8 nm dünne, haar-ähnliche Strukturen auf der bakteriellen oder archealen Zelloberfläche (Bradley 1973; Pelicic 2008). Der Typ-IV-Pili Aufbau und die vermittelte koordinierte TM der Zelle basiert auf über 40 verschiedenen Genen von *P. aeruginosa* (Mattick 2002; Pelicic 2008; Burrows 2012). Diese Gene können in strukturelle Komponenten, inklusive der notwendigen Biogenesefaktoren und regulatorischen Komponenten, welche die Steuerung über die Bewegungsrichtung und Zeitpunkte übernehmen, eingeteilt werden (Leighton *et al.*, 2015). Der Pilus-Zusammenbau hängt von vier voneinander abhängigen Unterkomplexen ab, dem Piluskomplex, dem äußeren Membrankomplex, dem Motorkomplex und dem Zentrierungskomplex (Burrows 2012).

Der distale wachsende Teil des Typ-IV-Pili, der Pilus, wird durch das PilA-Protein gebildet, welches die strukturelle Hauptkomponente des Nadel-ähnlichen Pilus aus mehreren hundert PilA-Polymeren bildet. Zudem werden in geringen Mengen sogenannte *minor* Pilin-Proteine

in den Pilus integriert (Strom & Lory 1993; Giltner *et al.*, 2010). Ein polycistronisches Operon kodiert die fünf *minor* Pilin-Proteine (FimU-PilVWXE) sowie die zwei PilY1 und PilY2 Pilus-Biogenesefaktoren (Belete *et al.*, 2008).

Die fünf *minor* Pilin-Proteine bilden den Initiierungskomplex für den Aufbau der Pili, was möglicherweise deren Integration in die Pili ermöglicht (Winther-Larsen *et al.*, 2005; Winther-Larsen *et al.*, 2007; Giltner *et al.*, 2010). Die Assemblierung dieses Komplexes basiert auf der Bildung eines Unterkomplexes aus PilVWX und dem Biogenesefaktor PilY1 an der inneren Membran, welcher anschließend PilE rekrutiert und dann mittels PilE und FimU mit PilA interagiert (Nguyen *et al.*, 2015). Die Funktion von FimU wird als Adapter zwischen PilA und dem PilCWXE-Y1-Komplex vermutet (Nguyen *et al.*, 2015). Der fertige Pilusinitiierungskomplex fungiert als Primer für die Polymerisierung hunderter PilA-Untereinheiten, welche sich schraubenförmig von der Basisstruktur aus aneinanderreihen (Leighton *et al.*, 2015). Die Stöchiometrie der an der Assemblierung beteiligten Proteine ist wichtig, da andernfalls eine Überexpression oder Deletion einzelner Untereinheiten zur Reduzierung der TM führt (Giltner *et al.*, 2010). Die PilA-Proteine und die *minor* Pilin-Proteine teilen eine hochkonservierte N-terminale Domäne, welche charakteristisch für Typ-IV-Pili und Typ-II-Sekretionsprotein sind, sich jedoch in ihrem C-Terminus unterscheiden.

Die Prepilin-Proteine werden co-translational von dem SRP (*signal recognition particle*) des Sec-Sekretionssystems (Typ-II) gebunden und über die innere Membran transportiert (Arts *et al.*, 2007; Francetic *et al.*, 2007). Die hydrophobe N-terminale α -Helix der Prepilins verbleibt in der inneren Membran, während die *leader*-Sequenz im Zytoplasma und die C-terminale Domäne im Periplasma lokalisiert ist (Strom & Lory 1987; Craig *et al.*, 2006). Diese Topologie des Prepilin ist notwendig für die korrekte Erkennung und Prozessierung durch die Prepilinpeptidase (PilD=XcpA). Die Prepilin-Peptidase PilD prozessiert in *P. aeruginosa* z.B. das PilA, das FimT-Prepilin-Protein sowie die *minor* Pilin-Proteine aus *P. aeruginosa*. Es werden jedoch nicht alle an der Pilus-Biogenese beteiligten Prepilin-Proteine durch die Peptidase prozessiert (Alm & Mattick 1996a; Winther-Larsen *et al.*, 2007; Giltner *et al.*, 2010). Der äußere Membrankomplex besteht aus einem stabilen Oligomer von zwölf PilQ-Untereinheiten und dessen Lipoprotein PilF, welche stabile Protein-Protein-Interaktionen ausbilden (Koo *et al.*, 2008). Das PilF-Protein ist für die

Oligomerisierung und die korrekte Lokalisierung in der äußeren Membran verantwortlich (Koo *et al.*, 2008). Dieser Komplex bildet einen Kanal für die Freisetzung der Pilus-Nadelstruktur aus der Zelle hinaus (Wolfgang, M. *et al.*, 2000).

Der Motorkomplex enthält die Proteine PilB, PilC, PilT und PilU (Whitchurch *et al.*, 1991; Whitchurch & Mattick 1994; Chiang *et al.*, 2005). PilB ist eine hexamere ATPase, welche für die Pilus-Zusammensetzung notwendig ist. PilT und PilU sind PilB-ähnliche ATPasen, welche für die Pilin Depolymerisierung erforderlich sind. Das PilT-Protein fungiert als Retraktionsmotor für den Typ-IV-Pilus (Sakai *et al.*, 2001; Satyshur *et al.*, 2007; Savvides 2007). Das PilC-Protein ist ein Membranprotein, welches zwei zytoplasmatische Domäne aufweist, von der jede sechs α -Helix-Strukturen enthält (Karuppiiah *et al.*, 2010). Das PilC- und PilB bilden vermutlich die minimale Funktionseinheit des Motors und sind in den Typ-IV-Pili und dem Typ-II-Sekretionssystem hochkonserviert (Averhoff & Friedrich 2003; Peabody *et al.*, 2003; Pohlschroder *et al.*, 2011).

Der Zentrierungskomplex verbindet den inneren Membranmotorkomplex mit dem äußeren Membrankomplex und ist für den ausbildenden Pilus in der korrekten Position zuständig. Dieser Zentrierungskomplex besteht aus den Proteinen PilMNOP und wird von demselben Operon wie PilQ kodiert (Pelicic 2008). Die Proteine PilNOP bilden einen Komplex an der inneren Membran (Tammam *et al.*, 2011), während das Aktin-ähnliche PilM-Protein zytoplasmatisch lokalisiert und über den N-Terminus an PilN gebunden wird (Karuppiiah & Derrick 2011). Das PilP ist ein Lipoprotein das an die innere Membran assoziiert (Golovanov *et al.*, 2006; Tammam *et al.*, 2011) einen stabilen Komplex mit PilNO(+M) bildet und zudem die Interaktion mit dem äußeren Membrankomplex über PilQ herstellt (Balasingham *et al.*, 2007; Tammam *et al.*, 2011). Zudem wird für die korrekte Ausrichtung des Komplexes an das PilQ-Sekretin das FimV-Protein benötigt, welches sowohl eine zytoplasmatische als auch periplasmatische Domäne aufweist. Letztere enthält ein Peptidoglykanbinde-Motiv (Semmler *et al.*, 2000), welches für die korrekte Formation mit PilQ benötigt wird und so die korrekte Ausrichtung des Komplexes ermöglicht (Wehbi *et al.*, 2011).

Die Typ-IV-Pili spielen neben der Bewegung von *P. aeruginosa* eine wichtige Rolle bei der Oberflächen-Adhäsion, der Zell-Zell Aggregation, DNA-Aufnahme und Biofilmbildung (Bradley 1980; Saiman *et al.*, 1990; Lee, K. K. *et al.*, 1994; Mattick 2002; Pelicic 2008). In Abwesenheit der Typ-IV-Pili zeigt sich, dass diese in der Wirtzellkolonisierung beeinträchtigt

und weniger infektiös sind, weshalb die Typ-IV-Pili als Virulenzfaktoren kategorisiert werden (Farinha *et al.*, 1994; Hahn 1997). Bisher wurde mehrere Theorien aufgestellt, wie die Pili an einer Oberfläche adhären. Eine Theorie postuliert, dass das Pila sowohl als Strukturelement des Pili, als auch als Adhäsion fungiert (Lee, K. K. *et al.*, 1994). Dies konnte allerdings bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht belegt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Glykosylierung der Pili und die Adhäsion an Oberflächenrezeptoren des Wirtes. Analysen zeigen, dass die Typ-IV-Pili von *P. aeruginosa* 1244 glykosyliert sind (Castric 1995). Die Typ-IV-Pili von *P. aeruginosa* PA01 und PAK sind dagegen nicht glykosyliert (Frost & Paranchych 1977; Paranchych *et al.*, 1979).

1.3.3 Die Flagellum- und Typ-IV-Pili-vermittelte Schwärmbewegung

Neben der Schwimm- und Kriechbewegung von *P. aeruginosa* konnte eine dritte Bewegungsform identifiziert werden, das Schwärmen (Köhler *et al.*, 2000). Die Schwärmbewegung von *P. aeruginosa* in semisoliden Umgebungen ist QS-reguliert und basiert auf dem Zusammenspiel der Typ-IV-Pili mit dem Flagellum (Köhler *et al.*, 2000; Shrout *et al.*, 2006). Dabei können bestimmte Umgebungskonditionen die Schwärmbewegung induzieren. Zu diesen Umgebungskonditionen gehören die Viskosität, die Stickstoffverfügbarkeit und die Aminosäurekomposition der Umgebung (Köhler *et al.*, 2000). Interessanterweise zeigen schwärmende *P. aeruginosa* Zellen am Rand des Schwärmbereichs einen elongierten Phänotyp mit zwei Flagellen (Köhler *et al.*, 2000; Rashid & Kornberg 2000). Möglicherweise fungieren die Typ-IV-Pili als Sensoren für die Viskosität der Umgebung und initiieren das Schwärmverhalten. Zudem beeinflusst eine Stickstoff-limitierende Umgebung die Pilussynthese, da die Transkription einiger Pilusgene (*pilABCD*) durch die Regulatoren *pilS* und *pilR*, sowie durch den RpoN-Sigmafaktor kontrolliert werden, welche ebenfalls an der Transkription Stickstoff-regulierter Gene beteiligt sind (Ishimoto & Lory 1989; Hobbs *et al.*, 1993). Die Schwärmbewegung dient dem Bakterium als weitere Bewegungsform, um ein möglichst umfangreiches Spektrum an Umweltnischen zu erreichen und zu besiedeln.

1.4 Rolle der Sekretion für die bakterielle Pathogenität

Die Sekretion von Virulenzfaktoren ist entscheidend für die Pathogenität von *P. aeruginosa* (Hauser 2011). Bekannte Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* sind die Exotoxine A, S, U (Liu 1973, 1974; Iglewski & Kabat 1975; Klinger *et al.*, 1978; Gambello *et al.*, 1993; Bitter 2003; Hauser 2009), ein Zytotoxin (Lutz *et al.*, 1992), das Pyocyanin (Lyczak *et al.*, 2000), als auch eine Elastase, welche möglicherweise eine bedeutende Rolle bei der Initiierung der Pathogenen-Phase besitzt (Döring & Hoiby 1983; Gambello & Iglewski 1991; Stehling *et al.*, 2008). Darüber hinaus gehören Enzyme mit lipolytischer Aktivität wie z.B. die Phospholipasen C, eine Esterase (Berka & Vasil 1982; Wilhelm *et al.*, 1999) sowie mehrere Lipasen (Stuer *et al.*, 1986; Jaeger *et al.*, 1991; Martinez, A. *et al.*, 1999; Barker *et al.*, 2004), außerdem verschiedene Proteasen (Klinger *et al.*, 1978; Döring *et al.*, 1981; Obernesser *et al.*, 1981; Döring & Hoiby 1983; Caballero *et al.*, 2001; Marquart *et al.*, 2005; Thibodeaux *et al.*, 2005) zu den *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren. Neben diesen Virulenzfaktoren synthetisiert *P. aeruginosa* die Lipopolysaccharide (LPS), Exopolysaccharide sowie die Lektine LecA und LecB, welche ebenfalls an der Pathogenität beteiligt sind (Ohman & Chakrabarty 1981; Cryz *et al.*, 1984; Gilboa-Garber 1997). Die Lektine sind an der Adhäsion des Mikroorganismus an die Zelloberfläche des Wirtes ebenso beteiligt wie an zytotoxischen Effekten gegenüber Epithelzellen des respiratorischen Traktes und dessen Zilienbewegung (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994; Adam, E. C. *et al.*, 1997a; Adam, E. C. *et al.*, 1997b).

P. aeruginosa besitzt, bis auf den Typ-IV-Sekretionsweg, alle in Gram-negativen Bakterien bekannte Sekretionsapparate (Ma, Q. *et al.*, 2003; Filloux 2004). Die Proteine können über Ein-Schritt- oder Zwei-Schritt-Sekretionsmechanismen transportiert werden (Koster *et al.*, 2000; Rosenau & Jaeger 2000; Ma, Q. *et al.*, 2003). Die Ein-Schritt-Sekretion von Proteinen erfolgt unter ATP-Verbrauch entweder durch ABC-Transporter (Typ-I) oder Typ-III-Exportproteine, welche dem Flagellen-Export-Apparat ähneln (Aizawa 2001; Blocker *et al.*, 2003). Die akute Infektion und Zytotoxizität von *P. aeruginosa* wird durch das Typ-III-Sekretionssystem von Bakterien ermöglicht. Dieses ist für die Translokation von einer Vielzahl verschiedener Virulenzfaktoren, wie ExoU, ExoS, ExoT und ExoY, über die innere- und äußere Membran des Bakteriums sowie über die Wirtszellmembran der eukaryotische Zelle verantwortlich (Yahr *et al.*, 1996a; Yahr *et al.*, 1996b; Finck-Barbancon *et al.*, 1997; Frank 1997; Yahr *et al.*, 1998; Dacheux *et al.*, 1999) und teilweise durch das QS-Netzwerk (Bleves *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2008) beziehungsweise durch das intrazelluläre

3',5'-zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Level reguliert (Wolfgang, M. C. *et al.*, 2003). *In silico* Ansätze legen nahe, dass etwa 40 Gene mit der Aktivität des Typ-III-Sekretionssystem assoziiert sind (Frank 1997). Eine neuere Studie zeigt, dass unter Calcium-limitierenden Bedingungen die *P. aeruginosa* Adenylat Zyklastase CyaB das intrazelluläre cAMP-Level erhöht und die Expression des Typ-III-Sekretionssystems sowie weitere Calcium-abhängige Virulenzfaktoren über das cAMP-bindende Protein Vfr reguliert (Wolfgang, M. C. *et al.*, 2003). Transkriptom-Daten zeigen, dass eine Vielzahl von Wirtszell-gerichteten Virulenzfaktoren sowie die Bewegungssysteme, Adhäsionsorganellen und der Typ-II-Sekretionsapparat ähnlich wie der Typ-III-Sekretionsapparat koordiniert, reguliert sind (Wolfgang, M. C. *et al.*, 2003). Proteine, die über einen Zwei-Schritt-Sekretionsmechanismus sekretiert werden, gelangen zunächst über den Sec- oder Tat-Weg vom Zytoplasma über die innere Membran ins Periplasma (Economou 1999; Berks *et al.*, 2000). Diese Proteine enthalten eine für Sec- oder Tat-spezifische N-terminale Signalsequenz, welche die Translokation ermöglicht. Dabei unterscheiden sich die beiden Sekretionswege im Mechanismus. Über das Sec-Translokon werden ungefaltete Proteine ATP-abhängig transportiert werden, während über Tat gefaltete Proteine ATP-unabhängig transportiert werden. Die Proteine, die den Sec- oder Tat-Sekretionsweg nutzen, benötigen für den Transport vom Periplasma über die äußere Membran den Typ-II-Sekretionsapparat, welcher in *P. aeruginosa* aus den 12 Xcp-Proteinen gebildet wird (Filloux *et al.*, 1998; Filloux 2004).

Der Transfer von Proteinen der äußeren Membran über das Periplasma erfolgt durch die Lol- und Bam-Maschinerie (Okuda & Tokuda 2011). Die Lipoproteine der äußeren Membran werden als Prolipoprotein-Vorstufen durch eine N-terminale Signalsequenz im Zytoplasma erkannt und durch das Sec-Translokon über die innere Membran ins Periplasma transportiert. Hinter dem Signalpeptid tragen diese Lipoproteine eine sogenannte Lipobox, welche posttranslational acetyliert wird, wodurch diese kovalent an die innere Membran gebunden werden (Hayashi & Wu 1990). Die reifen Lipoproteine werden anschließend durch den LolCDE-Komplex gebunden und unter ATP-Hydrolyse die Acetylgruppe des Lipoproteins von der inneren Membran auf das LolA-Chaperon übertragen (Matsuyama, S. *et al.*, 1995). Dieses transportiert das Lipoprotein an die äußere Membran, wo es durch das LolB-Lipoprotein in die äußere Membran transloziert wird (Matsuyama, Si *et al.*, 1997). Neben dem Sekretionssystem für Lipoproteine der äußeren Membran gibt es in *P. aeruginosa* den Bam-Sekretionsapparat (Knowles *et al.*, 2009), welcher

nichtlipo- β -Fassproteine, wie z.B. das äußere Membran Porin OprF, in die äußere Membran transloziert (Hoang *et al.*, 2011). Dazu werden die ungefalteten für die äußere Membran vorgesehenen Proteine (OMP) durch das Sec-Translokon über die innere Membran transportiert. Nachdem das N-terminale Signalpeptid des OMP durch die Signalpeptidase abgespalten wurde, gelangt das Protein ins Periplasma, wo es durch verschiedene Chaperone gebunden und zur äußeren Membran transportiert wird. Dazu bindet das Skp-Chaperone das OMP direkt nach Verlassen des Sec-Apparates, welches es durch das Periplasma zur äußeren Membran transportiert (Harms *et al.*, 2001), während das SurA-Chaperon die Faltung des OMP unterstützt (Lazar & Kolter 1996). An der äußeren Membran wird, katalysiert durch den Bam-Komplex (β -*barrel assembly machine*) bestehend aus dem β -Fass Membranprotein Bam sowie den vier BamB-, BamC-, BamD- und BamE-Lipoproteinen, das nichtlipo- β -Fassprotein gefaltet und in die äußere Membran integriert (Ricci & Silhavy 2012). Es konnte gezeigt werden, dass das Bam-System hochkonserviert ist. Die Funktion und Struktur der evolutionären Bam-Komponente, das BamA-Protein, konnte sowohl in Mitochondrien und Chloroplasten als auch in Gram-negativen Bakterien identifiziert werden (Voulhoux *et al.*, 2003; Ricci & Silhavy 2012). Darüber hinaus zeigte Hoang, dass sowohl der Lol-, als auch der Bam-Sekretionsapparat für *P. aeruginosa* essentiell sind (Hoang *et al.*, 2011). Zudem besitzt *P. aeruginosa* das Typ-V-Sekretionssystem, welches ein Autotransportsystem darstellt, in dem die Proteine ihren eigenen Transport über die äußere Membran vermitteln (Henderson *et al.*, 2004).

1.5 Lektine – Definition

Die meisten lebenden Zellen und Gewebe exprimieren Oberflächenkohlenhydrate, welche an intrazellulären Reaktionen und Interaktionen der Zelle mit zahlreichen weiteren Molekülen beteiligt sind (Beuth *et al.*, 1996). Lektine sind Kohlenhydrat-bindende, von Antikörpern und Enzymen zu unterscheidende Proteine (Barondes 1988), welche ubiquitär in allen Domänen des Lebens zu beobachten sind. Diese sind in der Lage, Erythrozyten zu agglutinieren (Hämagglutination), indem multivalente Bindungen von Oberflächen-exponierten Glykokonjugaten wie Glykolipiden, Glykoproteinen oder weiteren Kohlenhydratstrukturen gebunden werden. Es wird davon ausgegangen, dass Lektine eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Interaktion spielen (Gabius *et al.*, 2002).

Zunächst waren primär pflanzliche Lektine bekannt, bis die Kohlenhydrat-spezifische Adhäsion von Bakterien an Glykokonjugate der Wirtszellen beobachtet wurde, diese Lektine sind z.B. an den bakteriellen Pili und Fimbrien lokalisiert (Boyd, W. C. & Shapleigh 1954; Duguid *et al.*, 1955; Salit & Gotschlich 1977b, a). Lektine haben ein hohes biotechnologisches und medizinisches Potential, wie das Galaktosid-bindende Mistellektin, welches in großem Maßstab, zur Unterstützung in der Anti-Krebs-Therapie eingesetzt wird (Beuth *et al.*, 1995). Lektine weisen in der Regel flache Bindestellen an der Proteinoberfläche auf, an denen die Liganden mit Kontakt zur umgebenden Lösung gebunden werden, während Enzyme ihre Liganden meist vollständig in tiefe Bindetaschen einschließen (Rini 1995). Die Bindung von Lektinen und Kohlenhydratligand basiert grundlegend auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Lektin und den Hydroxylgruppen des Kohlenhydratliganden sowie teilweise auf hydrophoben Wechselwirkungen (Sabin *et al.*, 2006).

Zusammenfassend basiert die fundamentale gemeinsame Charakteristik der Lektine auf der Fähigkeit, verschiedene Kohlenhydrate, nicht-kovalent, reversibel und mit einer hohen Spezifität zu binden (Andre *et al.*, 2015).

1.6 Lektine in Mikroorganismen

Die Lektin-vermittelte Erkennung von Glykoproteinen und Kohlenhydratstrukturen von Zelloberflächen stellt einen wichtigen Schritt für die Interaktion von Pathogen und Wirtszelle dar und ist eng mit der bakteriellen Pathogenität verknüpft (Mrazkova *et al.*, 2017). Durch die Adhäsion pathogener Mikroorganismen an die Wirtszelle beginnt die Besiedlung und Infektion des Wirtes. Durch die Infektion des Wirtes generiert der Mikroorganismus zahlreiche Vorteile. Es wird der Zugang zu Nährstoffen verbessert und die Adhäsion ermöglicht einen Schutz gegen den Selbstreinigungsmechanismus und das Immunsystem des Wirtes (Vierbuchen 1991; Sharon & Ofek 2002). Einige Lektine ermöglichen die Penetration des Wirtsorganismus. Dabei wird zum Beispiel das eukaryotische Glykosphingolipid Gb3 vom bakteriellen LecA-Protein gebunden und durch einen als *Lipid Zipper* benannten Mechanismus die Zelle durch das Bakterium penetriert (Eierhoff *et al.*, 2014), gefolgt von der Freisetzung bakterieller Toxine. Um diese Virulenzkaskade zu inhibieren, wird an der sogenannten Anti-Adhäsions-Therapie geforscht (siehe 1.10). Grundlage dafür ist die

Wechselwirkung von Lektinen und Kohlenhydratstrukturen sowie deren Affinitäten. Wie wichtig die Inhibierung dieses Prozesses ist, zeigt der Blick auf die verschiedensten Lektin-vermittelten Adhäsionen von humanpathogenen Bakterien. So bindet das Mannose-spezifische Lektin FimH von *E. coli*, welches an den Typ-I-Pili lokalisiert ist, an das Uroepithelium (Sharon 1987; Hung *et al.*, 2002), während an der Initiation und Aufrechterhaltung von Infektionen des Gastrointestinaltraktes durch *Helicobacter pylori* mehr als zehn verschiedene Lektine beteiligt sind (Hynes *et al.*, 2003). Auf der Gegenseite bilden einige Wirtsorganismen ebenfalls Kohlenhydrat-bindende Proteine zur spezifischen Adhäsion der Mikroorganismen (Sharon & Ofek 2002). Diese wechselseitige Lektin-vermittelte Interaktion führt zu einem dualen Erkennungsmechanismus, der für den Organotropismus symbiotischer und pathogener Mikroorganismen verantwortlich ist (Beachey 1980; Liener *et al.*, 1986; Mirelman & Ofek 1986).

1.7 Lektine aus *P. aeruginosa*

Die bakterielle Adhäsion von *P. aeruginosa* an den Wirt erfolgt neben unspezifischen Wechselwirkungen auch durch das Flagellin (FliC) und das FliD-Protein des Flagellums (Scharfman *et al.*, 2001), die Typ-IV-Pili (Hahn 1997) sowie die Lektine. *P. aeruginosa* besitzt zwei dieser löslichen Lektine, LecA (früher PA-IL (Gilboa-Garber *et al.*, 1972)) und LecB (früher PA-IIL (Gilboa-Garber *et al.*, 1977)), beide sind direkt mit der Virulenz des Bakteriums assoziiert (Gilboa-Garber 1982). *P. aeruginosa* Stämme, welche diese Virulenz-assoziierten Faktoren exprimieren, weisen ein erhöhtes Virulenzpotential auf (Gilboa-Garber & Garber 1992) und haben somit eine wichtige Rolle bei der humanen Infektion. Die an der Zelloberfläche exponierten Oligossacharidrezeptoren sind in der Natur ubiquitär verbreitet. Es ist daher davon auszugehen, dass beide Lektine an der Adhäsion von Zellen an biotische Oberflächen beteiligt sind (Tielker *et al.*, 2005). Dies wird durch die Beobachtung untermauert, dass die Zugabe von LecA- und LecB-spezifischen Kohlenhydraten zu einer erfolgreichen Behandlung von *P. aeruginosa* induzierter *otitis externa diffusa* Ohrerkrankung (Steuer *et al.*, 1995) sowie einer Atemwegsinfektion führt (von Bismarck *et al.*, 2001). Diese Behandlung basiert auf der hohen Affinität der Lektine zu den Kohlenhydraten, weshalb die Lektin-vermittelte bakterielle Adhäsion an den Wirt verhindert wird (Tielker *et al.*, 2005).

Die Expression dieser beiden Lektine von *P. aeruginosa* ist mit zahlreichen weiteren Virulenzfaktoren assoziiert, welche durch das komplexe QS-System sowie den alternativen Sigmafaktor RpoS der stationären Phase reguliert werden (Gilboa-Garber 1997; Winzer *et al.*, 2000). Aufgrund dessen ist die Synthese der beiden Lektine eng an die von weiteren Virulenzfaktoren, wie die alkalische Protease, Elastase, Exotoxin A und Pyocyanin gekoppelt, bzw. erfolgt zeitgleich (Whiteley *et al.*, 1999). Die beiden Gene *lecA* und *lecB* liegen im Genom relativ weit auseinander (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass die beiden Lektine evolutionär nicht verwandt sind, obwohl sie im weitesten Sinne eine ähnliche Struktur ausbilden (Imberty *et al.*, 2004) und relativ resistent gegenüber Proteolyse, Säuren sowie hohen Temperaturen sind (Imberty *et al.*, 2004). Darüber hinaus sind beide Lektine in der Lage, Erythrozyten von Ratten, Kaninchen, Hunden, Mäusen und Schafen zu agglutinieren, weshalb diese als Breitspektrum-Agglutinine bezeichnet werden (Gilboa-Garber 1972a). Die optimalen Agglutinationstemperaturen von LecA und LecB unterscheiden sich jedoch, so bindet LecA bei 4°C während LecB bei 37°C am idealsten Erythrozyten bindet (Gilboa-Garber *et al.*, 1999). Aufgrund ihrer Funktion stellen die beiden *P. aeruginosa* Lektine LecA und LecB ein vielversprechendes Ziel in der Behandlung von *P. aeruginosa* Infektionen dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Komposition von Oligosacchariden und Glykokonjugaten der menschlichen Muttermilch eine physiologische Schutzfunktion der Babys vor LecA- und LecB-vermittelter *P. aeruginosa* Infektionen darstellen kann (Sharon & Ofek 2000; Lesman-Movshovich *et al.*, 2003; Perret *et al.*, 2005). Besonders das Lektin LecB wird durch die fukosylierten Glykane gebunden und in seiner Funktion als Virulenzfaktor blockiert (Lesman-Movshovich *et al.*, 2003). Zusätzlich könnten sie vergleichbar zum Mistellektin als potentielle Pharmazeutika für die Krebstherapie interessant sein, so zeigen LecA und LecB in *in vitro* Studien Antitumor-Effekte (Avichezer & Gilboa-Garber 1991). Der Sekretionsmechanismus dieser Lektine ist bisher unbekannt (Ma, Q. *et al.*, 2003; Tielker *et al.*, 2005).

1.7.1 Struktur und Funktion von LecA

Das Lektin LecA (Winzer *et al.*, 2000), früher als PA-IL (Gilboa-Garber 1972b) bezeichnet, ist ein galaktophiles Kohlenhydrate-bindendes Protein, welches aus vier gleichen Monomeren von je 12,76 kDa gebildet wird (Avichezer & Gilboa-Garber 1991; Avichezer *et al.*, 1992; Avichezer *et al.*, 1994; Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Jedes dieser Monomere besitzt eine

Zuckerbindestelle, welche jeweils ein Ca^{2+} -Ion enthält, dass die Zuckerbindung ermöglicht (Cioci *et al.*, 2003). Das LecA-Protein zeigt eine Zuckerspezifität von Melibiose > Methyl- α -D-Galaktose > D-Galaktose > Methyl- β -D-Galaktose > N-Acetylgalaktosamin auf (Chen *et al.*, 1998). Die Affinität von LecA zu D-Galaktose weist eine Assoziationskonstante (K_a) von $3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ auf (Garber *et al.*, 1992). Zudem bindet LecA an eine Vielzahl von Glykoproteinen (Chen *et al.*, 1998) und Glykosphingolipiden (Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Lanne *et al.*, 1994). Darüber hinaus kann eine hohe Affinität von LecA zu Adenin und N-Acyl-Homoserinlactone (AHL) beobachtet werden, welche jedoch von der Zuckerbindung unabhängig und auf hydrophobe Liganden zurückzuführen ist (Stoitsova *et al.*, 2003; Boteva *et al.*, 2005). Eine vergleichbare Bindung von Adenin kann zudem beim Lektin Rizin (Watanabe *et al.*, 1992) und einem Shiga-ähnlichen Toxin (Pallanca *et al.*, 1998) beobachtet werden.

Das LecA-Monomer umfasst 121 Aminosäuren (Avichezer *et al.*, 1992; Gilboa-Garber *et al.*, 2000) und wird von dem 369 bp großen *lecA*-Gen kodiert (Avichezer *et al.*, 1994). Die Expression des *lecA*-Gens ist an das *P. aeruginosa* QS-System, den alternativen Sigmafaktor RpoS und an das *P. aeruginosa* Quinolone-Signal (PQS) gekoppelt (Winzer *et al.*, 2000; Diggle *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003). Zudem wird die Expression von *lecA* durch Zell-Zell-Kontakt mit Wirtszellepithelen, wie z.B. Intestinumepithelzellen induziert (Wu *et al.*, 2003). Durch die Kopplung der *lecA*-Expression an das PQS-System ist die Expression von LecA bereits in der frühen stationären Phase unabhängig von der Aktivierung des Rhl-Systems durch LasR möglich (Diggle *et al.*, 2003). Dadurch umgeht das PQS-System die negative transkriptionelle Regulierung von LecA durch MvaT, bzw. die posttranslationale Regulierung durch die RsmA-vermittelte Repression der *lecA*-Transkription (Pessi *et al.*, 2001; Diggle *et al.*, 2003). Die Transkriptionsterminierung erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende Stoppkodons, welche eine Haarnadelstruktur ausbilden und eine Rho-unabhängige Terminierung ermöglichen (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Das LecA-Protein ist reich an Alanin, Asparagin, Asparaginsäure und Glycin, während es geringe Mengen an Arginin, Histidin und Methionin enthält (Avichezer *et al.*, 1992).

Die Struktur von LecA (PDB: 1OKO) weist Ähnlichkeiten mit anderen Lektinen auf. Darüber hinaus weist es einen relativ niedrigen isoelektrischen Punkt von $pI = 4,94$ auf (Avichezer *et al.*, 1992; Gilboa-Garber *et al.*, 2000), enthält einen überwiegend hydrophoben Kern und ein

umfangreiches Netz an β -Faltblättern (Becker *et al.*, 1975; Shaanan *et al.*, 1991; Weis *et al.*, 1991; Avichezer *et al.*, 1992). Trotz dieser und weiterer Gemeinsamkeiten mit anderen Lektinen weist LecA keine ausgeprägte Sequenzhomologie mit diesen auf (Avichezer *et al.*, 1992; Avichezer *et al.*, 1994).

Zudem besitzt LecA kein bekanntes Signalpeptid für die Sekretion (Avichezer *et al.*, 1994) und ist hauptsächlich intrazellulär lokalisiert (Glick & Garber 1983; Diggle *et al.*, 2006). Es können lediglich geringe Mengen des LecA-Proteins an der Zelloberfläche beobachtet werden (Glick & Garber 1983; Diggle *et al.*, 2006), welche vielfältige biologische Funktion aufweisen. So ist LecA an der Biofilmbildung, Zellaggregation und der Adhäsion beteiligt (Lanne *et al.*, 1994; Blanchard *et al.*, 2008; Boukerb *et al.*, 2014). Wie bereits beschrieben, bindet LecA Glykosphingolipide (Gilboa-Garber *et al.*, 1994; Lanne *et al.*, 1994). Eierhoff und Kollegen zeigten, dass das Glykosphingolipid Gb3 der Wirtszelle von dem bakteriellen LecA gebunden und durch einen LecA-vermittelten „Lipid Zipper“ die Zelle durch das Bakterium penetriert wird und die Freisetzung bakterieller Toxine erfolgt (Eierhoff *et al.*, 2014). Das LecA ist somit ein Schlüsselement und Invasionsfaktor für die Penetration des Bakteriums in die Wirtszelle (Eierhoff *et al.*, 2014). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Lektin LecA einen negativen Einfluss auf die Zilienbewegung der Atemwege (Mewe *et al.*, 2005; Gustke *et al.*, 2012) sowie zytotoxische Effekte auf Atemwegsepithelzellen aufweist und deren Wachstumsrate reduziert, wodurch die *P. aeruginosa* Infektion der Atemwege ermöglicht wird (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994). Darüber hinaus induziert LecA eine Erhöhung der Permeabilität in Darmepithelzellen, wodurch es zu einer erhöhten Aufnahme des *P. aeruginosa* extrazellulären Exotoxins A kommt (Laughlin *et al.*, 2000). Die Fähigkeit des LecA, verschiedenste Kohlenhydratstrukturen zu binden, ermöglicht dem Bakterium, Kohlenhydratestrukturen zu vernetzen und ist notwendig für die initiale Biofilmbildung. Das extrazelluläre Polysaccharid Psl besteht neben Mannose ebenfalls aus Galaktose (Ma, L. *et al.*, 2007), für welches LecA eine hohe Affinität aufweist (Garber *et al.*, 1992). Die teilweise extrazelluläre Lokalisation des LecA-Proteins an der äußeren Membran (Glick & Garber 1983) führt zudem zu einer Zellagglutination, welche möglicherweise auf der Bindung von Galaktose-Derivaten der Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran von *P. aeruginosa* durch das LecA basiert (Kulshin *et al.*, 1991; Sadovskaya *et al.*, 1998). Dies würde die Gegenwart von LPS in Reinigungen des LecA-Proteins erklären (Gilboa-Garber 1997).

1.7.2 Die Expression, Funktion und Struktur von LecB

Das Lektin LecB ist ein Kohlenhydrat-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu L-Fukose (K_a $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) und D-Mannose (K_a $3,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$) (Garber *et al.*, 1987). Die Expression und Regulation des *lecB*-Gens, welches 345 bp umfasst, unterliegt dem komplexen QS-Regulon sowie dem alternativen Sigmafaktor RpoS der stationären Phase (Gilboa-Garber 1997; Winzer *et al.*, 2000) und dem globalen AmrZ (*alginate and motility regulator Z*) Transkriptions-regulator (Xu & Wozniak 2015). Die Transkriptionsterminierung erfolgt möglicherweise durch eine 16 bp hinter dem Stoppkodon beginnende GC-reiche Region, welche eine Haarnadelstruktur und somit eine Rho-unabhängige Transkriptionsterminierung ermöglichen kann (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Die transkriptionelle Kopplung der *lecB* Expression an das QS-System ermöglicht eine definierte Expression des Lektins parallel zu weiteren Virulenzfaktoren sowie dem LecA-Protein. Es wurde gezeigt, dass das homotetramere LecB-Protein in der logarithmischen Wachstumsphase weder extrazellulär noch in einer zellulären Fraktion detektiert werden konnte (Lecoutere *et al.*, 2012; Couto *et al.*, 2015; Reales-Calderón *et al.*, 2015), wohingegen es in Gesamtzelllysaten der stationären Phase nachweisbar war (Gilboa-Garber 1972a, b; Gilboa-Garber *et al.*, 1977).

Im Vergleich zu LecA weist LecB eine ähnliche Aminosäurekomposition von Alanin, Arginin, Glutamin und Glutaminsäure auf (Gilboa-Garber *et al.*, 2000), wohingegen LecB kein Cystein, Methionin und Histidin sowie weniger Glycin und Isoleucin, dafür aber mehr Asparagin, Serin, Theronin und Valin als LecA aufweist (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Das LecB-Protein umfasst 114 Aminosäuren und weist einen relativ niedrigen isoelektrischen Punkt von $pI = 3,88$ auf (Gilboa-Garber *et al.*, 2000). Vier LecB-Monomere von je 11,73 kDa bilden ein biologisch funktionales Homotetramer (Gilboa-Garber *et al.*, 2000; Mitchell, E. *et al.*, 2002; Loris *et al.*, 2003; Mitchell, E. P. *et al.*, 2005). Jedes Monomer ermöglicht die Bindung eines Kohlenhydratliganden in einer flachen Bindetasche. Die Zuckerspezifität von LecB reicht von p -Nitrophenyl- α -L-Fukose > L-Fukose > Fukosylamin = L-Galaktose > D-Mannose zu D-Fukose (Garber *et al.*, 1987). Zudem kann eine besonders hohe Affinität des LecB gegenüber fukosehaltigen Lewis^a-Trisacchariden ($K_d = 210 \text{ nM}$) beobachtet werden (Perret *et al.*, 2005). Durch die Aufklärung der 3D-Struktur (Abb. 2) des LecB-Proteins in hoher Auflösung konnte die strukturelle Grundlage und Interaktion mit Kohlenhydraten erklärt werden (Mitchell, E. *et al.*, 2002; Loris *et al.*, 2003; Mitchell, E. P. *et al.*, 2005; Perret *et al.*, 2005; Sabin *et al.*, 2006; Marotte *et al.*, 2007).

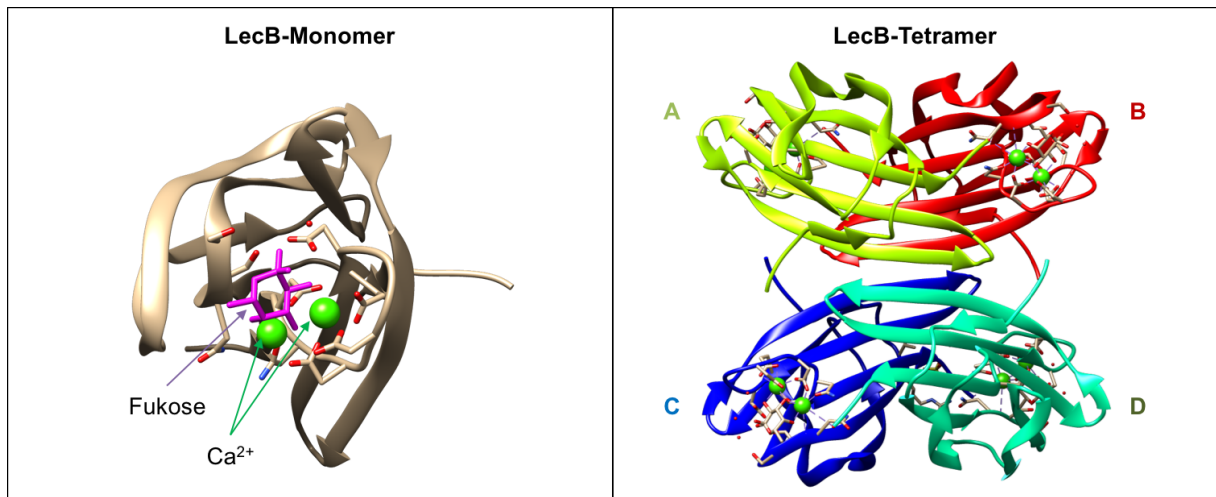


Abbildung 2 Die schematische Darstellung der Struktur von LecB. Links dargestellt ist das LecB-Monomer mit den beiden für die Zuckerbindung koordinierten Ca^{2+} -Ionen (grüne Kugeln) und dem gebundenem Fucose Liganden (lila). Rechts dargestellt ist das LecB-Tetramer bestehend aus vier Monomeren, jeweils in einer anderen Farbe dargestellt (A, B, C oder D) mit den koordinierten Ca^{2+} -Ionen (grüne Kugeln). Jedes Monomer hat ein Fucose-Molekül gebunden. Die Abbildung basiert auf der PDB Struktur 1OXC von Loris *et al.*, 2003.

Dabei zeigt sich, dass die Konformation des LecB-Monomers und des Tetramers eine starre Einheit bilden, die nicht von den Kohlenhydrat-Liganden oder spezifischen Kristallumgebungen beeinflusst werden (Loris *et al.*, 2003). Die Interaktion von Kohlenhydraten und Proteinen basiert auf einer Balance von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen (Sabin *et al.*, 2006). Das *P. aeruginosa* LecB weist eine mikromolare Zuckerbindeaffinität auf, welche durch zwei Ca^{2+} -Ionen und die Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt wird (Garber *et al.*, 1987; Adam, J. *et al.*, 2007). Zudem kann im LecB-Protein lediglich eine hydrophobe Interaktion zwischen der Aminosäure Thr45 und der Fucose beobachtet werden, welche jedoch für die Affinität entscheidend ist (Sabin *et al.*, 2006). Diese Faktoren zusammen vermitteln dem LecB-Protein eine deutlich höhere Affinität als es in klassischen Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen üblich ist (Mitchell, E. *et al.*, 2002). Die beiden maßgeblich an dieser Bindung beteiligten Ca^{2+} -Ionen des LecB-Proteins befinden sich sehr nah beieinander, lediglich 2,73 bis 2,75 Å trennen diese (Adam, J. *et al.*, 2007). Die Koordinierung der Ca^{2+} -Ionen ist für die Zuckerbindung entscheidend (Tielker 2005) und wird durch eine saure Bindetasche der Aminosäuren Asn21, Glu95, Asp99, Asp101, Asn103, Asp104 sowie der Gly114-Terminus des benachbarten Monomers ermöglicht (Tielker 2005; Sabin *et al.*, 2006). Jedes der Ca^{2+} -Ionen komplexiert jeweils drei Hydroxylgruppen der gebundenen Monosaccharide (Tielker 2005). In Abwesenheit eines Kohlenhydrat-Liganden ersetzen Wassermoleküle die Sauerstoffatome des Kohlenhydrates, welche an der Interaktion mit der Bindestelle des LecB-Proteins beteiligt sind (Loris *et al.*, 2003; Tielker 2005; Sabin *et al.*, 2006). Die gelöste Struktur des

bakteriellen pflanzenpathogenen *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) RS-IIL-Proteins weist Ähnlichkeiten zu LecB auf, dennoch unterscheiden sich die Affinitäten zu Monosacchariden (Sudakevitz *et al.*, 2004). Das RS-IIL-Protein weist eine hohe Affinität zu Mannose und Fruktose auf, während das LecB-Protein Fukose als Ligand präferiert (Sudakevitz *et al.*, 2004). Dies legt nahe, dass die Affinität zu verschiedenen Kohlenhydraten mit der Architektur der Zuckerbindetasche zusammenhängt. Innerhalb der Zuckerbindestelle befindet sich der sogenannte Spezifitätsloop, bestehend aus drei Aminosäuren. Im *P. aeruginosa* Lektin LecB besteht dieser Spezifitätsloop aus der Aminosäuren-Triade Ser22, Ser23 und Gly24 (Adam, J. *et al.*, 2007), während im *R. solanacearum* RS-IIL-Lektin die Aminosäuren Ala22-Ala23-Asn24 den Spezifitätsloop bilden (Sudakevitz *et al.*, 2004). Dabei konnte gezeigt werden, dass in *P. aeruginosa* LecB die Aminosäure Ser23 über die Spezifität des LecB-Proteins zu verschiedenen Zuckern entscheidet (Adam, J. *et al.*, 2007). Der Austausch des Spezifitätsloops des *P. aeruginosa* LecB-Proteins gegen den des homologen RS-IIL-Proteins hat keinen Einfluss auf die Bildung von Tetrameren, wohl aber auf die Spezifität zu Kohlenhydraten (Adam, J. *et al.*, 2007). Das LecB-Protein wurde zunächst überwiegend zytoplasmatisch detektiert (Glick & Garber 1983), später konnte dies periplasmatisch (Bartels *et al.*, 2011) als auch in größeren Mengen in den äußeren Membranfraktionen von sessilen *P. aeruginosa* Zellen detektiert werden (Tielker *et al.*, 2005). Es ist allerdings bisher nicht bekannt, wie LecB an die äußere Membran lokalisiert wird, da alle bekannten Sekretionssignale für den Transport über die innere und äußere Membran von *P. aeruginosa* fehlen (Ma, Q. *et al.*, 2003; Tielker *et al.*, 2005).

1.8 Bakterielle und eukaryotische Interaktionspartner von LecB

Patienten mit zystischer Fibrose weisen erhöhte Mengen an fukosylierten Glykoproteinen der Atemwegsepithelien sowie einen erhöhten Anteil an sialylierten und sulfatierten Oligosacchariden auf, welche die bevorzugten Liganden von LecB darstellen (Mitchell, E. *et al.*, 2002). Die Bindung des LecB-Proteins an diese Zellen trägt wesentlich zur chronischen *P. aeruginosa*-vermittelten Atemwegsinfektion bei (Scanlin & Glick 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LecB *in vitro* die Zilienbewegung der Atemwegsepithelien reduziert und so den natürlichen Abwehrmechanismus der menschlichen Lunge inhibiert (Adam, E. C. *et al.*, 1997a; Adam, E. C. *et al.*, 1997b; Mewe *et al.*, 2005; Gustke *et al.*, 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass das LecB Protein an der äußeren Membran lokalisiert ist (Tielker *et al.*, 2005) und durch die Behandlung der äußeren Membran mit *p*NPF, einem L-Fukose-Derivat, für welches LecB eine hohe Affinität aufweist (Garber *et al.*, 1987) von der äußeren Membran gelöst werden kann (Tielker *et al.*, 2005). Daraus wurde geschlossen, dass LecB möglicherweise mit fukosehaltigen Liganden der äußeren Membran interagiert (Tielker *et al.*, 2005). Die Lipopolysaccharide und glykosylierte Proteine der äußeren Membran, wie die Typ-IV-Pili des *P. aeruginosa* 1244 Stammes (Castric 1995; Castric *et al.*, 2001) sowie die Flagellen von *P. aeruginosa* PAK (Flagellin-Typ-A) und PA01 (Flagellin-Typ-B) (Brimer & Montie 1998) stellen kohlenhydrathaltige Liganden dar. Durch weitergehende Analysen der äußeren Membran konnte das äußere Membran Porin OprF (1.9) als Interaktionspartner von LecB identifiziert werden (Bartels 2009; Funken *et al.*, 2012). Der Mechanismus der LecB-OprF-Interaktion ist bisher unbekannt (Funken *et al.*, 2012). Mittels bioinformatischer Vorhersage können vier N-Glykosylierungsstellen im OprF-Protein bestimmt werden (Gupta *et al.*, 2004), allerdings kann experimentell keine Glykosylierung des OprF-Proteins beobachtet werden, die eine Interaktion des LecB-Proteins mit OprF erklären könnte (Funken *et al.*, 2012). Die Lokalisierung an der äußeren Membran erklärt jedoch den Einfluss von LecB auf die Biofilmbildung (Tielker *et al.*, 2005). So zeigen Biofilmanalysen, dass *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stämme in der Biofilmbildung beeinträchtigt sind (Tielker *et al.*, 2005). Es kann gezeigt werden, dass Mannose, ein Zucker für den LecB besonders affin ist (Garber *et al.*, 1987), eine der Hauptbestandteile der extrazellulären Polysaccharide von *P. aeruginosa* PA01 Biofilmen ist (Wozniak *et al.*, 2003). Es wird davon ausgegangen, dass LecB möglicherweise diese Kohlenhydrate bindet und den Biofilm auf diese Weise vernetzt und stabilisiert. Zudem kann gezeigt werden, dass das LecB an der initialen

Mikrokoloniebildung für den Biofilm beteiligt ist (Boukerb *et al.*, 2014). Die Zugabe von Glykopeptid-Dendrimern, welche das LecB-Protein als Ziel haben, zu *P. aeruginosa* Kulturen zeigt, dass dies zu einer Inhibierung und Auflösung von Biofilmen führt, weshalb LecB als Ziel für die Entwicklung von *P. aeruginosa* Biofilminhibitoren geeignet erscheint (Johansson *et al.*, 2008; Kolomiets *et al.*, 2009). Darüber hinaus kann ein Einfluss des LecB-Proteins auf die Biogenese der Typ-IV-Pili und die extrazelluläre Protease IV Aktivität beobachtet werden, weshalb dieses möglicherweise die Typ-II Proteinsekretion von *P. aeruginosa* beeinflusst (Sonawane *et al.*, 2006).

Zusammengefasst weist das LecB-Protein einen Einfluss auf die Adhäsion an den Wirt, die Typ-IV-Pili-Biogenese und die Mikrokolonie- sowie Biofilmbildung auf. Bartels zeigt, dass die hypothetische, periplasmatische Glutaminase-Asparaginase AnsB mit LecB und OprF gereinigt werden konnte und möglicherweise mit LecB interagiert (Funken *et al.*, 2012). Weitere Anhaltspunkte für eine Interaktion können jedoch nicht bestimmt werden.

1.9 Der LecB Interaktionspartner der äußeren Membran - OprF

Das äußere Membran Porin (*outer membrane porin F*) OprF konnte als spezifischer Interaktions- und Bindepartner von LecB identifiziert werden (Bartels 2009; Funken *et al.*, 2012). Bei OprF handelt es sich um ein multifunktionales Protein, welches erstmals von Hancock und Kollegen 1979 identifiziert wurde (Hancock *et al.*, 1979). Die *oprF*-Expression ist durch die Sigmafaktoren für die extrazytoplasmatische Funktion, AlgU und SigX gesteuert (Brinkman *et al.*, 1999; Bouffartigues *et al.*, 2012), welche ebenfalls an der Homöostase der Zellhülle beteiligt sind (Wood *et al.*, 2006; Boechat *et al.*, 2013; Gicquel *et al.*, 2013; Blanka *et al.*, 2014). OprF weist ein Sec-Signalpeptid auf, welches zwischen Position 20 / 21 hydrolysiert wird (Bagos *et al.*, 2010). Die Sequenz, Struktur und Funktion von OprF weist eine deutliche Homologie zum OmpA-Protein der äußeren Membran von *E. coli* auf (Doolittle 1986; Duchene *et al.*, 1988; Woodruff & Hancock 1989). OprF ist, wie der Name nahelegt, in der äußeren Membran lokalisiert und fungiert unter anderem als Strukturprotein, dass die äußere Membran mit der Peptidoglykanschicht verankert (Hancock *et al.*, 1981; Woodruff & Hancock 1989; Rawling *et al.*, 1998). Bei OprF handelt es sich um eines der drei am häufigsten in der äußeren Membran vorkommenden Proteine (Hancock *et al.*, 1981) mit bis zu 200.000 Kopien pro Zelle (Bellido *et al.*, 1992), dessen primäre Funktion

als Porin identifiziert wurde (Hancock *et al.*, 1979; Nicas & Hancock 1983; Woodruff *et al.*, 1986). Frühere Studien zeigen, dass OprF eine im Durchmesser 2,2 nm große Pore bildet (Benz, R. & Hancock 1981), welche vermutlich an der Aufnahme hydrophiler Substanzen über die äußere Membran verantwortlich ist (Nicas & Hancock 1983; Woodruff & Hancock 1988) und einen signifikanten Einfluss auf die Permeabilität der äußeren Membran hat (Woodruff & Hancock 1989). Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass das OprF homolog OmpA möglicherweise am Transport verschiedener Aminosäuren beteiligt ist (Manning *et al.*, 1977), während Studien zu OprF darauf hindeuteten, dass dieses eine Vielzahl ungeladener Polysaccharide *in vivo* und *in vitro* passieren lässt (Hancock & Nikaido 1978; Hancock *et al.*, 1979; Nikaido & Vaara 1985). Spätere Studien zeigten, dass OprF die unspezifische Diffusion von Ionen (Yoon *et al.*, 2002) und kleiner polarer Nährstoffe, inklusive der Polysaccharide bis 1,5 kDa Größe, ermöglicht (Nestorovich *et al.*, 2006).

Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen OmpA und OprF ist die Pore mit zwei möglichen Zuständen, offen oder geschlossen (Benz, R. & Hancock 1981; Nikaido & Vaara 1985; Sugawara & Nikaido 1994; Sugawara *et al.*, 2006). Dabei zeigten 1-5 % der OprF-Proteine eine große offene und 95-99 % eine kleine geschlossene Pore (Woodruff *et al.*, 1986; Sugawara *et al.*, 2006). Weitere Analysen offenbarten, dass OprF für die osmotische Stabilisierung der Zelle notwendig ist und somit für die progressive Stabilisierung der äußeren Membran verantwortlich ist (Woodruff & Hancock 1989). Durch Abwesenheit von OprF in *P. aeruginosa* *oprF*-defizienten Stämmen, kommt es zu einer Veränderung des Zellwachstums unter veränderten osmotischen Bedingungen (Woodruff & Hancock 1989). Außerdem weisen sie eine veränderte Zellmorphologie auf, bei der die Zellen runder und 33 % kürzer sind sowie eine 46 % geringere Oberflächenabdeckung als der Referenzstamm aufweisen (Gotoh *et al.*, 1989; Woodruff & Hancock 1989). Mausinfektionsstudien mit *P. aeruginosa* *oprF*-defizienten Stämmen belegen, dass im Gegensatz zu Laborkulturen, diese *P. aeruginosa* Stämme *in vivo* keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum aufweisen (Rawling *et al.*, 1998). Dass die Deletion von *oprF* keinen Einfluss auf das Zellwachstum aufweist, konnte ebenfalls in virulenten *P. aeruginosa* PA14-Stämmen in LB-Medium beobachtet werden (Dotsch *et al.*, 2009). Möglicherweise hängt dieser Effekt mit dem QS-Netzwerk im Referenzstamm zusammen, da die Deletion von *oprF* zu einer Desorganisation des QS-Netzwerks führt (Bouffartigues *et al.*, 2015). Dies hat eine Reduktion der Produktion von zahlreichen wichtigen Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* zur

Folge (Fito-Boncompte *et al.*, 2011). Zu diesen *oprF*-abhängigen Virulenzfaktoren gehören die extrazelluläre Elastase LasB, welche an der Degradation der Wirtszellmembranen beteiligt ist (Yanagihara *et al.*, 2003) und Pyocyanine, die Gewebe schädigen und Lungenentzündungen in Mäusen hervorrufen (Lau *et al.*, 2004; Caldwell *et al.*, 2009). Zudem gehören zu den *oprF*-abhängigen Virulenzfaktoren das Exotoxin A, welches die Proteinbiosynthese in Säugerzellen inhibiert (Wretling & Pavlovskis 1981) und das lösliche Galaktose-bindende Lektin LecA, welches *P. aeruginosa* vermittelte Lungenverletzungen verursacht, indem es die Lungenepithel beschädigt (Chemani *et al.*, 2009) und eine Penetration des Bakteriums in die Wirtszelle ermöglicht (Eierhoff *et al.*, 2014). Dabei führt die Deletion von *oprF* zwar nicht zu einer veränderten Lebensfähigkeit oder zur Zelllyse (Woodruff & Hancock 1989), allerdings ist OprF in der Wirt-Pathogen Interaktion und Pathogenität involviert. Die Untersuchungen zeigten, dass OprF als Adhäsion bei der bakteriellen *P. aeruginosa* Adhäsion an den Wirt beteiligt ist. Zudem konnten OprF-spezifische Antikörper aus Patienten mit chronischer Infektion isoliert werden können (Yoon *et al.*, 2002). Die Expression von *oprF* ist für die vollständige Ausbildung der Virulenz von *P. aeruginosa* erforderlich (Fito-Boncompte *et al.*, 2011). Durch die Bindung des humanen Interferon- γ an OprF wird die Expression von QS-abhängigen Virulenzfaktoren, wie dem Lektin LecA von *P. aeruginosa*, ausgelöst (Wu *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass OprF als Sensor für die Wirtszellerkennung fungiert (Wu *et al.*, 2005). Für die Erkennung von humanen Interferon- γ durch den OprF-Rezeptor wird ein Fucosyl-Rest benötigt (Lundell & Narula 1994), weshalb es möglich ist, dass das Fucose-spezifische Lektin LecB als Adapter die Erkennung des Zytokins durch OprF vermittelt (Funken *et al.*, 2012).

Darüber hinaus zeigen Analysen, dass ein *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm eine 80 % reduzierte Virulenz gegenüber dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und eine 71 % reduzierte Zytotoxizität gegenüber humanen Caco-2/TC7 Zellen aufweist (Fito-Boncompte *et al.*, 2011). Adhäsionsstudien zeigen, dass OprF für die Bindung von *P. aeruginosa* an eukaryotische Zellen notwendig ist (Azghani *et al.*, 2002; Fito-Boncompte *et al.*, 2011). Die reduzierte Zytotoxizität basiert nicht ausschließlich auf der reduzierten Adhäsion des Bakteriums an den Wirt, sondern hängt mit einer Umgestaltung und veränderten Aktivität der Typ-III Sekretionsmaschinerie zusammen (Fito-Boncompte *et al.*, 2011), welche für die Translokation von Toxinen in die Wirtszelle verantwortlich ist (Yahr &

Frank 1994; Yahr *et al.*, 1996b; Dacheux *et al.*, 1999). Die Deletion von *oprF* führt zudem zu einer verstärkten Biofilmbildung, durch eine Überproduktion des Exopolysacchariden Pel, nicht jedoch Psl, einem verstärkten c-di-GMP Level und einer erhöhten Expression einer kleinen nicht kodierenden RNA (*rsmZ*) des Gac/Rsm Signalwegs (Bouffartigues *et al.*, 2015). Dadurch werden zwei Gene (*adcA* und PA1181) des SigX-Regulons (Jones, C. J. *et al.*, 2014), welche an der Regulation des c-di-GMP Levels beteiligt sind, hochreguliert (Bouffartigues *et al.*, 2015). Dies hat, wie eingangs beschrieben zur Folge, dass die Deletion von OprF in der äußeren Membran zu einer Desorganisierung des QS-Netzwerks (Bouffartigues *et al.*, 2015) und zur Ausbildung veränderter, weniger komplexer Biofilme führt.

Ähnlich wie ein *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter Stamm, so ist auch ein *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm in der Hämagglutination negativ beeinflusst (Funken *et al.*, 2012). Dies legt nahe, dass LecB und OprF für die Agglutination von roten Blutkörperchen durch *P. aeruginosa* notwendig sind (Funken *et al.*, 2012).

Aufgrund der multifunktionalen Fähigkeiten von OprF, der Quantität der OprF-Kopien in der äußeren Membran und der Immunantwort der Wirtszellen besteht gesteigertes Interesse an der Entwicklung von Impfstoffen gegen dieses Protein (Cripps *et al.*, 1995; von Specht *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2001). Auf Basis dessen wurde ein Impfstoff entwickelt, der auf einem Fusionsprotein von OprF-, OprI- und Typ-A/B-Epitopen des Flagellums basiert (Weimer *et al.*, 2009). Durch Verabreichung dieses Proteins an Mäuse, welche mit nicht-mukoiden *P. aeruginosa* infiziert wurden, können hohe Mengen an Antiseren detektiert und die Infektion deutlich abgemildert und beendet werden (Weimer *et al.*, 2009).

1.10 Anti-Adhäsionsstrategien

Aufgrund der steigenden bakteriellen Resistenz gegenüber herkömmlichen Antibiotika ist es unerlässlich, alternative Medikamente zur Behandlung viraler und bakterieller Infektionen zu entwickeln (Beuth *et al.*, 1996; Thomas & Brooks 2004). Besonders deutlich wird dies in der Betrachtung der zwischen den Jahren 2011 und 2016 in den deutschen Markt eingebrachten Antibiotika. In diesem Zeitraum sind lediglich zehn neue Antibiotika auf den Markt gekommen (vfa 2016). Die Problematik wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgegriffen und in regelmäßigen Prioritätenlisten für die Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika und Alternativen zusammengefasst. In der Prioritätenliste 2017 gehört

P. aeruginosa zu den drei der kritischsten bakteriellen Pathogene für die zeitnah Alternativen entwickelt werden sollen (World-Health-Organization 2017). Diese hohe Priorität unterstreicht abermals die Notwendigkeit der alternativen Ansätze zur Behandlung von *P. aeruginosa* Infektionen.

Die Entwicklung und Verabreichung von Medikamenten, welche die Biofilmbildung verhindern oder inhibieren, stellt einen vielversprechenden Behandlungsansatz dar (Stewart & Costerton 2001). Ein Ansatz ist die Verhinderung des ersten essentiellen Schrittes einer Infektion, die initiale Adhäsion des Mikroorganismus an den Wirt. Die Blockade von Adhäsinen, zum Beispiel von Lektin-Kohlenhydrat-Interaktionen durch anti-adhäsive Medikamente, könnte eine Infektion verhindert oder diese abschwächen (Mulvey *et al.*, 2001). Dies wurde bereits am Beispiel von *Streptococcus pneumoniae* und *P. aeruginosa* gezeigt, indem die bakterielle Lektin-vermittelte Adhäsion an die menschliche Lunge und Niere kann durch Blockade der Lektine mit einem Liganden (z.B. *N*-acetyl-D-Glukosamine/D-Galaktose oder *N*-acetyl-Neuraminsäure) abgewendet wurden (Sharon 1984; Beuth *et al.*, 1987a; Beuth *et al.*, 1987b). Dies stellt besonders bei bisher unzureichend therapierbaren Infektionen einen neuen therapeutischen Ansatz dar (Irvin & Bautista 1999). Zudem zeigen Untersuchung von Diggle und Kollegen, dass die Zugabe von Lektin-spezifischen Liganden *in vitro* zur Auflösung von Biofilmen führt (Diggle *et al.*, 2006). Dies verdeutlicht, dass die Lektine von *P. aeruginosa* ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von Medikamenten, welche die Adhäsion des Humanpathogens an die Wirtszelle und somit die bakterielle Infektion des Wirtes blockieren sind.

Die Verwendung von anti-adhäsiven Therapeutika weist zudem einen entscheidenden Vorteil gegenüber herkömmlichen Antibiotika auf, denn es gilt als unwahrscheinlich, dass die pathogenen Mikroorganismen Resistenzen gegen diese Therapeutika, welche die Bindung an Wirtsoberflächen verhindern, entwickeln, da diese keinen direkten Einfluss auf das Wachstum oder den Stoffwechsel des Bakteriums aufweisen (Ofek *et al.*, 2003). Zudem ermöglicht der Verzicht auf Antibiotika den Schutz der apathogenen Organismen im natürlichen Mikrobiom des Wirtes, wodurch (multi-)resistente Mikroorganismen im direkten Wettbewerb um das vorhandene Nährstoffangebot stehen (Mulvey *et al.*, 2001).

1.11 Zielsetzung dieser Arbeit

Bakterielle Infektionen, besonders verursacht durch das Gram-negative, opportunistisch humanpathogene Bakterium *P. aeruginosa*, stellen ein Problem mit hoher klinischer Relevanz dar. Aufgrund der hohen Zahl an (multi-)resistenten Bakterien werden Alternativen zu den konventionellen Antibiotikatherapien benötigt. Einen vielversprechenden Ansatz für solche notwendigen Therapiemöglichkeiten stellt die anti-Adhäsionstherapie dar. Dabei wird der initiale Schritt der bakteriellen Infektion, welcher durch verschiedene Adhäsine vermittelt wird, durch Zugabe eines Bakterium-spezifischen Medikamentes unterbunden. Zudem bietet sich die Möglichkeit an, den Sekretionsmechanismus der Proteine, welche für die Adhäsion entscheidend sind, zu inhibieren, wodurch eine Infektion ebenfalls verhindert werden kann. Das *P. aeruginosa* Lektin LecB ist ein auf der äußeren Membran lokalisiertes kohlenhydratbindendes Protein, welches mit der Wirtszelloberfläche interagiert und an der Entwicklung von Biofilmen beteiligt ist. Dieses Lektin gilt daher als vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von Medikamenten, welche die Adhäsion des Humanpathogens *P. aeruginosa* an die Wirtszelle und somit die bakterielle Infektion des Wirtes blockieren.

Da bisher nicht bekannt ist, wie LecB über zwei Membranen auf die Zelloberfläche von *P. aeruginosa* transportiert wird, ist das Ziel dieser Arbeit, Proteine zu identifizieren, die an der Sekretion von LecB beteiligt sind. Um dies zu erreichen, wird ein System zur *quorum sensing* (QS) unabhängigen Expression von nicht zellgebundenen LecB in *P. aeruginosa* etabliert. Dazu soll neben dem Einsatz eines konstitutiven Promotors auf einem *plecB*-Expressionsvektor ein *P. aeruginosa lecB*- und *oprF*-defizienter PATS1 Stamm konstruiert werden, welcher durch die fehlende Interaktion mit OprF, das QS-entkoppelte LecB im extrazellulären Medium lokalisiert. Ferner wird das modified Enzyme-Linked Lectin Assay (mELLA) Hochdurchsatzverfahren entwickelt, welches eine sensitive Quantifizierung von extrazellulärem LecB in Kulturüberständen ermöglicht. Mit Hilfe des mELLA wird eine zu erzeugende Transposon-Bibliothek des *P. aeruginosa* PATS1 Stammes mit Expressionsvektor nach Genen durchsucht, die einen Einfluss auf die Sekretion von LecB aufweisen. Durch die Identifizierung des Transposonintegrationsortes der Stämme, welche signifikant reduzierte extrazelluläre Mengen an LecB aufweisen, sollen Rückschlüsse auf den Transportmechanismus von LecB gezogen werden. Komplementiert werden diese Untersuchungen durch vergleichende Proteomanalysen und die Aufklärung der physiologischen Rolle bekannter Interaktionspartner von LecB.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden falls nicht anders angegeben von folgenden Firmen bezogen:

Antibiotika: Sigma (Deisenhofen), AppliChem (Darmstadt)

Chemikalien: Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), GE Healthcare (Solingen)

Enzyme: New England Biolabs (Frankfurt am Main), ThermoFisher Scientific (Darmstadt)

2.2 Bakterienstämme, Hefen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme (Tab. 1) und Plasmide (Tab. 2) sind nachfolgend dargestellt.

Tabelle 1 Verwendete Bakterien und Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>F- ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (<i>λ</i> ts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene1</i>)	Studier <i>et al.</i> , 1986
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44 (lacZYA-argF)U196 (Φ80</i> <i>lacZM15) 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 ^r ::Mu) (Km ^r ::Tn7)], <i>pro, res, recA, tra⁺,</i> <i>Tpr, Smr</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i> S17-1 λpir	Ec294::[RP4-2 (Tc ^r ::Mu) (Km ^r ::Tn7)], <i>pro, res, recA, tra⁺,</i> <i>Tpr, Smr, thi, λpir</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983

Tabelle 1 Fortsetzung verwendeter Bakterien und Hefestämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PATI3	<i>P. aeruginosa</i> PA01, $\Delta lecA$	Tielker 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PATI4	<i>P. aeruginosa</i> PA01, $\Delta lecB$	Tielker <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PATS1	<i>P. aeruginosa</i> PA01, $\Delta lecB$, $\Delta oprF::\Omega Gm^r$	Diese Arbeit
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\Delta amrZ$	<i>P. aeruginosa</i> PA01, $\Delta amrZ::Tn5$	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\Delta ansB$	<i>P. aeruginosa</i> PA01, $\Delta ansB::Tn5$	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\Delta oprF$	<i>P. aeruginosa</i> H636, $\Delta oprF::Strep^r$	Rawling <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\Delta xcpA$	<i>P. aeruginosa</i> 2B18 $pilD(\Delta xcpA)::Tn5$	Strom <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAG2 ($\Delta xcpQ$)	<i>P. aeruginosa</i> PA01, $\Delta xcpQ$	de Groot <i>et al.</i> , 2001
<i>Candida albicans</i> SC5414	Wildtyp	Klinisches Isolat

Tabelle 2 Verwendete Vektoren.

Vektoren	Genetische Marken	Referenz/Bezugsquelle
pET19b	ColE1 P _{T7φ10} , Amp ^r , lacI ^q	Novagen, Madison, USA
pET22b	ColE1 P _{T7φ10} , Amp ^r , lacI ^q , pelB	Novagen, Madison, USA
pSUP202	pBR325, Amp ^r , Cm ^r , Tet ^r , mob	Simon <i>et al.</i> , 1986
pSUP-UD	pSUP202 mit 1.090 bp NcoI / PstI PCR Produkt mit US und DS Region von ΔoprF	Diese Arbeit
pSUP-UGD	pSUP202 mit 2.662 bp NcoI / PstI PCR Produkt mit US und DS Region von ΔoprF sowie ΩGm ^r -Kassette	Diese Arbeit
pBBR1MCS1	rep, mob, lacZα, P _{lac} , P _{T7} , Cm ^r	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pBSL142	pBluescript Derivat, MCS, Amp ^r , Gm ^r	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pUTmini-Tn5-luxCDABE-tc	Transposon-basierter Mutagenesevektor mit Tet ^r und luxCDABE-Kassette	Winson <i>et al.</i> , 1998
plecB (alias pBBC2)	398 bp XbaI / SacI-Fragment aus pEC2 in pBBR1MCS (lecB P _{lac} -kontrolliert)	Tielker 2001(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)(Tielker 2001)
plecB-L	plecB mit N-terminalem Lumio-Tag TM an lecB fusioniert	Funken, unveröffentlicht
pURE	pET19b mit synthetischem Polylinker und 345 bp NdeI / BamHI PCR-Produkt mit lecB-Gen	Bartels 2004

2.3 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) in HPSF bzw. HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form bezogen (Tab. 3, 4). Die Nukleinsäuren wurden gemäß den Herstellervorgaben mit dH₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/μL eingestellt.

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden für Polymerasekettenreaktion (PCR), Sequenzierung (Seq.), Inverser-PCR (IP) und *Plasmid-Rescue*-Versuche (PR) verwendet.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Merkmal	Referenz
DSΔoprF-A	GGACGCGTTCGGCTGAGCCTCTAAGGAAA	<i>MluI</i>	Diese Arbeit
DSΔoprF-B	TACTGCAGGATCCATGCATCTTCGGCCGC	<i>PstI</i>	Diese Arbeit
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Seq.	MWG Biotech, Ebersberg
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	Seq.	MWG Biotech, Ebersberg
TET-1-FP-1-FW	GGGTGCGCATGATCCTCTAGAGT	PR	EpiCentre, Madison WI, USA
TET-1-FP-2-FW	TAAATTGCACTGAAATCTAGAAATA	PR	EpiCentre, Madison WI, USA
TET1-FP4_TS	CAGAACATATCCATCGCGTCCG- CCATCTCCAGCAG	Seq.	Diese Arbeit
TS-A6	ATCAAGATGGGGATTAAACGG	Seq.	Diese Arbeit
TS-A7	TTTCCTTAGAGGCTCAGCCGA	Seq.	Diese Arbeit
TS-IP_NarI1	CATTCAGGTCGAGGTGGCCCG	IP	Lewenza <i>et al.</i> , 2005
TS-IP_NarI2	CAGAACATATCCATCGCGTCCGCC	IP	Lewenza <i>et al.</i> , 2005
TS-IP_NarI3	CGGTTTACAAGCATAAAGCTTGC	Seq.	Lewenza <i>et al.</i> , 2005
USΔoprF-A	TTTACCATGG GCTACCTGGGCAACGACCGCG	<i>NcoI</i>	Diese Arbeit
USΔoprF-B	ATATATCCCGACGCGTCCG- TTAAATCCCCATCTTGAT	<i>MluI</i>	Diese Arbeit

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten qPCR Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden für die quantitative PCR (qPCR) verwendet (2.10.4).

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Merkmal	Referenz
TS-D0R	CTAGCCGAGCGGCCAGTTGA	<i>lecB</i>	Diese Arbeit
TS-D1L	GGCAGCAGTGGCAAGGTACA	<i>lecB</i>	Diese Arbeit
TS-D5L	TCGCGGCTACAAGTTCTCCA	<i>rpoD</i>	Diese Arbeit
TS-D5R	GCGGTTGAGCTTGTTGATCG	<i>rpoD</i>	Diese Arbeit
TS-D6L	GTTACGGACCTACCCAGA	<i>lecA</i>	Diese Arbeit
TS-D6R	GCACGTCGTTGTAGATAAGA	<i>lecA</i>	Diese Arbeit
TS-D7L	GAGCACACCGAGAAGCCTAT	<i>ansB</i>	Diese Arbeit
TS-D7R	TTCGGTCTTGATGTTGACCA	<i>ansB</i>	Diese Arbeit

2.4 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die verwendeten *Escherichia coli* (*E. coli*) und *P. aeruginosa* Bakterienkulturen wurden in LB-Medium bei 37°C inkubiert. Die Flüssigkulturen mit einem Volumen von bis 5 mL wurden auf einem Reagenzglas-Rotator (Stuart, England), über 5 mL im Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH) bei 150 UpM kultiviert. Das Verhältnis von Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens entsprach dem Verhältnis 1:10. Die Kultivierung von Stämmen mit im Vektor oder Genom kodierten Resistenzmarkern, erfolgte unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 5). Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden Kulturen bezeichnet, welche mindestens für 16 h inkubiert wurden. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine optische Dichte O.D._{580 nm} (Spektralphotometer Genesys 10uv, ThermoFisher Scientific, Darmstadt) inokuliert. Die kurzfristige Lagerung der Bakterien erfolgte durch Ausstreichen der Zellen auf LB-Festmedien. Für die dauerhafte Lagerung der Bakterien wurden ÜK mit 7,5% (v/v) DMSO versetzt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium: 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton

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

TSB-Medium: 17 g/L Casein Pepton, 2,5 g/L Dikaliumhydrogenphosphat, 2,5 g/L Glukose, 5 g/L NaCl, 3 g/L Soja Pepton

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Hitzesensitive Zusätze wurden mit Membranfiltern (Porendurchmesser <0,2 µm GE Healthcare, Solingen) steril filtriert und den autoklavierten Medien bei einer Temperatur von ≤60°C zugesetzt.

Tabelle 5 Konzentration der eingesetzten Antibiotika. Die dargestellten Antibiotika Konzentrationen (µg/mL) wurden verwendet um den Selektionsdruck für die Bakterienkulturen zu erzeugen.

Antibiotikum	Konzentration für <i>E. coli</i> (µg/mL)	Konzentration für <i>P. aeruginosa</i> (µg/mL)
Ampicillin (Amp)	100	-
Chloramphenicol (Cm)	50	300
Gentamycin (Gm)	10	30
Tetracyclin (Tet)	10	100

2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly 1979) bzw. durch die Verwendung des „*innuPrep Plasmid Mini Kit*“ (Analytic Jena, Jena) gemäß den Herstellerangaben. Die chromosomale DNA aus *P. aeruginosa* Zellen wurde mit Hilfe des „*DNeasy Blood & Tissue Kit*“ (QIAGEN, Hilden) gemäß den Herstellerangaben für Gram-negative Bakterien, isoliert.

2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mittels NanoDrop 2000c Spektralphotometer (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) gemäß den Herstellerangaben.

2.7 Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 1-2 %ige Agarosegele auf 0,5x TBE-Pufferbasis (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA; pH 8.3) gegossen und mit Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Die zu untersuchende DNA wurde mit DNA-Probenpuffer (*5x DNA loading dye*, ThermoFisher Scientific, Darmstadt) versetzt und in die entsprechenden Spuren gegeben. Als Größenstandard wurde je nach zu untersuchendem Fragment der 100 bp GeneRuler™ (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) bzw. 1 kB GeneRuler™ (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 130 V für 25 min in 0,5x TBE-Laufpuffer. Die DNA konnte anschließend aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids mittels UV-Strahlung im „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) visualisiert werden.

2.8 Präparative Gelelektrophorese und Isolation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die präparative Gelelektrophorese erfolgte äquivalent zur analytischen Gelelektrophorese, jedoch ohne Zugabe des Ethidiumbromids. Nach der Gelelektrophorese wurden die gewünschten Fragmente vorsichtig und zügig unter UV-Belichtung mit einem Skalpell

ausgeschnitten. Die Gelelution erfolgte mittels QIAGEN „*QIAquick Gel Extraction Kit*“ gemäß den Herstellerangaben. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten Nukleinsäure bestimmt (2.6). Abweichend wurden bei geringen Ausbeuten der DNA-Konzentration, die Elutionsschritte durch Erhöhung der Inkubationstemperatur von RT auf 50°C erhöht und die finale Zeit der Zentrifugation verdoppelt erhöht.

2.9 *In vitro* - Rekombination von DNA

Die Restriktionshydrolyse erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Anschließend wurden die Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben inaktiviert. Die Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophoresen (2.7) auf die Fragmentlänge überprüft. Die hydrolysierte DNA wurde mittels präparativen Gelelektrophoresen und anschließender Gelextraktion (2.8) extrahiert oder durch das „*Double-Pure Kit*“ (Analytic Jena, Jena) gemäß den Herstellerangaben, gereinigt. Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific, Darmstadt). Dazu wurden die Fragmente in 1x T4 Ligase Puffer mit entsprechenden Einheiten (Units) der T4 DNA Ligase entweder für zwei Stunden bei 37°C inkubiert, oder bei 16°C über Nacht im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Ligase bei 65°C für zehn Minuten Hitze-inaktiviert. Danach wurden die Proben entweder direkt für die Transformation von Bakterienzellen verwendet (2.12) oder mittels „*Double-Pure Kit*“ (Analytic Jena, Jena) gereinigt.

2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.10.1 Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki durchgeführt (Saiki *et al.*, 1988). Dazu wurden standardmäßig folgende Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µL für die Polymerasekettenreaktion (PCR) angesetzt: 1 ng Vektor- oder 10 ng genomische DNA als Vorlagenmatrix für die Amplifizierung, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) und 2,5 U *Pfu*-, *Taq*- oder *Phusion*®-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde im „Biometra T Advanced PCR-Cycler“ (Biometra, Göttingen) mit folgendem Programm durchgeführt: 1x (1 min: 98°C) 30x (1 min: 98°C; 0,5 min: 50-68°C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten

Oligonukleotide; 0,5-2 min x 72°C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes); 1x (5 min: 72°C); 1x (Abkühlen auf 4-16°C). Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels gereinigt (2.10.5).

2.10.2 Kolonie-PCR

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten direkt aus Bakterienkolonien erfolgte mittels Einzel-Kolonie-PCR. Dazu wurde die PCR (2.10.1) mit einer einzelnen Bakterienkolonie als Matrize anstelle gereinigter DNA durchgeführt. Abweichend zur Standard-PCR wurde der initiale Denaturierungsschritt bei 98°C auf 10 min verlängert.

2.10.3 Inverse-PCR

Die Inverse-PCR (IP) diente der Amplifizierung eines Genabschnitts zum Nachweis eines Transposonintegrationsortes. Dazu wurden die zu untersuchenden Fragmente wie in 2.15.3 beschrieben isoliert. Die IP erfolgte je nach Fragmentlänge und GC-Gehalt mit der *Phusion*® (mit *high-fidelity*- oder GC-Puffer; ThermoFisher Scientific, Darmstadt) oder *Taq* Polymerasen (ThermoFisher Scientific, Darmstadt). Als Oligonukleotide wurden TS-IP_*NarI*1 und TS-IP_*NarI*2 verwendet (T_m: 66°C). Diese dienten der Amplifizierung des DNA-Bereiches aus dem Transposon heraus. Die Amplifizierung erfolgte nach dem Protokoll von Lewenza (Lewenza *et al.*, 2005).

2.10.4 Quantitative PCR

Der spezifische Nachweis von mRNA-Transkripten erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR). Dazu wurden zunächst die zu untersuchenden Kulturen inkubiert (2.4) und die Zellen mittels Zentrifugation (5.000 x *g*, 15 min) zum zu untersuchenden Zeitpunkt sedimentiert. Die RNA-Isolierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben des „*NucleoSpin*® *RNA-Isolierungskit*“ (Macherey-Nagel, Düren). Anschließend wurde die isolierte RNA mittels Ambion „*DNase Treatment & Removal*“ Kit (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) behandelt und mögliche vorhandene DNA hydrolysiert. Nachfolgend wurde die mRNA mittels reverser Transkriptase (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) in cDNA umgeschrieben und deren Konzentration

mittels NanoDrop 2000c Spektralphotometer (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) bestimmt (2.6). Die qPCR erfolgte mit Hilfe des „*Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*“-Kits von ThermoFisher Scientific (Darmstadt) gemäß den Herstellerangaben. Die verwendeten Oligonukleotide (Tab. 4) für die qPCR wurden mittels der Primer3-Website (<http://primer3.ut.ee>) ermittelt (Programmparameter: Produktlänge: ~120 bp, Oligonukleotidlänge: 20 bp, Oligonukleotid-Schmelztemperatur: 55-61°C).

2.10.5 Reinigung von PCR-Proben

Die Reinigung von PCR-Proben erfolgte entweder durch das „*QIAquick PCR Purification Kit*“ QIAGEN (Hilden) bzw. dem „*Double-Pure Kit*“ (Analytic Jena, Jena) gemäß den Herstellerangaben oder durch die präparative Gelelektrophorese mit anschließender Gelelution (2.8).

2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde als Auftragsarbeit von der Firma MWG Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) durchgeführt. Sofern entsprechende Oligonukleotide zur Sequenzierung nicht bei MWG vorlagen, wurden die Proben vorab mit den entsprechenden Oligonukleotiden versetzt.

2.12 Übertragung von Plasmid-DNA

2.12.1 Übertragung von Plasmid-DNA durch Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation sowie die Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte nach Hanahan (Hanahan 1983).

2.12.2 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Die mobilisierbaren Plasmide wurden in *P. aeruginosa*-Zellen durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dazu wurden ÜK des plasmidhaltigen Donorstammes *E. coli* S17-1 oder S17-1 λ pir und des Rezipientenstammes von *P. aeruginosa* angezogen (Tab. 1). Je 1 mL des

Donorstammes wurde mit einem 1 mL des jeweiligen Rezipientenstammes, die zuvor für zehn Minuten bei 46°C inkubiert wurden, gemischt und durch Zentrifugation (3 min; 5.000 x g, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in LB-Medium resuspendiert und für vier bis acht Stunden bei 37°C auf Membranfiltern (0,2 µm Cellulose-Acetat, GE Healthcare, Solingen) auf LB-Festmedium inkubiert. Anschließend wurden die Filter mit den Zellen abgenommen und in Reaktionsgefäße mit LB-Medium überführt. Darin wurden die Zellen durch vortexen von dem Membranfilter gelöst und in unterschiedlichen Verdünnungen auf Selektivagarplatten ausplattiert. Zur Kontrastselektion von *E. coli* S17-1 wurden zusätzlich im Selektivagar 25 µg/mL Irgasan oder 100 µg/mL Ampicillin verwendet.

2.12.3 Übertragung von (Plasmid-) DNA durch Elektroporation

Die Übertragung von Plasmid-DNA in *P. aeruginosa* Zellen erfolgte mittels Elektroporation von elektro-kompetenten *P. aeruginosa* Zellen. Dazu wurden Hauptkulturen von 10-100 mL aus einer ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und die Zellen in der stationären Phase mittels Zentrifugation (10 min, 5.000 x g, RT) sedimentiert. Die Elektrokompetenz der Zellen wurde durch drei Waschschrte in 30 %iger Saccharose-Lösung und anschließender Zentrifugation (10 min, 5.000 x g, RT) erzeugt. Die Transformation von elektro-kompetenten *P. aeruginosa*-Zellen mit 20-30 ng Plasmid-DNA erfolgte durch Elektroporation bei einer Spannung von 2,5 kV. Die transformierten Zellen wurden bei 37°C für die Dauer der phänischen Expression inkubiert und anschließend auf Selektionsmedien ausplattiert.

2.13 Konstruktion eines *P. aeruginosa lecB*- und *oprF*-defizienten Stammes

Für die Erzeugung eines *P. aeruginosa* $\Delta lecB \Delta oprF$ Stammes wurde das Gen *oprF* im *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm deletiert. Für diesen Zweck wurde zunächst ein Mutagenesevektor konstruiert, welcher auf dem mobilisierbaren pSUP-202 Vektor basiert (Tab. 2). *P. aeruginosa* kann diesen Vektor nicht replizieren, weshalb dieser als „Suizidvektor“ fungiert. Zunächst wurden die stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Gensequenzen des *oprF*-Zielgens mittels PCR (2.10.1) mit den Oligonukleotiden US $\Delta oprF$ -A/US $\Delta oprF$ -B (stromaufwärts) und DS $\Delta oprF$ -A/DS $\Delta oprF$ -B

(stromabwärts) amplifiziert. Dies diente der Insertion von Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* (US Δ *oprF*-A), *MluI* (US Δ *oprF*-B, DS Δ *oprF*-A) und *PstI* (DS Δ *oprF*-B). Die Klonierung des „pSUP-UGD“ Mutagenesevektors erfolgte wie in Abb. 3 (A-D) dargestellt.

Nach der Transformation (2.12.1) von chemisch-kompetenten *E. coli* DH5 α mit dem Mutagenesevektor, zur Amplifizierung des Vektors, wurde dieser isoliert und in elektro-kompetente *E. coli* S17.1 eingebracht. Anschließend wurde der Mutagenesevektor mittels konjugativen Transfers (2.12.2) in den *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm überführt (Tab. 1). Durch homologe Rekombination der stromaufwärts und stromabwärts gerichteten Gensequenz von *oprF* wurde der Mutagenesevektor ins Genom integriert (Abb. 3 E). Die Transkonjuganden, die auf den Selektivagarplatten (Tet₅₀₋₁₀₀, Gm₃₀, Irg₂₅) anwuchsen, enthielten den Mutagenesevektor im Genom. Für die Selektion auf das zweite homologe Rekombinationsereignis und den damit verbundenen Verlust des Vektoranteils wurden Kolonien auf Tet- und Gm-haltige Selektionsmedien überführt, inkubiert und auf Tetrazyklin-sensitive Stämme überprüft. Diese enthielten keinen Mutagenesevektor, sondern lediglich das *UGD*-Fragment im Genom anstelle des *oprF*-Gens.

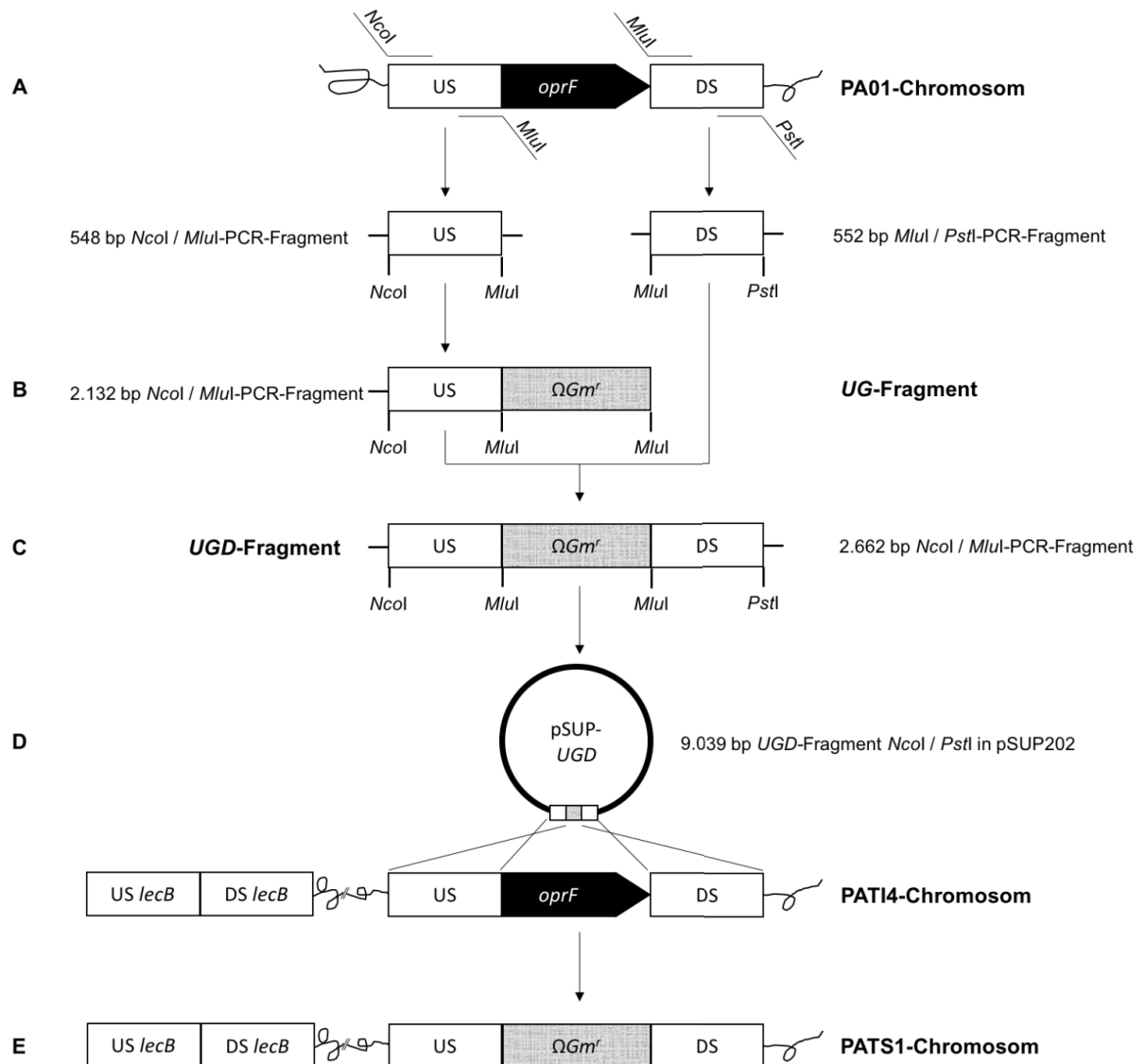


Abbildung 3 Die Konstruktion des *P. aeruginosa* $\Delta lecB \Delta oprF$ PATS1 Stammes. (A) Dazu wurden die stromaufwärts (US) und stromabwärts (DS) flankierenden Gensequenzen des *oprF*-Zielgens mittels PCR amplifiziert und Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme, inseriert. (B) Aus dem Vektor pBSL141 wurde die ΩGm^r -Kassette mittels *MluI* Restriktionshydrolyse isoliert und mit dem ebenfalls mit *MluI* hydrolysiertem US-Fragment ligiert (UG-Fragment). (C) Nach Dephosphorylierung des UG-Konstruktes wurde dieses mit dem *MluI* hydrolysierten DS-Fragment zum UGD-Fragment ligiert. (D) Dieses wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *PstI*, ebenso wie der pSUP-202 Vektor hydrolysiert und die linearisierten Fragmente, ligiert (pSUP-UGD). (E) Chemisch-kompetente *E. coli* S17.1 wurden mit dem Vektor transformiert und der pSUP-UGD Vektor mittels Konjugation auf den *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Empfängerstamm übertragen. Die Erzeugung des *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stammes erfolgte durch homologe Rekombination der US- und DS-Regionen mit dem Genom.

2.14 Konstruktion von Tn5-Transposon-Bibliotheken

Transposons sind DNA-Fragmente, die in die genomische DNA von Zellen integrieren können. Dabei wird zwischen Transposons unterschieden, welche spezifisch in definierte Zielregionen und denen, welche unspezifisch, wie das Tn5-Transposon, in das Genom des Wirtes, integrieren. Mit Hilfe einer Transposon-Bibliothek wurde nach Genen gesucht, die einen Einfluss auf die Sekretion von LecB aufweisen. Dazu wurden *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stämme mit Mutagenesevektoren (2.14.1) bzw. *in vitro*-Transposon/Transposase Komplexen (2.14.2) transformiert. Das verwendete Tn5-Transposon integriert zufällig und ungerichtet in das Genom des Wirtes. Zudem trägt das Transposon eine Tetrazyklin-Resistenzkassette (*Tet^r*), die eine Selektion auf Mutanten die das Transposon tragen, ermöglicht. Die Integration des Transposons hat zur Folge, dass das Leseraster des betroffenen Gens verschoben bzw. verändert wird, sodass dieses nicht mehr nativ vorliegt und das Genprodukt nicht mehr funktionsfähig ist. Daraus resultiert ein veränderter Genotyp, der möglicherweise einen veränderten Phänotyp aufweist.

2.14.1 Erzeugung einer Transposon-Bibliothek mittels pUTminiTn5-*luxCDABE*

In dieser Arbeit wurde das Tn5-*luxCDABE*-tc System aus *Photobacterium luminescens* auf einem pUT-Vektor eingesetzt, um in einem *P. aeruginosa* Stamm eine Transposon-Bibliothek nach Lewenza anzulegen, um eine Analyse von möglichst vielen verschiedenen Mutanten eines Stammes, durchzuführen (Winson *et al.*, 1998; Lewenza *et al.*, 2005). Dieses Tn5-*luxCDABE*-tc Transposon besitzt neben einer Tetrazyklin-Resistenzkassette (*Tet^r*) das promotorlose *lux*-Operon aus den Genen *luxC*, *luxD*, *luxA*, *luxB* und *luxE* (*luxCDABE*). Die *luxCDE*-Gene kodieren für einen Fettsäure-Reduktase-Komplex, welcher an der Synthese von dem Substrat für die Lumineszenzreaktion, katalysiert durch LuxAB, beteiligt ist. Die Lumineszenz konnte bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt werden. Basierend auf der Lumineszenz ermöglicht dieses System, neben der Konstruktion einer Transposon-Bibliothek, eine quantitative Aussage über die aktive oder inaktive Transkription des durch das Transposon betroffenen Gens.

2.14.2 Erzeugung einer Transposon-Bibliothek mittels *in vitro* Tn5-Konstruktes

Eine weitere Transposon-Bibliothek wurde mit dem EZ-Tn5™-Transposon (EpiCentre, Madison WI, USA) erzeugt. Der EZ-Tn5™ *in vitro* Komplex wurde *in vitro* wie folgt hergestellt:

2 µL des EZ-TET-1 Transposons wurden mit 4 µL EZ-Tn5™-Transposase und 2 µL sterilem dH₂O versetzt. Dieser „Transposome Mix“ wurde für 30 min bei RT inkubiert und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. 1 µL des „Transposome Mix“ wurde mittels Elektroporation in die *P. aeruginosa* PATS1 Zellen eingebracht (2.12.3). Die Selektionsplatten enthielten neben dem Selektionsantibiotikum (Tet₅₀₋₁₀₀) 5 mM Magnesium. Diese Transposonmutanten wiesen eine Tetrazyklin-Resistenz (*Tet'*) auf.

2.14.3 Kultivierung und Lagerung der Transposon-Bibliotheken

Zur Analyse des extrazellulären Lektins LecB in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienten PATS1 Stämmen mit *plecB*-Expressionsvektor wurden zunächst Lagerkulturen jeder einzelnen Mutante angelegt. Dazu wurden 175 µL LB-Medium inkl. Selektionsmarker (Cm₃₀₀ und Tet₅₀) mit einer Kolonie der Transposonmutanten-Bibliothek inokuliert und über Nacht bei 37°C und 650 UpM in 96 Well-Zellkulturplatten (VWR, Pennsylvania, USA) mit atmungsaktiven Folien (VWR, Pennsylvania, USA) abgeschlossen, kultiviert. Diese Kulturen wurden am folgenden Tag mit 13,4 µL DMSO versetzt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Kultivierung der Transposonmutanten-Bibliothek für die Verwendung im modified Enzyme-Linked Lectin Assay (mELLA) erfolgte in 2 mL Deep-Well-Platten (Greiner bio-one, Österreich) mit 750 µL LB-Medium inkl. Selektionsmarker (Cm₃₀₀ und Tet₅₀). Dazu wurden die Mutanten aus den Lagerkulturen mit Hilfe eines „Impfigels“ überimpft und die Kulturen für 24 h bei 37°C und 650 UpM inkubiert. Nach 24 h wurden 100 µL der Kultur abgenommen und in 96 Well-Mikrotiterplatten (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) zur Bestimmung der optischen Dichte im Plattenphotometer (MWG-Biotech Spectra Max 250, Ebersberg) verwendet. Die Kulturen in den 2 mL Deep-Well-Platten wurden parallel zentrifugiert (15 min, 4.000 UpM, RT) und die Überstände zur Verwendung im mELLA abgenommen.

2.15 Lokalisierung des Transposon-Insertionsortes

2.15.1 Single-Primer Methode

Die Identifizierung des Transposon-Integrationsortes erfolgte mit der Single-Primer Methode. Dazu wurde zunächst die genomische DNA der Transposonmutante (2.14) wie in 2.5 beschrieben, isoliert und eine PCR mit nur einem Oligonukleotid (TET1-FP4_TS; 2.3) durchgeführt. Dies hat zur Folge, dass nicht exponentiell pro PCR-Zyklus Amplifikate erzeugt, sondern nur geringe Mengen amplifiziert werden, da der Gegenstrang nicht mit amplifiziert wird. Die Menge der Amplifikate ist jedoch für eine nachfolgende Sequenzierung ausreichend (2.11) und ermöglicht die Identifizierung des Transposon-Integrationsortes.

2.15.2 Plasmid-Rescue

Zur Analyse und Identifizierung des Transposon-Integrationsortes wurden zunächst *E. coli* DH5 α -Zellen mit dem *high-copy* Vektor pUC18 transformiert (2.12) und auf LB+Amp₁₀₀-Agaroseplatten ausgestrichen. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und in Flüssigkultur inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Plasmide aus den Zellen mittels Mini-Präparation (2.5) isoliert werden. Die Plasmide wurden mit *KpnI* (2.9) hydrolysiert (5'-GGTAC'-3'). Die geschnittenen Vektoren dienten als Vektorrückgrat für die *Plasmid-Rescue*-Versuche. Parallel dazu wurde die genomische DNA aus den mELLA-EZ-Tn5[™]-Mutanten isoliert (2.5) und mit *KpnI* ebenfalls hydrolysiert. Dabei entstanden 1.340 verschieden große Fragmente, welche als Inserts dienten. Diese Inserts und das Vektorrückgrat wurden mit der T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) über Nacht ligiert (2.9) und erneut mittels Transformation von *E. coli* in die Zellen eingebracht (2.12). Da das Transposon eine Tetrazyklin-Resistenzkassette mit eigenem Promotor enthält, konnte auf die Tetrazyklin-Resistenz selektiert werden. Die Kolonien, die auf den LB+Tet₁₀-Agarplatten wuchsen, besaßen ein genomisches Fragment, welches das Transposon mit Resistenzkassette, als auch einen Teil der nachfolgenden Gene enthielt. Diese Kolonien wurden für die Isolierung der Plasmide mittels Mini-Präparation (2.5) genutzt. Da der Insertionsort des unbekannten Inserts in dem Vektor bekannt ist, konnte mit zwei Oligonukleotiden (TET-1-FP-1-FW und TET-1-FP-2-FW; Tab. 3) das Fragment zunächst amplifiziert (2.10.1) und anschließend durch Sequenzierung (2.11) identifiziert werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden gegen das Genom von *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000)

mittels Homologievergleich mit den BLAST-Algorithmen (Altschul *et al.*, 1997) des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt und der Transposon-integrationsort bestimmt.

2.15.3 Inverse-PCR

Für die Identifizierung des Transposon-Integrationsortes mittels Inverser-PCR (IP) wurde zunächst die genomische DNA der Transposonmutanten isoliert (2.5), gereinigt (2.8) und mit der Restriktionsendonuklease *NarI* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) hydrolysiert (2.9). *NarI* hydrolysiert die genomische DNA an 11.677 Stellen. Die anschließend wie in Kapitel 2.8 gereinigte DNA wurde über Nacht mit T4 DNA Ligase (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) ligiert (2.9). Die zirkularisierte DNA wurde als Matrix für eine IP ausgehend vom Transposon verwendet und Teile des Transposons bzw. der Bereiche um das Transposon amplifiziert (2.10.3; Oligonukleotide: TET-1-FP-1-FW, TET-1-FP-1-RV; 2.3). Das PCR-Produkt wurde über Nacht mit *DpnI*, welches nur die methylierte genomische DNA hydrolysiert, behandelt. Die amplifizierte DNA wurde gereinigt (2.10.5) und mit dem Oligonukleotid TET-1-FP4_TS (2.3) sequenziert (2.11).

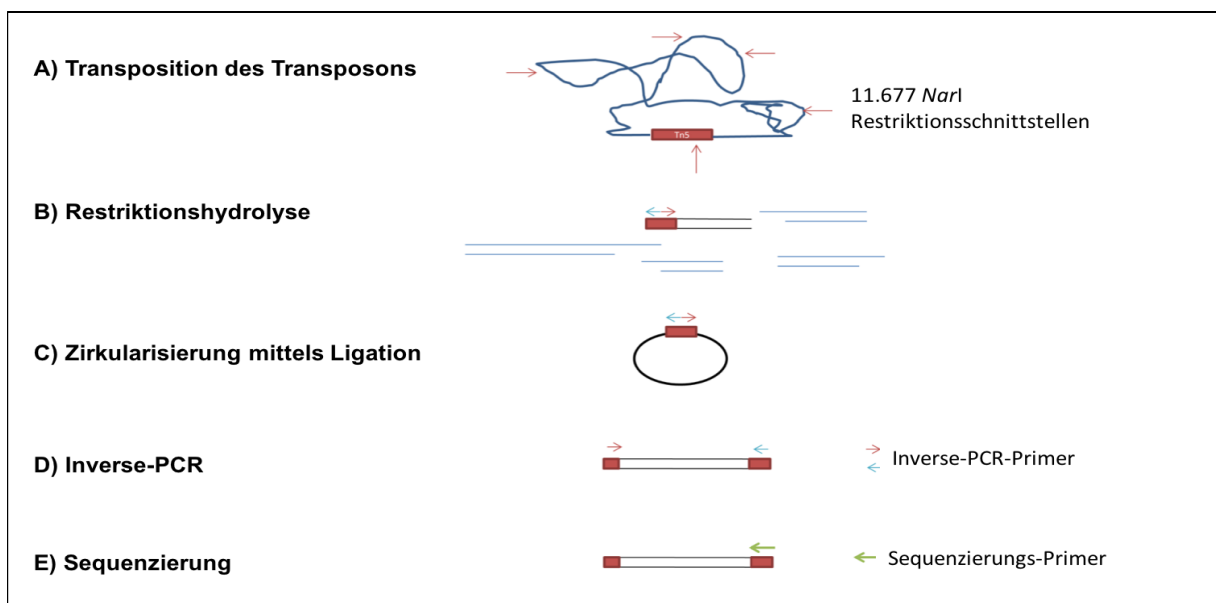


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Transposonnachweises mittels Inverser-PCR. (A) Die Transposition des Tn5-Transposons erfolgte zufällig und randomisiert in das Genom des *P. aeruginosa* PATS1 Stammes. Das Genom weist dabei eine Vielzahl von Restriktionsschnittstellen für die Endonuklease *NarI* auf (rote Pfeile). (B) Durch Restriktionshydrolyse mit *NarI* entstehen 11.677 lineare Fragmente. (C) Die DNA-Fragmente werden mittels Ligation zirkularisiert. (D) PCR-Amplifizierung der zirkularisierten DNA, welche das Transposon enthält mittels IP (Inverse-PCR-Primer: roter und blauer Pfeil). (E) Die amplifizierte DNA wurde mit dem Oligonukleotid (grüner Pfeil) versetzt und sequenziert. Auf Basis der Sequenzierung wurde eine BLAST-Suche durchgeführt und der Transposon-Integrationsort identifiziert. Abbildung nach Lewenza und Hancock optimiert (<http://pseudomutant.pseudomonas.com>).

2.16 Entwicklung, Etablierung und Durchführung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von LecB

Zur quantitativen Analyse von gereinigtem LecB bzw. LecB im extrazellulärem Medium von Bakterienkulturen wurde der *modified Enzyme-Linked Lectin Assay*, kurz mELLA, verwendet (Abb. 5). Dieses Verfahren basiert auf dem *Enzyme-Linked Lectin Assay* (ELLA), welcher sich vom *sandwich* ELISA ableitet. Dabei wird über einen indirekten immunologischen Nachweis von immobilisierten Lektinen deren Konzentration in Lösungen bestimmt.

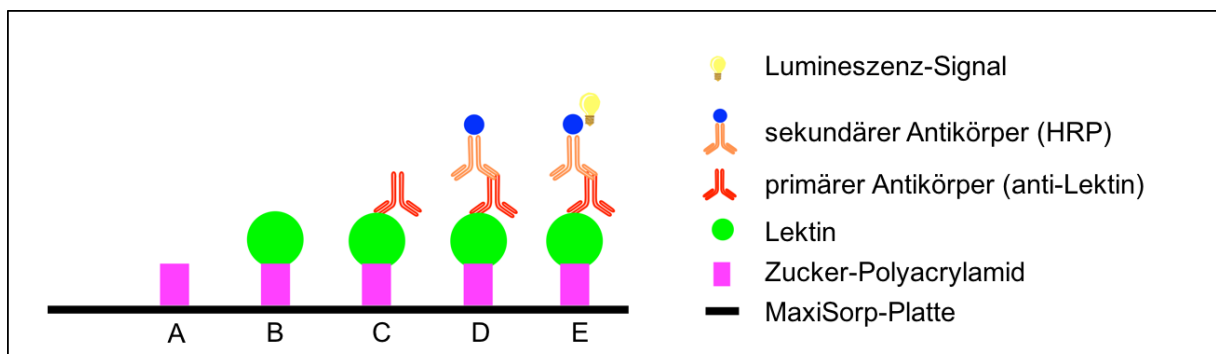


Abbildung 5 Schematische Darstellung des *modified Enzyme-Linked Lectin Assay*. Zunächst wird die hydrophobe MaxiSorp-Platte mit Zucker mit Polyacrylamid (Zucker-PAA) inkubiert (A). Anschließend werden die Lektine aus Lektin-haltigen Lösungen an den fixierten Zuckern immobilisiert (B). Das primäre anti-Lektin Antiserum bindet das Lektin (C) während der sekundäre HRP-konjugierte Antikörper das primäre Antiserum bindet (D). Durch Zugabe eines Substrates, welches durch das HRP-konjugierte sekundäre Antiserum umgesetzt wird, wird ein Lumineszenzsignal sichtbar (E).

2.16.1 Quantitative Analyse von LecB-haltigen Medien mittels des *modified Enzyme-Linked Lectin Assay*

Für die quantitative Analyse von Lektinen wurde zunächst ein Zucker-Polyacrylamid-Konjugat (Zucker-PAA; GlycoTech, Kanada; in 0,3 M Natriumphosphat-Puffer pH 8.0) an eine hydrophobe Nunc-Immuno MaxiSorp-Platte (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) immobilisiert. Dazu wurde die MaxiSorp-Platte mit Zucker-PAA-Lösung (100 µL einer 5 µg/mL-Lösung; 1 h, 150 UpM, 37°C) inkubiert und anschließend die überschüssige Lösung entfernt. Die mit Fukose-PAA (Fuc-PAA) immobilisierte MaxiSorp-Platte wurden mit PBST-Puffer (137 mM NaCl; 1,4 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,2 % (v/v) Tween 20, pH 7.4) mit 3 % (w/v) BSA (100 µL; 1 h, 150 UpM, 37°C) behandelt und anschließend die Lösung verworfen. Die zu untersuchende Probe wurde hinzugeben (100 µL) und inkubiert (1 h, 150 UpM, 37°C), der Überstand verworfen und die Probe drei Mal mit PBST + 3 % (w/v) BSA gewaschen (je 100 µL; 20 min, 150 UpM, 37°C). Abweichend davon wurde im Falle der *P. aeruginosa amrZ*-, *ansB*-, *oprF*-, *xcpA*-, *xcpQ*-defizienten Stämme, das Volumen der zu untersuchenden Probe verdoppelt, ebenso wie alle nachfolgenden

Behandlungen des mELLA. Dies hatte eine erhöhte Sensitivität des Verfahrens zur Folge, das eine Quantifizierung unterhalb der normalen LecB-Konzentration ($<0,25$ ng/mL) ermöglicht. Nach den Waschschritten wurde das primäre Antiserum (polyklonalem anti-LecB Antiserums aus Kaninchen; 1:5.000 in PBST + 3 % (w/v) BSA; (Tielker 2001)) hinzugeben und über Nacht inkubiert (150 UpM, 4°C). Es folgten drei Waschschrritte mit PBST + 3 % BSA (je 100 µL; 20 min, 150 UpM, 37°C) und ein Waschschrtritt mit PBST (100 µL; 20 min, 150 UpM, 37°C). Das sekundäre Antiserum (Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP Konjugat; 1:20.000 in PBST; Bio-Rad, München) wurde hinzugegeben und die Probe mit diesem inkubiert (1 h, 150 UpM, 37°C). Es folgten drei Waschschrritte mit PBST (je 100 µL; 20 min, 150 UpM, 37°C) und die Zugabe des ECL-Substrates (je Platte: 10 mL Lösung A (0,1 M Tris/HCl (pH 8.6), 250 mg/L Luminol), 1 mL Lösung B (1,1 g/L para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO), 3 µL Lösung C (35 % Wasserstoffperoxid)) für das Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antiserum mit anschließender Lumineszenzmessung (2.16.2) und Aufnahme (2.16.3).

2.16.2 Quantitative Lumineszenzmessung

Messung der Lumineszenz des umgesetzten ECL-Substrates durch das Meerrettich-Peroxidase-konjugierte sekundäre Antiserum wurde am Plattenphotometer (Infinite M1000 Pro, Tecan Trading AG, Schweiz) direkt nach Zugabe des Substrates durchgeführt. Als Parameter für das Programm Tecan i-Control (Version 1.11.1.0) wurden die Standardwerte für Lumineszenzmessungen (Modus: Lumineszenz, Integrationszeit: 1.000 ms, Nunc 96-Well MaxiSorp weiß) ausgewählt.

2.16.3 Lumineszenz-Aufnahme von mELLA-Platten

Die Lumineszenz-Aufnahme der mELLA-Platten (2.16.1) erfolgte nach Abschluss der Lumineszenzmessung (2.16.2) in der Lumineszenz-Dokumentationsanlage (STELLA, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) mit dem Programmparameter „CL-Standard“. Für die Zuordnung der Lumineszenz und der dazugehörigen Wells wurde eine Weißlichtaufnahme („WL-overlay Standard CL“) angefertigt und die Bilder mittels AIDA-Software (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) digital fusioniert.

2.16.4 Analyse der mELLA-Messwerte

Für die Etablierung des mELLA wurden verschiedene Konzentrationen des gereinigten LecB-Proteins eingesetzt, die Lumineszenzwerte durch diese Konzentration geteilt und der lineare Arbeitsbereich des mELLA in Bezug auf die ideale LecB-Konzentration ermittelt. Im Anwendungsfall des mELLA mit LecB-haltigen Kulturüberstandspuben wurden die gewonnenen Lumineszenz Messwerte mit Hilfe eines LecB-Standards, dessen Konzentration bekannt ist sowie den eingesetzten optischen Dichten der Kulturen auf LecB in ng/mL/O.D._{580 nm} normalisiert.

2.16.5 Nomenklatur von Transposonmutanten

Die Transposonmutanten aus dem mELLA-Screening wurden nachfolgendem Schema benannt:

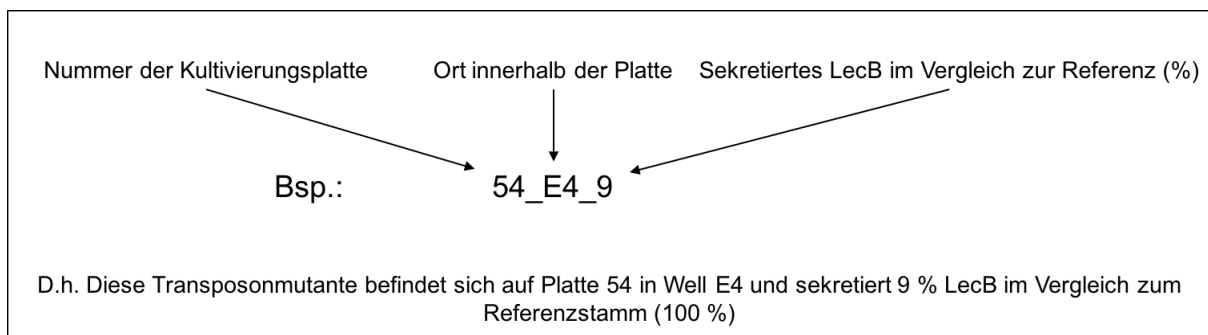


Abbildung 6 Die Nomenklatur von Transposonmutanten. Zunächst wird die Nummer der Kultivierungsplatte benannt, in diesem Fall Kultivierungsplatte **54**. Das Well der Transposonmutante innerhalb der 96 Well-Mikrotiterplatte/-Kultivierungsplatte wird getrennt mit einem Unterstrich angesetzt (**E4**). Durch einen weiteren Unterstrich wird das Sekretierte LecB im Vergleich zum Referenzstamm angesetzt (**9**), sodass durch diese Nomenklatur jederzeit die entsprechende Transposonmutante identifiziert werden kann.

2.17 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford (Bradford 1976), Lowry (Lowry *et al.*, 1951), dem „BCA Protein Assay“ (Pierce, Rockford, USA) bzw. unter Verwendung der „Coomassie Plus Protein Assay Reagent“ (ThermoFisher Scientific, Darmstadt). Für die Kalibrierung des Assays wurde Rinderserumalbumin (=BSA; Roth, Karlsruhe) als Referenz verwendet.

2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichtes erfolgte unter denaturierenden Bedingungen und in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli 1970), bestehend aus einem SDS-Polyacrylamid-Gradientengels (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel; Invitrogen, Kalifornien, USA). Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen 10 min bei 95°C denaturiert. Proben mit geringer Proteinkonzentration wurden vor der Gelelektrophorese mittels TCA-Fällung präzipitiert (Sivaraman *et al.*, 1997) und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in den Gelsystemen „Novex® Mini-Cell“ der Firma Invitrogen (Kalifornien, USA) bei einer Spannung von 200 V und 110 mA pro Gel für 25 min und anschließend für 15 min bei 80 mA pro Gel in NuPAGE™-MES-SDS-Laufpuffer (50 mM MES, 50 mM Tris, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7.3). Die aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgetrennten Proteine wurden nach Merrill mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg) gefärbt (Merrill 1990). Abschließend wurden die Gele fotografisch mittels Geldokumentationsanlage (STELLA, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) dokumentiert.

2.19 Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western Blot

Zur Analyse der aufgetrennten Proteine mittels SDS-PAGE (2.18) wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, München) unter Verwendung des „Mini-Protean“ Systems (Bio-Rad, München) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte mittels Elektroblot in einem nach Dunn (Dunn 1986) beschriebenen Puffer (Dunn-Carbonat-Puffer; 10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20 % (v/v) Methanol) bei 150 V für 15 min und anschließend bei 300 V für weitere 45 min. Die PVDF-Membran wurde für eine Stunde in PBST-Puffer (137 mM NaCl; 1,4 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 0,2 % (v/v) Tween 20, pH 7.4) mit 3 % (w/v) BSA blockiert. Der indirekte immunologische Nachweis, der auf die PVDF-Membran übertragenen und immobilisierten Proteine (z.B. LecB-Protein), erfolgte unter Verwendung Protein-spezifischer primärer Antiseren (Tab. 6). Die Detektion erfolgte durch Messung der Lumineszenz, welche auf der Umsetzung des ECL-Substrates basiert. Diese Umsetzung wird durch das Meerrettich-Peroxidase (HRP-) konjugierte sekundäre Antiserum (Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP Konjugat; Bio-Rad, München) katalysiert. Im

Falle von primären HRP-konjugierten Antikörpern (Tab. 7) wird kein sekundäres Antiserum benötigt. Die Visualisierung der Lumineszenz erfolgte im STELLA Isotopenmessgerät (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) für 30 Sekunden, 1 Minute und 2 Minuten im Programm „CL-Standard“. Für die Zuordnung der Lumineszenz wurde eine Weißlichtaufnahme („WL-overlay Standard CL“) angefertigt und die Bilder mittels AIDA-Software (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) digital übereinandergelegt und zu einer Aufnahme fusioniert.

ECL-Substrat	1 mL Lösung A 0,1 mL Lösung B 0,3 µL 35 % (v/v) Wasserstoffperoxid
Lösung A	0,1 M Tris/HCl (pH 8.6), 250 mg/L Luminol
Lösung B	1,1 g/L para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO

Tabelle 6 Verwendete primäre Antiseren. Dargestellt sind die zum indirekten immunologischen Nachweis eines Proteins verwendeten primären Antiseren sowie die genutzten Verdünnungen.

Primäres Antiserum	Verdünnung	Referenz
anti-LecA aus Kaninchen (polyklonal)	1:20.000	(Tielker 2001)
anti-LecB aus Kaninchen (polyklonal)	1:20.000	(Tielker 2001)
anti-DsbA aus Kaninchen (polyklonal)	1:100.000	(Urban <i>et al.</i> , 2001)

Tabelle 7 Verwendete HRP-konjugierte Antiseren. Die zum direkten Nachweis genutzten Antiseren eines spezifischen Proteins.

HRP-konjugierte Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-His-HRP (C-term.)	1:5.000	Invitrogen, Kalifornien, USA
anti-His-HRP (N+C-term.)	1:5.000	Invitrogen, Kalifornien, USA

2.20 Amidoschwarz-Färbung von PVDF-Membranen

Als Nachweis der korrekten Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen (2.18) auf die PVDF-Membran des immunologischen Nachweises (2.19) wurden die Proteine auf den Membranen mit Amidoschwarz gefärbt. Dazu wurden etwa 1 mL Amidoschwarz-Lösung

(0,1 % (w/v) Amidoschwarz, 45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) auf die Membran gegeben und zügig wieder entfernt. Nach dem Lufttrocknen der Membranen bei RT konnten die Proteinbanden beobachtet werden.

2.21 Sekretomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

2.21.1 TCA-Fällung von extrazellulären Proteinen

Um Proteinproben aus extrazellulären Kulturen mittels quantitativer zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) aufzutrennen, wurden zunächst Hauptkulturen aus ÜK auf O.D._{580 nm} 0,05 inokuliert und für 24 h in NB-Medium bei 37°C inkubiert. Die Hauptkulturen wurden mittels Zentrifugation (1 h, 10.000 x g, 4°C) sedimentiert. Nach der Zentrifugation wurde der Kulturüberstand sorgfältig abgenommen und steril filtriert. Anschließend wurde der Überstand mit 40 %iger Trichloressigsäure (TCA) in Aceton über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Fällung der Proteine wurden diese zentrifugiert (1 h, 15.000 UpM, 4°C) und der Überstand verworfen. Das proteinhaltige Pellet wurde vorsichtig mit -20°C vorgekühltem Aceton gewaschen und zentrifugiert (10 min, 15.000 UpM, 4°C). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das präzipitierte Proteinpellet erneut mit Aceton gewaschen und zentrifugiert (10 min, 15.000 UpM, 4°C). Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in Rehydrierungspuffer aufgenommen.

Rehydrierungspuffer: 8 M Harnstoff, 3 % (w/v) CHAPS, 2 % (v/v) IPG-Puffer (pH 4-7),
 0,1 % (v/v) Bromphenolblau

2.21.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von 2D-Gel-Proben

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „2-D Quant Kit“ von GE Healthcare (Solingen) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die ermittelten Proteinkonzentrationen wurden zum Einstellen einer definierten Menge an Proteinen mit Resuspendierungspuffer für die nachfolgenden Analysen aller Proben verwendet.

Resuspendierungspuffer: 50 mM Tris/HCl (pH 7.0), 7 M Harnstoff, 1 M Thioharnstoff,
 4 % (w/v) CHAPS

2.21.3 Die isoelektrische Fokussierung (Erste Dimension)

Für die isoelektrische Fokussierung wurden IPG-Gelstreifen (IPG pH 4-7, 24 cm; GE Healthcare, Solingen) zunächst mit den Proben (250 µg) für 18 Stunden bei RT beladen. Die maximale Probenmenge ist dabei abhängig von der geringsten Proteinkonzentration und wurde in diesem Fall auf 450 µL eingestellt. Anschließend erfolgte die isoelektrische Fokussierung der Proteine nachfolgendem Programm im „Ettan IPGphor 3 System“ (GE Healthcare, Solingen):

Tabelle 8 Programm für die isoelektrische Fokussierung.

Ladung durch Rehydrierung				Temperatur (°C)	Stromstärke (µA)
Schritt	Methode	Volt (V)	Zeit (h)		
1	Step&Hold	150	3	20	75
2	Step&Hold	300	3		
3	Gradient	1.000	6		
4	Gradient	10.000	1		
5	Step&Hold	10.000	5		

2.21.4 Die Auftrennung nach Molekulargewicht (Zweite Dimension)

Die zweite Dimension der Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes erfolgte durch Auftragen der Gelstäbchen, nach der isoelektrischen Fokussierung (2.21.3), auf 12,5 %ige SDS-Gele und anschließender SDS-PAGE. Dazu wurden die Proben zunächst mit DTT-haltigem Equilibrierungspuffer (Eq.-Waschpuffer I) und anschließend mit Iodacidamid-haltigem Equilibrierungspuffer (Eq.-Waschpuffer II) für je für 15 Minuten schwenkend gewaschen. Die Gele wurden anschließend luftblasenfrei auf die SDS-Gele aufgelegt und mit 2 %iger (w/v) Agarose-Lösung, luftblasenfrei fixiert. Die Gelelektrophorese erfolgte im „Ettan DALT six“ Gelelektrophoresesystem (GE Healthcare, Solingen) in zwei Schritten. Zunächst wurden die Proben für eine Stunde bei 50 V, 60 mA und 3 W langsam aus dem Gelstäbchen über die Agarose ins Gel transferiert. Danach wurden die Parameter der Elektrophorese auf 600 V, 360 mA und 180 W erhöht und die Proben für fünf Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Fixierlösung im Gel fixiert und über Nacht in Coomassie-Lösung (Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva (Heidelberg)) gefärbt. Am folgenden Tag wurden die Gele mit dH₂O in mehreren Schritten gewaschen.

Equilibrierungspuffer:	6 M Harnstoff, 75 mM Tris/HCl (pH 8.8), 87 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Bromphenolblau
Eq.-Waschpuffer I:	150 mg DTT in 15 mL Equilibrierungspuffer
Eq.-Waschpuffer II:	375 mg Iodacidamid in 15 mL Equilibrierungspuffer
Fixierlösung:	10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Ethanol

2.21.5 Bioinformatische Analyse des Sekretoms

Die 2D-Gele konnten mittels Scanner (Typhoon Trio; Amersham Biosciences; Freiburg) digitalisiert werden. Die anschließende Auswertung und Erkennung von veränderten Spots erfolgte mit der Software „Decodon Delta 2D“ (Decodon, Greifswald) zur Bildanalyse. Die dabei identifizierten Spots wurden gepickt, in „*protein low-binding*“ Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und die enthaltenen Proteine mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (2.22) analysiert.

2.22 Identifizierung von Proteinen

Die ausgeschnittenen Proteinspots wurden zunächst mittels Acetonitril/-Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (30 % Acetonitril, 0,1 M NH_4HCO_3) für 20 min bei Raumtemperatur und 1.200 UpM im Thermoschüttler entfärbt. Der Überstand wurde verworfen und die Entfärbung wiederholt bis das Gelstück vollständig entfärbt war. Die entfärbten Gelstücke wurden anschließend für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Pro Ansatz wurden 6 μL Tris-Probenpuffer (3 mM Tris/HCl pH 8.8) und 0,12 μL Trypsin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Trypsin Gold Mass, Promega GmbH, Mannheim) hinzugegeben und die Ansätze über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Trypsin Behandlung wurden die Proben mit 2 μL MilliQ dH_2O versetzt und die Proben für 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und in neuen Reaktionsgefäßen gesammelt. Den Gelstücken wurden 5 μL Acetonitril/TFA-Lösung (30 % Acetonitril, 1 % Trifluoressigsäure (TFA)) hinzugegeben und für 15 min bei RT im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit den gesammelten Überständen aus dem ersten Schritt vereint.

Die massenspektroskopische Analyse der eluierten Proteine erfolgte mittels MALDI-TOF-MS im Institut für Bio- und Geowissenschaften – Biotechnologie (IBG-1) des Forschungszentrums Jülich.

2.23 Expression und Reinigung von LecB

Für zahlreiche nachfolgende Experimente wurde gereinigtes LecB aus *P. aeruginosa* sowie heterolog exprimiertes LecB aus *E. coli* benötigt. Dazu wurden die Stämme *E. coli* BL21 (DE3) bzw. *P. aeruginosa* PA01 mit dem Vektor *plecB* (Tielker 2001) verwendet. Dieser Vektor trägt das *lecB*-Gen unter Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors. Die verwendeten Stämme *E. coli* BL21 (DE3) bzw. *P. aeruginosa* PA01 mit dem Vektor *plecB* wurden unter Selektionsdruck bei 37 °C bis zu einer O.D._{580 nm} 0,6 kultiviert (24 h, 37°C, 25-1.000 mL LB-Medium). Anschließend wurden die Kulturen für 16 h bei 30 °C kultiviert und abschließend mittels Zentrifugation (30 min, 5.000 x *g*, RT oder 4°C) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 30 mL Equilibrierungspuffer (100 mM Tris/HCL, pH 8.0) aufgenommen und mittels Ultraschall (3 x 2,5 min, 45 %, SONOPLUS HD 60) aufgeschlossen. Das Gesamtzellextrakt (GZE) wurde zentrifugiert (30 min, 10.000 x *g*, RT) und der Überstand für die Reinigung verwendet. Diese wurde zur idealen Proteinausbeute bei 37 °C, gemäß dem Temperaturprofil der Hämagglutinationsreaktion des LecB-Proteins (Gilboa-Garber *et al.*, 1999), durchgeführt. Das Säulenmaterial (2 mL D-Mannose-Agarose, Sigma, Deisenhofen) wurde equilibriert, mit dem Gesamtzellextrakt beladen und mit 20 mL Waschpuffer (100 mM Tris/HCL, pH 8.0; 140 mM NaCl) gewaschen. Die Elution des LecB(-L) Proteins erfolgte durch Zugabe von 20 mL Elutionspuffer (20 mM D-Mannose, 100 mM Tris/HCL, pH 8.0). Zum Entfernen der zur Elution eingesetzten D-Mannose und zur Konzentrierung der Proteinlösung wurden Zentrifugenkonzentratoren (VivaSpin, GE Healthcare, Solingen) mit einer Ausschlussgröße von 5.000 MWCO gegen den Equilibrierungspuffer eingesetzt. Dazu wurden die Konzentratoren in einem Ausschwingrotor der Kühltzentrifuge (4°C) bei 3.000 *g* zentrifugiert und die Proteinlösung bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Das gereinigte Protein wurde mittels SDS-PAGE (2.18) und immunologischen Nachweis (2.19) bestätigt und die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt (2.17).

2.24 Motility-Assays

Die *Motility-Assays* erfolgten im M9-Medium (Atlas 2010), welches jeweils angepasst an den *Motility-Assay* aus vier Stammlösungen angesetzt wurde. Diese wurden wie nachfolgend beschrieben kombiniert (Tab. 9), die *Motility-Assay*-Platten gegossen und die *Motility-Assays* durchgeführt. Die Agarose-Konzentration und Kohlenstoffquelle induziert die entsprechenden Fortbewegungen des Bakteriums. Bei einer 0,3 % Agarkonzentration können Schwimm- (Murray & Kazmierczak 2006; Jarrell & McBride 2008), bei 0,5 % die Schwärmbewegung (Köhler *et al.*, 2000) sowie bei 1 % Agarkonzentration die *twitching motility* (Rashid & Kornberg 2000) beobachtet werden.

2.24.1 Schwimm und Schwärmbewegung

Nach dem Trocknen der Agarplatten wurden 5 µL einer ÜK einer O.D._{580 nm} 3,0 zentral in der Mitte der Platte auftragen und die Kultur über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Dokumentation der Schwimmbewegung bzw. die der Schwärmbewegung zu verschiedenen Zeitpunkten mittels einer Dokumentationsanlage (STELLA, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

2.24.2 Twitching motility

Die Agarplatten wurden dünn gegossen (3 mm) und eine ÜK einer O.D._{580 nm} 1,0 zentral in der Mitte der Platte auf den Boden der Agarplatte mit Hilfe eines Zahnstochers aufgetragen. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C, danach bei RT inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die *twitching motility* (TM) mittels DSLR-Kamera (Canon EOS 600D: Blende 11, 106 mm, Belichtung 2 Sekunden, ISO 100, 18-135 mm Objektiv, schwarz-weiß; Canon, Japan) mit den Einstellungen erfasst.

Tabelle 9 Übersicht der *Motility-Assay* Medien.

Lösung	Bewegung		
	Schwimm	Schwärm	TM
Stammlösung I	25 mL	25 mL	25 mL
Stammlösung II	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Stammlösung III	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Stammlösung IVa	-	25 mL	-
Stammlösung IVb	25 mL	-	25 mL
dH ₂ O	195 mL	195 mL	195 mL
Agar	0,3 % (w/v)	0,5 % (w/v)	1 % (w/v)

Stammlösung I 0,4 % (w/v) Glukose-Lösung

Stammlösung II 2,5 % (w/v) MgSO₄-Lösung

Stammlösung III 0,2 % (w/v) CaCl₂-Lösung

Stammlösung IVa 7 % (w/v) Na₂HPO₄, 3 % (w/v) KH₂PO₄, 1,25 % NaCl-Lösung

Stammlösung IVb 7 % (w/v) Na₂HPO₄, 3 % (w/v) KH₂PO₄, 1,25 % (w/v) NaCl,
2,5 % (w/v) NH₄Cl-Lösung

2.25 Biofilm-Quantifizierung mittels Kristallviolett

Für die Quantifizierung von Biofilmen wurden zunächst Zellkulturen der O.D._{580 nm} 1,0 in Mikrotiterplatten (96-Wells = 150 µL) bzw. Zell-Kulturplatten (24-Wells = 400 µL) für eine definierte Zeit inkubiert (2 - 120 h). Nach Erreichen des Messzeitpunktes wurden die Kulturen vollständig abgenommen und die Wells zweimal mit dem 1,2-fachen Kulturvolumen mit dH₂O gewaschen. Um sämtliche Flüssigkeit zu entfernen, wurden die Kulturplatten bei 37°C für etwa 30 Minuten inkubiert. Die getrockneten Wells wurden mit dem 1,2-fachen Kulturvolumen 0,1 %iger Kristallviolett-Lösung versetzt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Kristallviolett abgenommen und die Wells zweimal gewaschen (s.o.) und über Nacht bei RT getrocknet. Das Kristallviolett wurde darauf folgend durch Zugabe von 40% iger Essigsäure von den Biofilmen gelöst und in eine neue 96-Well Mikrotiterplatte überführt. Die Quantifizierung der Biofilme erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm im Plattenphotometer (MWG-Biotech Spectra Max 250, Ebersberg).

2.26 Biofilm-Quantifizierung mittels XTT-Reduktionstest

Für die Quantifizierung von co-kultivierten Biofilmen verschiedener Wirte wurde der XTT-Reduktionstest von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Joachim Ernst und dessen Arbeitsgruppe (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt. Hierzu wurden 10^6 Zellen pro Milliliter der Stämme *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* *lecB*-defizient und *C. albicans* Wildtyp (SC5414, klinisches Isolat) sowie die gemischten Stämme kultiviert und diesen die Adhäsion an Polystyrol-Flachboden-Mikrotiterplatten für zwei Stunden in PBS-Puffer bei 37°C ermöglicht. Anschließend wurden die an die Platte gebundenen Zellen mit PBS gewaschen und die nicht gebundenen Zellen entfernt. Jedes Well wurde mehrfach mit PBS gewaschen, um alle ungebundenen Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die gebundenen Zellen mit TSB Nährmedium versetzt und für 12 und 24 h inkubiert (RT). Im Anschluss wurden die Biofilme mit PBS gewaschen und mit XTT-Menadion-Lösung versetzt, 60 min bei 37°C im Dunklen inkubiert und der Überstand in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Die Farbänderung wurde im Plattenphotometer (MWG-Biotech Spectra Max 250, Ebersberg) bei 490 nm ermittelt.

XTT-Menadion-Lösung: 1,5 mM XTT (Sigma, Deisenhofen),
 0,4 M Menadion (Sigma, Deisenhofen)

2.27 Quantifizierung der Lipase-Aktivität

Die Quantifizierung der Lipase-Aktivität erfolgte durch Messung der Absorption eines *p*-nitrophenyl-Butyrat (pNPB) Substrat, katalysiert durch die Lipase, im Plattenphotometer (MWG-Biotech Spectra Max 250, Ebersberg) bei 410 nm. Das pNPB Substrat (Stock-Lösung) wurde 1:20 in 100 mM Kaliumhydrogenphosphat-Puffer verdünnt und 200 µL dieses vorgemischten Substrates zu 15 µL Probenmaterial gegeben. Direkt nach Zugabe des Substrates wurde die Kinetik bei O.D._{410nm} aufgenommen sowie die Aktivität (O.D._{410nm}/min) im linearen Bereich ermittelt.

pNPB-Stock-Lösung: 20 mM *p*-nitrophenyl-Butyrat in Ethanol (p.A.)

3 Ergebnisse

3.1 Stammverifizierung und physiologischer Einfluss der Deletion von *lecB*

Das System für die Untersuchung der Sekretion des Lektins LecB in dieser Arbeit basiert auf dem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm, weshalb zunächst die Abwesenheit von *lecB*, das Wachstum und die vektorbasierte Expression von *lecB* in diesem Stamm untersucht wurde. Dazu wurde der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (WT) und der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente PATI4 Stamm (Tielker *et al.*, 2005) für 24 Stunden bei 37°C kultiviert und anschließend mittels Zentrifugation sedimentiert. Die Kulturüberstände und Zellpellets wurden für die Auftrennung der Proteine anhand des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE (2.18) und anschließend immunologischen Nachweis (2.19) von LecB verwendet (Abb. 7).

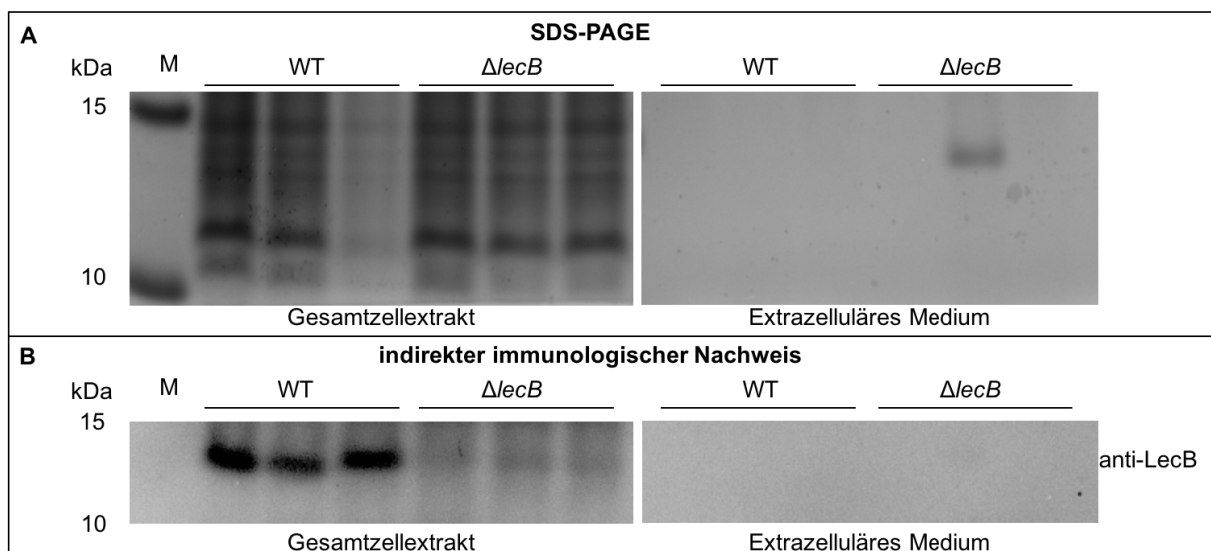


Abbildung 7 Der Nachweis und die Lokalisierung von LecB. Es wurden jeweils drei biologische Replikate des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes (WT) und des *lecB*-defizienten Stammes ($\Delta lecB$) als Übernachtskultur (ÜK) kultiviert. Die nachfolgende 24 h Hauptkultur wurde aus der ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert (LB-Medium, 37°C, 150 UpM). Die Kulturen wurden zentrifugiert (15 min, 4.000 x g, 4°C) und eine O.D._{580 nm} = 0,5 der Kulturüberstände sowie die Gesamtzellen für eine SDS-PAGE der enthaltenen Proteine (**A**) verwendet. Nachfolgend wurde der indirekte immunologische Nachweis von LecB mittels anti-LecB Antiseren durchgeführt (**B**). Als Größenstandard (M) wurde der PageRuler™ Prestained Ladder (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) verwendet.

Dabei zeigte sich, dass LecB mittels indirekten immunologischen Nachweis, in den Zelllysaten des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes (WT) detektiert werden konnte (Abb. 7 B). Es konnte kein LecB in den Überständen beider Stämme sowie in den Zelllysaten des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stammes (PATI4) beobachtet werden. In einem biologischen Replikate des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stammes konnte in dem SDS-PAGE-Gel eine Bande auf Höhe des LecB beobachtet werden (Abb. 7 A), bei der es sich jedoch nicht um

LecB handelt, wie der indirekte immunologische Nachweis gegen LecB zeigte (Abb. 7 B). Zur Verifizierung der Abwesenheit von genomisch exprimierten *lecB* wurde die quantitative PCR (qPCR) zur Ermittlung der *lecB*-Transkriptmenge der *P. aeruginosa* Stämme PA01 (Referenzstamm, WT) und *lecB*-defizient (PATI4) sowie dem Komplementierungsstamm *lecB*-defizient mit *plecB*-Expressionsvektor durchgeführt (Abb. 8 A). Darüber hinaus wurde ein indirektes Verfahren zur sensitiven Quantifizierung von LecB in Kulturüberständen, der modified Enzyme-Linked Lectin Assay (kurz: mELLA, 2.16) entwickelt (3.4.2) und verwendet (Abb. 8 B).

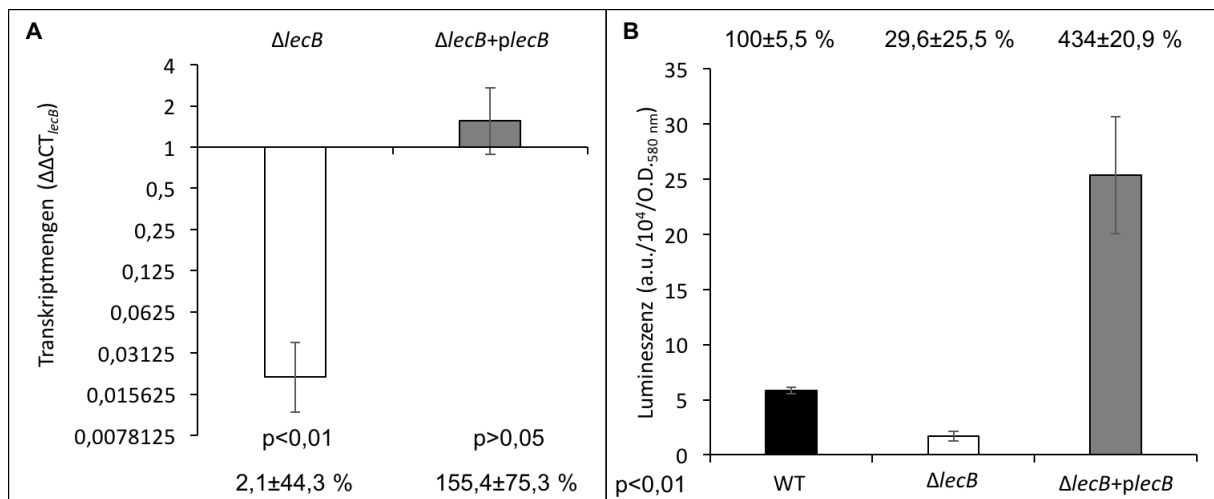


Abbildung 8 Die Quantifizierung von *lecB*-Transkripten und extrazellulärem LecB. (A) Quantifizierung von *lecB*-Transkripten des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes gegen den *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm bzw. den komplementierten *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor, normalisiert auf das *housekeeping*-Gen *rpoD*. Aufgetragen sind die relativen Transkriptmengen ($\Delta\Delta CT_{lecB}$). Dazu wurden HK aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und die RNA nach exakt 16 h isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR (2.10.4) die Transkriptmengen bestimmt (n=3). **(B)** Mittels des mELLA wurde das extrazelluläre LecB der *P. aeruginosa* Kulturen quantifiziert. Dazu wurden HK aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert, zentrifugiert (15 min, 4.000 x g, RT) und die zellfreien Kulturüberstände (100 µL) im mELLA (2.16) untersucht (n=8, p<0,01).

Mittels qPCR konnten die Transkriptmengen von *lecB* ermittelt werden. In den Ergebnissen wird sichtbar, dass der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente PATI4 Stamm nahezu keine *lecB*-Transkripte (-97,9 %) im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm aufweist (p<0,01). Die detektierten *lecB*-Transkripte liegen sehr nahe am Hintergrund. Es ist daher von einer Abwesenheit des *lecB*-Gens auszugehen. Durch die Komplementierung der *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Mutante mit dem *plecB* Expressionsvektor, konnte eine wildtyp-ähnliche Expression wiederhergestellt werden, da die 1,5-fache Erhöhung aufgrund der Streuung der Messwerte nicht signifikant vom Referenzstamm abweicht (p>0,05). Die Quantifizierung von extrazellulärem LecB mittels mELLA (Abb. 8 B) zeigte, dass der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stamm ein 70,4 % geringeres Lumineszenz-Niveau im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (WT) aufweist (Abb. 8 B) und als Basislinie für den

Hintergrund definiert wurde. Im Kulturüberstand des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stammes mit *plecB*-Expressionsvektor wurde eine 4,3-fach erhöhte LecB-Menge, im Vergleich zum Referenzstamm, beobachtet. Da in vorherigen Studien gezeigt wurde, dass *lecB* in der stationären Phase exprimiert wird (Gilboa-Garber 1972a, b; Gilboa-Garber *et al.*, 1977) war davon auszugehen, dass die notwendigen Transportmechanismen für die Sekretion von LecB zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehen. Daher wurde überprüft, ob die Deletion von *lecB* einen Einfluss auf die Zelldichte in der stationären Phase (Abb. 9) und die Fähigkeit Biofilme zu bilden aufweist (Abb. 10).

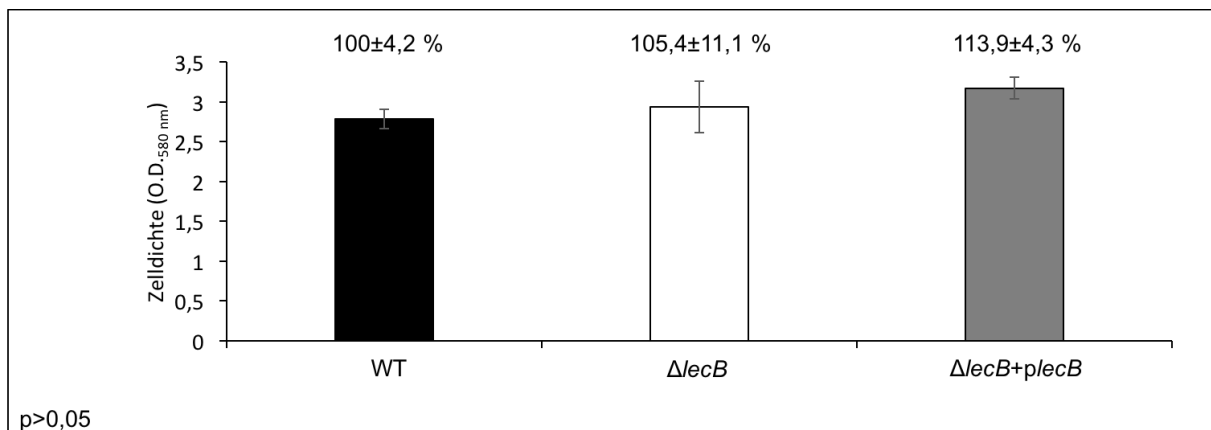


Abbildung 9 Die Deletion von *lecB* hat keinen Einfluss auf die Gesamtzellzahl. Dazu wurden Kulturen des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes (WT), des *lecB*-defizienten und des *lecB*-defizienten Stammes mit *plecB*-Expressionsvektor (dieser Stamm wuchs unter Selektionsdruck (Cm₃₀₀; 2.4)) auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert (LB-Medium, 150 UpM). Nach 24 h erfolgte die Zelldichtemessung mittels Endpunktmessung bei 580 nm Wellenlänge (O.D._{580 nm}; p>0,05 = Keine signifikante Abweichung).

Die Analyse der Gesamtzellzahl (Abb. 9) nach 24 h durch Messung der optischen Dichte (O.D._{580 nm}) zeigte, dass ein *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter Stamm nicht signifikant vom *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm abweicht (p>0,05). Die Abwesenheit von *lecB* hat keinen Einfluss auf die Zelldichte nach 24 h. Der komplementierte *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor zeigte gegenüber dem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm ebenfalls keine signifikante Abweichung (p>0,05). Darüber hinaus wurde das Wachstum des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stammes und des Referenzstammes in der logarithmischen Phase untersucht (Abb. 9). Dabei zeigte sich, dass diese nicht voneinander abweichen und neben der maximalen Zellzahl ähnlich schnell wachsen.

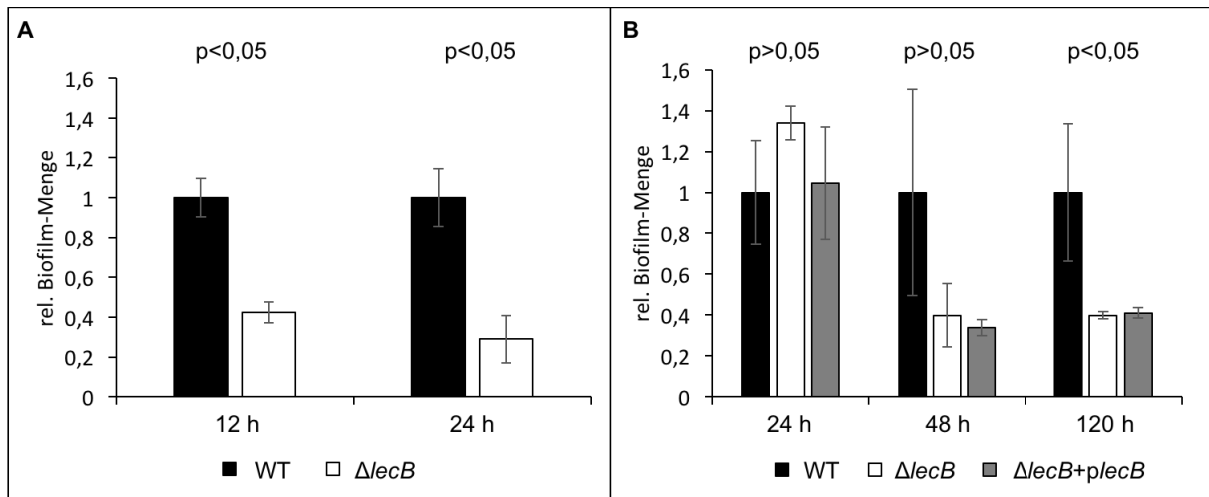


Abbildung 10 Ein *lecB*-defizienter Stamm weist eine reduzierte Biofilmbildung auf. (A) Quantifizierung von Biofilmen nach 12 und 24 h mittels XTT-Reduktionstest. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in Polystyrol-Flachboden-Mikrotiterplatten für zwei Stunden kultiviert, die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend in TSB Nährmedium für 12 bzw. 24 h inkubiert, anschließend erfolgte der XTT-Reduktionstest (2.26). (B) Quantifizierung von Biofilmen mittels Kristallviolett-Färbung. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme auf O.D._{580 nm} = 1,0 inokuliert und für 24, 48 oder 120 h kultiviert (400 μ L LB-Medium, 37°C). Anschließend folgte die Kristallviolett-Färbung (2.25). In beiden Versuchen wurden die Stämme WT (*P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm), $\Delta lecB$ (*lecB*-defizienter *P. aeruginosa* Stamm) und $\Delta lecB + plecB$ (*lecB*-defizienter *P. aeruginosa* Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor) verwendet. Die Signifikanzwerte (p) sind auf den *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (WT) der jeweiligen Zeitpunkte bestimmt.

Neben dem Wachstum der Zellen wurde der Einfluss von LecB auf die Biofilmbildung überprüft (Abb. 10), da die Abwesenheit von LecB einen negativen Einfluss auf die Biofilmbildung ausweist (Tielker 2005; Tielker *et al.*, 2005). Für die Bestimmung der Biofilmmenge wurden zwei unterschiedliche Methoden getestet. Zum einen wurde der XTT-Reduktionstest (2.26) und zum anderen die Kristallviolett-Färbung der Biofilme (2.25) verwendet. In Biofilm-Quantifizierung mittels XTT-Reduktionstest erhalten die Zellen zunächst die Möglichkeit an die Oberfläche der Mikrotiterplatte (MTP) zu binden. Nach dieser Bindung wurden alle ungebundene Zellen entfernt und die gebundenen Zellen in Kulturmedium inkubiert (Abb. 10 A). Dabei konnten die Ergebnisse früherer Studien bestätigt werden, dass der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stamm eine deutlich reduzierte Biofilmbildung aufweist (Tielker *et al.*, 2005; Sonawane *et al.*, 2006). Im Detail konnte nach 12 h eine um 58 % bzw. nach 24 h eine um 71 % reduzierte Biofilmbildung im *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente PATI4 Stamm im Vergleich zum PA01 Referenzstamm ermittelt werden.

Diese Methode der Biofilm-Quantifizierung legt zugrunde, dass die Zellen in der Lage sind an die Oberfläche der MTP zu binden. Dies ist jedoch bei einigen nachfolgend untersuchten Stämmen, z.B. dem *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienten PATS1 Stamm, nicht der Fall (3.2). Zwar weisen diese Stämme ebenfalls eine deutliche Menge an Biofilmen sowohl im Erlenmeyer-Kolben als auch in der Mikrokultivierung auf, durch die eingeschränkte

Adhäsionsfähigkeit, welche in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt wird, können diese Zellen jedoch nicht an die Oberfläche adhären und werden im Waschschrift entfernt. Daher wurden alternativ die Zellen kultiviert und die Biofilme ohne den initialen Waschschrift nach zwei Stunden direkt durch Kristallviolett-färbung (2.25) angefärbt und quantifiziert (Abb. 10 B). Nach 24 h konnte beobachtet werden, dass die Menge an Biofilm in *P. aeruginosa lecB*-defizienten Stämmen oberhalb des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes liegt. Allerdings zeigten die Quantifizierungen von späteren Biofilmen nach 48 und 120 h, dass der *P. aeruginosa lecB*-defizienten PATI4 Stamm etwa 60 % weniger Biofilm als der Referenzstamm aufweist (Abb. 10 B).

Die Ergebnisse der 24 h Kultivierung der Biofilme zeigten, dass die vektorbasierte Expression von *lecB*, unter Kontrolle des *lac*-Promotors, den Phänotyp des Referenzstammes im *P. aeruginosa lecB*-defizienten PATI4 Stamm wiederherstellt (Abb. 10 B). Dies konnte zuvor in einem *P. aeruginosa lecB*-defizienter PAK Stamm, welcher mit vektorbasiertem *lecB*, unter Kontrolle des bis zu zehnmal stärkeren *tac*-Promotors gegenüber des *lac*-Promotors (de Boer *et al.*, 1983) komplementiert wurde, ebenfalls nach 24 h beobachtet werden (Sonawane *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde der Einfluss von LecB auf spätere Biofilme nach 48 und 120 h untersucht und gezeigt, dass der *plecB*-Expressionsvektor im *P. aeruginosa lecB*-defiziente PATI4 Stamm den späten Biofilm-Phänotyp des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes im Gegensatz zu den 24 h Biofilmen, nicht wiederherstellen konnte (Abb. 10 B).

Die *twitching motility* (TM) ist eine Typ-IV-Pili vermittelte Bewegungsform, welche auf der Streckung und Retraktion der Pili basiert (Bradley 1980; Merz *et al.*, 2000). Es ist bereits bekannt, dass ein *P. aeruginosa lecB*-defizienter Stamm eine Einschränkung in dieser Bewegungsform aufweist, da LecB an der Biogenese des Typ-IV-Pili beteiligt ist (Sonawane *et al.*, 2006). Eine fehlende TM kann als Nachweis zur Verifizierung des *P. aeruginosa lecB*-defizienten Stammes genutzt werden, um die Abwesenheit von *lecB* zu bestätigen.

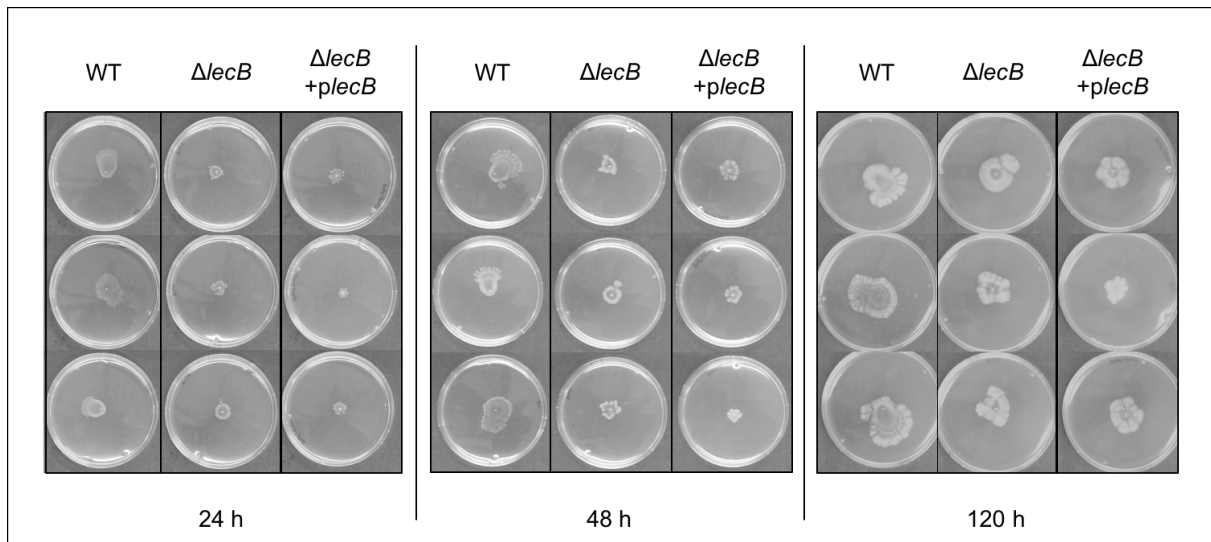


Abbildung 11 Der Einfluss von LecB auf die *twitching motility* von *P. aeruginosa*. Dazu wurden M9-TM-Agarmedien mit Zellen aus einer HK des Referenzstammes *P. aeruginosa* PA01, *lecB*-defizienten und des *lecB*-defizienten Stammes mit *plecB*-Expressionsvektor der O.D._{580 nm} = 1,0 inokuliert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C (2.24.2). Die weitere Inkubation bis zum Erreichen der jeweiligen Zeitpunkte zur Dokumentation, erfolgte bei RT. Die Dokumentation erfolgte mittels fotografischer Aufnahmen (EOS 600D, Canon, Japan).

Die TM-Nachweise zeigten, dass der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stamm gegenüber dem Referenzstamm eine deutlich geringere TM in den ersten 24 h aufweist (Abb. 11). Durch die Komplementierung des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stammes mit dem *plecB*-Expressionsvektor konnte der Phänotyp des Referenzstammes nicht wiederhergestellt werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass der vorliegende *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stamm kein *lecB* exprimiert, von der Zelldichte nach 24 h nicht vom Referenzstamm abweicht und wie erwartet eine reduzierte Biofilmbildung nach 120 h sowie eine reduzierte TM aufweist. Nachfolgend diente dieser *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stamm als Ausgangsstamm zur Konstruktion eines Stammes, welcher *lecB* QS-unabhängig, exprimiert und das LecB-Protein extrazellulär lokalisiert (3.2).

3.2 Konstruktion des *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienten Stammes

Die Ergebnisse aus 3.1 zeigten, dass mittels SDS-PAGE (Abb. 7 A) und indirektem immunologischen Nachweis via Western Blot (Abb. 7 B) kein bzw. mittels mELLA (Abb. 8 B) kein ausreichendes LecB im Überstand des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm detektiert werden konnte, obwohl per qPCR eindeutig die Expression des *lecB*-Gens nachgewiesen wurde (Abb. 8 A). Für weitergehende Analysen von extrazellulärem LecB wurde daher ein Stamm benötigt, welcher *lecB* in moderaten Mengen, entkoppelt vom QS-System, exprimiert und dieses im extrazellulären Medium lokalisiert. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das äußere Membran Porin OprF ein Interaktionspartner von LecB ist (Bartels 2009) und die Bindung von LecB an OprF reversibel durch Zugabe von L-Fukose gelöst werden kann (Funken *et al.*, 2012). In Abwesenheit von OprF ist LecB im extrazelluläre Medium lokalisiert (Bartels 2009). Um die extrazelluläre Menge an LecB mittels Hochdurchsatzverfahrens von zellfreien Kulturüberständen quantifizieren zu können, wurde daher ein *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienter Stamm konstruiert und dieser mit dem *plecB*-Expressionsvektor für die moderate Expression von *lecB* transformiert. Für die Konstruktion des *P. aeruginosa* $\Delta lecB \Delta oprF$ Stammes (2.13) wurden die stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Gensequenzen des *oprF*-Zielgens mittels PCR amplifiziert (2.10) und in den pSUP-202 Vektor, welcher in *P. aeruginosa* nicht repliziert werden kann, kloniert (Abb. 3). Zwischen den stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Gensequenzen wurde ein Ω -Gentamycin-Resistenzmarker (Gm^r), welcher eine Gm-Resistenz vermittelt, kloniert. Der erzeugte pSUP-UGD Vektor wurde in *E. coli* DH5 α repliziert, das Plasmid isoliert (2.5) und für die Transformation eines *lecB*-defizienten *P. aeruginosa* Stammes mittels Konjugation (2.12.2) mit dem *E. coli* S17.1/pSUP-UGD Stamm verwendet. Die erfolgreiche Übertragung des pSUP-UGD Vektors und die Selektion auf chromosomale Integration durch das erste Rekombinationsereignis erfolgte anhand des Wachstums von Zellen auf Gm_{30} -Selektionsplatten. Als Kontrollen wurden die Stämme *E. coli* S17.1 und *P. aeruginosa* PATI4 ($\Delta lecB$) verwendet. Dabei zeigte sich, dass lediglich der Akzeptorstamm mit pSUP-UGD Kolonien aufwies. Anschließend wurden einige hundert Kolonien auf das zweite Rekombinationsereignis überprüft, indem diese sowohl auf Gm_{30} - als auch Tet₅₀-Selektionsplatten überimpft wurden, da das Vektorrückgrat eine Tetrazyklin-Resistenzkassette aufweist. Die Kolonien, die auf Gm_{30} -, nicht aber auf Tet₅₀-Selektionsplatten anwuchsen, wurden in Flüssigkultur kultiviert und bei -80°C gelagert. Diese

Tet-sensitiven Stämme weisen das zweite Rekombinationsereignis auf und enthalten im Chromosom anstelle des *oprF*-Gens das *UGD*-Fragment (siehe Abb. 3 E; Kapitel 2.13).

Zur genotypischen Verifizierung der identifizierten *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienten Stämme wurde die chromosomale DNA isoliert (2.5) und die Gegenwart des *UGD*-Fragmentes anstelle des *oprF*-Gens mittels PCR (2.10) und anschließender analytischer Agarosegel-Elektrophorese (2.7) überprüft (Abb. 12 C).

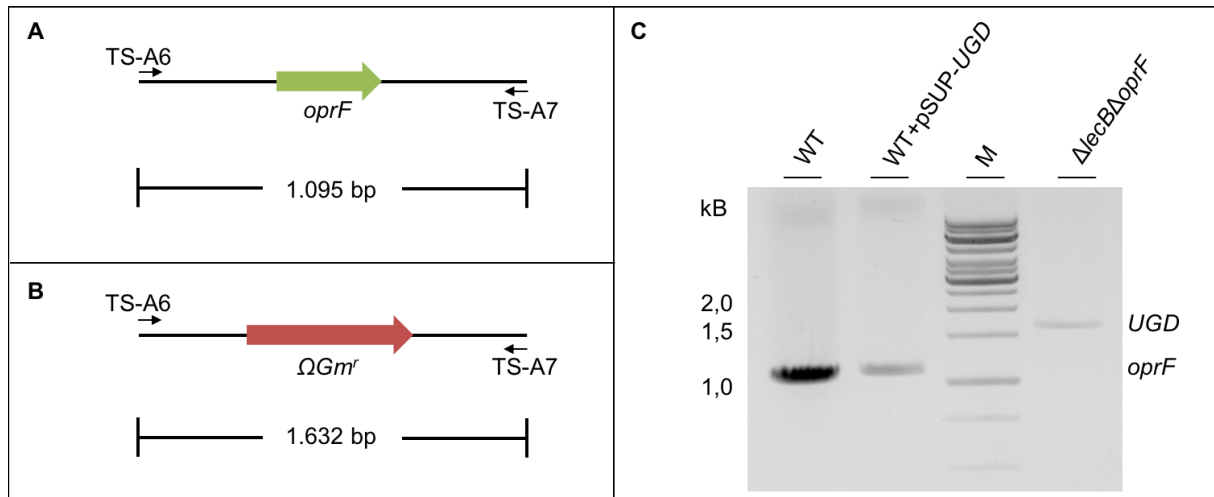


Abbildung 12 Der Nachweis der *oprF*-Deletion mittels PCR. Links: Schematische Darstellung der Oligonukleotid-Bindestellen (TS-A6 und TS-A7) sowie der Längenangabe der zu erwartenden PCR-Produkte (A: *oprF*-Gen; B: *UGD*-Fragment). (A) entspricht den *P. aeruginosa* PA01 Referenz- (WT), *lecB*- (PAT14), (B) dem *lecB*- und *oprF*-defizienten Stamm. Elektrophoretisch (2.7) aufgetrennte PCR Produkte (2.10) auf einem 1 %igen analytischen Agarosegel (C). Als Matrizen-DNA wurden 10 ng genomische DNA der einzelnen *P. aeruginosa* Stämme (WT = PA01 Referenzstamm, WT/pSUP-*UGD* und dem *lecB*- und *oprF*-defizienten Stamm) verwendet, welche aus ÜK Kulturen isoliert (2.5) wurde. Die Größe der jeweiligen Fragmente ist in kDa angegeben, bzw. durch Namensnennung (rechts) dargestellt. Als Größenstandard (M) wurde der 1 kDa GeneRuler™ (ThermoFisher Scientific, Darmstadt) verwendet.

In der genotypischen Analyse konnten im *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienten Stamm Fragmente bei der zu erwartenden Größe des *UGD*-Fragmentes von 1.600 bp (theoretische Fragmentlänge: 1.632 bp) detektiert werden. Der Referenzstamm weist Fragmente bei 1.100 bp auf. Dies entspricht der Fragmentlänge des *oprF*-Gens (theoretische Fragmentlänge: 1.095 bp). Die genotypische Analyse des *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienten Stammes belegt die Anwesenheit des *UGD*-Fragmentes im Chromosom anstelle des *oprF*-Gens. Der bestätigte *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defiziente Stamm wird nachfolgend als „PAT1“ bezeichnet. Um mögliche negative Einflüsse der *oprF*-Deletion auf das Zellwachstum zu überprüfen, wurde das Wachstum dieses Stammes mit dem der Referenzstämme, in der logarithmischen Wachstumsphase, verglichen (Abb. 13).

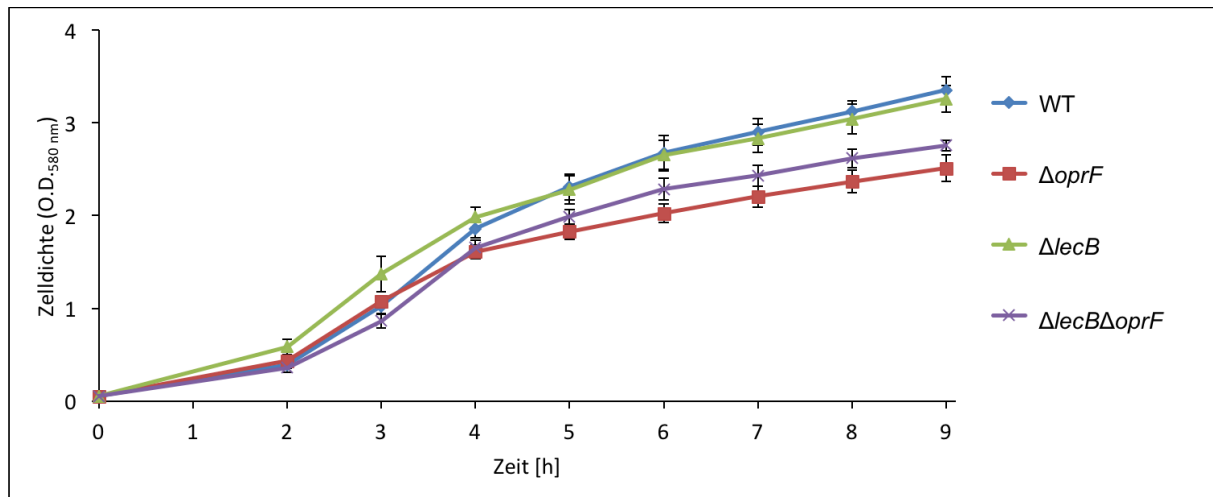


Abbildung 13 Der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm weist ein langsames Wachstum auf. Es wurden je Stamm drei biologische Replikate der *P. aeruginosa* Stämme (2.2) verwendet um je eine ÜK für die Wachstumsanalysen zu inokulieren. Diese wurden verwendet um eine Hauptkultur auf $O.D_{580\text{ nm}} = 0,05$ zu inokulieren (2.4) und das Wachstum mittels Messung der optischen Dichte bei 580 nm Wellenlänge zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert (LB-Medium, 150 μM , 37°C).

Die Wachstumsanalysen zeigten, dass der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm etwas langsamer als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm wächst und eine geringere Zelldichte erreicht. Im Detail weist der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm eine etwas höhere Gesamtzellzahl nach neun Stunden als ein *P. aeruginosa oprF*-defizienter Stamm auf, jedoch weniger Zellen als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm oder ein *P. aeruginosa lecB*-defizienter Stamm. Das Wachstum zwischen dem *P. aeruginosa oprF*-defizientem Stamm und dem *P. aeruginosa* PATS1 Stamm ist ähnlich und entspricht den Erwartungen.

Nach der genotypischen Bestätigung und Wachstumscharakterisierung des *P. aeruginosa* PATS1 Stammes wurde dieser verwendet, um die Lokalisierung von LecB im Überstand zu überprüfen. Dazu wurde zunächst dieser mit dem *plecB*-Expressionsvektor bzw. als Kontrolle mit dem pBBR1MCS1-Leervektor (pLV), transformiert. Anschließend wurden die Kulturen über Nacht bei 37°C in LB-Medium mit Cm_{300} inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die optische Dichte ($O.D_{580\text{ nm}}$) der Kulturen bestimmt und der zellfreie Kulturüberstand sowie die Gesamtzellextrakte per SDS-PAGE (2.18) und indirekten immunologischen Nachweis (2.19) analysiert (Abb. 14 A, B). Darüber hinaus wurde die extrazelluläre LecB-Menge im zellfreien Kulturüberstand quantifiziert (Abb. 14 C). Parallel wurde der *P. aeruginosa lecB*-defiziente PATI3 Stamm ebenfalls untersucht, um Hinweisen einer möglichen Co-Regulation von *lecA* und *lecB* nachzugehen (siehe Kapitel 3.9.1).

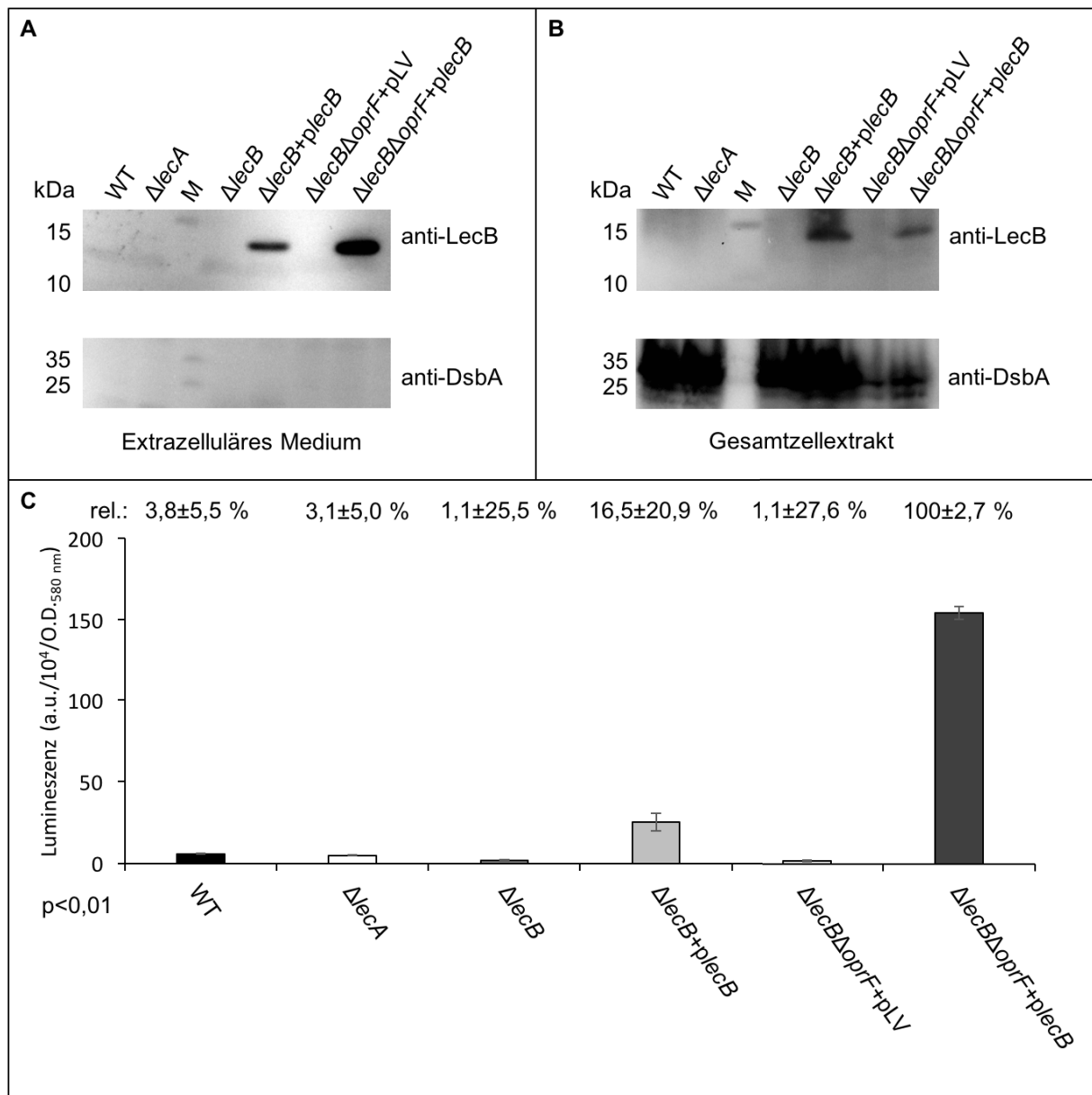


Abbildung 14 Die Lokalisierung von LecB in verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen. Es wurden HK der *P. aeruginosa* *lecA*-, *lecB*-, sowie der *lecB*- und *oprF*-defizienten Stämme, des PA01 Referenzstammes sowie die mit *plecB*-Expressionsvektor komplementierten Stämme ($\Delta lecB+plecB$; $\Delta lecB\Delta oprF+plecB$) für 24 Stunden in Deep-Well-Platten inkubiert (LB-Medium, 650 UpM, 37°C) und die Zellen mittels Zentrifugation (15 Min, 4.000 x g, RT) sedimentiert. Die Proteine der Kulturüberstände (**A**) und die Gesamtzellextrakte (**B**) wurden mittels SDS-PAGE (2.18; O.D._{580 nm} = 0,5) aufgetrennt und LecB (oben) bzw. als Kontrolle das periplasmatisch lokalisierte DsbA (unten) indirekt mittels immunologischen Nachweis (2.19), detektiert. (**C**) Das extrazelluläre LecB wurde mittels mELLA (2.16) quantifiziert (p<0,01, n=8). Oberhalb sind die relativen Mengen an extrazellulärem LecB in % bezogen auf den *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienten PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor (=100 %) dargestellt.

Der indirekte immunologische Nachweis des LecB-Proteins zeigte, dass LecB in den Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor und des *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor nachgewiesen werden konnte, nicht aber in den weiteren *P. aeruginosa* Stämmen: WT (PA01 Referenzstamm), $\Delta lecA$, $\Delta lecB$ und $\Delta lecB\Delta oprF$ mit pLV-Leervektor (Abb. 14 A). Zu erkennen ist zudem, dass im Vergleich zu *P. aeruginosa* *lecB*-defizientem Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor mehr

LecB, bezogen auf die Zelldichte (O.D._{580 nm}), im Überstand lokalisiert aufweist, während umgekehrt im Gesamtzellextrakt von *P. aeruginosa* *lecB*-defizientem Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor mehr LecB als der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor aufweist (Abb. 14 B). Die produzierten Mengen LecB der beiden Stämme sind absolut betrachtet ähnlich und entsprechen der Erwartung, da durch die Verwendung des gleichen Expressionsvektors (*plecB*) und Bedingungen von einer ähnlichen *lecB*-Expression auszugehen ist.

Eine quantitative Analyse des extrazellulären LecB in Kulturüberständen erfolgte mittels indirektem immunologischen Nachweises im mELLA (2.16). Dabei zeigte sich, dass der *P. aeruginosa* $\Delta lecA$, $\Delta lecB$, und der $\Delta lecB \Delta oprF$ Stamm ohne *plecB*-Expressionsvektor kein LecB im Überstand aufwies (Abb. 14 C). Der neu konstruierte *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor weist die 26-fache, bzw. der *P. aeruginosa* $\Delta lecB$ Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor die 4,3-fache Menge an extrazellulärem LecB im Vergleich zum Referenzstamm auf. Interessant ist der deutliche Einfluss von OprF als Interaktionspartner von LecB, die Deletion von *oprF* führt zu einer 6-fach erhöhten Menge extrazellulären LecB. Als Kontrolle zum Nachweis möglicher Zelllyse durch Deletion von *oprF*, welches ein häufig vorkommendes Protein der äußeren Membran darstellt (Hancock *et al.*, 1981), wurden parallel immunologische Nachweise gegen das periplasmatische DsbA-Protein (Urban *et al.*, 2001) angefertigt (Abb. 14 A und B, jeweils unten). Die indirekte immunologische Analyse bezüglich der DsbA-Präsenz zeigte, dass kein DsbA in den Überständen detektiert werden konnte, während das Lumineszenzsignal in den Gesamtzellextrakten gesättigt vorlag. Dies widerlegt eine mögliche Zelllyse als Grund für die Lokalisierung von LecB im Überstand.

Abschließend wurde die Fähigkeit der Biofilmbildung untersucht, dabei zeigten Quantifizierungen mittels XTT-Reduktionstest (2.26) keine Biofilme, welche jedoch im Erlenmeyerkolben deutlich sichtbar waren (Daten nicht gezeigt). Für die Quantifizierung wurde folglich die Kristallviolett-färbung (2.25) von Biofilmen in Zellkulturplatten, kultivierten Zellen, durchgeführt (Abb. 15).

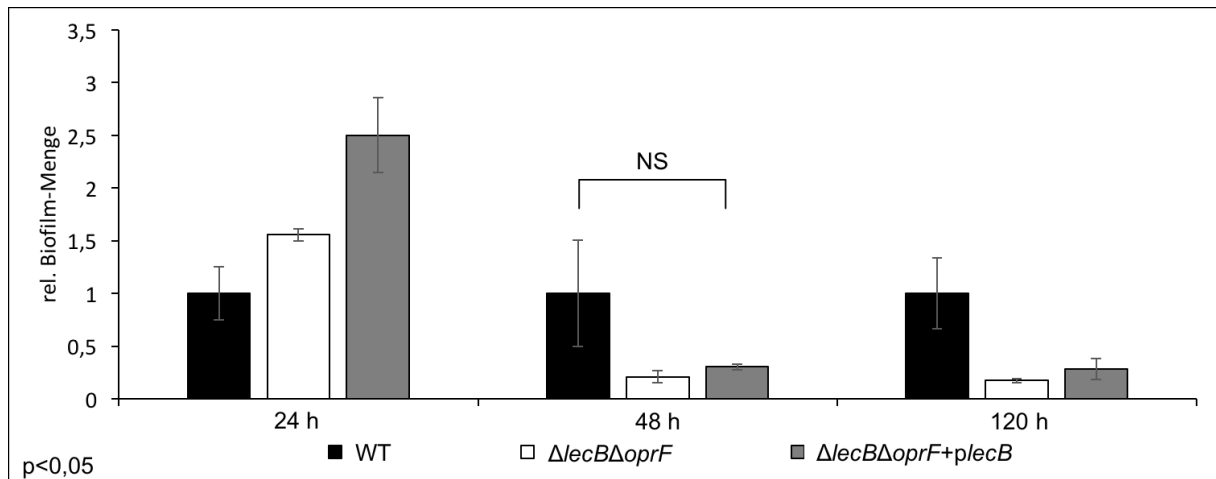


Abbildung 15 Die Deletion von *lecB* und *oprF* hat einen Einfluss auf die Biofilmbildung. Dazu wurden die *P. aeruginosa* Kulturen für die Biofilmbildung in 24-Well-Zellkulturplatten auf O.D._{580 nm} = 1,0 inokuliert und für 24, 48 oder 120 h kultiviert (400 μ L LB-Medium, 37°C). Die Quantifizierung der produzierten Biofilme erfolgte mittels Kristallviolett färbung der Biofilme (2.25). NS: Nicht signifikant, WT vs. $\Delta lecB \Delta oprF + plecB$.

Die Quantifizierung der Kristallviolett färbung der Biofilme (Abb. 15) zeigte, dass ein *P. aeruginosa* PATS1 Stamm nach 24 h, etwa 1,5-fach mehr Biofilm aufweist als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm. Nach 48 und 120 h weist dieser Stamm jedoch etwa 80 % weniger Biofilm als der Referenzstamm auf. Der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit vektorbasierter Expression von *lecB* mit dem *plecB*-Expressionsvektor hat nach 24 h 2,5-fach mehr Biofilm als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm und knapp 38 % mehr Biofilm als derselbe Stamm ohne *lecB*-Expression gezeigt (Abb. 15). Der direkte Vergleich der Biofilm-Mengen nach 120 h verdeutlicht, dass die vektorbasierte Expression von *lecB* im *P. aeruginosa* PATS1 Stamm zu einer etwa 39 % höhere Biofilm-Menge ($p < 0,05$) als im selben Stamm ohne *lecB*-Expression führt (Abb. 15). Dies bestätigt vorherige Studien, dass LecB an der Biofilmbildung beteiligt ist (Tielker *et al.*, 2005). Zusammenfassend konnte ein *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienter PATS1 Stamm konstruiert und verifiziert werden, welcher *lecB* QS-unabhängig vom *plecB*-Expressionsvektor exprimiert und LecB extrazellulär im Kulturüberstand lokalisiert. Ein negativer Einfluss auf die Fitness der Zellen bzw. die Sekretion von LecB durch die Deletion von *oprF* konnte nicht beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden das LecB, unter den getesteten Bedingungen, unabhängig von OprF einen Einfluss auf die frühe Biofilmbildung bis 24 h aufweist. Ferner ist festzuhalten, dass die Menge an Biofilm eines *P. aeruginosa* PATS1 Stammes unabhängig von der Expression von *lecB* über längere Zeiträume (48 bis 120 h) deutlich stärker als im Referenzstamm abnimmt. Es konnte außerdem bestätigt werden, dass das LecB-Protein nach Deletion von *oprF*, extrazellulär lokalisiert ist, d.h. der bislang unbekannte Sekretionsmechanismus von LecB scheint weiter funktionsfähig zu sein.

3.3 Expression und Reinigung von LecB

Für die Entwicklung eines Hochdurchsatzverfahrens (3.4) zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB wurde gereinigtes LecB aus *P. aeruginosa* sowie heterolog exprimiertes LecB von *P. aeruginosa* aus *E. coli* als Referenz benötigt. Dazu wurden die Stämme *E. coli* BL21 (DE3) bzw. *P. aeruginosa* PA01 mit dem Vektor *plecB* (Tielker *et al.*, 2005) verwendet. Dieser Vektor trägt das *lecB*-Gen unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Die verwendeten Stämme wurden unter Selektionsdruck (Cm^r) kultiviert und die Zellen nach 24 h mittels Zentrifugation sedimentiert. Zur Reinigung wurde die natürliche Affinität des LecB-Proteins zu D-Mannose ausgenutzt (Garber *et al.*, 1987), d.h. das LecB-Protein wurde aus dem Gesamtzellextrakt an die D-Mannose-Agarose-Säulenmatrix (Sigma, Deisenhofen) immobilisiert. Nach Entfernung der unspezifisch gebundenen Proteine durch verschiedene Waschschrte wurde das LecB-Protein mit 20 mM D-Mannose eluiert. Die Fraktionen der Reinigung des LecB-Proteins wurden anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 16).

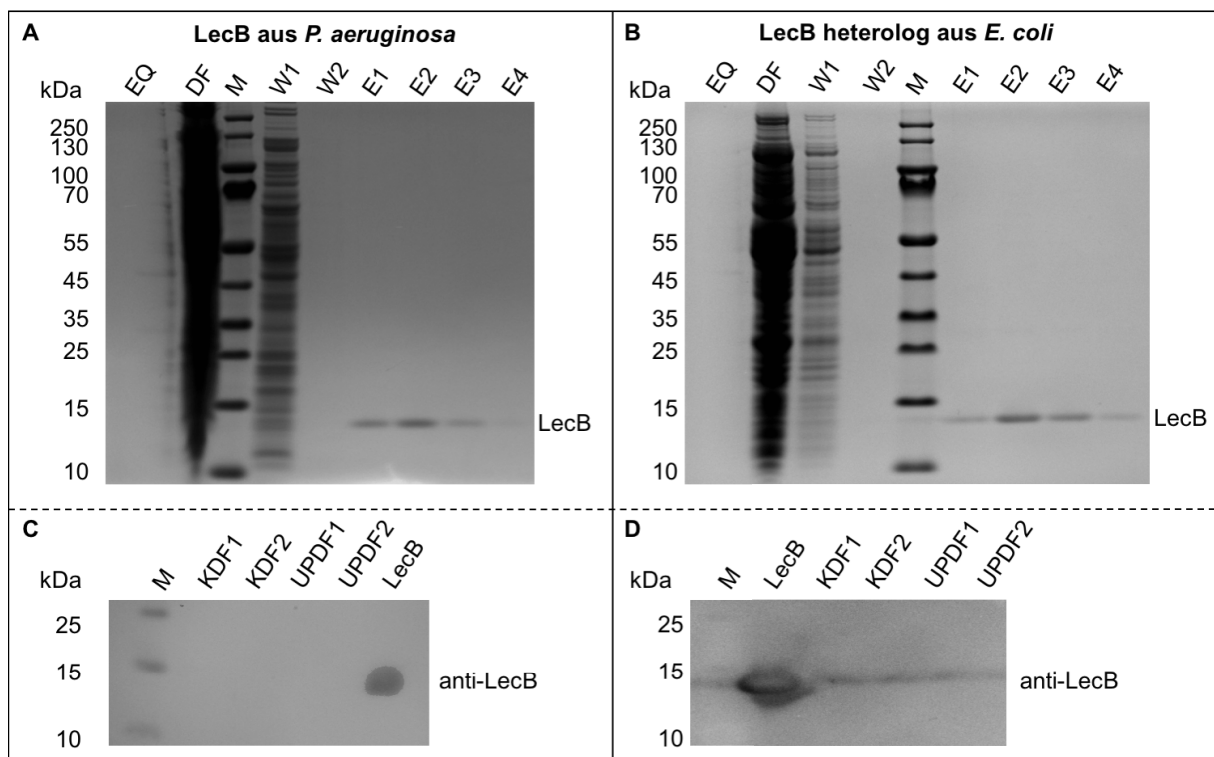


Abbildung 16 Die Reinigung und Identifizierung von LecB. Es wurden HK von *E. coli* BL21(DE3) und *P. aeruginosa* PA01 jeweils mit *plecB*-Expressionsvektor auf $\text{O.D.}_{580\text{ nm}} = 0,05$ inokuliert, für 24 h inkubiert (150 UpM; 37°C ; 450 mL (*E. coli*) bzw. 900 mL (*P. aeruginosa*) LB-Medium), sedimentiert und die Gesamtzellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Es folgte die Reinigung von LecB mittels D-Mannose-Agarosematrix (2.23). Jeweils 10 μL der einzelnen Fraktionen (EQ: Equilibrierung; DF: Durchfluss; M: Größenstandard; W1-2; Waschschrte 1-2; E1-4: Elutionsfraktionen 1-4) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.18).

Nach der Konzentrierung und Umpufferung von LecB wurden die Fraktionen (KDF1-2: Durchflüsse der Konzentrierung; UPDF1-2: Umpufferung) sowie das gereinigte LecB (LecB) mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.18). Anschließend wurde mittels indirektem immunologischen Nachweis (2.19) *P. aeruginosa* LecB (C) bzw. in *E. coli* heterolog exprimiertes LecB von *P. aeruginosa* (D) detektiert.

Die SDS-PAGE der Proteinreinigungen zeigten, dass sowohl in *P. aeruginosa* PA01 (Abb. 16 A) als auch *E. coli* BL21(DE3)/*plecB* (Abb. 16 B) Proteine bei etwa 14 kDa in den Elutionsfraktionen (E1-4) beobachtet werden konnten. Dies entspricht der Größe von LecB in SDS-Gelen (im Gel: etwa 14 kDa, theoretisches Molekulargewicht: 11,73 kDa). Diese Elutionsfraktionen wurden vereint, konzentriert und die verwendete D-Mannose mittels Umpufferung entfernt (Abb. 16 C, D). Dabei wurde gezeigt, dass LecB sowohl aus *P. aeruginosa* PA01/*plecB* (Abb. 16 C) als auch *E. coli* BL21(DE3)/*plecB* (Abb. 16 D) erfolgreich gereinigt werden konnten. Die Ausbeute an eluierten LecB wurde mittels Bradford (2.17) ermittelt und liegt zwischen 12 mg/L (*P. aeruginosa* PA01/*plecB*) und 194 mg/L (*E. coli* BL21(DE3)/*plecB*).

3.4 Entwicklung, Etablierung und Durchführung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB

3.4.1 Fluoreszenz-basierte Quantifizierung von LecB mittels *Lumio-Tag*[™]

Zur Quantifizierung von LecB mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher an ein an LecB fusioniertes Hexapeptid (*Lumio-Tag*[™]) bindet, wurde der Vektor *plecB-L* (Funken, H., unveröffentlicht) konstruiert. Dieser Vektor enthält die Gensequenz für die C-C-P-G-C-C Peptidabfolge des *Lumio-Tags*[™] und ist N-terminal vor das *lecB*-Gen kloniert. Das exprimierte Fusionsprotein kann nach Zugabe eines Farbstoffes (FIAsH) der durch die vier Cysteine des *Lumio-Tags*[™] gebunden wird, durch ein Fluoreszenzsignal, nach Anregung detektiert werden (Griffin *et al.*, 1998).

Erste fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines *P. aeruginosa lecB*-defizienten Stammes mit diesem Vektor zeigten, dass einige der Zellen nach Anregung (508 nm) ein Fluoreszenzsignal (528 nm) emittieren (Daten nicht gezeigt, Funken, H., unveröffentlicht). Anhand dieser Daten wurde der Vektor für die Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens im Mikrotiterplatten-Format ausgewählt. Dazu wurde der *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stamm mit dem Vektor sowie den *plecB*- und pLV- Kontrollen transformiert. Wachstumsanalysen dieser Stämme nach 24 h zeigten, dass die Stämme mit dem *plecB*-Expressionsvektor keinen Einfluss auf die Zelldichte aufweisen (Abb. 17 A).

Weiterhin haben erste Pilotexperimente mit dem FIAsh Farbstoff zum Ergebnis gehabt, dass ein *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB-L* Expressionsvektor kein verändertes Fluoreszenzsignal, im Vergleich zum gleichen Stamm mit pLV- bzw. *plecB*-Expressionsvektor, aufweist (Daten nicht gezeigt). Ein daraufhin durchgeführter Galaktose-basierter mELLA (Abb. 17 B) offenbarte, dass der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor 3,4-fach mehr LecB im extrazellulären Medium aufweist, als der gleiche Vektor mit N-terminaler Lumio-Tag™-Fusion (*plecB-L*). Im *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit dem Leervektor (pLV = pBBR1MCS1) konnte kein LecB detektiert werden.

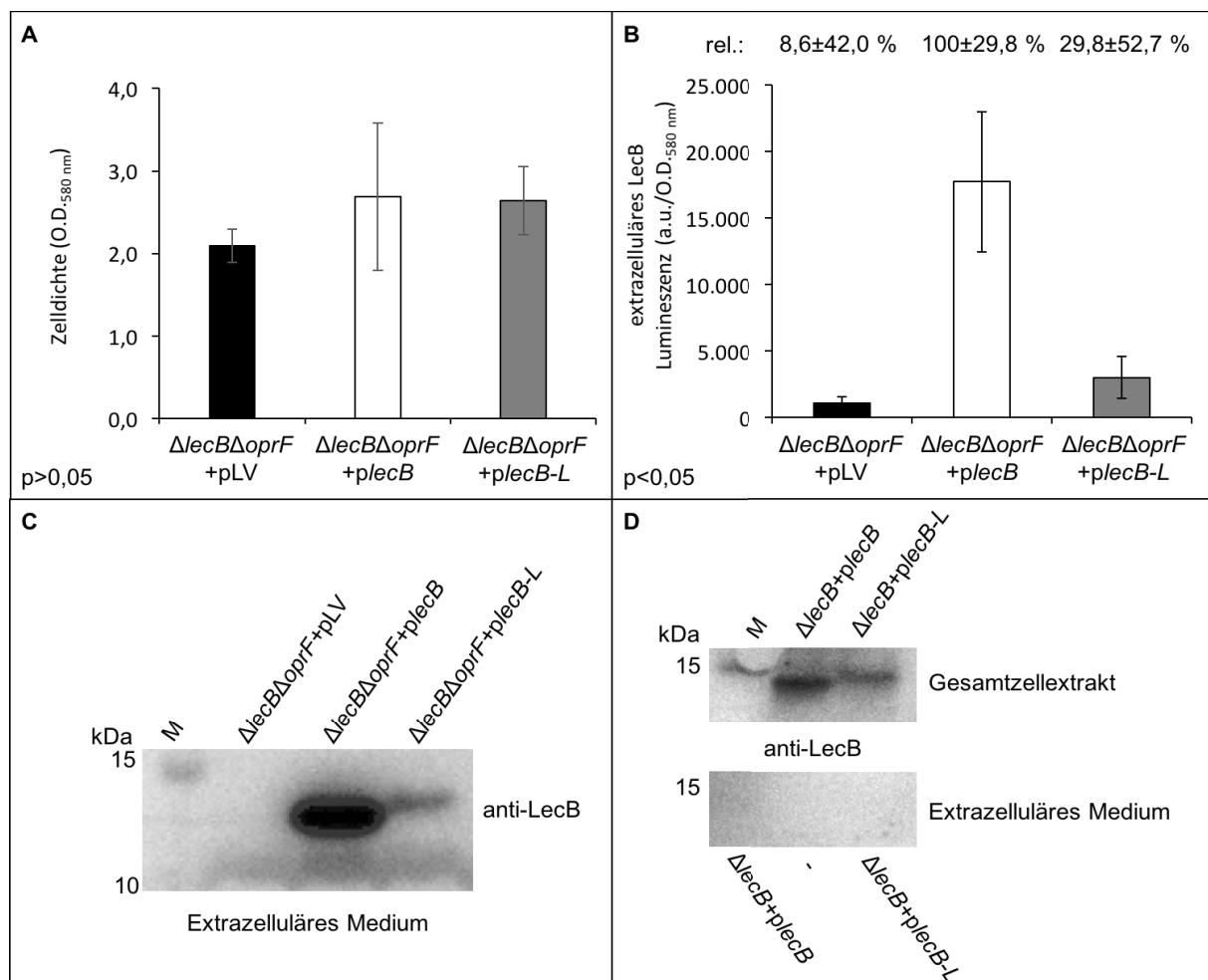


Abbildung 17 Der Einfluss des Lumio-Tags™ auf die Zelldichte, Lokalisierung und Menge von LecB. **(A)** Messung der Zelldichte nach 24 h Kultivierung. Dazu wurden HK aus einer ÜK der *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stämme mit dem Referenzvektor ohne *lecB* (pLV), dem *plecB*-Expressionsvektor und dem *plecB-L*-Expressionsvektor, welcher eine *lecB-L*-Fusion enthält auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und für 24 h bei 37°C inkubiert (LB-Medium, 150 UpM). Die Messung der Zelldichte erfolgte photometrisch bei O.D._{580 nm} ($p > 0,05$). **(B)** Die Kulturen wurden zentrifugiert und der Kulturüberstand (extrazelluläres Medium) für den Galaktose-basierten mELLA (2.16) verwendet ($p < 0,05$, $n = 8$). **(C)** Die gleichen Überstände wie in B wurden für den indirekten immunologischen Nachweis von LecB verwendet (2.19). **(D)** Indirekter immunologischer Nachweis der Lokalisierung von LecB bzw. LecB-L im *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm. Dazu wurden HK aus einer ÜK der *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stämme mit dem *plecB*-Expressionsvektor und dem *plecB-L*-Expressionsvektor, welcher eine *lecB-L*-Fusion enthält auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und für 24 h bei 37°C inkubiert (LB-Medium, 150 UpM). Das Gesamtzellextrakt wurde mit SDS-Probenauftragspuffer auf eine Endkonzentration von O.D._{580 nm} = 0,5 für den indirekten immunologischen Nachweis von LecB eingestellt, während das extrazelluläre Medium unverdünnt eingesetzt wurde.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde ein indirekter immunologischer Nachweis von LecB in extrazellulären Medien der zuvor getesteten *P. aeruginosa* PATS1 Stämme durchgeführt (Abb. 17 C). Diese bestätigen den Galaktose-basierten mELLA (Abb. 17 B). Im *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit Leervektor (pLV) konnte kein LecB detektiert werden, im *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB-L*-Expressionsvektor geringe Mengen. Im Gegensatz dazu wurden Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor deutliche Mengen LecB detektiert. Dies legt nahe, dass der N-terminale *Lumio-Tag*[™] einen negativen Einfluss auf die Sekretion von LecB hat.

Um auszuschließen, dass dieser Einfluss nicht auf den *Lumio-Tag*[™] zurückzuführen ist, sondern auf der Deletion von *oprF* basiert, wurde ein weiterer indirekter immunologischer Nachweis im *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm mit *plecB*- bzw. *plecB-L*-Expressionsvektor durchgeführt (Abb. 17 D). Im extrazellulären Medium konnte weder im *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm mit *plecB*- bzw. *plecB-L*-Expressionsvektor LecB detektiert werden, wohingegen LecB in beiden Stämmen im Gesamtzellextrakt detektiert wurde. Es zeigte sich, dass im *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor mehr LecB vorliegt, als im Stamm mit *plecB-L*-Expressionsvektor. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die N-terminale Fusion des *Lumio-Tags*[™] an *lecB* einen Einfluss auf *lecB* bzw. LecB hat und sich dieses Verfahren deshalb nicht für weitergehende Analysen zur Aufklärung der Sekretion mittels Hochdurchsatzverfahrens und randomisierter Mutagenese des Genoms eignet.

3.4.2 Entwicklung eines Lumineszenz-basierten Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB

Der *Enzyme-Linked Lectin Assay* (ELLA; 2.16) basiert auf dem ELISA-Verfahren und wird für die Quantifizierung von Lektin-haltigen Proben verwendet (de Bentzmann *et al.*, 2014). Für die Quantifizierung von extrazellulärem LecB bedarf es einem sensitiven und auf das LecB-Protein optimierten Hochdurchsatzverfahrens. In dieser Arbeit wurde daher der ELLA auf LecB adaptiert und der sogenannte *modified Enzyme-Linked Lectin Assay* (mELLA) für die Quantifizierung von extrazellulärem *P. aeruginosa* LecB entwickelt. Zunächst wurde das Biotin/Streptavidin-basierte Nachweisverfahren des ELLA durch einen indirekten immunologischen Nachweis mit spezifischen Antisera ersetzt. Dabei zeigten erste Ergebnisse, dass LecB detektiert und semi-quantifiziert werden kann. Allerdings war der quantifizierbare Konzentrationsbereich für weitergehende Analysen zu schmal (Daten nicht gezeigt). Zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität des optimierten ELLA wurde der initiale Immobilisierungsschritt des Lektins betrachtet. Im ELLA wird als Standard-Zucker für die Immobilisierung des Lektins D-Galaktose verwendet, frühere Studien legen jedoch dar, dass *P. aeruginosa* LecB für D-Mannose ($K_A 3,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$) bzw. L-Fukose ($K_A 1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) eine höhere Bindeaffinität im Vergleich zu Galaktose aufweist (Garber *et al.*, 1987). Folglich wurde der optimierte ELLA zur Etablierung vergleichend mit Fukose, Galaktose und Mannose durchgeführt (Abb. 18).

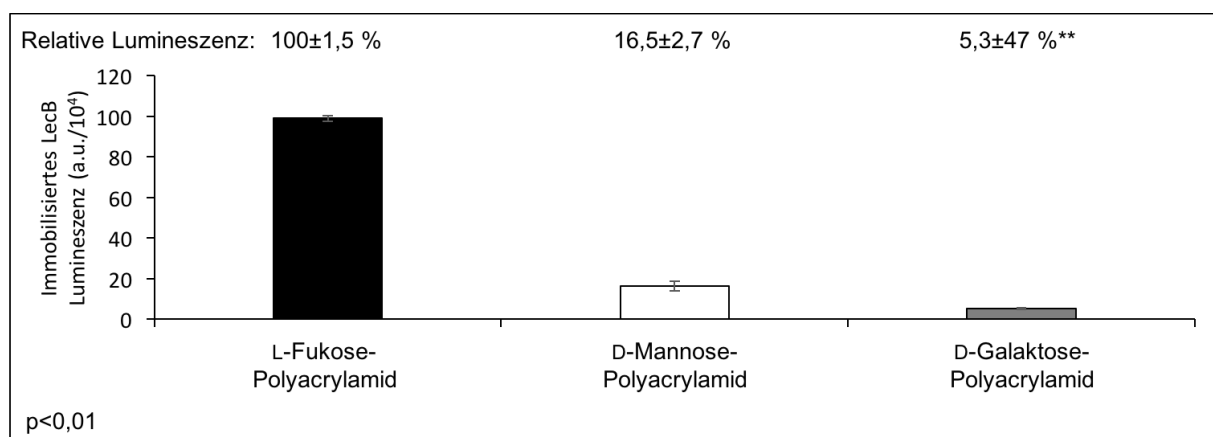


Abbildung 18 Der Einfluss verschiedener Zucker-PAA-Konjugate auf die Immobilisierung von LecB. Die Durchführung erfolgte gemäß (2.16). Zur Immobilisierung von gereinigtem LecB-Protein (1 ng/Well) wurde α -L-Fukose-, β -D-Galaktose- und α -D-Mannose-Polyacrylamid verwendet. Die Lumineszenzmessung von drei Messplatten mit je vier Proben à 1 ng gereinigtes LecB pro Well. Die relative Lumineszenz, normiert auf den höchsten Wert als 100 % zeigt, dass Fukose- (100±1,5 %) das höchste relative Lumineszenzsignal aufweist, während Galaktose- (5,3±47 %**) und Mannose-PAA (16,5±2,7 %) folgen. ** gibt an, dass die Messwerte innerhalb der drei verwendeten Messwerte stark abweichen und bei einer Platte keine Daten erfasst werden konnten, weshalb hier n=8 statt 12 ist.

Die Quantifizierung von immobilisiertem LecB zeigte, dass durch den L-Fukose-PAA-basierten mELLA deutlich mehr LecB immobilisiert werden konnte, als durch die Verwendung von D-Mannose-PAA (-83,5 %) oder D-Galaktose-PAA (-97 %). Daraus resultiert, dass der Austausch des initialen Zuckers zur Immobilisierung des Lektins LecB; L-Fukose-PAA anstelle von D-Galaktose-PAA, eine Sensitivitätssteigerung um Faktor 18,9 ermöglichte. Neben dieser Steigerung der Sensitivität konnten in weiteren Experimenten zwei limitierende Faktoren für die (m)ELLA-basierten Quantifizierung ermittelt werden. Der erste Faktor ist die Alterung vom Zucker-PAA-Konjugates. Die in Puffer gelöste α -L-Fukose-PAA, welche eine Woche bei 4°C gelagert wurde, immobilisiert 5,4 % weniger LecB, wie mittels Lumineszenzmessung ermittelt werden konnte. Zudem steigt unter diesen Bedingungen die Standardabweichung von 1,5 auf 19,5 % an. Dieses Phänomen des „alternden“ Zucker-PAA-Konjugates konnte mehrfach beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zudem konnte beobachtet werden, dass die Qualität der Lektinpräparation den Assay signifikant beeinflusst. Durch Varianz in der Zahl und Qualität der Dialyse-Schritte zur Reinigung des Lektins, vom zur Elution verwendeten Zuckers sowie des Alters des gereinigten Lektins, variiert die Fähigkeit der Immobilisierung an den zur Verfügung gestellten Zuckern im mELLA. Ein nicht ausreichend dialysiertes Lektin enthält noch zahlreiche Zucker (D-Mannose). Daraus resultiert, dass jede (m)ELLA-Quantifizierung eine interne Kalibrierung des Lektins benötigt und eine Kalibriergerade einer Konzentrationsreihe nur individuell für das jeweilige Experiment verwendbar ist. Werden diese beiden Faktoren beachtet, ist eine reproduzierbare Quantifizierung von extrazellulärem oder gereinigtem Lektin möglich.

Für nachfolgende Experimente wurde, basierend auf den beschriebenen Ergebnissen, ausschließlich L-Fukose-PAA als Immobilisierungszucker verwendet und der modifizierte ELLA nachfolgend als mELLA bezeichnet. Für die Eingrenzung des Konzentrationsbereiches, in dem LecB innerhalb des mELLA quantifiziert werden kann, wurde der mELLA mit verschiedenen LecB Konzentrationen in dreifach-Bestimmung durchgeführt (Abb. 19).

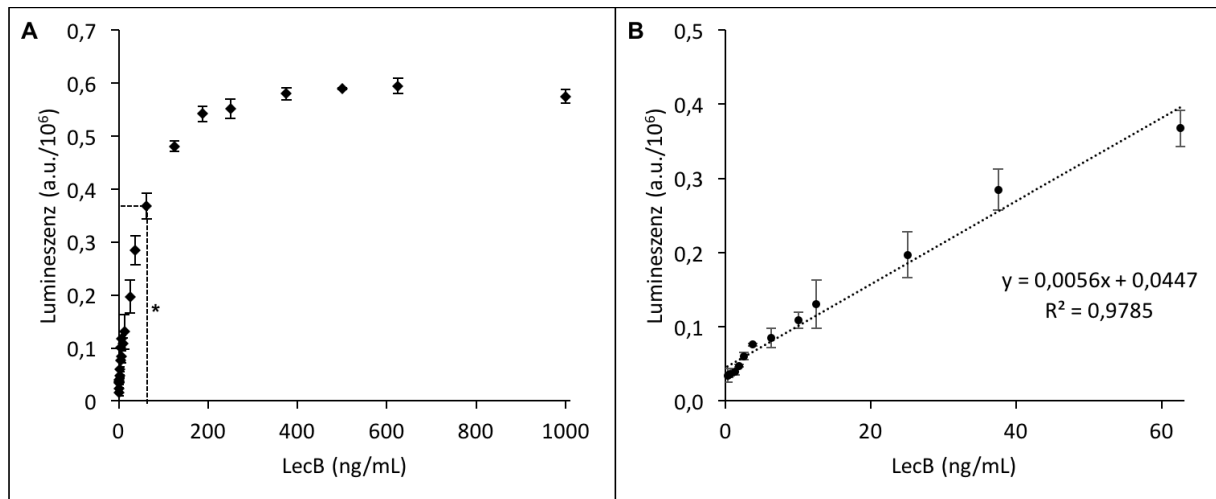


Abbildung 19 Der mELLA ist zur Quantifizierung von LecB geeignet. (A) Ermittlung des quantifizierbaren Konzentrationsbereichs in ng/mL gereinigtem LecB mittels mELLA (n=3). Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von gereinigtem LecB-Protein von <0,1 bis 1.000 ng/mL in 100 mM Tris/HCl, pH 8.0 angesetzt und im Fukose-basierten mELLA untersucht. Nach Identifizierung des Sättigungsbereiches wurde der lineare Bereich (*), in der die Konzentration und Lumineszenz korrelieren, ermittelt **(B)**. Dieser Bereich konnte zwischen 0,25 und 62,5 ng/mL LecB quantifiziert werden (n=3).

Dabei zeigte sich, dass eine Sättigungskurve der Lumineszenz mit LecB ab etwa 100 ng/mL beobachtet werden kann (Abb. 19 A). Durch Wiederholung des Experimentes mit geringer konzentrierten LecB-Proben konnte der lineare Bereich des Fukose-basierten mELLA, von 0,25-62,5 ng/mL LecB und einer Linearität ($R^2 = 0,98$) ermittelt werden (Abb. 19 B). Innerhalb dieses Konzentrationsbereiches kann der mELLA als Hochdurchsatzverfahren zur Quantifizierung von gereinigtem LecB genutzt werden.

Zur Überprüfung, ob dieses Verfahren in extrazellulären Kulturüberständen anwendbar ist, wurde eine absolute sowie eine relative Quantifizierung von LecB des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes (WT) sowie dem *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stammes mit *plecB*-Expressionsvektor unter Hochdurchsatzverfahren-typischen Bedingungen (Mikrokultivierung in Deep-Well-Platten) durchgeführt (Abb. 20).

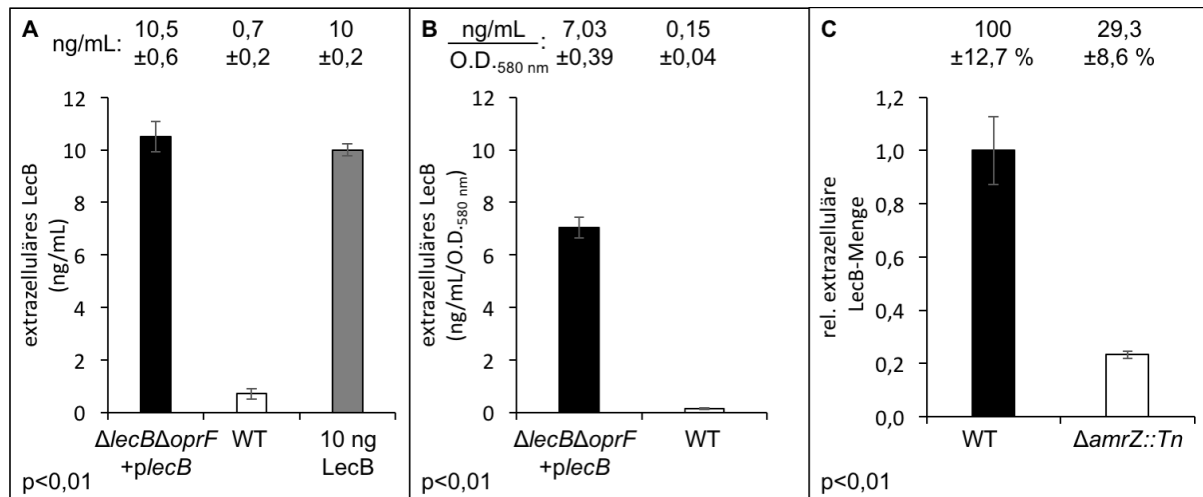


Abbildung 20 Der mELLA ist zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB verschiedener *P. aeruginosa* Kulturen geeignet. Dazu wurde der *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor, der *amrZ*-defiziente und der PA01 Referenzstamm für 24 h in 96-Deep-Well-Platten kultiviert (750 μ L LB-Medium, 650 UpM, 37°C). Anschließend wurde die Zelldichte der Kulturen bestimmt (O.D._{580 nm}: 4,9 $\pm$ 0,67 (PA01); 1,5 $\pm$ 0,08 ($\Delta lecB \Delta oprF$ +*plecB*)) die Zellen mittels Zentrifugation (15 min, 4.000 x g, RT) sedimentiert und die Überstände (100 μ L) für den mELLA verwendet. **(A)** Absolute Quantifizierung von extrazellulärem LecB mittels mELLA (LecB in ng/mL, n=24, p<0,01). **(B)** Relative Quantifizierung von LecB bezogen auf die Zelldichte (O.D._{580 nm} mittels mELLA (n=24 p<0,01). **(C)** Relative Quantifizierung von extrazellulärem LecB des PA01-Referenzstammes (WT = 1) sowie der *amrZ*-defizienten Transposonmutante ($\Delta amrZ::Tn$) (n=8). Dazu wurden Hauptkulturen aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und bei 37°C inkubiert (LB-Medium, 150 UpM). Nach 24 h wurde die O.D._{580 nm} ermittelt, die Zellen mittels Zentrifugation (15 min, 4.000 x g, RT) sedimentiert und die extrazellulären Medien für die LecB-Quantifizierung mittels mELLA (2.16) verwendet.

Die Quantifizierung des extrazellulären Mediums nach 24 h zeigte, dass der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor 10,5 ng/mL, bzw. der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm 0,7 ng/mL LecB aufweist (Abb. 20 A). Diese Werte der absoluten Quantifizierung befinden sich innerhalb des linearen Messbereiches von 0,25-62,5 ng/mL LecB (siehe Abb. 19 B). Der mELLA ist somit als Hochdurchsatzverfahren zur Quantifizierung von LecB in extrazellulären Kulturüberständen im verwendeten Expressionssystem nutzbar.

Auf die Zelldichte der eingesetzten Kulturen bezogen weist der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor (LecB: 7,03 ng/mL/O.D._{580 nm}) die 47-fache LecB-Menge gegenüber dem Referenzstamm (LecB: 0,15 ng/mL/O.D._{580 nm}) auf. Dies ermöglicht eine sensitive Quantifizierung von Unterschieden in der Sekretion von LecB, zum Beispiel von Transposonmutanten (3.5). Interessanterweise erreichte der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm unter diesen Bedingungen eine geringere Zelldichte. Der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm wies wiederum im Vergleich zum Wachstum im Erlenmeyer-Kolben (2,8 $\pm$ 0,12, siehe 3.1)) eine höhere Zelldichte in der Deep-Well-Platte (O.D._{580 nm}: 4,9 $\pm$ 0,67) auf.

Um zu überprüfen, ob der mELLA neben der Quantifizierung des optimierten Expressionssystems für Regulationsstudien geeignet ist, wurde der aus der Literatur

bekannte, globale Regulator AmrZ (*alginate and motility regulator Z*), welcher an der positiven Regulation der Transkription von *lecB* beteiligt ist (Xu & Wozniak 2015) untersucht. Dazu wurde der Kulturüberstand eines *P. aeruginosa* *amrZ*-defizienter Stammes (*amrZ::Tn5*) mittels des mELLA untersucht. Die Quantifizierung zeigte, dass die Deletion von *amrZ* im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm zu einer 70 % reduzierten Menge an extrazellulären LecB führt (Abb. 20 C). Dies bestätigt die vorherige Studie von Xu und Kollegen (Xu & Wozniak 2015). Die erfolgreiche Quantifizierung eröffnet die Möglichkeit neben dem konstruierten Expressionssystem (*P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta\textit{lecB}\Delta\textit{oprF}$) Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor) verschiedene Regulationsmechanismen in Bezug auf die LecB-Sekretion mit Hilfe des mELLA zu untersuchen, sofern sich die LecB-Menge innerhalb des linearen Messbereiches befindet. Im Fall des $\Delta\textit{amrZ}$ Stammes befand sich dieser an der unteren Grenze des linearen Messbereiches des mELLA. Unterhalb des linearen Messbereiches konnte ein Hintergrund-Signal der Lumineszenz sowohl in gering konzentrierten LecB-Lösungen als auch in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stämmen mittels mELLA detektiert werden (Abb. 8 B, 29 B).

3.5 Erzeugung der Transposon-Bibliothek

Da die Sekretion des *P. aeruginosa* Lektins LecB bisher nicht aufgeklärt ist, wurde mit einem Hochdurchsatzverfahren nach Gene gesucht, welche an der Sekretion von LecB beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde eine Tn5-Transposonmutagenese-Bibliothek von *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta\text{lecB}\Delta\text{oprF}$) Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor erzeugt. Dazu wurden der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm, welcher den *plecB*-Expressionsvektor trägt, mit dem Mutagenesevektor (3.5.1) bzw. den *in vitro* Transposon-Transposase-Komplexen (3.5.2), transformiert. Das hier verwendete Tn5-Transposon integriert zufällig und ungerichtet in das Genom des Wirtes und trägt zudem eine Tetrazyklin-Resistenzkassette, die eine Selektion auf Mutanten, die das Transposon tragen, ermöglicht (Abb. 21 A). Die Integration des Transposons in ein Gen führt in den meisten Fällen zu einer negativen Beeinflussung der Expression des betroffenen Genes (Abb. 21 B1-3).

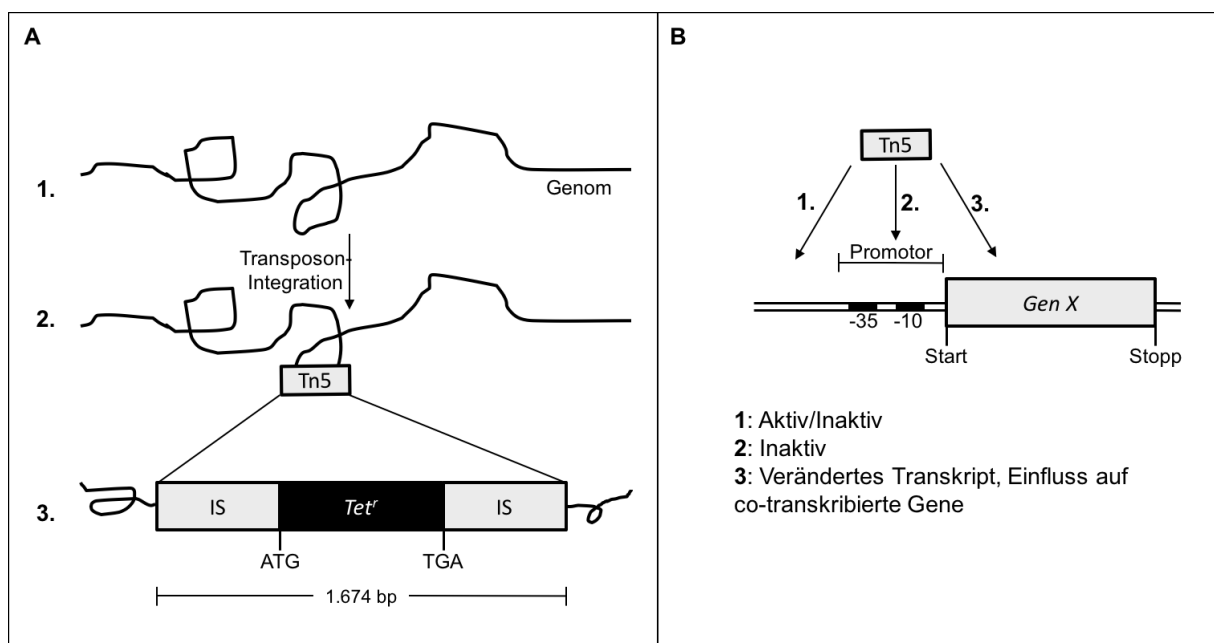


Abbildung 21 Die Transposition des Transposons ins Genom und die Auswirkung auf die Gen-Expression. (A) In das Genom des Wirtes (A1) integriert das Transposon zufällig und ungerichtet (A2). Das Transposon (A3) trägt invertierte Sequenzen (IS) an beiden Enden sowie eine Resistenzkassette für Tetrazyklin (*Tet^r*), Start- (ATG) und Stopp-Sequenzen (TGA). Die Integration des Transposons im Genom, verursacht mögliche Einflüsse auf die Gen-Expression von durch das Transposon betroffener Gene **(B)**. Die Integration stromaufwärts eines Gens kann zur Aktivierung oder Inaktivierung der Expression führen (B1). Die Integration in die Promotorregion führt meist zu einer Inhibierung der Gen-Expression (B2), während die Integration innerhalb des Gens zu einem veränderten Transkript führt, welches einen Einfluss auf die Funktionalität, Stabilität oder Lokalisierung des Proteins, bzw. einen Einfluss auf nachfolgend (co-)transkribierte Gene aufweist (B3).

3.5.1 Erzeugung der Transposon-Bibliothek mittels Mutagenesevektor

Zunächst wurde versucht eine Transposon-Bibliothek mithilfe eines Mutagenesevektors (pUTminiTn5-*luxCDABE*) im *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta\text{lecB}\Delta\text{oprF}$) Stamm zu erzeugen (Winson

et al., 1998; Lewenza *et al.*, 2005). Dazu wurde dieser Vektor in die *E. coli* S17.1 λ pir übertragen. Dieser Stamm ist in der Lage, das verwendete Plasmid zu replizieren. Der Vektor besitzt jedoch keinen funktionalen *origin of replication* für die Replikation in *P. aeruginosa*. Allerdings beinhaltet dieser Vektor ein Tn5-Transposon, welches eine Tetrazyklin-Resistenz- und eine *luxCDABE*-Kassette beinhaltet. Dies vermittelt dem Wirt nach Integration des Transposons eine Tetrazyklin-Resistenz (*Tet^r*), auf die selektiert wurde. Darüber hinaus ermöglicht die Integration eines promotorlosen *luxCDABE*-Operons, die Erzeugung eines Lumineszenz-Signals, falls das Transposon hinter einen aktiven Promotor integriert. Auf den Selektionsagarplatten (LB-Festmedium mit Cm₃₀₀, Tet₅₀, Irg₂₅) konnten nach Konjugation $6,1 \times 10^4$ CFU erzeugt werden, jedoch wies keine dieser Kolonien ein solches Lumineszenz-Signal auf. Zu erwarten wäre, basierend auf Ergebnissen vorangegangener Studien, dass etwa 7 % der Kolonien nach Integration mit transkriptionell aktiver *luxCDABE*-Fusion ein Lumineszenz-Signal aufweisen (Lewenza *et al.*, 2005). Von den $6,1 \times 10^4$ Kolonien der Transposon-Bibliothek wurden zufällig 1.728 Kolonien ausgewählt und in Flüssigmedium (LB-Medium mit Cm₃₀₀, Tet₅₀, Irg₂₅) kultiviert. Dabei zeigte sich, dass lediglich 359 Mutanten (20,78 %) in einer ersten Kultivierungsrunde anwuchsen. In einer zweiten Runde für die Erzeugung von Gefrierkulturen reduzierte sich die Zahl der kultivierbaren Mutanten von 359 auf 329 (-9,1 %). Folglich ist davon auszugehen, dass nicht alle der 1.728 „Transposonmutanten“ tatsächlich das Transposon tragen. Möglicherweise war die Tetrazyklin-Konzentration zu gering gewählt und das Antibiotikum über den MexXY-Exportmechanismus an der Wirkung verhindert (Morita *et al.*, 2014). Zudem weist der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm eine erhöhte Biofilmbildung durch die Deletion von *oprF* und die damit verbundene erhöhte Synthese des Pel-Exopolysaccharides (Bouffartigues *et al.*, 2015) auf, wodurch zum einen die Durchmischung des Donor- und Akzeptorstammes bei der Konjugation erschwert wird und zum anderen der Zugang der Antibiotika eingeschränkt sein könnte. Um dies in erneuten Versuchen auszuschließen, bzw. die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, wurde die Antibiotika-Konzentration erhöht (Tet₁₀₀). Allerdings stellte sich dabei heraus, dass weder Kolonien mit Lumineszenz-Signal noch eine ausreichende Menge an Transposonmutante, lediglich wenige hundert Kolonien, mit dieser Methode erzeugt werden konnten. Vergleichende Analysen mit dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm verdeutlichen, dass dieser eine signifikant erhöhte Anzahl an Transposonmutanten aufweist und zahlreiche Kolonien mit heterogener Lumineszenz beobachtet werden können (Daten

nicht gezeigt). Die heterogene Lumineszenz basiert auf der unterschiedlichen Expression der durch das Transposon betroffenen Gene. Ferner wurde bei der Konstruktion der Transposon-Bibliothek mittels Konjugation beobachtet, dass ein *P. aeruginosa* PATS1 Stamm eingeschränkt in der Konjugationsfähigkeit und temperatursensitiv gegenüber Temperaturen über 42°C ist (Daten nicht gezeigt). Diese Effekte basieren vermutlich auf der Umstrukturierung der äußeren Membran bei Abwesenheit von *oprF* (Woodruff & Hancock 1989). Dies hat allerdings keinen Einfluss auf die Sekretion von LecB wie immunologische Untersuchungen zeigten (Abb. 31 A, B und 33). Eine reproduzierbare Transposon-Bibliothek konnte auf diese Weise nicht erzeugt werden.

3.5.2 Erzeugung und Validierung der EZ-Tn5™-Transposon-Bibliothek

Da die Konstruktion einer Transposon-Bibliothek mittels Konjugation im *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stamm nicht funktionierte, wurde ein alternativer Ansatz gewählt. Dazu wurde im *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor eine EZ-Tn5™-Transposon-Bibliothek erzeugt, indem mittels Transformation der Zellen mit dem *in vitro* EZ-Tn5™<Tet> der Transposon-Transposase-Komplex (EpiCentre, Madison WI, USA) durch Elektroporation (2.12.3) eingebracht wurde und das Transposon ungerichtet in das Genom transloziert. Die erzeugte Transposon-Bibliothek wurde auf Selektionsmedien kultiviert (LB-Festmedium mit Cm₃₀₀ und Tet₅₀). Dadurch konnten ausschließlich *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stämme wachsen, die sowohl den *lecB*-Expressionsvektor (Resistenz für Cm₃₀₀) als auch das Tn5-Transposon (Resistenz für Tet₅₀) tragen. Auf diese Weise konnte eine Transposon-Bibliothek erzeugt werden, die $6,5 \times 10^4$ Mutanten umfasst und mit einer statistischen Abdeckung von 99,99% (siehe unten) alle 5.570 Gene von *P. aeruginosa* PA01 (Stover *et al.*, 2000) abdeckt, sofern angenommen wird, dass die Gene ähnlich groß sind und es keine nicht-kodierenden Bereiche gäbe, was in der Realität nicht der Fall ist.

Formel:

$$n = \frac{\log(1 - p)}{\log(1 - f)}$$

Dabei ist n = der Zahl der benötigten Klone, p = die Wahrscheinlichkeit und f = Zahl der Gene des Genoms.

Berechnung:

$$51.297 = \frac{\log(1 - 0,9999)}{\log(1 - (1/5.570))}$$

Für die weitergehenden Versuche wurden über 5.000 dieser Mutanten zufällig ausgewählt und in Mikrotiterplatten kultiviert (2.14.3). Von diesen wuchsen 88,2 % mittels Mikrokultivierung an. Im Gegensatz zum zuvor verwendeten Tn5-Transposon (*pUTminiTn5-luxCDABE*), welches mittels Konjugation von *E. coli* S17.1 λpir mit *P. aeruginosa* PATS1 übertragen wurde, konnte die Zahl der bestätigten Transposonmutanten signifikant erhöht werden. Zudem ermöglicht diese Methode eine einfache und reproduzierbare Erzeugung einer *P. aeruginosa* Transposon-Bibliothek.

3.6 Ergebnisse des mELLA Screenings der Transposon-Bibliothek

Die in dieser Arbeit erzeugte Transposon-Bibliothek (3.5.2) des *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stammes mit *plecB*-Expressionsvektor wurde verwendet, um mit Hilfe des mELLA (2.16) Transposonmutanten zu identifizieren, die kein oder deutlich weniger LecB als der Referenzstamm sekretieren. Dazu wurde eine Ausschlussgrenze von 15 % sekretiertem LecB in Bezug auf den *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor (Referenzstamm) definiert. Für den mELLA wurden 2.856 Mutanten zufällig ausgewählt und in Deep-Well-Platten 24 Stunden kultiviert (2.14.3). Die optische Dichte der Kulturen wurde nach exakt 24 Stunden bei 580 nm Wellenlänge ermittelt. Kulturen, welche eine $O.D._{580\text{ nm}}$ von unterhalb 0,05 aufwiesen, wurden als „nicht angewachsen“ definiert. Insgesamt wuchsen nach dieser Definition 134 der 2.856 Mutanten (4,7 %) nicht in der Flüssigkultur an. Die übrigen 2.722 Kulturen wurden zentrifugiert und die Überstände für den mELLA verwendet (Abb. 22).

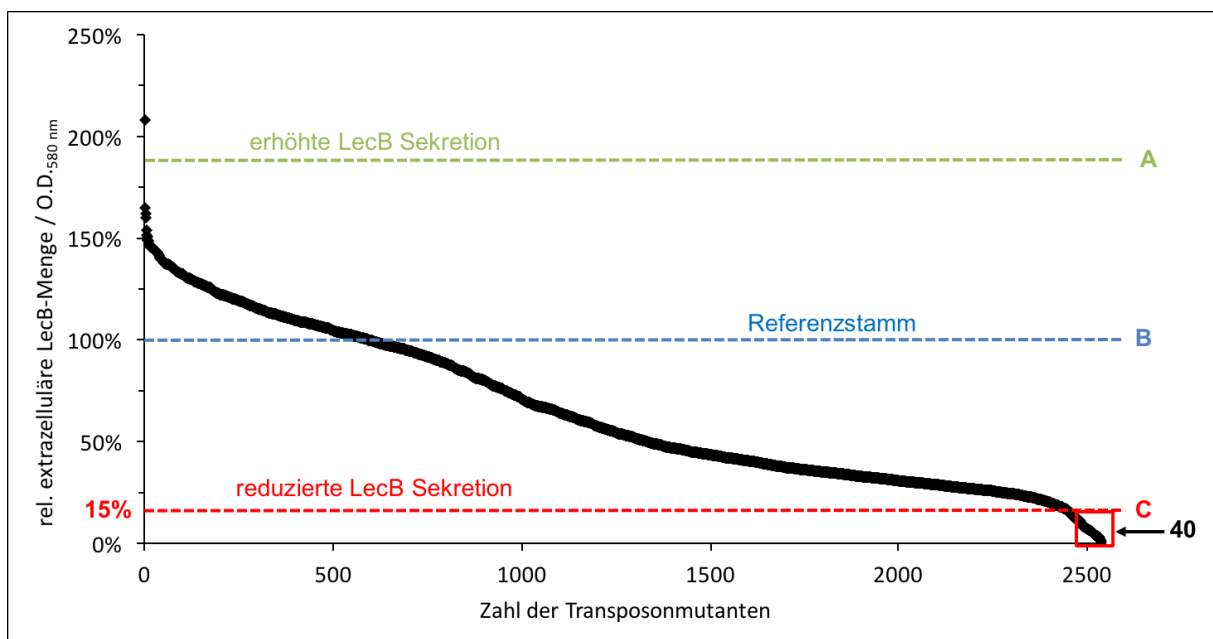


Abbildung 22 Einige Transposonmutanten weisen eine reduzierte Menge an extrazellulärem LecB auf. Aufgetragen wurde die Anzahl der Transposonmutanten (X) gegen die relative Menge an sekretiertem LecB (Y) in Bezug auf den Referenzstamm *P. aeruginosa* $\Delta lecB \Delta oprF / plecB$ (Referenzlinie B = 100 % der extrazellulären Menge von LecB pro $O.D._{580\text{ nm}}$). Als gewählte Ausschlussgrenze (C) wurden 15 % definiert. Der Schnittpunkt der Transposonmutanten mit der Ausschlussgrenze weist auf 40 Transposonmutanten mit reduzierter LecB Sekretion, hin. Zudem konnte ein Stamm mit erhöhter LecB Sekretion (A) identifiziert werden. Für diese Analysen wurden HK in Deep-Well-Platten (750 μL LB-Medium) auf $O.D._{580\text{ nm}} = 0,05$ aus ÜK in Deep-Well-Platten inokuliert und für 24 h bei 37°C bei 650 UpM inkubiert (2.14.3). Anschließend wurden 100 μL der Kultur abgenommen, die Zelldichte bestimmt und die Zellen in den Deep-Well-Platten sedimentiert (15 min, 4.000 x g, RT). Jeweils 100 μL des Überstandes wurden für den mELLA verwendet (2.16).

Aus den 2.722 getesteten Transposonmutanten konnten 47 Mutanten (1,7 %) identifiziert werden, die weniger als 15 % LecB im Vergleich zum *P. aeruginosa* PATS1 Referenzstamm mit *plecB*-Expressionsvektor (100 %) im extrazellulären Medium aufwiesen (Tab. 10). Darüber hinaus konnte eine Mutante (57_D3_208) beobachtet werden, die signifikant mehr LecB im extrazellulären Medium als im Vergleich zum Referenzstamm aufwies.

3.7 Verifizierung und Identifizierung der Mutanten mit reduzierter LecB-Sekretion

3.7.1 Verifizierung der Mutanten mit reduzierter LecB-Sekretion

Für die Identifizierung und Verifizierung des Transposon-Integrationsortes wurden die Transposonmutanten mit beeinträchtigter LecB Sekretion (3.6), in tetrazyklinhaltigem Flüssigselektionsmedium kultiviert. 2 von 40 Mutanten konnten nicht erneut kultiviert werden und wurden daher nicht weiter untersucht. Die Mutanten, die phänotypisch auf Tetrazyklin wuchsen, wurden verwendet, um die Plasmid-DNA (2.5) zu isolieren. Dies diente der Bestätigung, dass die reduzierte extrazelluläre LecB-Menge nicht auf dem Fehlen des Expressionsvektors oder der Integration des Transposon im Vektor basiert. Die Plasmide wurden mit dem *Pst*I Restriktionsenzym hydrolysiert (2.9) und mittels Agarosegelen (2.7) die Größe sowie die Anwesenheit des Expressionsvektors bestimmt (Tab. 10, sowie exemplarisch in Abb. 23 A dargestellt).

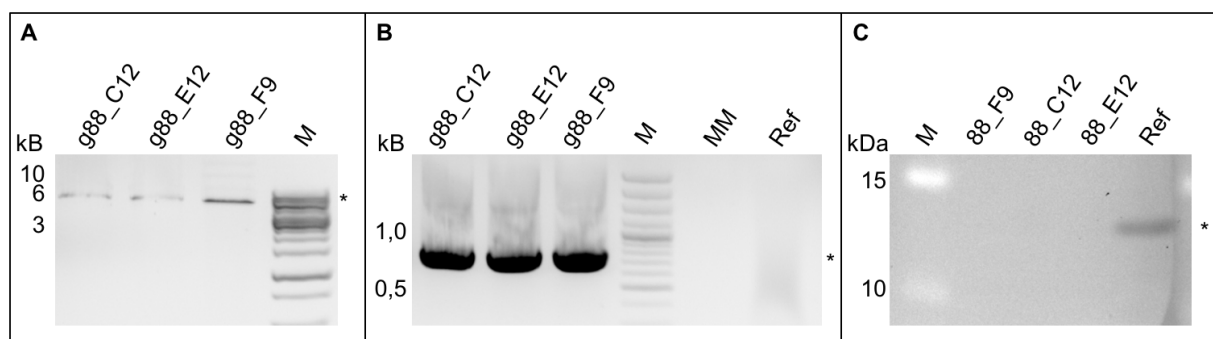


Abbildung 23 Die Verifizierung der Transposonmutanten. (A) Restriktionshydrolyse (2.9) der isolierten Plasmide (2.5) der jeweiligen Transposonmutanten mit *Pst*I (M: 1 kDa GeneRuler™). Der *plecB*-Expressionsvektor weist eine Fragmentlänge von 5,1 kDa auf. (B) DNA-Fragmentlängen-Bestimmung des mittels PCR (2.10) mit den Oligonukleotiden (TS-EZ_Pos-FW und TS-EZ_Pos-RV) amplifizierten Transposons aus dem Genom der jeweiligen Mutante (M: 100 bp GeneRuler™ Größenstandard; MM: Master-Mix; Ref: genomische DNA des *P. aeruginosa* PATS1 (Δ *lecB* Δ *oprF*) Referenzstammes als Negativkontrolle). (C) Indirekter immunologischer Nachweis (2.19) von LecB mit anti-LecB-Antisera in den Kulturüberständen der untersuchten Stämme (LB-Medium, 37°C, 150 UpM, 24 h; M: PageRuler™ Größenstandard; Ref: *P. aeruginosa* PATS1 (Δ *lecB* Δ *oprF*) Referenzstamm mit *plecB*-Expressionsvektor).

Die Dokumentation der Agarosegelbildaufnahmen zeigte, dass die korrekte Größe des Vektors (5.085 bp) verifiziert werden konnte. Die bestätigten Plasmide wurden mit dem

Oligonukleotid „T7“ und „T7 term“ sequenziert (2.11) sowie die korrekte Sequenz des *lecB*-Gens der Plasmide überprüft und verifiziert (Tab. 10). Zudem wurden die Transposonmutanten weitergehend auf die Gegenwart des Transposon überprüft, dazu wurden ÜK der Transposonmutanten inokuliert und die genomische DNA isoliert (2.5). Diese genomische DNA diente als Matrize für die nachfolgende PCR (2.10) zur Amplifizierung des Transposons, mit den Oligonukleotiden TS-EZ_Pos-FW und TS-EZ_Pos-RV (Tab. 3). Die Auswertung der PCR-Fragmente der aufgefallenen Transposonmutanten im analytischen Agarosegel (2.7; Abb. 23 B) zeigte die erwartete Fragmentgrößen von etwa 760 bp. In dem PCR Produkt des Referenzstammes konnte dieses Fragment nicht beobachtet werden. Dies unterstreicht neben dem Wachstum in tetrazyklinhaltigen Medien die Anwesenheit des EZ-Tn5™-Transposons im Genom dem *P. aeruginosa* PATS1 Stamm. Darüber hinaus wurden immunologische Analysen der Kulturüberstände der Transposonmutanten, ergänzend zum mELLA (3.6), durchgeführt (Abb. 23 C). Dabei zeigte sich, dass die stichprobenhaft ausgewählten Transposonmutanten kein LecB im Kulturüberstand aufwiesen und das Ergebnis des mELLA bestätigen.

Tabelle 10 Übersicht der zur Verifizierung untersuchten Transposonmutanten. Die Prozent (%) geben die verbleibende Menge an extrazellulärem LecB im Vergleich zum Referenzstamm (*P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB\Delta oprF$) Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor) an, während ein Plus (+) die jeweiligen Verifizierungsschritte (Wachstum, Transposon- und Plasmid Gegenwart) bestätigt, bzw. ein Minus (-) diese widerlegt.

Transposonmutante	%	mELLA Nomenklatur	Wachstum	Transposon	Plasmid
54_E4	9	54_E4_9	+	+	+
54_H4	14	54_H4_14	+	+	+
55_B2	15	55_B2_15	+	+	+
55_E4	11	55_E4_11	+	+	+
55_H11	10	55_H11_10	+	+	+
55_H12	13	55_H12_13	+	+	+
56_G11	13	56_G11_13	+	+	+
57_G8	6	57_G8_6	+	+	+
59_B3	9	59_B3_9	+	+	+
60_C5	8	60_C5_8	+	+	+
61_A3	13	61_A3_13	+	+	+
61_A4	14	61_A4_14	+	+	+
61_F3	11	61_F3_11	+	+	+
61_H4	13	61_H4_13	+	+	+
62_C8	17	62_C8_17	+	+	+
63_E10	18	63_E10_18	+	+	+
63_H9	18	63_H9_18	+	+	+

63_C9	19	63_C9_19	+	+	+
63_E7	17	63_E7_17	+	+	+
63_B5	18	63_B5_18	+	+	+
65_D5	17	65_D5_17	+	+	+
66_B10	7	66_B10_7	+	+	+
66_G9	12	66_G9_12	+	+	+
66_A9	19	66_A9_19	+	+	+
66_G5	14	66_G5_14	+	+	+
67_D9	16	67_D9_16	+	+	+
68_C9	19	68_C9_19	+	+	+
68_B9	18	68_B9_18	+	+	+
69_E11	6	69_E11_6	+	+	+
75_D4	21	75_D4_21	+	+	+
79_G12	7	79_G12_7	+	+	+
88_F9	18	88_F9_18	+	+	+
88_C12	22	88_C12_22	+	+	+
88_E12	15	88_E12_15	+	+	+
58_A11	10	58_A11_10	+	+	-
66_B7	15	66_B7_15	+	+	-
68_G12	17	68_G12_17	+	+	-
79_C9	31	79_C9_31	+	-	-
88_A4	8	88_A4_8	-	-	-
88_A11	2	88_A11_2	-	-	-

Zusammenfassend konnten 34 der 40 Transposonmutanten unter den oben genannten Bedingungen bestätigt werden (Tab. 10). Die übrigen sechs Transposonmutanten konnten nicht verifiziert werden, da diese entweder nicht erneut kultiviert (88_A4_8 und 88_A11_2), das Transposon nicht amplifiziert (79_C9_31), oder die Plasmid Gegenwart nicht verifiziert werden konnte (58_A11_10, 66_B7_15 und 68_G12_17).

3.7.2 Identifizierung der Transposon-Integrationsorte

Die Identifizierung der Transposon-Integrationsorte in den oben beschriebenen Transposonmutanten mit verringerter LecB-Sekretion könnte zur Aufklärung der an der Sekretion von LecB beteiligten Gene beitragen. Um den Integrationsort des Transposon in den 34 verifizierten Transposonmutanten (3.7.1) zu bestimmen, wurden verschiedene Identifizierungsmethoden (2.15) angewendet, die auf unterschiedlichen Fragmentlängen und Restriktionsmustern basieren. Auf diese Weise konnten 19 der 34 Transposonmutanten im *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta\text{lecB}\Delta\text{oprF}$) Stamm identifiziert werden (Tab. 11). Dabei zeigte sich, dass bestimmte Gene mehrfach von der Transposonintegration betroffen waren. Daher reduziert sich die Zahl der identifizierten Gene, die mutmaßlich einen Einfluss auf die LecB-Sekretion haben, von 19 auf 15 verschiedene (Tab. 11). Die aus der Annotation zu schließende Funktionen dieser Gene sind unterschiedlich, einige sind an der Adhäsion, andere an Transportprozessen oder biosynthetischen Prozessen beteiligt (Tab. 11).

Im Detail konnten zwei Gene *fgtA* und *pilY1* identifiziert werden, welche an dem initialen Schritt der Infektion, der Adhäsion des humanpathogenen Bakteriums an den Wirt beteiligt sind. Drei weitere Gene sind an verschiedenen Transport-Prozessen der Zelle beteiligt (*PA1288*, *PA2018*, *PA2204*), wobei das Transposon im Gen *PA1288* in zwei verschiedenen Transposonmutanten (55_B2_15, 59_B3_9) beobachtet werden konnte. Zudem konnten acht Gene identifiziert werden, welche an biosynthetischen Prozessen beteiligt sind, wobei drei Transposonmutanten dasselbe Gen aufwiesen (*PA3753*). Bei zwei weiteren Genen sind bislang keine Rolle oder Funktion in zellulären Prozessen zugeordnet, da diese bisher lediglich als hypothetische Proteine vorhergesagt wurden (*PA0135*, *PA1383*). Wie die Funktion der Proteine verschieden ist, so verhält es sich auch mit der Lokalisierung. Von den 15 identifizierten Genen in 19 Transposonmutanten konnten die entsprechenden Proteine in allen Zellfraktionen bioinformatisch vorhergesagt werden. Im Detail sind diese wie folgt verteilt: Zytoplasma (5x), Zytoplasma-Membran (4x), Periplasma (1x), äußerer Membran (2x) und extrazellulärem Medium (1x), zwei weitere konnten nicht zugeordnet werden (Tab. 11).

Tabelle 11 Übersicht der identifizierten Gene der Transposonmutanten. Dargestellt sind die Bezeichnung der Tn5-Transposonmutanten im *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta\text{lecB}\Delta\text{oprF}$) Stamm-Hintergrund, die Nachweis-Methode (s.u.), dem identifizierten Gen, der Sequenzübereinstimmung in bp (Seq.-Homologie), der prozentualen Übereinstimmung mit dem Referenzgen (Ident. %), das genetische Umfeld bezogen auf Operons (*: Transposon innerhalb eines Operons; **: Transposon innerhalb des letzten Gens eines Operons), das zugehörige Protein zum Gen, die Funktion und Lokalisierung des Proteins sowie dessen biologischer Kontext bezogen auf die zelluläre Funktion. Die Nachweis-Methode A steht für die *Single-Primer-Methode* (2.15.1), B für den Nachweis mittels Inverser-PCR (2.15.3) und C für die *Plasmid-rescue-Methode* (2.15.2).

Transposon- mutante	Nachweis Methode	Ident. Gen	Seq.- Homologie (bp)	Ident. (%)	Gen.- Umfeld	Protein- Name	Protein Funktion	Protein Lokalisierung	Zelluläre Funktion
63_E10_18	A	PA1091	188	88		FgtA	Flagellar Glykosyltransferase	Cytoplasmatische Membran	Adhäsion
55_E4_11	B	PA4554	163	100	**	PIIY1	Typ-IV Fimbrial Biogenese Protein	Äußere Membran	Adhäsion
55_B2_15 59_B3_9	B	PA1288	955 631	100 99		ExFadLO	Export von langkettigen Fettsäuren	Äußere Membran	Transport
61_A3_13	A	PA2204	78	86		-	möglicher ABC-Transporter	Periplasma	Transport
54_E4_9	B	PA2018	125	100	**	MexY	multidrug Efflux-Transporter	Cytoplasmatische Membran	Transport
88_C12_22	B	PA5250	667	99		TerC- ähnlich	mögliches Tellur Resistenz und Efflux-System	Cytoplasmatische Membran	Transport / Biosynthetische Prozesse
79_G12_7	B	PA5539	409	100	*	FolE2	GTP-Cyclohydrolase	-	Biosynthetische Prozesse
88_F9_18	B	PA0916	221	100		RimO	Methylthiotransferase	Cytoplasma	Biosynthetische Prozesse
54_H4_14 61_A4_14 61_H4_13	A	PA3753	304 150 308	100 85 100	*	DapH	putative N-Acetyltransferase	Cytoplasma	Biosynthetische Prozesse
55_H11_10	B	PA5236	639	100	**	-	putative aromatische Kohlenwasserstoff-Reduktase	Cytoplasma	Biosynthetische Prozesse
66_A9_19	A	PA4560	80	98	*	IleS	isoleucyl-tRNA Synthetase	Cytoplasma	Biosynthetische Prozesse
68_B9_18	A	PA5020	85	99		-	putative acyl-CoA Dehydrogenase	Cytoplasma	Biosynthetische Prozesse
60_C5_8	B	PA3947	278	90		RocR	Negativ Regulator der Transkription	Cytoplasmatische Membran	Biosynthetische Prozesse
88_E12_15	C	PA0135	356	99		hyp.Prot	-	-	-
56_G11_13 57_G8_6	A	PA1383	196 120	99 92		hyp.Prot	-	Extrazellulär	-

3.7.3 Der Einfluss von FgtA und FliC auf die Sekretion von LecB

Die vorherigen Ergebnisse haben nahegelegt, dass FgtA möglicherweise an der Sekretion von LecB beteiligt ist (Tab. 11). Die zelluläre Funktion von FgtA ist die Glykosylierung des bakteriellen Flagellins (FliC) mit einer Deoxyhexose, wie Fukose. LecB wiederum weist eine hohe Affinität zu Fukose auf (Garber *et al.*, 1987). Zudem legten vorherige Arbeiten nahe, dass LecB über einen Zucker-vermittelten Transport sekretiert werden könnte (Tielker *et al.*, 2005). Um den möglichen Einfluss von FgtA und FliC auf den Transport von LecB zu untersuchen, wurde begonnen, *P. aeruginosa* Stämme mit einer Deletion von *fgtA* und *fliC* zu konstruieren. Da dies jedoch noch nicht abgeschlossen werden konnte, wurden entsprechende Transposonmutanten des *P. aeruginosa* PA14 Stammes von der *Havard Medical School* zur Überprüfung der Hypothese bezogen (Liberati *et al.*, 2006). Diese Stämme wurden kultiviert und die Menge an extrazellulärem LecB mittels mELLA quantifiziert (Abb. 24 A).

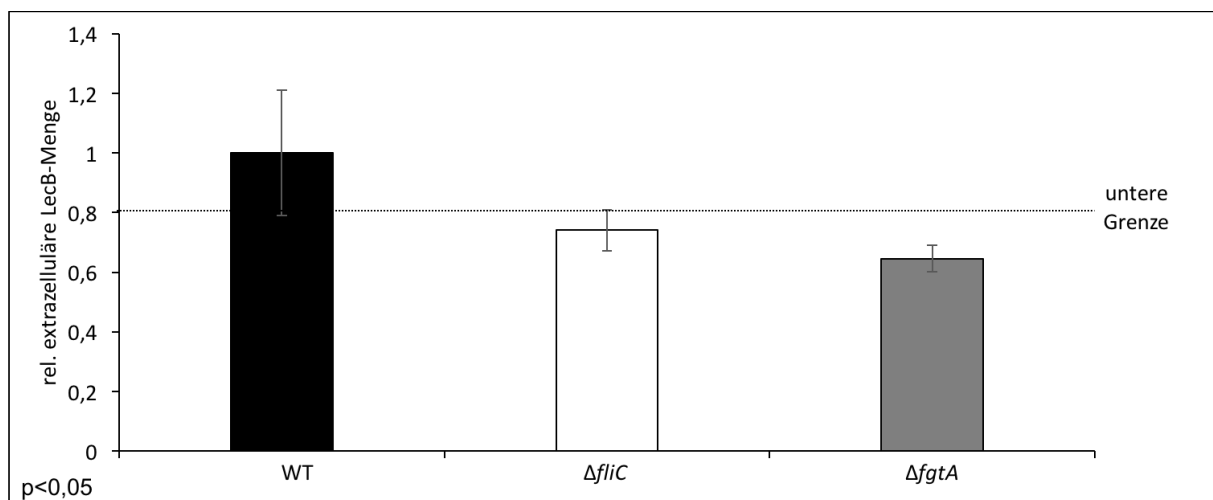


Abbildung 24 Der Einfluss von FliC und FgtA auf die extrazelluläre Menge an LecB. Quantifizierung von extrazellulärem LecB mittels mELLA. Dazu wurden HK aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und für 24 h kultiviert (LB-Medium, 650 UpM, 37°C). Anschließend wurde die Gesamtzellzahl mittels Messung der optischen Dichte bei 580 nm Wellenlänge ermittelt, die Zellen sedimentiert (15 min, 4.000 x g, RT) und die Überstände für den mELLA (2.16) verwendet ($p < 0,05$; $n = 4$). Die in diesem Versuchsteil verwendeten Stämme und Transposonmutanten basieren auf dem *P. aeruginosa* PA14 Referenzstamm. Oberhalb der „untere(n) Grenze“ kann die Menge an LecB mittels mELLA quantifiziert werden.

Die Deletion von *fliC* bzw. *fgtA* hat eine deutlich reduzierte Menge an extrazellulärem LecB zur Folge (Abb. 24). Da die extrazellulären LecB-Mengen an der unteren Grenze des linearen Messbereiches des mELLA liegen, konnte keine belastbare Quantifizierung des Einflusses der Deletionen getroffen werden. Dass die Deletionen aber einen Einfluss haben, konnte bestätigt werden. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Deletion von *fliC* im Vergleich zum Referenzstamm zu einer knapp 70 % reduzierten Biofilmmenge führt (Daten nicht gezeigt).

3.8 Der physiologische Einfluss von LecB in *P. aeruginosa*

Für die Aufklärung der physiologischen Rolle des Lektins LecB wurde der Einfluss einer *lecB* Deletion auf das Sekretom (3.8.1), die Bewegung (3.8.2), bekannte und putative Interaktionspartner (3.9) sowie auf die Co-Kultivierung mit einem weiteren Humanpathogen (3.10) untersucht.

3.8.1 LecB hat einen physiologischen Einfluss auf das Sekretom

Anknüpfend an die Untersuchungen aus Kapitel 3.1 wurde der physiologische Einfluss von LecB, durch Sekretomanalysen ergänzend untersucht. Dazu wurden die extrazellulären Medien des *P. aeruginosa* PA01 Referenz- sowie des *P. aeruginosa lecB*-defizienten PAT14 Stammes mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2.21) untersucht (Abb. 25).

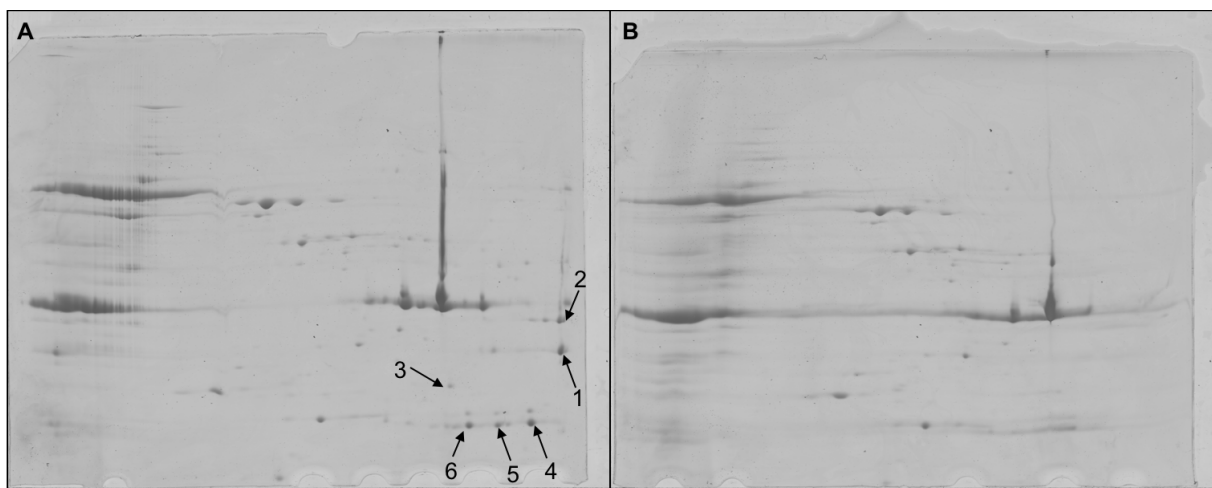


Abbildung 25 Ein *lecB*-defizienter Stamm weist ein verändertes Sekretom auf. LecB weist pleiotrope Einflüsse in der Sekretomanalyse des *P. aeruginosa* PA01 Referenz- und *lecB*-defizienten Stammes auf. Dazu wurden HK aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und für 24 h in NB-Medium inkubiert (37°C, 25 mL, 150 UpM). Die Zellen wurden zentrifugiert (1 h, 10.000 x g, 4°C), die Überstände steril filtriert und mittels TCA-Fällung die extrazellulären Proteine konzentriert (2.21.1). Die Proteinkonzentration wurde mittels „2-D Quant Kit“ von GE Healthcare (Solingen) bestimmt (2.21.2), die isoelektrische Fokussierung (2.21.3) und die zwei-dimensionale Auftrennung (0) durchgeführt. Anschließend wurden die 2D-Gele Coomassie gefärbt, digitalisiert und mittels des Bildanalyseprogrammes „Decodon Delta 2D“ (Decodon, Greifswald), analysiert. **(A)** Das Sekretom des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes **(B)** Das Sekretom des *P. aeruginosa lecB*-defizienten PAT14 Stammes. Mit Pfeilen sind im *P. aeruginosa* Referenzstamm die im *P. aeruginosa lecB*-defizienten Stamm Proteine markiert und mit Identifikationsnummern (1-6) der Tabelle 12 versehen, welche in geringeren Mengen vorliegen.

Hierbei waren im extrazellulären Proteom bzw. Sekretom zahlreiche Unterschiede zu beobachten. Besonders deutlich ist das Fehlen einiger Proteinspots in dem *P. aeruginosa lecB*-defizienten Stamm.

Die äquivalenten Spots im *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm wurden isoliert und mittels MALDI-TOF Analyse (2.22) identifiziert (Tab. 12).

Tabelle 12 Übersicht der im Sekretom des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stammes reduziert vorliegenden oder fehlenden Proteine. Der verwendete Mascot-Score basiert auf einer bioinformatischen Analyse der identifizierten Peptide mittels MALDI-TOF Analyse. Ein Score von >50 gibt an, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit (=sicher) um dieses Protein handelt. 40-50 gelten als wahrscheinlich (=möglich), <40 als unsicher. Die Lokalisierung der Proteine ist experimentell bestätigt. *: Die Lokalisierung dieses Proteins ist bioinformatisch vorhergesagt.

ID	Mascot Score	Identifiziert	Gen	Gen Name	Protein	Protein Lokalisierung
1	79	sicher	PA4175	<i>piv</i>	Protease IV	Extrazellulär
2	69	sicher	PA3734	-	hypothetisches Protein	Zytoplasmatische Membran*
3	69	sicher	PA5489	<i>dsbA</i>	Disulfid-Oxidoreduktase	Periplasmatisch
4	56	sicher	PA0852	<i>cbpD</i>	Chitin-Bindeprotein Vorläufer	Extrazellulär
5	47	möglich	PA2891	<i>atuF</i>	Biotin-Carboxylase / Transporter	Zytoplasmatisch
6	46	möglich	PA4524	<i>nadC</i>	Nicotinat-Nukleotid-Pyrophosphorylase	Zytoplasmatisch

Die MALDI-TOF Analyse ergab, dass vier Proteine sicher identifiziert werden konnten, welche in deutlich geringeren Mengen im extrazellulären Medium der *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stammes vorliegen, als im *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm. Derselbe Einfluss konnte bei zwei weiteren Proteinen beobachtet werden, diese konnten jedoch nicht sicher identifiziert werden.

3.8.2 Der physiologische Einfluss von LecB auf die Bewegungsfähigkeit von *P. aeruginosa*

Die Bewegung eines Bakteriums, gesteuert durch unterschiedliche Signale, ist hoch komplex reguliert (Guttenplan & Kearns 2013). In Kapitel 3.1 wurde bereits beschrieben, dass die Deletion von *lecB* zu einer im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm eine deutlich geringeren TM führt. Für eine weitergehende Analyse, des Einflusses von LecB auf weitere Bewegungsformen, wurde die Schwimm- (Abb. 26) und Schwärmbewegung (Abb. 27) verschiedener *P. aeruginosa* Stämme untersucht. Die Schwimmbewegung des Bakteriums ist eine durch das Flagellum vermittelte Fortbewegung, welche den Bewegungsschub aus der rotierenden Bewegung der extrazellulären Filamentstruktur generiert.

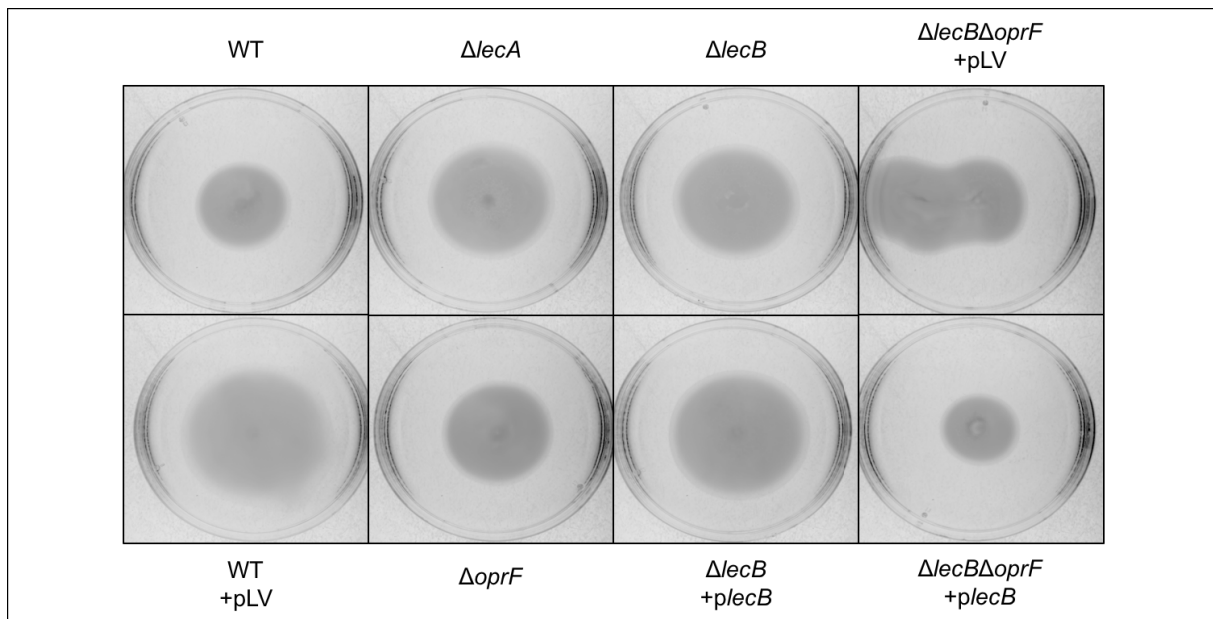


Abbildung 26 Die Deletion von *lecB* weist keinen Einfluss auf die Schwimmbewegung auf. Dazu wurden 5 μ L einer ÜK einer O.D._{580 nm} = 3,0 in der Mitte der Platte auftragen und die Kultur über Nacht bei 37°C inkubiert (2.24). Anschließend erfolgte die fotografische Dokumentation der Schwimmbewegung mittels Dokumentationsanlage (STELLA, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

Im Schwimmbewegungstest konnte kein signifikanter Einfluss der *lecB* und *oprF* Deletion auf die Schwimmfähigkeit von *P. aeruginosa* beobachtet werden (Abb. 26). Wiederholte Experimente zeigten, dass der *P. aeruginosa* PATS1 (Δ *lecB* Δ *oprF*) Stamm einen heterogenen Phänotyp in Bezug auf die Schwimmfähigkeit aufzeigt, meist ähnelt dieser dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm, nur in seltenen Fällen konnte ein reduziertes Schwimmverhalten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener Deletionsstämme auf die Schwärmbewegung von *P. aeruginosa* untersucht (Abb. 27). Die Schwärmbewegung wurde als die dritte Bewegungsform von *P. aeruginosa* neben der Schwimmbewegung und der TM identifiziert (Köhler *et al.*, 2000). Die Schwärmbewegung von *P. aeruginosa* basiert auf dem Zusammenspiel der Typ-IV-Pili mit dem Flagellum und ist QS-reguliert (Köhler *et al.*, 2000; Shrout *et al.*, 2006).

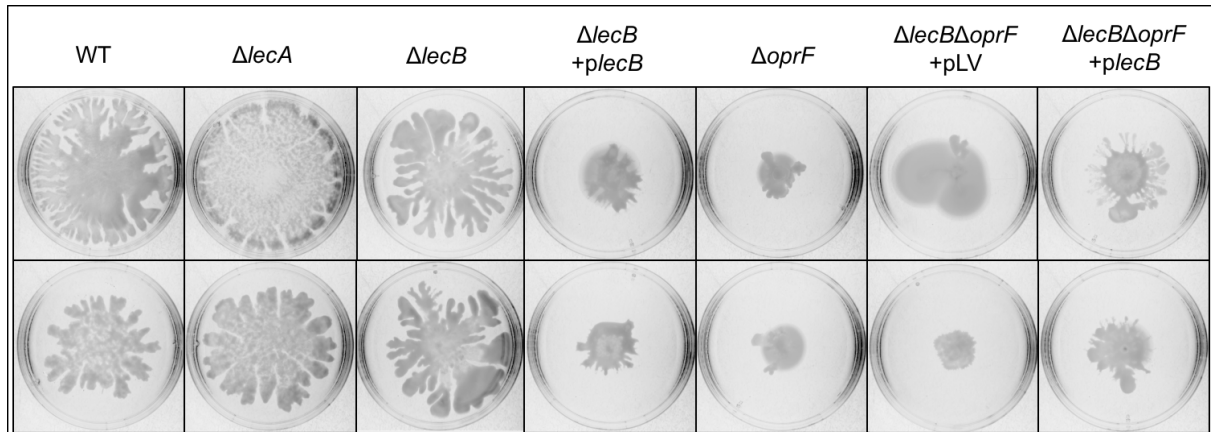


Abbildung 27 Die Deletion von *lecB* hat keinen Einfluss auf die Schwärmfähigkeit. Dazu wurden 5 μ L einer ÜK der O.D._{580 nm} = 3,0 in der Mitte der M9-Schwärmagarplatte (2.24) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C, anschließend bis zum Erreichen der 48 h bei RT. Die Aufnahmen der Schwärmbewegung erfolgten mittels Dokumentationsanlage (STELLA, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH).

Die Untersuchung der Schwärmfähigkeit von *P. aeruginosa* *lecA*- und *lecB*-defizienten Stämmen zeigte, dass die Deletion, keinen Einfluss auf das Schwärmverhalten von *P. aeruginosa* verursacht (Abb. 27). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Deletion von *oprF* zu einem deutlich eingeschränkten Schwärmverhalten von *P. aeruginosa* führt. Bemerkenswerterweise konnte eine Veränderung des Phänotyps nach vektorbasierter Expression von *lecB* mittels *plecB*-Expressionsvektor beobachtet werden, dies ist besonders im *P. aeruginosa* PATS1 (Δ *lecB* Δ *oprF*) Stamm zu beobachten.

3.9 Einfluss von bekannten und putativen Interaktionspartnern auf LecB

3.9.1 Der Einfluss von *lecA* auf *lecB*

Die beiden Lektine LecA und LecB von *P. aeruginosa* besitzen Zuckerbindeigenschaften und weisen ähnliche physiologische Funktionen auf (Lanne *et al.*, 1994; Blanchard *et al.*, 2008; Boukerb *et al.*, 2014) unterscheiden sich jedoch in der Sequenz deutlich (Avichezer *et al.*, 1994). Da die Expression von *lecA* und *lecB* zu ähnlichen Zeitpunkten erfolgt, wurde ein möglicher Einfluss, zum Beispiel durch eine Co-Regulation von *lecA* auf *lecB* untersucht. Dazu wurde zunächst überprüft, ob die Deletion von *lecA* im Genom einen Einfluss auf die Zelldichte der Kulturen aufweist (Abb. 28 A). Um diese Ergebnisse einzuordnen wurde der *P. aeruginosa* $\Delta lecB$ Stamm als Referenz verwendet und zudem indirekte immunologische Analysen gegen LecB durchgeführt (Abb. 28 B, C).

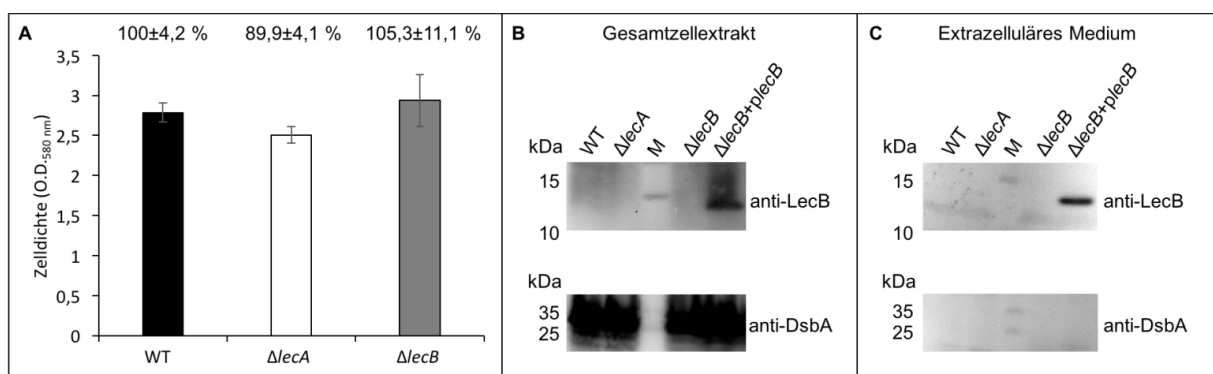


Abbildung 28 Die Deletion von *lecA* hat einen negativen Einfluss auf die Zelldichte der stationären Phase. Dazu wurden HK aus ÜK auf $O.D_{580\text{ nm}} = 0,05$ inokuliert und für 24 h inkubiert (LB-Medium, 150 UpM, 37°C). **(A)** Bestimmung der Zelldichte durch Messung der optischen Dichte bei 580 nm nach 24 h Kultivierung (n=8). **(B)** Indirekter immunologischer Nachweis von LecB (oben) und DsbA (unten) in Gesamtzellextrakten ($O.D_{580\text{ nm}} = 0,5$). **(C)** Immunologischer Nachweis von extrazellulärem LecB (oben) und dem Zellyse-Marker DsbA (unten). Das periplasmatische DsbA ist nur nach Zellyse im extrazellulären Medium detektierbar. Dazu wurden die Zellen nach der Bestimmung der Zelldichte zentrifugiert und die Kulturüberstände ohne weitere Behandlung mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-Page analysiert.

Die Zelldichtemessung der stationären Phase zeigte, dass ein *P. aeruginosa* *lecA*-defizienter Stamm eine etwa 10 % reduzierte absolute Zellzahl nach 24 h aufweist (Abb. 28 A). Im nachfolgenden indirekten immunologischen Nachweis von LecB konnte gezeigt werden, dass ein *P. aeruginosa* *lecA*-defizienter Stamm kein detektierbares LecB im extrazellulären Medium (Abb. 28 C) bzw. zellassoziiert (Abb. 28 B) aufweist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *lecA* bzw. *lecB* nicht zur Zellyse und damit verbundener Freisetzung von periplasmatischen DsbA (Bardwell *et al.*, 1991) in das extrazelluläre Medium führt (Abb. 28 C unten).

In weitergehenden Untersuchungen wurde der Einfluss von *lecA* auf *lecB* Transkript- und Protein-Ebene untersucht. Dazu wurden quantitative PCR Analysen sowie mELLA-

Quantifizierungen von LecB des *P. aeruginosa* Referenz-, des *lecA*-defizienten und *lecB*-defizienten Stammes durchgeführt (Abb. 29).

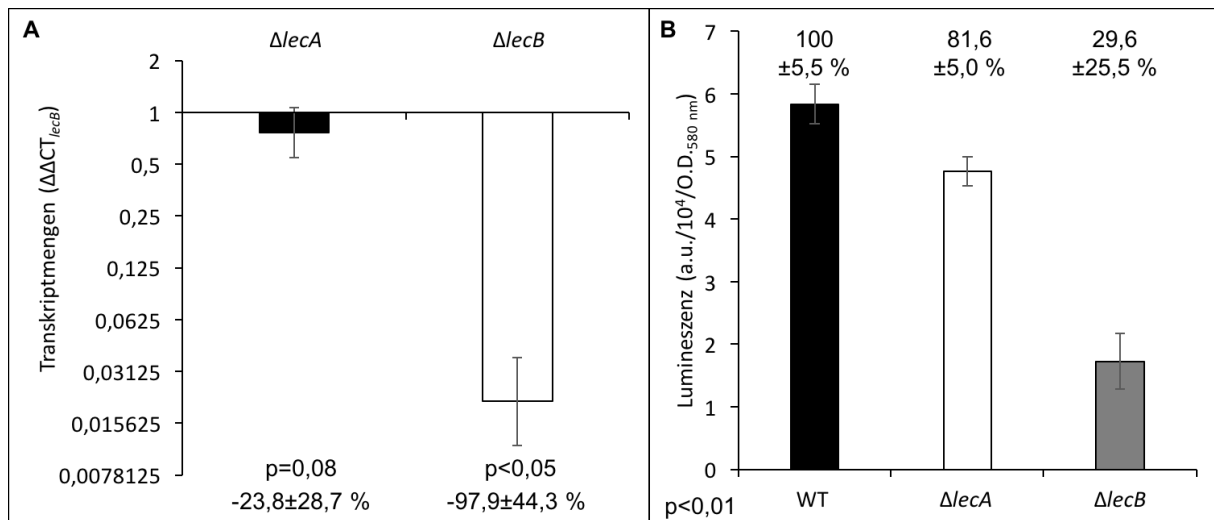


Abbildung 29 Vergleich von Transkriptmengen und sekretiertem LecB in *P. aeruginosa* *lecA*- und *lecB*-defizienten Stämmen. (A) Quantifizierung der *lecB*-Transkriptmengen mittels qPCR aus *P. aeruginosa* *lecA*- und *lecB*-defizienten Stämme im Vergleich zum Referenzstamm (PA01 = 1). Quantifizierung von *lecB*-Transkripten des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes gegen den *lecA*-defizienten bzw. *lecB*-defizienten *P. aeruginosa* Stamm, normalisiert auf das housekeeping-Gen *rpoD*. Aufgetragen sind die relativen *lecB* Transkriptmengen ($\Delta\Delta CT_{lecB}$). Dazu wurden HK aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert (LB-Medium, 150 UpM, 37°C) und die RNA nach 16 h isoliert (2.10.4). Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR (2.10.4) die Transkriptmengen bestimmt (n=3). (B) Quantifizierung von extrazellulärem LecB des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes (WT), des *lecA*-defizienten sowie des *lecB*-defizienten Stammes mittels mELLA (2.16). Dazu wurden HK aus ÜK in Deep-Well-Platten auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und für 24 h inkubiert (LB-Medium, 650 UpM, 37°C), die Zelldichte bei O.D._{580 nm} bestimmt, die Zellen zentrifugiert und die zellfreien Kulturüberstände für den mELLA (2.16) verwendet (n=8).

Die quantitative PCR Analyse weist auf keinen Einfluss der Deletion *lecA* auf die *lecB*-Transkription hin (Abb. 29 A). Die quantitative Analyse von extrazellulärem LecB mittels mELLA (2.16) zeigte, dass der *P. aeruginosa* *lecA*-defiziente Stamm 18,4 % weniger LecB im Kulturüberstand im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm aufweist (Abb. 29 B). Eine frühere Studie zeigte, dass LecB notwendig für die Biofilmbildung ist, LecA jedoch nicht (Tielker 2005). Dem entgegen zeigte eine weitere Studie jedoch, dass LecA einen Einfluss auf die Biofilmbildung aufweist (Diggle *et al.*, 2006). Da ein *P. aeruginosa* *lecA*-defizienter Stamm jedoch weniger LecB im extrazellulären Medium aufweist (Abb. 29 B), wurden die Biofilm-Untersuchungen mit dem *P. aeruginosa* *lecA*-defizienten Stamm durchgeführt (Abb. 30).

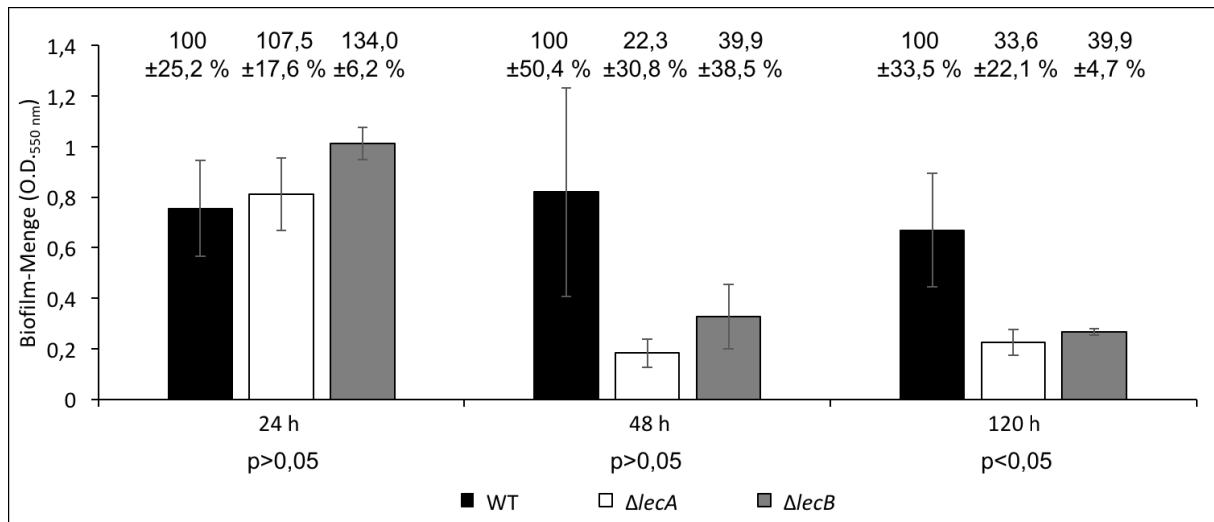


Abbildung 30 Die Deletion von *lecA* bzw. *lecB* hat einen Einfluss auf die Biofilmbildung. Für die Biofilm-Quantifizierung wurden Kulturen (400 μ L, LB-Medium) aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 1,0 in Zellkulturplatten inokuliert und bis zum Erreichen der entsprechenden Inkubationszeit, bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die Quantifizierung der Biofilme (n=3) mittels Kristallviolett-färbung und Messung der O.D._{550 nm} (2.25).

Die Biofilm-Quantifizierungen zeigten, dass ein *P. aeruginosa* *lecA*-defizienter Stamm nach 48 h (77,7 %) und 120 h (66,4 %) weniger Biofilm als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm aufweist (Abb. 30). Dies ähnelt dem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm, welcher nach 48 h und 120 h (60,1 %) weniger Biofilm als der Referenzstamm aufweist. Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die Deletion von *lecA* einen negativen Einfluss auf die Zelldichte, die Biofilmbildung und die Menge an extrazellulärem LecB aufweist.

3.9.2 Der Einfluss von OprF auf die Expression und Lokalisierung von LecB

In einer vorangegangenen Studie (Funken *et al.*, 2012) konnte mittels *pull-down* Analysen gezeigt werden, dass LecB und OprF putative Interaktionspartner sind. Das Modell legt nahe, dass das tetramere LecB-Protein mit dem in der äußeren Membran lokalisierten Porin OprF interagiert und auf diese Weise an der äußeren Membran lokalisiert ist. Quantitative Bestimmungen von extrazellulärem LecB (3.1) zeigten, dass lediglich geringe Mengen LecB frei und ungebundenen im extrazellulären Medium detektiert werden konnten. Dies legt nahe, dass die Zelle die Menge an extrazellulärem LecB reguliert. Ein im Kapitel 3.2 konstruierter *P. aeruginosa* PATS1 (Δ *lecB* Δ *oprF*) Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor zeigte keinen Einfluss der *oprF*-Deletion auf die Sekretion von vektorexprimierten und mittels mELLA quantifizierten LecB. Es ist davon auszugehen, dass OprF zwar ein Interaktionspartner der äußeren Membran (Funken *et al.*, 2012), aber kein Sekretionspartner von LecB ist.

Eine genauere Untersuchung der Zusammenhänge zwischen beiden Proteinen erfolgte hier mit Hilfe eines *P. aeruginosa* *oprF*-defizienten Stammes. Indirekte immunologische Nachweise von LecB in *P. aeruginosa* Kulturüberständen (Abb. 31 A) und Gesamtzellextrakten (Abb. 31 B) zeigten, dass ein *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm signifikant mehr LecB produziert und dieses sowohl zellassoziiert als auch extrazellulär nachgewiesen werden kann. So konnte interessanterweise LecB im *P. aeruginosa* *oprF*-defizienten Stamm bereits nach sieben Stunden mittels indirektem immunologischen Nachweises detektiert werden. Der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm wies hingegen erst nach etwa 24 h (zellassoziiert) bzw. 48 h (extrazellulär) LecB auf. Quantitative PCR Analysen zeigten, dass ein *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm 7,7-fach mehr *lecB* exprimiert als der Referenzstamm (Abb. 31 C).

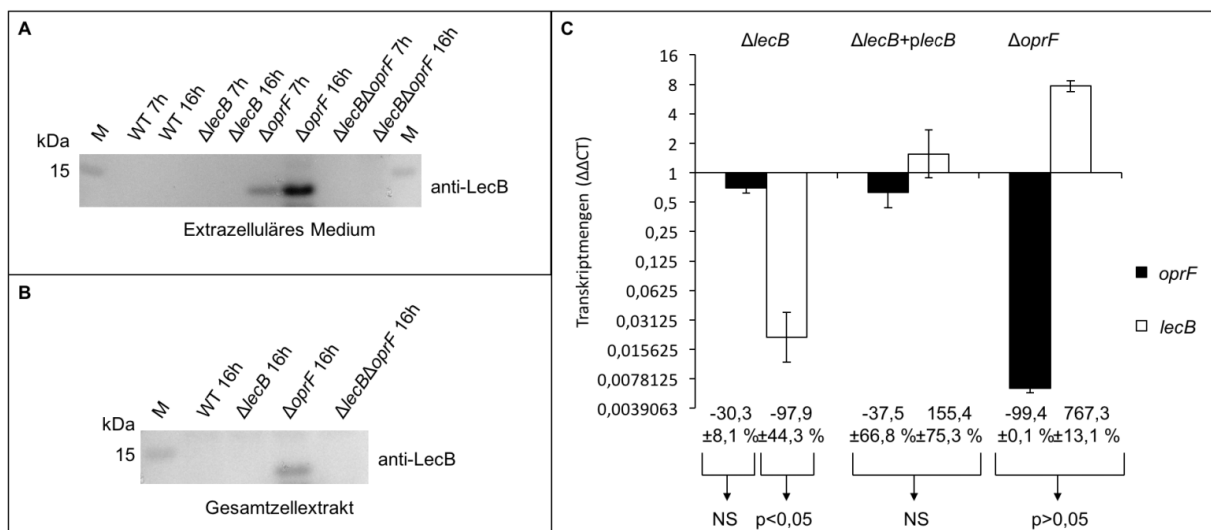


Abbildung 31 Lokalisierung von LecB und Quantifizierung von *lecB* und *oprF*-Transkripten. Lokalisierung von LecB in extrazellulären Medien (A) und in Gesamtzellextrakten (B) nach 7 h bzw. 16 h. Dazu wurden die Kulturen (WT: *P. aeruginosa* PA01 Referenz- und der $\Delta lecB$, $\Delta oprF$ und $\Delta lecB \Delta oprF$ Stämme) aus einer ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und nach 7 h oder 16 h zentrifugiert (15 min, 4.000 x g, 4°C). Es wurden jeweils O.D._{580 nm} = 0,5 für die SDS-PAGE (2.18) verwendet. Der indirekte immunologische Nachweis erfolgte gemäß 2.19. (C) Quantifizierung der *lecB*- und *oprF*-Transkriptmengen mittels qPCR aus *P. aeruginosa* *lecB*- und *oprF*-defizienten bzw. dem komplementierten $\Delta lecB / plecB$ -Stamm im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (WT = 1), normalisiert auf das housekeeping-Gen *rpoD*, dargestellt als relative Veränderung der Transkriptmengen ($\Delta\Delta CT_{lecB}$, $\Delta\Delta CT_{oprF}$). Dazu wurden HK aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und die RNA nach 16 h isoliert (2.10.4). Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR (2.10.4) die Transkriptmengen bestimmt (n=3). Die Signifikanzen (p) beziehen sich jeweils auf den *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm. NS: nicht signifikant p < 0,05.

Die Analyse der Transkriptmengenbestimmung mittels qPCR zeigten zudem, dass die Deletion von *lecB* und die vektorbasierte Expression von *lecB* im *lecB*-defizienten Stamm keinen Einfluss auf die *oprF*-Transkription aufweist (Abb. 31 C). Zusammengefasst resultiert aus diesem Ergebnis, dass *oprF* einen transkriptionellen Einfluss auf die Expression von *lecB* aufweist, während *lecB* unter den getesteten Bedingungen jedoch keinen Einfluss auf die *oprF*-Transkriptmenge zeigt.

Basierend auf der Transkriptmengen-Bestimmung wurde die Hypothese aufgestellt, dass OprF nicht ausschließlich Interaktionspartner, sondern potentiell als Regulationspartner direkt oder indirekt in Frage kommt. Möglicherweise basiert diese Regulation auf der durch die Deletion von *oprF* resultierende Desorganisation des QS-Netzwerks (Bouffartigues *et al.*, 2015) oder auf einer Feedback-Regulation von OprF, welche die Transkription von *lecB* inhibiert (Abb. 32). Daraus folgt, dass in Abwesenheit von *oprF* in *P. aeruginosa*, dieses keinen negativen Einfluss auf die Transkription von *lecB* aufweist und dieses bereits früher und möglicherweise verstärkt exprimiert wird als im *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm. Zudem zeigte Bouffartigues zuvor, dass die *oprF*-Transkriptmenge bis 5 h Inkubation ansteigt und anschließend deutlich abnimmt und auf einem niedrigen Level verbleibt (Bouffartigues *et al.*, 2012). Dabei wurde angenommen, dass ein weiterer (Regulations-) Faktor die Transkription von *oprF* beeinflusst.

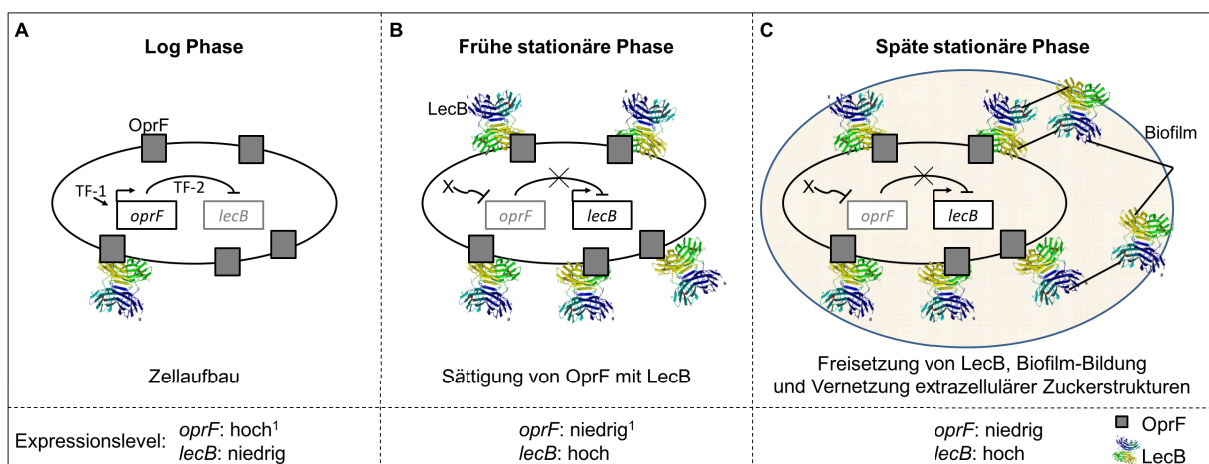


Abbildung 32 Hypothetisches Modell des Aufbaus von Biofilmen durch Interaktion von LecB und OprF. (A) In dem hypothetischen Modell, basierend auf der Transkriptmengen-Bestimmung mittels quantitativer PCR und den indirekten immunologischen Nachweisen. In der logarithmischen Phase wird die Expression von *oprF* durch einen Transkriptionsfaktor (TF-1, z.B. SigX) aktiviert, wodurch die Transkription von *lecB* vermutlich über einen Transkriptionsfaktor (TF-2) reprimiert wird. (B) In der frühen stationären Phase wird die Expression von *oprF* reduziert (X) und die Transkription von *lecB* initialisiert. (C) In einer späten stationären Phase, beginnt die Zelle Biofilme auszubilden. 1: Bouffartigues *et al.*, 2012, Struktur von LecB modifiziert nach Loris (Loris *et al.*, 2003).

Zur Überprüfung der Hypothese eines regulatorischen Einflusses von *oprF* auf *lecB*, welche auf der Analyse der Transkriptmengen basiert wurde die Menge an extrazellulärem LecB nach 24 h Kultivierung, quantifiziert (Abb. 33 A).

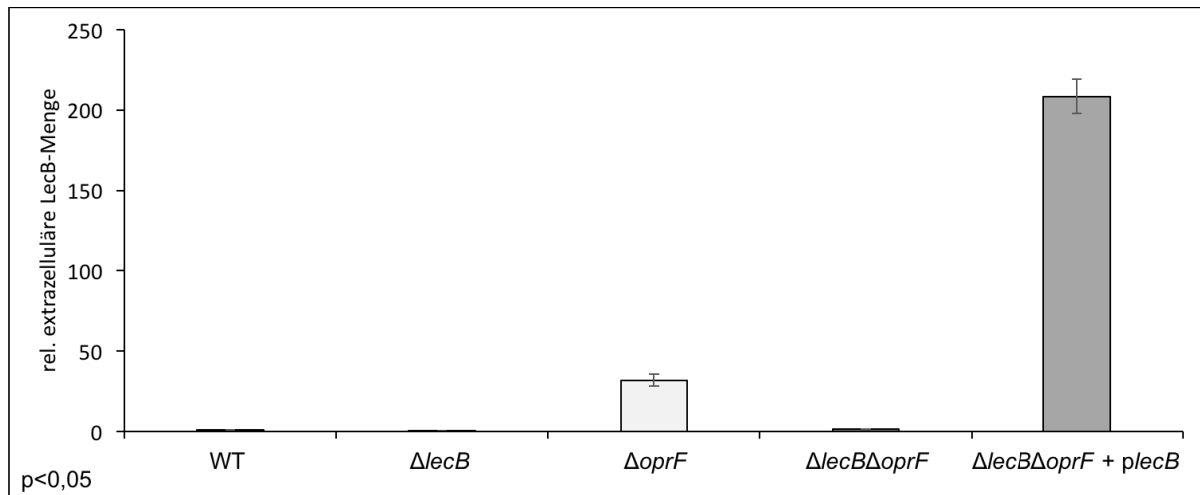


Abbildung 33 OprF hat einen Einfluss auf die extrazelluläre Menge an LecB. Relative Quantifizierung von LecB aus extrazellulären Medien des *P. aeruginosa* Referenzstammes PA01 (WT), des *lecB*-, des *oprF*-defizienten Stammes sowie des PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stammes mit pLV bzw. *plecB*-Expressionsvektor mittels mELLA (2.16) nach einer Kultivierung von 24 h in LB-Medium (150 UpM, 37°C, n=4, p<0,05).

Die Quantifizierung von LecB mittels mELLA zeigte, dass ein *P. aeruginosa oprF*-defizienter Stamm nach 24 h, etwa 32-fach mehr LecB im extrazellulären Medium aufweist als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (Abb. 33). Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse des indirekten immunologischen Nachweises von LecB mittels Western Blot in dem *P. aeruginosa oprF*-defizienten Stamm (Abb. 31) und unterstützt die Hypothese (Abb. 32), dass *oprF* die Transkription von *lecB* beeinflusst und somit neben der Interaktion mit LecB einen regulatorischen Einfluss auf *lecB* aufweist. Die Quantifizierung von LecB mittels mELLA zeigte zudem, dass ein *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor bei Kultivierung im Erlenmeyer-Kolben 6,5-fach mehr LecB extrazellulär aufweist als ein *P. aeruginosa oprF*-defizienter Stamm, bzw. 200-fach mehr LecB als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm.

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass LecB einen entscheidenden Einfluss auf die Biofilm-Bildung von *P. aeruginosa* hat (Tielker *et al.*, 2005), weshalb parallel die Menge an Biofilmen eines *P. aeruginosa oprF*-defizienten, eines *lecB*-defizienten und des PA01 Referenzstammes bestimmt wurde (Abb. 34).

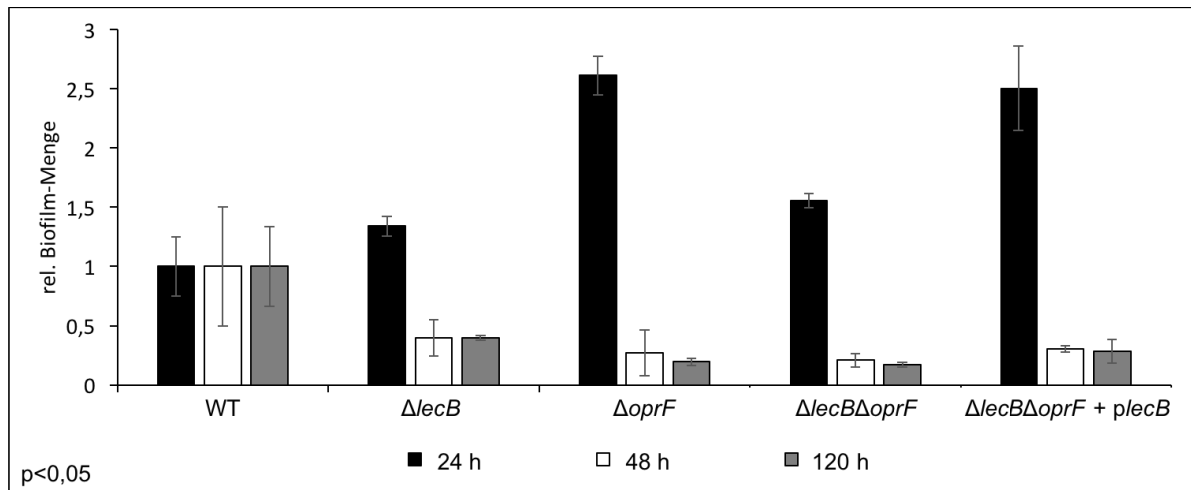


Abbildung 34 Der Einfluss von LecB auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* PATS1 Stämmen. Die relative Quantifizierung von Biofilmen des *P. aeruginosa* Referenzstammes PA01 (WT), des *lecB*-, des *oprF*-defizienten und des PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stammes mit pLV bzw. *plecB*-Expressionsvektor mittels Kristallviolett färbung (2.25) nach 24, 48 und 120 h ($p < 0,05$, Ausnahme: $\Delta lecB$: $p > 0,05$ 24-48 h; $p < 0,05$ 120 h, $\Delta oprF$: $p < 0,05$; $n=3$). Die absoluten Messwerte (nicht gezeigt) zeigten, dass der Wildtyp-Referenzstamm nach 48 h 8,6 % mehr, bzw. nach 120 h 11,4 % weniger Biofilm im Vergleich zum 24 h Zeitpunkt aufweist.

Die Quantifizierung der Biofilme zeigte, dass ein *P. aeruginosa oprF*-defiziente Stamm nach 24 h Kultivierung 2,6-fach mehr Biofilm im Vergleich zum Referenzstamm aufweist (Abb. 34). Es ist bekannt, dass in Abwesenheit von *oprF* das c-di-GMP Level und die *pel*-Transkription erhöht sind und dies zu einer verstärkten Biofilmbildung und Produktion von Pel-Exopolysacchariden führt (Bouffartigues *et al.*, 2015). Basierend auf diesen Daten wurde der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm ebenfalls untersucht (Abb. 34). Der Vergleich der Biofilm-Mengen zeigte, dass der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor nach 24 h Inkubation ähnlich viel Biofilm wie der *P. aeruginosa oprF*-defiziente Stamm aufweist, während der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm ohne *lecB* Expression 37,8 % weniger Biofilm als derselbe Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor aufweist. Nach 48 h weisen die drei Deletionsstämme im Vergleich zur 24 h Kultur eine deutliche Abnahme der Biofilm-Menge auf. Nach 120 h konnten in diesen Stämmen 71-82 % weniger Biofilm als im *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm ermittelt werden. Der Vergleich der 120 h Werte zeigt, dass ein *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor 30,8 % mehr Biofilm als ein *oprF*-defizienter Stamm aufweist.

3.9.3 Die regulatorischen Einflüsse von *ansB* auf *lecB*

In einer vorherigen Studie (Funken *et al.*, 2012) konnte neben dem äußeren Membran Porin OprF (siehe 3.9.2) ein zweites Protein mittels *pull-down Assay* und MALDI-TOF Analyse identifiziert werden, welches als putativer LecB Interaktionspartner infrage kommt. Dabei handelt es sich um PA1337, bekannt als AnsB. Protein AnsB ist eine 362 Aminosäuren umfassende, periplasmatisch lokalisierte, putative Glutaminase-/Asparaginase. Interessant ist die Frage, ob die Expression von *lecB* und *ansB* miteinander verknüpft sind. Zur Analyse dieser Frage wurde eine Expressionsanalyse mittels qPCR durchgeführt (Abb. 35).

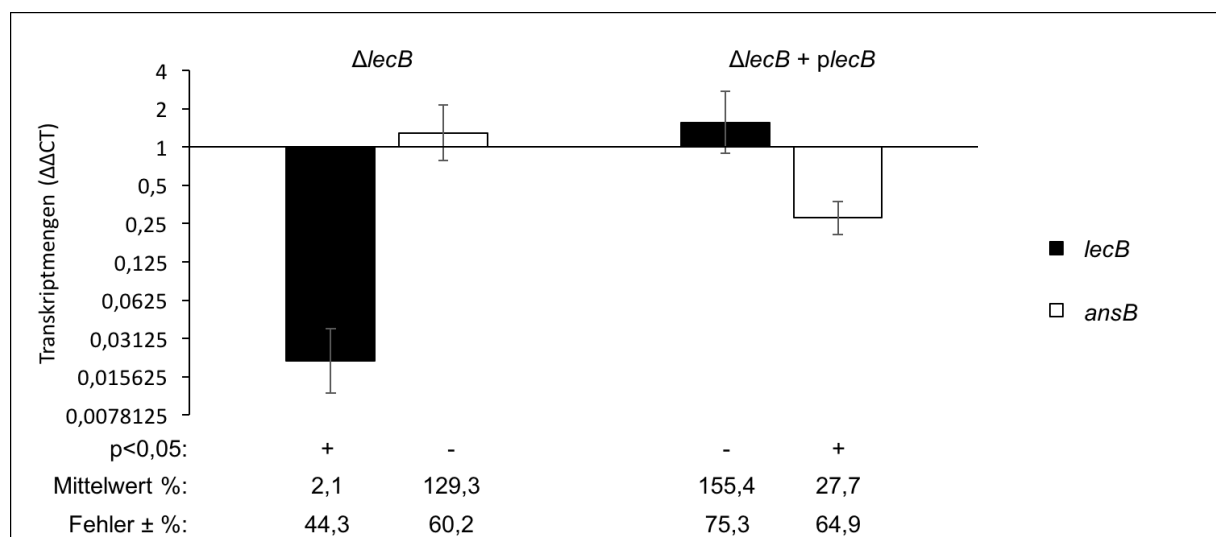


Abbildung 35 Der mögliche Einfluss von *lecB* auf *ansB*. Die Quantifizierung der *lecB*- und *ansB*-Transkriptmengen mittels qPCR des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten bzw. dem komplementierten $\Delta lecB/plecB$ -Stamm im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm, normalisiert auf das *housekeeping*-Gen *rpoD*, dargestellt als relativen Transkriptmengen ($\Delta\Delta CT_{lecB}$, $\Delta\Delta CT_{ansB}$). Dazu wurden HK aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und die RNA nach exakt 16 h isoliert (2.10.4). Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR (2.10.4) die Transkriptmengen bestimmt (n=3).

Die Expressionsstudie zeigte, dass in Abwesenheit von *lecB* die *ansB*-Transkription nicht signifikant verändert ist, wogegen die vektorbasierte Expression von *lecB* im selben Stamm zu einer 3,6-fache Abnahme der *ansB*-Transkription führt (Abb. 35). Dies könnte auf ein Gleichgewicht bzw. eine ähnliche aber entgegengesetzte Regulation hindeuten. Unterstützt wird dies durch die Quantifizierung von extrazellulärem LecB eines *P. aeruginosa* *ansB*-defizienten Stammes, welche eine 2,9-fache Abnahme von extrazellulärem LecB im Vergleich zum Referenzstamm aufweist (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte eine Expressionsstudie, dass ein *P. aeruginosa* *lecA*-defizienter Stamm ein 2,5-fach erhöhtes *ansB*-Transkriptlevel aufweist (Daten nicht gezeigt).

3.9.4 Der Einfluss von *xcpA* und *xcpQ* auf die Sekretion von LecB

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Deletion von *lecB* einen Einfluss auf die Biogenese der Typ-IV Pili hat (Sonawane *et al.*, 2006). Ergänzend dazu konnte in dieser Arbeit das Typ-IV-Pilus Biogeneseprotein PilY1 im Screening der Transposonmutanten (3.6) identifiziert werden, welches möglicherweise an der Sekretion von LecB beteiligt ist. Darüber hinaus konnte durch die Sekretomanalyse ein Protein, das NadC, identifiziert werden, welches im Falle eines *P. aeruginosa lecB*-defizienten Stammes in geringeren Mengen im Sekretom vorliegt. Das *nadC*-Gen befindet sich in genetischer Nachbarschaft zu *pilA*, *pilB* und dem *pilCD*-Operon. Da die Pili-Biogenese von der bifunktionale Prepilin-Peptidase PilD (auch bekannt als XcpA) als Teil des Typ II Sekretionsapparates in der zytoplasmatischen Membran abhängig ist, wurde mittels mELLA die extrazelluläre Menge LecB eines *P. aeruginosa pilD(xcpA)*-defizienten Stammes sowie eines *xcpQ*-defizienten Stammes untersucht (Abb. 36 B). XcpQ bildet ein Oligomer, bestehend aus 12 XcpQ-Untereinheiten die zusammen eine Pore mit einer zentralen Öffnung in der äußeren Membran formen, welche gefaltete Proteine translozieren kann und essentieller Bestandteil des Xcp-Apparates ist (Bitter *et al.*, 1998; Filloux *et al.*, 1998; Brok *et al.*, 1999).

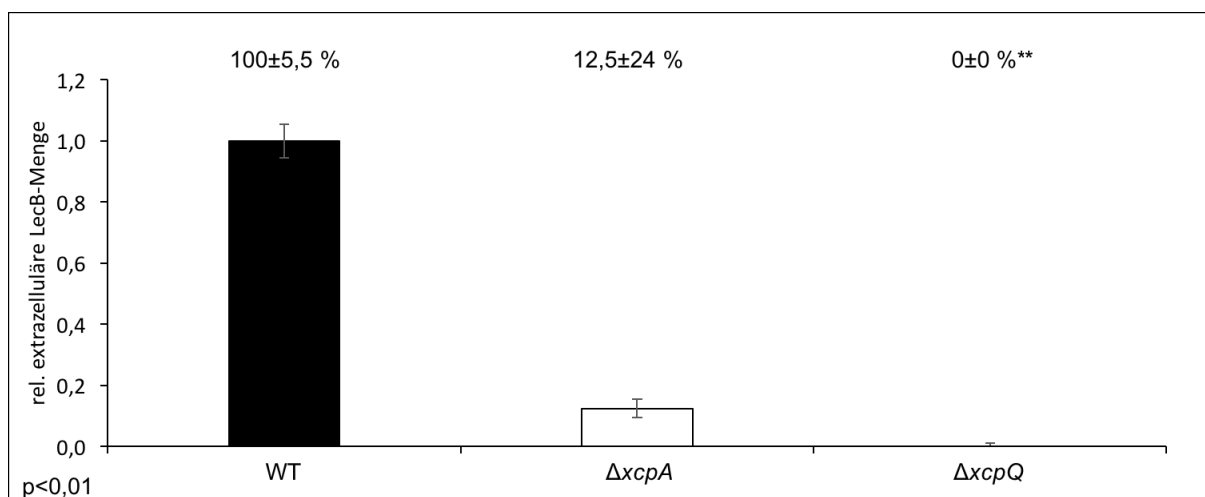


Abbildung 36 Die Deletion von *xcpA* bzw. *xcpQ* hat einen Einfluss auf die extrazelluläre LecB-Menge. Relative Quantifizierung von extrazellulärem LecB des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes (WT = 1) sowie der *xcpA*- und *xcpQ*-defizienten Stämme (n=8). Dazu wurden Hauptkulturen aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und bei 37°C inkubiert (LB-Medium, 150 UpM). Nach 24 h wurde die O.D._{580 nm} ermittelt, die Zellen mittels Zentrifugation (15 min, 4.000 x g, RT) sedimentiert und die extrazellulären Medien für die LecB-Quantifizierung mittels mELLA (2.16) verwendet. ** Es konnte kein Lumineszenz-Signal detektiert werden.

Die relative Quantifizierung (Abb. 36) von extrazellulärem LecB zeigte, dass ein *P. aeruginosa xcpA*-defizienter (-87 %) bzw. ein *P. aeruginosa xcpQ*-defizienter-Stamm (-100 %) im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm weniger LecB aufweist.

3.10 Einfluss von LecB auf die Co-Kultivierung von *Candida albicans* und *Pseudomonas aeruginosa*

In der Forschung werden häufig Monokulturen untersucht, dabei sind diese in der Natur die Ausnahme. In der Natur leben pathogene und nichtpathogene Organismen mit und nebeneinander im Mikrobiom des Lebensraumes. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Ernst (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) konnte ein möglicher physiologischer Einfluss von LecB auf co-kultivierte Humanpathogene, *P. aeruginosa* und *Candida albicans* (*C. albicans*), untersucht werden. *C. albicans* gehört zu den Hefepilzen und ist ein fakultativ pathogener Erreger, welcher ebenso wie *P. aeruginosa* immunsupprimierte Personen verstärkt infiziert.

3.10.1.1 Biofilme co-kultivierter Stämme

Sowohl *C. albicans* als auch *P. aeruginosa* bilden Biofilme zum Schutz vor mechanischen und Immunsystem-bedingten Abwehrmechanismen des Wirtes, wie zum Beispiel Antikörpern. Wie bereits gezeigt wurde, spielt LecB eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung (Tielker *et al.*, 2005) und Adhäsion von *P. aeruginosa* und der daraus vermittelten Grundlage für die Infektion des Wirtes. Die Kommunikation zwischen Organismen aus verschiedenen Bereichen des Lebens, z.B. Prokaryot vs. Eukaryot, wird als *Interkingdom-Signalling* bezeichnet (Hughes & Sperandio 2008). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss das Lektin LecB auf die Biofilmbildung und die möglicherweise damit vermittelte Kommunikation mit *C. albicans*, hat. Dazu wurde *P. aeruginosa* mit *C. albicans* für 12 bzw. 24 h inkubiert und die Biofilm-Menge mittels XTT-Reduktionstest, quantifiziert (Abb. 37).

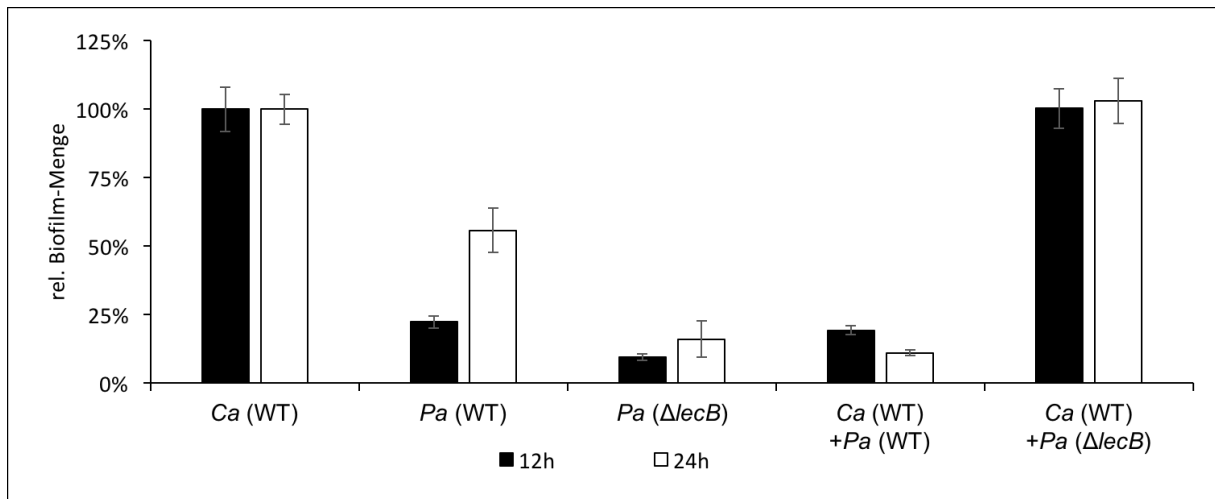


Abbildung 37 Die Deletion von *lecB* hat einen Einfluss auf die Biofilmbildung co-kultivierter Stämme. Die Biofilm Quantifizierung erfolgte mittels XTT-Reduktionstest (2.26), dazu wurden 1×10^6 Zellen für zwei Stunden Polystyrol-Flachboden-Mikrotiterplatten kultiviert, die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend in TSB Nährmedium für 12 bzw. 24 h inkubiert. Die Messung der Absorption des XTT-Reduktionstest erfolgte bei 490 nm Wellenlänge im Plattenphotometer (MWG-Biotech Spectra Max 250, Ebersberg). Für diesen Versuch wurden folgende Stämme als Triplikate kultiviert: *Ca* (WT) = *C. albicans* Referenzstamm; *Pa* (WT) = *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm, *Pa* ($\Delta lecB$) = *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter Stamm.

Die Quantifizierung der Biofilme mittels XTT-Reduktionstest, bei dem die Zellen an die Oberfläche adhären und ungebundene Zellen abgewaschen werden, zeigte, dass der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm im Vergleich zu *C. albicans* weniger Biofilm bildet, während der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stamm deutlich eingeschränkt in der Biofilmbildung ist (Abb. 37). Die Co-Kultivierung des *C. albicans* Referenzstammes mit dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm führte zu einer deutlich reduzierten Menge an Biofilm gegenüber von *C. albicans* Monokulturen. Bei Co-Kultivierung von *C. albicans* mit dem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm resultierte hingegen in ähnlichen Mengen Biofilm, wie genannte *C. albicans* Monokulturen. Daraus folgt, dass das Lektin LecB einen negativen Einfluss auf die Biofilmbildung in Co-Kultivierung hat.

Um herauszufinden, ob das LecB wichtig für die Signalkaskade zur Biofilmbildung von *C. albicans* ist, wurde ein Kontrollexperiment mit gereinigtem Lektin LecB aus *P. aeruginosa* und einem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor unter Verwendung der Biofilm-Quantifizierung mittels Kristallviolett-Färbung (2.25) durchgeführt (Abb. 38).

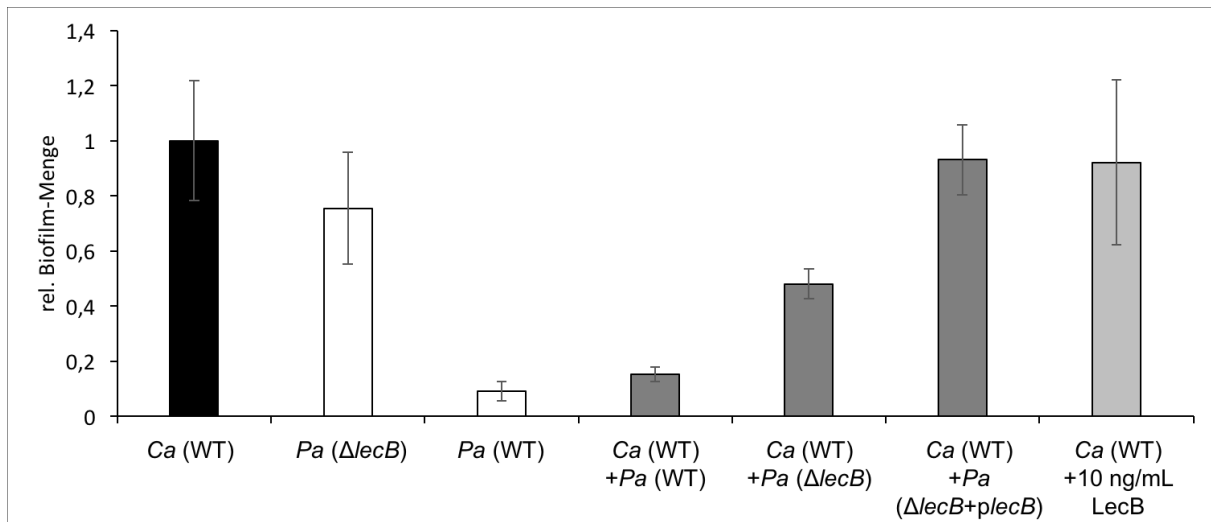


Abbildung 38 Das LecB-Protein hat keinen Einfluss auf die Biofilmbildung co-kultivierter Stämme. Die Quantifizierung der Biofilme erfolgte mittels Kristallviolett-färbung (2.25). Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme auf O.D._{580 nm} = 1,0 inokuliert und für 24 h kultiviert (150 µL LB-Medium, 37°C). Anschließend folgte die Kristallviolett-färbung (2.25) und die Messung der Absorption bei 550 nm Wellenlänge im Plattenphotometer (MWG-Biotech Spectra Max 250, Ebersberg). Ca (WT) = *C. albicans* Referenzstamm; Pa (WT) = *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm, Pa (ΔlecB) = *P. aeruginosa* lecB-defizienter Stamm, n=4.

Die Biofilmbildung mittels Kristallviolett-färbung zeigte, dass der *P. aeruginosa* lecB-defiziente Stamm nach 24 h, erwartungsgemäß zunächst mehr Biofilm in dieser Methode aufweist, als mittels XTT-Reduktionstest und in der Literatur gezeigt (Tielker *et al.*, 2005). Nach 48 h weist der *P. aeruginosa* lecB-defiziente Stamm eine deutlich reduzierte Biofilm-Menge im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm auf (Abb. 10 B). Die Biofilm-Quantifizierung mittels XTT-Reduktionstest (Abb. 37) und Kristallviolett-färbung (Abb. 38) zeigte, dass die Co-Kultivierung der beiden Referenzstämmen dazu führt, dass deutlich weniger Biofilm als in der *C. albicans* Monokulturen gebildet wird. Die Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* lecB-defizienten und *C. albicans* Referenzstamm führt zu weniger Biofilm als die Monokultivierung beider Stämme. Interessanterweise weist eine Komplementation des *P. aeruginosa* lecB-defizienten mit *plecB*-Expressionsvektor und *C. albicans* Referenzstamm ähnlich viel Biofilm auf, wie in der Monokultur des *C. albicans* Referenzstammes. Die Zugabe von 10 ng/mL gereinigtem LecB, dies entspricht der vielfachen Menge an extrazellulärem LecB die der Referenzstamm aufweist (siehe 3.4.2), zeigte keinen Einfluss auf den Biofilm des *C. albicans* Referenzstammes. Es ist davon auszugehen, dass der *plecB*-Expressionsvektor den *P. aeruginosa* lecB-defizienten Stamm in der Co-Kultivierung mit dem *C. albicans* Referenzstamm möglicherweise nicht komplementieren konnte. Dies deutet darauf hin, dass LecB nicht allein als Signal für die Biofilmbildung von *C. albicans* dient und die Deletion von *lecB* den Einfluss auf die Biofilmbildung verursacht.

3.10.1.2 Die Lipase Aktivität von Humanpathogenen in Co-Kultivierung

Die Hydrolyse von Fettsäuren durch Lipasen wird von verschiedenen Organismen genutzt, um Informationen auszutauschen und hat einen Einfluss auf die Biofilmbildung (Rosenau *et al.*, 2010). Da die Co-Kultivierung von *C. albicans* und *P. aeruginosa* einen Einfluss auf die Menge an Biofilmen aufweist (3.10.1.1), ist es möglich, dass die Regulation der Biofilmsynthese auf einer komplexen Regulierung basiert, an der LecB möglicherweise beteiligt ist. In den Analysen der Transposon-Bibliothek konnten zahlreiche verschiedene Gene identifiziert werden, welche eine Rolle in der Sekretion von LecB spielen. Eines davon ist das Gen für ExFadLO, welches ein an dem Export von Fettsäuren beteiligtes Protein ist. Um zu untersuchen, ob die Regulation von LecB möglicherweise einen Einfluss auf die Hydrolyse von Fettsäuren und damit Einfluss auf die Lipase bzw. Esterase-Aktivität aufweist, wurde mittels *p*NPB-Test (2.27) die Lipase/Esterase-Aktivität der untersuchten Stämme bestimmt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Biofilme, welche parallel zum XTT-Reduktionstest (2.26) für 24 h angezogen wurden, zentrifugiert, die Kulturüberstände abgenommen und die Zellen mittels Ultraschall lysiert. Mit diesen Proben wurde der *p*NPB-Test durchgeführt (Abb. 39).

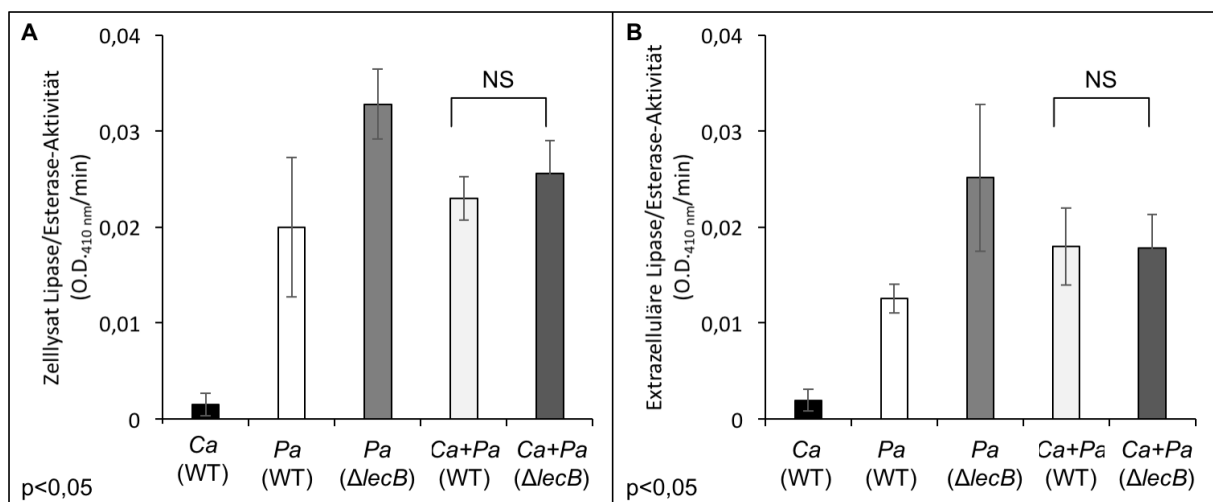


Abbildung 39 Die Deletion von *lecB* hat einen Einfluss auf die Lipase/Esterase-Aktivität von *P. aeruginosa* Monokulturen. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme auf O.D._{580 nm} = 1,0 inokuliert und für 24 h in Mikrotiterplatten kultiviert (150 µL LB-Medium, 37°C). Für die Bestimmung der Lipase/Esterase-Aktivität (2.27) wurden die entstandenen Biofilme zentrifugiert (15 min, 4.000 x g, RT). Die Überstände wurden abgenommen und das Zellpellet mittels Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Jeweils 5 µL Probenmaterial des Gesamtzelllysates bzw. 10 µL des extrazellulären Mediums wurden mit 200 µL *p*NPB-Substrat versetzt und die Kinetik der Absorption bei O.D._{410 nm} ermittelt. Die Aktivität wurde als Steigung der Änderung der O.D._{410 nm} pro Minute innerhalb des linearen Bereichs der Kinetik bestimmt. Ca (WT) = *C. albicans* Referenzstamm; Pa (WT) = *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm, Pa (Δ*lecB*) = *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter Stamm, n=3. NS = Nicht signifikant.

Der Lipase/Esterase-Aktivitätstest des Zelllysates und extrazellulären Mediums zeigte, dass die Co-Kultivierung der *C. albicans* und *P. aeruginosa* Stämme keinen Einfluss auf die

Lipase/Esterase-Aktivität hervorruft (Abb. 39). Es konnte jedoch beobachtet werden, dass ein *P. aeruginosa lecB*-defizienter Stamm in der Monokultivierung eine deutlich gesteigerte Lipase/Esterase-Aktivität im Zelllysats um 39 % und im extrazellulären Medium um 50 % gegenüber dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm aufweist ($p < 0,05$).

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von LecB auf die Physiologie und Pathogenität

4.1.1 Der Einfluss von OprF auf die Expression von *lecB*

Zur Untersuchung der Regulation von *lecB* wurden zunächst Wachstumsanalysen durchgeführt und überprüft ob die Deletion von *lecB* oder eine vektorbasierte Expression von *lecB* einen Einfluss auf das Wachstum von *P. aeruginosa* aufweist. Diese Analysen zeigten, dass die Deletion von *lecB* im Vergleich zum Referenzstamm keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. aeruginosa* in logarithmischen (Abb. 13) und stationären Phase aufweist (Abb. 9). Dies steht im Einklang mit vorherigen Studien, da gezeigt wurde, dass das LecB-Protein während der logarithmischen Wachstumsphase in keiner Fraktion detektiert werden konnte (Lecoutere *et al.*, 2012; Couto *et al.*, 2015; Reales-Calderón *et al.*, 2015) und es demnach unwahrscheinlich das LecB einen Einfluss auf das Wachstum aufweist. Die Beobachtung von LecB im Gesamtzelllysaten der stationären Phase (Abb. 7) steht in Übereinstimmung mit den vorherigen Studien von Gilboa-Garber und Kollegen die dieses ebenfalls dort detektieren konnten (Gilboa-Garber 1972a, b; Gilboa-Garber *et al.*, 1977). Die Deletion bzw. die moderate Expression von *lecB* mittels *plecB*-Expressionsvektor in einem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PAT14 Stamm, zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die maximale Zelldichte in der stationären Phase im Vergleich zum PA01 Referenzstamm (Abb. 9).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionstudien konnte festgestellt werden, dass die Deletion von *oprF*, welches der Interaktionspartner der äußeren Membran von LecB ist, einen Einfluss auf die Transkription von *lecB* in der stationären Phase aufweist und eine etwa 8-fach erhöhte Expression von *lecB* im *oprF*-defizienten Stamm beobachtet werden konnte (Abb. 31 C). Umgekehrt konnte kein Einfluss einer Deletion von *lecB* auf die Transkriptmengen von *oprF* detektiert werden (Abb. 31 C). Dies deutet auf eine *lecB*-unabhängige Expression von *oprF* hin. Auf der Gegenseite bedeutet dies jedoch, dass OprF vermutlich indirekt über einen Transkriptionsregulator die Transkription von *lecB* inhibiert, da kein DNA-binde Motiv von OprF bekannt ist (Abb. 32).

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass ein *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm die Expression des *oprF*-Promotors über einen Feedback-Mechanismus, welcher möglicherweise

durch Signale der Zellhülle das OprF fehlt aktiviert wird (Bouffartigues *et al.*, 2012). Die Expression von *oprF* in *P. aeruginosa* erreicht nach 5 h das höchste Expressionslevel, anschließend nimmt dieses deutlich ab bis ein niedriges konstantes Expressionslevel erreicht ist (Bouffartigues *et al.*, 2012). Dies funktioniert wie eine Art Zeitschaltuhr bei der die Transkription von *oprF* ab einem definierten Zeitpunkt durch einen Transkriptionsfaktor für die extrazytoplasmatische Funktion, dem Sigmafaktor SigX aktiviert wird (Bouffartigues *et al.*, 2012). Anschließend nimmt die Expression von *oprF* ab und die Transkription von *lecB* wird, möglicherweise über einen weiteren Transkriptionsfaktor, ermöglicht. Die Expression von *lecB* wird in *P. aeruginosa* unter anderem durch die beiden Transkriptionsfaktoren AmrZ und dem stationäre Phase Regulator RpoS reguliert (Winzer *et al.*, 2000; Xu & Wozniak 2015). Denkbar ist daher ein Einfluss auf die *lecB* Expression durch eine Interaktion von SigX, welches *oprF* reguliert, mit den Transkriptionsregulatoren AmrZ und RpoS über eine Kreuzreaktion des komplexen Sigmafaktor-Regulons von *P. aeruginosa*, welches kürzlich für den *P. aeruginosa* PA14 Stamm näher untersucht wurde (Schulz *et al.*, 2015). Zudem wird die Transkription von *oprF* durch den AlgU-Transkriptionsregulator gesteuert (Brinkman *et al.*, 1999; Bouffartigues *et al.*, 2012). Dies ist interessant, da die Aktivität des AmrZ Regulators AlgU-abhängig erfolgt (Baynham *et al.*, 1999) und somit die Expression von *lecB* beeinflusst. Da die genaue Regulation an dieser Stelle jedoch nicht näher aufgeklärt werden kann ist festzuhalten, dass die Deletion von *oprF* zu einer deutlich erhöhten Expression von *lecB* führt. Dies kombiniert mit der fehlenden Interaktion von OprF mit LecB erklärt die Beobachtung, dass der Stamm bereits in der logarithmischen (nach 7 h) und der stationären Phase (nach 16 h) eine signifikant erhöhte extrazelluläre Menge an LecB aufweist (Abb. 31 A, B). Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass LecB im *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm erst nach 24 h zellassoziiert (Abb. 7) und 48 h extrazellulär (Daten nicht gezeigt) mittels indirektem immunologischen Nachweis via Western Blot detektiert wurde. Ein sensitiveres immunologisches Verfahren ermöglicht die Quantifizierung von extrazellulärem LecB im Referenzstamm bereits nach 24 h. Dieses Verfahren wird als modified Enzyme-Linked Lectin Assay (mELLA) bezeichnet und wurde in dieser Arbeit entwickelt. Die genaue Funktionsweise wird in Kapitel 2.16 ausgiebig vorgestellt. Die Quantifizierung der Kulturüberstände des *P. aeruginosa* des *P. aeruginosa oprF*-defizienten Stammes nach 24 h Kultivierung im Erlenmeyer-Kolben mittels mELLA ergab, dass dieser im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm 32-fach mehr LecB aufweist (Abb. 33).

Dies unterstreicht die Lokalisierung von LecB an OprF und legt nahe, dass die fehlende Interaktion von LecB mit OprF zu einer erhöhten Freisetzung von LecB ins extrazelluläre Medium führt und die Sekretion durch die Deletion von *oprF* nicht beeinflusst ist.

Zusammengefasst zeigten die Analysen, dass die Expression von *lecB* durch OprF, welches der Interaktionspartner der äußeren Membran ist, negativ beeinflusst wird. Weitere Analysen zeigten, dass in einem *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm das LecB-Protein extrazellulär lokalisiert ist. Es ist davon auszugehen, dass OprF über einen unbekannten Mechanismus, vermutlich einem Transkriptionsfaktor, die Expression von *lecB* reguliert. Dies ist biologisch sinnvoll, um zunächst den Interaktionspartner der äußeren Membran, das OprF, für das LecB-Protein zu synthetisieren und anschließend die Transkription von *lecB* zu initialisieren. Dadurch kann die Zelle möglicherweise verhindern, dass größere Mengen ungebundenen Lektins extrazellulär freigesetzt werden. Es ist möglich, dass ein weiterer Faktor, oder die bereits gezeigte eigene Feedback-Regulation die Transkription von *oprF* inhibiert, sobald ein Schwellenwert überschritten ist (Bouffartigues *et al.*, 2012). Dies führt zur Aktivierung der *lecB* Expression wie im schematischen Modell in Abbildung 32 dargestellt.

4.1.2 Die Lokalisierung des LecB-Proteins an der äußeren Membran

In Kapitel 3.1 konnte mittels indirektem immunologischen Nachweis gezeigt werden, dass das LecB-Protein in Gesamtzellextrakten von *P. aeruginosa* PA01 Kulturen der stationären Phase vorliegt, nicht aber in extrazellulären Medien (Abb. 7, 14). Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass das LecB-Protein an die äußere Membran gebunden ist und dass das äußere Membran Porin OprF ein Interaktionspartner von LecB ist (Tielker *et al.*, 2005; Bartels 2009; Funken *et al.*, 2012). Die Lokalisierung an die Zelloberfläche über OprF ist für zahlreiche bekannte Funktionen und Einflüsse von LecB auf die Physiologie und Pathogenität von *P. aeruginosa* notwendig (4.1.3). Darüber hinaus zeigte Funken und Kollegen, dass diese Interaktion reversibel ist und LecB durch Zugabe von L-Fukose von der Zelloberfläche gelöst werden kann (Funken *et al.*, 2012). Ferner konnte beobachtet werden, dass ein *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm LecB im extrazelluläre Medium lokalisiert (Bartels 2009). In dieser Arbeit wurde, wie bereits zuvor dargestellt die Menge an extrazellulärem

LecB in dem *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm quantifiziert, welche im Vergleich zum Referenzstamm 32-fach erhöht ist (Abb. 33).

Neben dieser Quantifizierung konnte in Kapitel 3.4.2 die Menge der ungebundenen extrazellulären LecB-Moleküle pro Zelle, unter den getesteten Bedingungen ermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm etwa 18 LecB-Tetramere pro Zelle im extrazellulären Medium aufweist (Abb. 20). Der von dem komplexen *quorum sensing* System entkoppelte *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta\text{lecB}\Delta\text{oprF}$) Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor weist etwa 880 LecB-Tetramere pro Zelle zum Messzeitpunkt nach 24 h Inkubation auf (Abb. 20). Dies zeigte, dass das äußere Membran Protein OprF, wie in Vorarbeiten propagiert, für die Lokalisierung des LecB-Proteins an der äußeren Membran erforderlich, nicht aber an dessen Sekretion beteiligt ist. Die Quantifizierung von extrazellulärem LecB legte zudem nahe, dass der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm die Menge an extrazellulärem LecB reguliert und nur äußerst geringe freigesetzte Mengen LecB detektiert werden können.

Das Fehlen des strikt periplasmatischen Proteins DsbA (Bardwell *et al.*, 1991) im extrazellulären Medium (Abb. 14) deutet zudem darauf, dass auch die von Wentworth 1991 vermutete Freisetzung von Lektinen durch Zelllyse, ähnlich der Freisetzung von extrazellulärer DNA durch Autolyse (Webb *et al.*, 2003) im Gegensatz zu einer aktiven Sekretion (Wentworth *et al.*, 1991) ebenfalls nicht in Frage kommt, um die Akkumulation von LecB im extrazellulären Medium zu begründen. Darüber hinaus wurden enzymatische Analysen angefertigt, welche auf der Umsetzung des CENTA-Substrates durch die periplasmatische β -Laktamase basieren (Livermore 1995; Bebrone *et al.*, 2001), ebenfalls die Zelllyse als primäre Freisetzung von LecB ins extrazelluläre Medium ausschließen (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch trotzdem nicht völlig ausgeschlossen, dass geringe Mengen LecB durch Zelllyse und gerichtete Freisetzung von eDNA sowie weiteren Proteinen durch explosive Zelllyse (Turnbull *et al.*, 2016) freigesetzt werden.

Auffällig ist, dass eine N-terminale Fusion des *lecB*-Gens mit dem *Lumio*-Tag™, welcher für ein Hexapeptid der Aminosäuren C-C-P-G-C-C kodiert und zur Quantifizierung von LecB genutzt werden sollte, zu einer deutlich reduzierten Menge an extrazellulärem LecB führt (Abb. 17 B, C). Es zeigte sich, dass ein *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta\text{lecB}\Delta\text{oprF}$) Stamm sowohl im indirekten immunologischen Nachweis als auch in der Quantifizierung des extrazellulären

LecB-Proteins über 70 % weniger LecB mit *Lumio-Tag*TM aufweist, als der Referenzstamm mit LecB ohne *Lumio-Tag*TM (Abb. 17 B, C). Ein anschließender indirekter immunologischer Nachweis eines *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PAT14 Stammes mit *plecB*- und *plecB-L*-Expressionsvektor ergab, dass extrazellulär kein LecB detektiert wurde und die Menge an LecB im Gesamtzellextrakt unterschiedlich ist (Abb. 17 D). Der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente Stamm mit *plecB-L*-Expressionsvektor wies weniger zellassoziertes LecB auf als der gleiche Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor. Es ist möglich, dass die N-terminale Fusion des *Lumio-Tags*TM einen negativen Einfluss auf die Transkription des *lecB*-Gens aufweist oder posttranslationale Einflüsse zu diesem Ergebnis führen. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass der *Lumio-Tag*TM einen Einfluss auf die Faltung oder Lokalisierung des LecB-Proteins hat und LecB intrazellulär abgebaut wird. Die Verwendung des N-terminalen *Lumio-Tags*TM für weitere Versuche wurde daher nicht weiterverfolgt. Dies deutet jedoch darauf hin, dass der N-terminale Bereich des *lecB*-Gens für die korrekte Lokalisierung notwendig sein könnte.

Der N-terminale Bereich von Proteinen kann ein Sekretionssignalpeptid enthalten, welches den Transport des Proteins durch ein Sekretionssystem in die entsprechende Zellfraktion ermöglicht. Allerdings konnten für LecB bisher keine Sekretionssignalpeptide oder Motive für die bekannten *P. aeruginosa* Proteinsekretionsmechanismen identifiziert werden (Ma, Q. *et al.*, 2003; Tielker *et al.*, 2005). Tielker beobachtete 2001, dass das zytoplasmatische LecB-Protein ein höheres Molekulargewicht als in den übrigen Fraktionen aufweist und einen Hinweis auf eine Prozessierung des LecB-Proteins für den Transport vom Zytoplasma ins Periplasma darstellt (Tielker 2001). Es ist beschrieben, dass LecB einen Einfluss auf die Biogenese der Typ-IV-Pili und die extrazelluläre Protease IV Aktivität hat (Sonawane *et al.*, 2006). Der Einfluss auf die extrazelluläre Protease IV Aktivität erfolgt möglicherweise nicht auf die Aktivität selber, sondern auf die Menge an sekretierter Protease IV, weshalb angenommen wird, dass LecB möglicherweise die Typ-II Proteinsekretion von *P. aeruginosa* beeinflusst (Sonawane *et al.*, 2006). Daraus wurde gefolgert, dass LecB möglicherweise eine Funktion im Periplasma aufweist (Bartels *et al.*, 2011). Es konnte jedoch kein LecB im Periplasma planktonischer Zellen und in Biofilmen detektiert werden (Tielker *et al.*, 2005). In sessilen *P. aeruginosa* PA01 Zellen, welche auf NB-Medium für 48 h bei 37°C kultiviert wurden, konnte LecB in zwei Formen im Periplasma detektiert und mittels MALDI-TOF-Analyse identifiziert werden (Bartels *et al.*, 2011).

Diese beiden Formen unterscheiden sich anhand ihres Molekulargewichtes (Bartels *et al.*, 2011), allerdings umgekehrt zu der Beobachtung von Tielker (Tielker 2001). Im Periplasma konnte LecB mit einem erhöhten Molekulargewicht gegenüber den weiteren Fraktionen beobachtet werden (Bartels *et al.*, 2011). Posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Glykosylierungen, können das Molekulargewicht von Proteinen signifikant erhöhen (Totten & Lory 1990; Swanson & Kuo 1991). Die Glykosylierung von Proteinen ist in Eukaryoten weit verbreitet und dient dort als Marker für die extrazytoplasmatische Lokalisierung durch kovalente Verknüpfung eines Zuckers an das Protein (Ungar 2009). Die Glykosylierung ist jedoch nicht ausschließlich Eukaryoten vorbehalten und kann ebenso, wenn auch weniger häufig, in Prokaryoten beobachtet werden (Nothaft & Szymanski 2010). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in *P. aeruginosa* das Pilin der Typ-IV-Pili (Castric *et al.*, 2001) und das Flagellin (FliC) des Flagellums (Totten & Lory 1990; Arora *et al.*, 2001; Schirm *et al.*, 2004) *O*-glykosyliert sind. Bei der *O*-Glykosylierung werden Glykanreste an Hydroxylgruppen von Serin und Threonin verknüpft, im Gegensatz zur *N*-Glykosylierung bei der Aminogruppen von Asparagin glykosyliert werden (Szymanski & Wren 2005; Lengeler *et al.*, 2008). Das LecB-Protein weist zwei potentielle *N*-Glykosylierungsstellen an Position N21 und N34 auf (Gilboa-Garber *et al.*, 2000), wobei die *N*-Glykosylierung des Asparagins N21 nach bioinformatischer Vorhersage am wahrscheinlichsten ist (Gupta *et al.*, 2004). Nach Behandlung des möglicherweise glykosylierten LecB-Proteins mit *N*-Glykosidase F weist dieses das erwartete unglykosylierte Molekulargewicht auf und wurde als *N*-glykosyliertes Protein definiert (Bartels *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurde postuliert, dass die Glykosylierung für die Lokalisierung in der äußeren Membran notwendig sei (Bartels *et al.*, 2011). Dazu wurde das Asparagin an Position 21 im LecB-Protein gegen Alanin ausgetauscht und in einem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PA01 Stamm für 16 und 48 h vektorbasiert exprimiert (Bartels *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das mutierte LecB-Protein ohne die *N*-Glykosylierungsstelle (N21A) nach 16 h ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, während das wildtypische LecB-Protein im Periplasma lokalisiert wurde (Bartels *et al.*, 2011). Nach 48 h konnte in keiner Zellfraktion N21A-mutiertes LecB-Protein beobachtet werden, wohingegen ausschließlich wildtypisches unglykosyliertes LecB im Zytoplasma und der äußeren Membranfraktion detektiert werden konnte (Bartels *et al.*, 2011). Da dieses jedoch nach 16 h detektiert werden konnte und auch nach 48 h dieses weiter transkribiert wurde, wurde angenommen, dass die Mutation der

N-Glykosylierungsstelle zur Degradation des N21A-mutierten LecB-Proteins führt (Bartels *et al.*, 2011). Die *N*-Glykosylierung ist potentiell an der Stabilität von Proteinen beteiligt (Yasuda *et al.*, 1999; Rudd *et al.*, 2001; Skropeta 2009). Zusammengefasst wurde postuliert, dass die *N*-Glykosylierung für den Transport von LecB notwendig ist (Bartels *et al.*, 2011).

In einer früheren Arbeit konnte allerdings keine Glykosylierung von LecB beobachtet werden (Gilboa-Garber *et al.*, 2000) sowie, wie beschrieben, ein höheres Molekulargewicht von LecB im Zytoplasma beobachtet werden (Tielker 2001). In dieser Arbeit konnte keine zweite LecB-Proteinbande in SDS-PAGE-Gelen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen beobachtet werden. Der Austausch des hydrophilen Asparagins durch das hydrophobe Alanin in direkter Nähe zum hydrophilen Serin, in der Studie von Bartels (Bartels *et al.*, 2011), hat möglicherweise einen Einfluss auf die Zuckerbindefähigkeit von LecB, da die Zuckerspezifität von LecB für Monosacchariden von der Aminosäuren-Triade Ser22-Ser23-Gly24 abhängt (Adam, J. *et al.*, 2007). Darüber hinaus hat das Asparagin an Position 21 einen Einfluss auf die Koordinierung der beiden Ca^{2+} -Ionen (Sabin *et al.*, 2006), durch Asn21, Glu95, Asp99, Asp101, Asn103, Asp104 sowie der Gly114-Terminus des benachbarten Monomers (Sabin *et al.*, 2006), die entscheidend für die Zuckerbindung sind (Tielker 2005). Der Austausch der Asparaginsäure an Position 104, welche für die Ca^{2+} -Ionen Komplexierung mitverantwortlich ist, durch Alanin führt zum Verlust der Zuckerbindefähigkeit von LecB (Tielker *et al.*, 2005). Die vektorbasierte Expression des D104A-LecB-Proteins in einem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm zeigte, dass das mutierte LecB in ähnlichen Mengen wie das vektorbasierte native LecB akkumuliert, jedoch ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert ist und kein LecB an der äußeren Membran identifiziert werden konnte (Tielker *et al.*, 2005). Es ist daher davon auszugehen, dass die Zuckerbindung für die Lokalisierung und Sekretion notwendig ist. Möglicherweise erfolgt die LecB-Sekretion durch einen Co-Transport mit einem Glykoprotein oder einem kohlenhydrathaltigen Liganden (4.3.4).

4.1.3 Die biologische Funktion von LecB

Das *P. aeruginosa* Lektin LecB ist ein Kohlenhydrat-bindendes Protein mit einer Affinität zu L-Fukose im mikromolekularen Bereich (Garber *et al.*, 1987), welches in vielfältigen biologischen Prozessen und der bakteriellen Virulenz beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden,

dass das LecB-Protein *in vitro* die Zilienbewegung der Atemwegsepithelien reduziert und auf diese Weise den natürlichen Abwehrmechanismus der menschlichen Lunge inhibiert (Adam, E. C. *et al.*, 1997a; Adam, E. C. *et al.*, 1997b; Mewe *et al.*, 2005; Gustke *et al.*, 2012). In einer vorherigen Studie wurde beobachtet, dass die Deletion des *lecB*-Gens in einem *P. aeruginosa* Stamm keinen Einfluss auf die Zelldichte planktonischer Zellen nach 24 h aufweist, die Daten wurden in der Studie jedoch nicht gezeigt (Tielker *et al.*, 2005). Die Analysen des Zellwachstums planktonischer Zellen in Kapitel 3.1 bestätigen diese Ergebnisse, da die Deletion von *lecB* im Genom von *P. aeruginosa* keinen Unterschied auf die Zelldichte nach 24 h gegenüber des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes aufweist (Abb. 9). Ein *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter PATI4 Stamm zeigte eine 58-71 % reduzierte Biofilmbildung im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (Abb. 10 A). Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Tielker der unter statischen Bedingungen in NB-Medium auf Glasoberflächen beobachten konnte, dass ein *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter PATI4 Stamm bei 30 und 37°C im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm dünnere und weniger ausgebreitete Biofilme hat (Tielker *et al.*, 2005). Das LecB-Protein erleichtert möglicherweise die Zell-Zell-Interaktion, da gezeigt werden konnte, dass das gereinigte LecB-Protein an die Zelloberfläche von *P. aeruginosa* Zellen bindet (Sudakevitz & Gilboa-Garber 1982; Tielker *et al.*, 2005). Wenn die ungebundenen Zellen während der Biofilmkultivierung jedoch nicht entfernt wurden, wies der *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter PATI4 Stamm nach 24 h ähnliche Biofilmmengen wie der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm auf (Abb. 10 B, 30). Der mittels *plecB*-Expressionsvektor komplementierte *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente PATI4 Stamm verhielt sich nach 24 h ebenfalls wie der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (Abb. 10 B). Dies deutet darauf hin, dass LecB nicht ausschließlich einen Einfluss auf die Biofilmbildung selber aufweist, sondern die Adhäsion an die Oberfläche der Mikrotiterplatte vermittelt. Tielker stellte die Hypothese auf, dass das LecB-Protein an der Zelladhäsion an abiotische Oberflächen beteiligt ist, da gezeigt werden konnte, dass ein *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter Stamm unter statischen Bedingungen nicht an Glasoberflächen adhärieren konnte (Tielker 2005). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass LecB für die langfristige Kolonisierung in Biofilmen möglicherweise notwendig ist, da die Menge an Biofilmen nach 48 und 120 h unter statischen Bedingungen eines *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stammes gegenüber des PA01 Referenzstammes deutlich reduziert ist (Abb. 10 B, 30). Nach 120 h weist der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente PATI4 Stamm etwa

60 % weniger Biofilm als der PA01 Referenzstamm auf. Aufgrund der stärkeren Abnahme der Biofilmmenge durch die Deletion von *lecB* im Vergleich zum Referenzstamm, deutet dies auf eine verringerte Stabilität der Biofilme hin. Die vektorbasierte Expression des *lecB* durch den *plecB*-Expressionsvektor konnte unter den getesteten Bedingungen den wildtypischen Phänotyp des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes nicht wiederherstellen (Abb. 10 B). Zwar wies der *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor nach 16 h eine Wildtyp-ähnliche *lecB*-Transkription (Abb. 8 A) und nach 24 h eine gesteigerte Menge an extrazellulärem LecB (Abb. 8 B) auf, jedoch kann gegenwärtig keine Aussage über die Expression während der späteren Biofilmbildung getroffen werden, da diese möglicherweise deutlich erhöht ist. Für eine genaue Analyse könnten Transkriptom-Daten verschiedener Wachstumsphasen, z.B. der logarithmischen, der frühen stationären und der spät stationären Phase zur Entschlüsselung verwendet werden. Hinweise darauf, dass die konstitutive Expression von *lecB* unter Kontrolle des *lac*-Promotors auf dem *plecB*-Expressionsvektor zu diesem Zeitpunkt deutlich niedriger ist als möglicherweise unter *in vivo* Bedingungen, zeigten *twitching motility* (TM) Analysen (Abb. 11).

Es konnte gezeigt werden, dass LecB mit der Biogenese der dafür notwendigen Typ-IV-Pili von *P. aeruginosa* verknüpft ist (Sonawane *et al.*, 2006). Typ-IV-Pili sind lange, dünne Haar-ähnliche Protein-Polymere, welche verschiedenste Funktionen wie z.B. die Bindung an Wirtszellen und Oberflächen, Flagellum-unabhängige *twitching motility*, Schwärm-Fähigkeit oder die Biofilm-Bildung ermöglichen (Craig *et al.*, 2004; Burrows 2012). Die Typ-IV-Pili vermittelte *twitching motility* basiert auf der Streckung und Retraktion der polarlokalisierten Typ-IV-Pili (Bradley 1980; Skerker & Berg 2001). Die TM-Analysen zeigten, dass der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente PATI4 Stamm in der TM deutlich eingeschränkt ist (Abb. 11) und bestätigen die Beobachtung von Sonawane, dass *lecB* für die Biogenese der Typ-IV-Pili notwendig ist (Sonawane *et al.*, 2006). Während Sonawane mit einer vektorbasierten *lecB* Expression mit einem etwa 10-fach stärkeren *tac*-Promotor gegenüber dem *lac*-Promotor (de Boer *et al.*, 1983) den wildtypischen Phänotypen in einem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten Stamm wiederherstellen konnte (Sonawane *et al.*, 2006), konnte dies mit dem *plecB*-Expressionsvektor, mit *lecB* Expression unter Kontrolle des *lac*-Promotors, nicht ermöglicht werden (Abb. 11).

Neben der TM sind die Typ-IV-Pili an der Adhäsion und Mikrokoloniebildung an Oberflächen beteiligt (Craig *et al.*, 2004). Ein Defekt der Typ-IV-Pili hat zur Folge, dass die Zellen eine geringere Biofilmbildung aufweisen (Sonawane *et al.*, 2006). Dies legt nahe, dass die Deletion von *lecB* zudem die Adhäsion der Typ-IV-Pili an Oberflächen beeinflusst, da LecB an der Typ-IV-Pili-Biogenese beteiligt ist. LecB hat somit zweierlei Einfluss auf die Adhäsion, zum einen als mögliches Adhäsion und zum anderen auf die Typ-IV-Pili vermittelte Adhäsion an Oberflächen sowie die TM. Zudem spielt die Lektine-vermittelte Zell-Zell-Interaktion und Aggregation möglicherweise bei der Mikrokolonie- bzw. Biofilmbildung von *P. aeruginosa* eine Rolle (Tielker *et al.*, 2005). Wie die Interaktion von LecB und den Typ-IV-Pili abläuft ist bisher unbekannt. Möglicherweise kann eine Analogie von LecB zum FimH-Lektin des uropathogenen *E. coli* gezogen werden (Tielker 2005). Dort ist das Lektin an den Typ-I-Pili assoziiert und neben der Adhäsion an eukaryotischen Oberflächen (Old 1972; Hanson & Brinton 1988) ebenfalls an der Adhäsion an abiotische Oberflächen beteiligt (Pratt & Kolter 1998).

Neben der TM wurde die bakterielle Schwimmbewegung des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stammes untersucht. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Deletion von *lecB* keinen Einfluss auf die Schwimmfähigkeit von *P. aeruginosa* hat (Abb. 26). Auffällig ist, dass eine konstitutive Expression von *lecB* vom *plecB*-Expressionsvektor im *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stamm im Vergleich zum gleichen Stamm mit pLV-Vektor zu einer leicht verringerten Schwimmbewegung führt (Abb. 26). Dieser Einfluss konnte jedoch nicht im *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor beobachtet werden (Abb. 26). Auch ist nicht von einem Einfluss von OprF auszugehen, da der *P. aeruginosa* *oprF*-defiziente Stamm keine signifikant reduzierte Schwimmfähigkeit aufgewiesen hat (Abb. 26).

Die Schwärmbewegung von *P. aeruginosa* basiert auf einem Zusammenspiel der Typ-IV-Pili und des Flagellums in semisoliden Umgebungen und wird durch das QS-System reguliert (Köhler *et al.*, 2000; Shrout *et al.*, 2006). Die Analyse der *P. aeruginosa* Schwärmbewegung verschiedener Stämme zeigte, dass die Deletion von *lecA* und *lecB* keinen Einfluss auf die Schwärmbewegung aufweist (Abb. 27). Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur Studie von Sonawane und Kollegen, in welcher gezeigt wurde, dass die Deletion von *lecB* in *P. aeruginosa* die Typ-IV-Pili Biogenese beeinträchtigt (Sonawane *et al.*, 2006). An dieser

Stelle war auffällig, dass eine moderate konstitutive Expression von *lecB* mit dem *plecB*-Expressionsvektor im *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm zu einem deutlich reduzierten Schwärmverhalten führt (Abb. 27). Dieses konnte zudem im *P. aeruginosa* *oprF*-defizienten Stamm beobachtet werden (Abb. 27), welcher deutlich mehr extrazelluläres LecB gegenüber dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm aufweist (Abb. 33). Die Deletion von *lecB* und *oprF* im *P. aeruginosa* PATS1 Stamm führt zu einem Phänotyp, welcher einem schwimmenden Phänotyp ähnelt, wohingegen die Expression von *lecB* in diesem Stamm mittels *plecB*-Expressionsvektor zu einem gänzlich veränderten Phänotyp mit spitzauseinanderlaufenden schwärmenden Enden führt (Abb. 27).

Dies zeigte, dass LecB einen Einfluss auf die Schwärmbewegung aufweist, jedoch weitere Faktoren, wie z.B. das QS-System eine Rolle spielen. Möglicherweise kann von einem Einfluss von LecB auf das Flagellum ausgegangen werden, da die vektorbasierte *lecB* Expression im *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stamm zu einer reduzierten Schwimmfähigkeit führt. Da die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* mit einer reduzierten Schwimmfähigkeit einhergeht, ist es möglich, dass LecB an diesem umgestalteten Phänotyp beteiligt ist.

Die Sekretomanalysen zeigten zudem, dass LecB einen Einfluss auf die Expression oder Sekretion der Protease IV verfügt, weil dieses in einem *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm deutlich reduziert im Sekretom vorliegt (Tab. 12). Dieser Befund wird unterstrichen durch vorangegangene Studien, die belegen, dass ein *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter Stamm über eine reduzierte proteolytischen Aktivität durch die Protease IV aufweist (Sonawane *et al.*, 2006). Die extrazelluläre Protease IV ist einer der Schlüssel-Virulenzfaktoren in der Pathogenese von *P. aeruginosa* bei Augeninfektionen (Engel *et al.*, 1997). Die Expression des *piv*-Genes der Protease IV wird wie zahlreiche weitere Virulenzfaktoren durch das *Las-quorum sensing* System reguliert (Conibear *et al.*, 2012). Die extrazelluläre Protease IV wird vermutlich über den Typ-II-Sekretionsapparat transportiert (Traidej *et al.*, 2003). Da ein *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter PATI4 Stamm einen Einfluss auf die Biogenese der Typ-IV-Pili und die extrazelluläre Protease IV Aktivität aufweist, wurde die Theorie aufgestellt, dass LecB möglicherweise die Typ-II-Sekretion von *P. aeruginosa* beeinflusst (Sonawane *et al.*, 2006). Zahlreiche Proteine, die über die innere Membran transportiert werden weisen eine N-terminale Signalsequenz für die Translokation über das Sec-Transportsystem des *general secretion pathways* (GSP) des Typ-II-Sekretionsapparates auf. Zahlreiche dieser Proteine

werden anschließend durch eine Peptidase (XcpA) des Xcp-Apparates geschnitten, zudem ist diese Peptidase an der Typ-IV-Pili-Biogenese beteiligt und dort als PilD (= XcpA) bekannt (Bally *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1997). Ein *P. aeruginosa xcpA*-defizienter Stamm wies einen Defekt in der Typ-IV-Pili Biogenese, einen Verlust der *twitching motility* und den Verlust des Xcp-Sekretionssystems auf (Nunn *et al.*, 1990). Quantitative Messungen von extrazellulärem LecB in *P. aeruginosa xcpA*- und *xcpQ*-defizienten Stämmen zeigten, dass diese beiden Stämme im Gegensatz zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm nahezu kein extrazelluläres LecB aufweisen (Abb. 36). Dies bedeutet jedoch nicht, dass LecB über den Xcp-Sekretionsapparat transportiert wird. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Deletion von *xcpA* bzw. *xcpQ* einen Einfluss auf das *P. aeruginosa* QS-System, die *lecB*-Transkription und möglicherweise auf den Transporter von LecB aufweist.

Da Bakterien in der Natur selten als Monokulturen vorkommen (Goers *et al.*, 2014), wurde untersucht, ob LecB einen Einfluss auf die Biofilmbildung in Co-Kultivierung von *P. aeruginosa* und dem Humanpathogen *C. albicans* hat. Die Biofilmanalysen zeigten, dass LecB einen Einfluss auf die Biofilmbildung von co-kultivierten Stämmen von *C. albicans* und *P. aeruginosa* aufweist (Abb. 36). Die Co-Kultivierung des *C. albicans* Referenzstammes mit dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm führte zu einer deutlichen Abnahme der Biofilmbildung der beiden Stämme gegenüber der Monokultivierung (Abb. 37, 38). Die Co-Kultivierung des *C. albicans* Referenzstammes mit dem *P. aeruginosa lecB*-defizienten PAT14 Stamm hingegen wies die Biofilmmengen des *C. albicans* Referenzstammes auf. Es ist daher möglich, dass die Erkennung von LecB aus *P. aeruginosa* die Biofilmbildung von *C. albicans* beeinflusst und umgekehrt die Erkennung von *C. albicans* durch *P. aeruginosa* zu einem Einfluss auf dessen Biofilmbildung führt.

Ein ergänzendes Experiment dazu zeigte, dass die Co-Kultivierung von *C. albicans* mit dem *P. aeruginosa lecB*-defizienten Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor überraschenderweise mehr Biofilm aufweist als die Co-Kultivierung von mit dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (Abb. 38). Dies legte nahe, dass neben LecB weitere Faktoren einen Einfluss auf die Biofilm-Menge von *C. albicans* und *P. aeruginosa* haben. Um dies weiter zu untersuchen, wurde der *C. albicans* Stamm mit 10 ng/mL LecB kultiviert. Dabei zeigte sich, dass auch unter diesen Bedingungen wildtypische Biofilme aufgebaut wurden (Abb. 38). Allerdings fanden die ergänzenden Experimente unter veränderten Laborbedingungen statt,

bei denen die ungebundenen Zellen nicht nach zwei Stunden abgewaschen wurden. Aus diesem Grund sollte in weiteren Studien mit gereinigtem LecB, unter denselben Laborbedingungen, überprüft werden, ob *P. aeruginosa* LecB einen Einfluss auf *C. albicans* aufweist oder, ob die Deletion von *lecB* zu einem Einfluss auf die Co-Kultivierung führt.

Frühere Studien legten dar, dass die Morphogenese von *C. albicans* (Noverr & Huffnagle 2004) und die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* (Marques *et al.*, 2015) durch freie Fettsäuren als Botenstoffe, welche z.B. durch Esterasen und Lipasen hydrolysiert wurden, beeinflusst wird. Daher wurde die Lipase/Esterase-Aktivität von *P. aeruginosa* und *C. albicans* in Monokulturen und unter co-kultivierten Bedingungen untersucht. Die Monokultivierung zeigte, dass ein *P. aeruginosa lecB*-defizienter PATI4 Stamm eine um 50 % bzw. 39 % gesteigerte intra- wie extrazelluläre Lipase/Esterase-Aktivität aufweist (Abb. 39). Die Co-Kultivierung von *C. albicans* und des *P. aeruginosa* PA01 Referenz- bzw. *lecB*-defizienten Stamm zeigte keinen Einfluss auf die Lipase/Esterase-Aktivität.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass LecB einen Einfluss auf die Biofilmbildung in Monokultivierung von *P. aeruginosa* sowie auf die Biofilmbildung von *C. albicans* und *P. aeruginosa* bei der Co-Kultivierung hat. Die Deletion von *lecB* führt zu einem Defekt in der Typ-IV-Pili-Biogenese und damit zu einer veränderten TM, die zudem Einfluss auf die Typ-IV-Pili vermittelte Adhäsion hat. Es konnten Hinweise auf den Einfluss von LecB bei der Adhäsion des Bakteriums an abiotische Oberflächen beobachtet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein *P. aeruginosa lecB*-defizienter PATI4 Stamm eine erhöhte Lipase/Esterase-Aktivität aufweist und die Deletion von *lecB* einen Einfluss auf die Zell-Zell-Interaktion von *P. aeruginosa* und *C. albicans* hat.

4.1.4 Der mögliche Einfluss von LecA auf LecB

P. aeruginosa weist zwei Kohlenhydrat-bindende Proteine, die Lektine LecA und LecB, auf (Gilboa-Garber *et al.*, 1972, 1977). Diese beiden Lektine werden über das komplexe *quorum sensing* System reguliert und können in der stationären Phase beobachtet werden (Gilboa-Garber 1997; Winzer *et al.*, 2000). Das LecA-Protein weist eine vielfältige biologische Funktion auf, welche dem des LecB-Proteins ähnelt. LecA ist an der Biofilmbildung, Zellaggregation und der Adhäsion beteiligt (Lanne *et al.*, 1994; Blanchard *et al.*, 2008; Boukerb *et al.*, 2014). Die Expression von *lecB* ist an das QS-System gekoppelt, welches eine definierte Expression des Lektins Zelldichte-abhängig parallel zu weiteren Virulenzfaktoren, wie dem LecA-Protein ermöglicht (Gilboa-Garber 1997; Winzer *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde aufgrund dessen untersucht, ob eine mögliche Co-Regulation von *lecA* auf *lecB* zu beobachten ist. Dazu wurden zunächst indirekte immunologische Nachweise von LecB angefertigt. Es konnte kein Einfluss der Deletion von *lecA* in *P. aeruginosa* auf die intra- und extrazelluläre Menge LecB mittels Western Blot beobachtet werden (Abb. 14, 28). Als sensitiveres Nachweisverfahren wurde der mELLA mit Kulturüberständen des *P. aeruginosa* *lecA*-defizienter PATI3 Stammes durchgeführt und im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm eine etwa 18 % reduzierte Menge an extrazellulären LecB quantifiziert (Abb. 29 B). Die Zelldichtemessung ergab, dass die Deletion von *lecA* in der stationären Phase zu einer etwa 10 % reduzierten Zelldichte im Vergleich zum Referenzstamm führt (Abb. 28 A). Da, wie eingangs beschrieben, die Expression von *lecA* und *lecB* zu ähnlichen Zeitpunkten erfolgt, wurde eine quantitative PCR durchgeführt und das *lecB*-Transkriptlevel ermittelt. Die Deletion von *lecA* hat keinen Einfluss auf die *lecB*-Transkription (Abb. 29 A).

Zudem wurde der Einfluss der Deletion von *lecA* auf die Biofilmbildung untersucht, da in verschiedenen Studien zuvor zum Teil ein Einfluss von LecA auf die Biofilmbildung beobachtet wurde (Diggle *et al.*, 2006; Boukerb *et al.*, 2014), während andere Studien keinen Unterschied zwischen einem *P. aeruginosa* *lecA*-defizienten Stamm und dem Referenzstamm beobachten konnten (Tielker 2005). Die Quantifizierung der Biofilme zeigte, dass die Deletion von *lecA*, unter den getesteten Bedingungen, keinen Einfluss auf die Biofilm-Menge nach 24 h hat (Abb. 30). In älteren Biofilmen, nach 48 h und 120 h, zeichnete sich jedoch ein anderes Bild ab, da sowohl der *P. aeruginosa* *lecA*-defiziente PATI3 als auch der *P. aeruginosa* *lecB*-defiziente PATI4 Stamm, deutlich weniger Biofilm als der *P. aeruginosa*

PA01 Referenzstamm aufwiesen (Abb. 30). Dies steht in Übereinstimmung mit einer anderen Studie (Diggle *et al.*, 2006), dort konnte beobachtet werden, dass *P. aeruginosa* *lecA*-defiziente Stämme 49 % weniger Biofilm aufweisen und nur 57 % der Oberfläche gegenüber dem PA01 Referenzstamm überdecken (Diggle *et al.*, 2006).

Diggle und Kollegen zeigten zudem, dass das LecA im Biofilm an der äußeren Membran vorliegt und durch Zugabe von IPTG, welches einen Liganden von LecA darstellt, der Biofilm zum Teil aufgelöst werden konnte (Diggle *et al.*, 2006). Es ist davon auszugehen, dass IPTG durch LecA gebunden wird und so dieses kompetitiv inhibiert (Diggle *et al.*, 2006). Da sowohl für LecA als auch LecB gezeigt werden konnte, dass diese als Agglutine heterolog in *E. coli* exprimiert, Bakterien aggregieren (Sudakevitz & Gilboa-Garber 1982), wurde angenommen, dass die Lektin-vermittelte Zellaggregation möglicherweise die grundlegende Funktion für die Biofilmbildung ist (Diggle *et al.*, 2006). Diese Zellaggregation konnte zudem beim Einsatz von LecA-spezifischen Glykoclustern beobachtet werden, die zu einer bakteriellen Zellaggregation führt (Boukerb *et al.*, 2014).

Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass LecA einen Einfluss auf die Biofilmbildung aufweist, der überwiegende Anteil der hier gezeigten Einflüsse aber auf die extrazelluläre Menge an LecB, womöglich durch die geringere Zelldichte, zurückzuführen ist. Zudem konnte kein Einfluss der Deletion von *lecA* auf die Expression von *lecB* beobachtet werden. Eine Co-Regulation von *lecA* und *lecB* kann somit zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht wahrscheinlich.

4.1.5 Der Einfluss von AnsB auf LecB

Eine frühere Studie zeigte, dass LecB mit OprF interagiert (Funken *et al.*, 2012). Neben dem OprF konnte zudem ein weiteres Protein, das periplasmatische AnsB als ein potentieller Interaktionspartner von LecB beobachtet werden. Allerdings konnte kein Hinweis auf eine Verbindung der putativen Glutaminase/Asparaginase AnsB, außer der Beobachtung im Experiment, gefunden werden (Funken *et al.*, 2012). Dementsprechend wurde in dieser Studie untersucht, ob die Expression von *lecB* und *ansB* möglicherweise miteinander verknüpft ist (3.9.3).

Die dazu durchgeführte quantitative PCR mit Zellen der stationären Phase des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4, des mittels *plecB*-Expressionsvektor komplementierten *lecB*-defizienten PATI4 und des *lecA*-defizienten PATI3 sowie des PA01 Referenzstammes zeigte, dass die vektorbasierte Expression von *lecB* einen negativen Einfluss auf die Transkription von *ansB* aufweist (Abb. 35). Im Detail führte die moderate Expression von *lecB* zu einer 3,6-fachen Abnahme der *ansB*-Transkripte. Ein Einfluss auf die Transkription von *ansB* konnte im *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm nicht beobachtet werden. Es ist daher möglich, dass unter anderen Testbedingungen eine entgegengesetzte Expression dieser beiden Gene, bzw. eines Regulationsmechanismus, welcher die Expression der Gene im Gleichgewicht hält, stattfindet. Um dies zu überprüfen werden Expressionsstudien benötigt, welche ebenfalls einen *P. aeruginosa* *ansB*-defizienten Stamm enthalten. Interessant ist zudem, dass die Deletion von *lecA* zu einem deutlich erhöhten *ansB*-Transkript-Niveau führt und dieses gegenüber dem Referenzstamm 2,5-fach erhöht ist. Die Möglichkeit besteht, dass die beiden Lektine LecA und LecB die Expression von *ansB* inhibieren. Wie dieser Prozess funktioniert ist unbekannt.

Die Quantifizierung von extrazellulärem LecB des *P. aeruginosa* *ansB*-defizienten Stammes zeigte, dass dieser etwa 66 % weniger extrazelluläres LecB aufweist als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass AnsB einen positiven Einfluss auf die Expression von *lecB* aufweist oder an dem Transportprozess von LecB beteiligt ist. Da AnsB als periplasmatisches Protein vorhergesagt ist, ist es wahrscheinlich, dass AnsB nicht direkt auf die Expression von *lecB* einwirkt, sondern indirekt über einen nicht bekannten Interaktionspartner.

Zudem stellt sich die Frage, wie LecB und AnsB möglicherweise interagieren und ob AnsB an dem Transport von LecB ins Periplasma beteiligt ist. Da die Expression der *lecB*- und *ansB*-Gene entgegengesetzt erfolgt, ist es unwahrscheinlich, dass das AnsB-Protein direkt an dem Transport von LecB beteiligt ist. Eine bioinformatische *String*-Analyse (Szklarczyk *et al.*, 2017), welche das Protein-Protein Interaktionsnetzwerk analysiert, gibt jedoch ebenfalls keine Hinweise auf einen Zusammenhang von LecA, LecB und AnsB. Es bleibt somit offen, wie die Gegenwart von LecB die Transkription von *ansB* reprimiert und ob AnsB einen Einfluss auf *lecB* aufweist. Eine Regulation der extrazellulären LecB-Menge über AnsB ist zudem unwahrscheinlich, da ein *P. aeruginosa* *lecA*-defizienter PATI3 Stamm ein deutlich

erhöhtes *ansB*-Level aufweist, jedoch keine erhöhten Mengen an extrazellulärem LecB aufweist (Abb. 29 B). Zudem müsste in diesem Fall das Level der *lecB*-Transkripte im *P. aeruginosa* *lecA*-defizienten PATI3 Stamm erhöht sein.

4.2 Aufklärung der LecB Sekretion

Für die gezeigten physiologischen Einflüsse von LecB ist eine Lokalisierung an der äußeren Membran an OprF notwendig. Die zuvor dargelegten Quantifizierungen heben hervor, dass LecB und OprF Interaktions-, aber keine Sekretionspartner sind. Über die Sekretion von LecB ist wenig bekannt. Es ist lediglich bekannt, dass LecB alle bekannten Sekretionssignale für den Transport über die innere und äußere Membran von *P. aeruginosa* fehlen (Ma, Q. *et al.*, 2003; Tielker *et al.*, 2005) und die Fähigkeit zur Zuckerbindung für die Lokalisierung von LecB notwendig ist (Tielker *et al.*, 2005).

4.2.1 Erzeugung eines geeigneten Expressionssystems

Um der Aufklärung der Sekretion von LecB näher zu kommen, wurde ein *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stamm erzeugt und mit dem *plecB*-Expressionsvektor transformiert. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine transkriptionell vom komplexen *quorum sensing* Netzwerk entkoppelte Expression von *lecB* vom *plecB*-Expressionsvektor und der gezielten Lokalisierung von LecB im extrazellulären Medium durch Deletion des LecB-Interaktionspartners OprF der äußeren Membran aus. Die erfolgreiche Konstruktion des Stammes konnte durch PCR-Amplifikation (Abb. 12) sowie durch indirekte immunologische Nachweise mit anti-LecB-Antiseren (Abb. 14 A, B) und Quantifizierung mittels des mELLA (Abb. 14 C) bestätigt werden. Vorherige Studien zeigten, dass das äußere Membran Porin OprF für die osmotische Stabilisierung der Zelle notwendig ist und die äußere Membran mit dem Peptidoglykan verankert (Hancock *et al.*, 1981; Woodruff & Hancock 1989; Rawling *et al.*, 1998). Um einen Stabilitätseinfluss auf die Zellen zu überprüfen wurden Wachstumsanalysen angefertigt. Die durchgeführten Wachstumsanalysen der logarithmischen Phase zeigten, dass der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm dem *P. aeruginosa* *oprF*-defizientem Stamm ähnelt und im Vergleich zum *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm sowie dem *lecB*-defizienten PATI4 Stamm langsamer

wächst (Abb. 13) und eine geringere Zelldichte in der stationären Phase erreicht (Abb. 20). Dabei zeigte sich zusätzlich, dass die Zelldichte der stationären Phase des *P. aeruginosa* PA01 Referenzstammes unter den getesteten Bedingungen in Deep-Well-Platten ($\text{O.D.}_{580\text{ nm}} = 4,9$) deutlich von der des *P. aeruginosa* PATS1 Stammes ($\text{O.D.}_{580\text{ nm}} = 1,5$) abweicht (Abb. 20). Einen Einfluss auf das Wachstum konnte in einer anderen Studie ebenfalls beobachtet werden (Fito-Boncompte *et al.*, 2011). Die physikalische Stabilität und Integrität der äußeren Membran ist OprF-abhängig, weshalb *P. aeruginosa oprF*-defiziente Stämme deutlich fragiler als der Referenzstamm sind (Gotoh *et al.*, 1989; Fito-Boncompte *et al.*, 2011). Um sicherzustellen, dass die Deletion von *oprF* auf die Mikrokultivierung keinen Einfluss hat, wurde vergleichend das Experiment im Erlenmeyer-Kolben bei 150 anstelle von 650 UpM wiederholt. Dabei zeigte sich, dass der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm unter diesen Bedingungen nahezu dieselbe Zelldichte erreichte. Der indirekte immunologische Nachweis des periplasmatischen DsbA (Bardwell *et al.*, 1991) in extrazellulären Medien des *P. aeruginosa* PATS1 Stammes, welcher in Deep-Well-Platten kultiviert wurde, zeigte, dass keine erhöhte Zelllyse durch die Deletion von *oprF* vorliegt (Abb. 14 A). Von einer übermäßigen Belastung der Zelle aufgrund der Kultivierungsbedingungen ist dementsprechend nicht auszugehen.

Da bekannt ist, dass die Deletion von *oprF* zu einer erhöhten Synthese der *pel*-Gene und einem erhöhten c-di-GMP Level führt (Bouffartigues *et al.*, 2015), hat dies einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*. Ein direkter Einfluss auf LecB über das c-di-GMP-Level oder die *pel*-Synthese ist bisher nicht untersucht worden, wäre aber ein interessanter Ansatz für weiterführende Studien. Die Analyse der Biofilmbildung des *P. aeruginosa* PATS1 Stammes zeigte, dass die Deletion von *lecB* und *oprF* zu einer deutlich erhöhten Biofilmmenge nach 24 h im Vergleich zum PA01 Referenzstamm führt (Abb. 34). Durch zusätzliche vektorbasierte Expression von *lecB* in diesem Stamm konnte die Biofilmmenge eines *oprF*-defizienten Stammes, welche im Vergleich zum Referenzstamm etwa 40 % erhöht war erzielt werden. Die Deletion von *lecB* und *oprF* hat zudem einen deutlichen Einfluss auf die Biofilmmenge in späteren Biofilmen nach 48 und 120 h, welche um bis zu 80 % reduziert ist.

Der konstruierte *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor wies unter den getesteten Mikrokultivierungsbedingungen in Deep-Well-Platten 26 bis 47-fach mehr

extrazelluläres LecB, bezogen auf die Zelldichte gegenüber dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm, auf (Abb. 14 C, 20 B). Dabei zeigte sich, dass die absolute Menge an extrazellulärem LecB, unabhängig von der Zelldichte, in einem *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor 15-fach gegenüber dem PA01 Referenzstamm erhöht ist (Abb. 20 A). Unter Kultivierungsbedingungen im Erlenmeyer-Kolben konnte bis zu 200-fach mehr extrazelluläres LecB im *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor gegenüber dem *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm ermittelt werden (Abb. 33). Die deutlich gesteigerte Menge von extrazellulären LecB ermöglichte im Folgenden eine detaillierte quantitative Analyse von Stämmen, welche durch ein Transposon-bedingt, weniger LecB sekretieren. Zudem zeigten indirekte immunologische Nachweise von LecB, dass die konstitutive vektorbasierte Expression von *lecB*, welche unter Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors erfolgte, nicht zu einer Akkumulierung von LecB innerhalb der Zelle führt (Abb. 14 B). Dies deutet darauf hin, dass das Sekretionssystem diese deutlich gesteigerten Mengen von LecB sekretieren kann.

Abschließend wurde der *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor für die Konstruktion einer Tn5-Transposon-Bibliothek für das mELLA-Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung des Sekretionsmechanismus von LecB genutzt. Die erzeugte Tn5-Transposon-Bibliothek umfasst $6,5 \times 10^4$ Transposonmutanten (3.5.2).

4.2.2 Gewinnung von LecB für die Etablierung des Testsystems

Um die nachfolgende Entwicklung und Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB zu ermöglichen, wurde gereinigtes LecB-Protein benötigt. Dazu wurde dieses sowohl homolog aus *P. aeruginosa* PA01 und dem *plecB*-Expressionsvektor als auch heterolog aus *E. coli* BL21 (DE3) mit dem *plecB*-Expressionsvektor exprimiert und gereinigt (Abb. 16). Das Verfahren zur Reinigung von LecB wurde bereits etabliert (Tielker 2005). In früheren Studien wurde für die heterologe *lecB* Expression ein Expressionsvektor mit induzierbaren T7-Promotor verwendet (Tielker 2005; Bartels 2009). In dieser Arbeit wurde ein *plecB*-Expressionsvektor genutzt, welcher in *P. aeruginosa* konstitutiv *lecB* exprimiert (Tielker 2001). Dies ermöglicht eine frühzeitige Expression von *lecB* und erhöht die absolute Menge an zellassoziiertem LecB-Protein, wie der indirekte immunologische Nachweis zeigte (Abb. 14 A). Die quantitative PCR (Abb. 8 A)

legte dar, dass ein *P. aeruginosa* *lecB*-defizienter PATI4 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor ähnlich viel *lecB*-Transkripte transkribiert, wie der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm in der stationären Phase nach 24 h Kultivierung. Durch die Proteinreinigung mittels D-Mannose-Agarose-Säulenmatrix und anschließenden Dialyseschritten konnten aus dem *P. aeruginosa* PA01 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor 12 mg/L und aus dem *E. coli* BL12 (DE3) Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor 194 mg/L isoliert werden. Zwei vorherige Studien von Tielker und Bartels zeigten, dass diese 65-70 mg LecB pro Liter heterolog in *E. coli* BL12 (DE3) produzieren und isolieren konnten (Tielker 2005; Bartels 2009). Allerdings wurde in den Studien ein *pEC2*-Expressionsvektor verwendet, welcher zwar ebenfalls eine geringe Kopienzahl aufweist, wie der hier verwendete *plecB*-Expressionsvektor, jedoch eine relativ starke T7-Expression von *lecB* nutzt. Die moderate *lecB* Expression des *plecB*-Expressionsvektors steht unter Kontrolle des *lac*-Promotors, welcher eine niedrige konstante Expression ermöglicht. Es ist möglich, dass eine weniger starke Expression die Faltung des LecB positiv beeinflusst, während fehlgefaltene Proteine durch eine starke Expression abgebaut werden oder als Einschlusskörper akkumulieren (Williams *et al.*, 1982; Schoner *et al.*, 1985). Diese können möglicherweise nicht über die natürliche Affinität zu den immobilisierten Kohlenhydraten der Säulenmatrix gebunden werden. Zudem wurde in den vorherigen Studien die Expression von *lecB* in der logarithmischen Phase induziert, während in dieser Arbeit die Expression konstitutiv auf einem moderaten Level erfolgte. Die moderate und konstante Expression von *lecB* ermöglichte eine 2,8-fache LecB Ausbeutensteigerung gegenüber den beiden vorherigen Studien (Tielker 2005; Bartels 2009).

4.2.3 Entwicklung eines Hochdurchsatzverfahrens zur Quantifizierung von extrazellulärem LecB

Der in der Literatur bekannte ELLA ermöglicht die Quantifizierung von gereinigten Lektin-Proben durch Biotinylierung des Lektins und Streptavidin-konjugierter Peroxidase Quantifizierung eines Substrates (de Bentzmann *et al.*, 2014). Für die nachfolgenden Analysen ist eine Methode erforderlich, welche sensitiv und spezifisch LecB quantifiziert. Dazu ist es notwendig, die Biotinylierungsreaktion gegen spezifische Antiseren für LecB auszutauschen. Grundlegend sollten zwar lediglich spezifische Lektine an den Immobilisierungszuckern binden, durch die Biotinylierung werden jedoch unspezifisch

gebundene Proteine ebenso biotinyliert wie Proteine, welche eine Affinität zu dem Immobilisierungszucker aufweisen. Der in dieser Arbeit entwickelte modified Enzyme-Linked Lectin Assay (mELLA) unterscheidet an dieser Stelle entscheidend vom ELLA, da zur Steigerung der Spezifität ein weiterer Antikörper spezifisch zum zu untersuchenden Lektin eingesetzt wird. Der Flaschenhals des klassischen ELLA ist die hohe notwendige Menge an Lektin (>2 mg/mL) sowie die Biotinylierung von unspezifisch gebundenen weiteren Proteinen der Gesamtüberstände, welche eine spezifische Quantifizierung des Lektins ausschließen.

Durch Verwendung von Lektin-spezifischen Antiseren kann dieses gezielt in Gemischen quantifiziert werden. Der Austausch des Immobilisierungs-Zucker-PAA-Konjugates von D-Galaktose hin zu L-Fukose, für das LecB eine deutlich höhere Affinität aufweist (Garber *et al.*, 1987), ermöglichte die Immobilisierung von 19-fach mehr LecB an die Mikrotiterplatte. (Abb. 18). Zudem konnte eine deutlich gesteigerte Sensitivität (<0,06 ng/mL) im Fukose-basierten mELLA mit gereinigtem Lektin LecB erzielt werden (Abb. 19).

Der mELLA wurde anschließend als Quantifizierungsmethode für LecB-haltige Lösungen, wie Kulturüberstände und gereinigte LecB-Proben in Puffer, etabliert und der Konzentrationsbereich ermittelt, in dem die Menge an LecB mit Lumineszenzsignal korreliert. Der lineare Messbereich des mELLA konnte zwischen 0,25 und 62,5 ng/mL LecB ermittelt werden (Abb. 19 B) und ermöglicht die Quantifizierung des *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor, da dieser unter Mikrokultivierungsbedingungen 10,5 ng LecB pro Milliliter Kulturüberstand aufweist und dies innerhalb der Grenzen des linearen Bereiches des mELLA liegt (Abb. 19 B, 20 A). Zudem ermöglicht der entwickelte mELLA die Quantifizierung von geringen Mengen LecB auf Wildtyp-Niveau und Stämmen, welche bis 0,25 mg LecB pro Milliliter aufweisen, weshalb ebenfalls Regulationsstudien von Stämmen, welche einen Einfluss auf die LecB Sekretion aufweisen untersucht werden können, wie dies exemplarisch für die Deletion von *amrZ* präsentiert wurde (Abb. 20 C).

Zusammengefasst konnte der mELLA erfolgreich für die Quantifizierung von LecB-haltigen Lösungen und extrazellulären Medien von *P. aeruginosa* Kulturen entwickelt und etabliert. Die gesteigerte Sensitivität ermöglicht die Quantifizierung von extrazellulären Medien im Hochdurchsatzverfahren ohne eine notwendige Konzentrierung der Proben, z.B. durch

TCA-Fällung. Der mELLA ist somit als Quantifizierungsmethode für Sekretionsstudien geeignet.

4.3 Die putativen Sekretionspartner von LecB

Die Aufklärung des Sekretionsweges des Lektins LecB erfolgte neben der proteomischen Analyse der Kulturüberstände mit dem mELLA-Hochdurchsatzverfahren. Das mELLA-Hochdurchsatzverfahren basierend auf der Quantifizierung von extrazellulärem LecB einer Transposon-Bibliothek des *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta\text{lecB}\Delta\text{oprF}$) Stammes mit *plecB*-Expressionsvektor zeigte, dass eine Vielzahl von Transposonmutanten die Sekretion von LecB deutlich beeinflussen (Abb. 22). Unter den getesteten Bedingungen konnten 1,7 % der Stämme beobachtet werden, welche weniger als 15 % LecB im Vergleich zum *P. aeruginosa* PATS1 Referenzstamm mit *plecB*-Expressionsvektor sekretieren. Zudem konnte ein Stamm beobachtet werden, welcher deutlich mehr LecB gegenüber dem Referenzstamm sekretiert (Abb. 22). Der Transposonintegrationsort dieses Stammes konnte jedoch weder durch die Inverse-PCR, die *Plasmid-rescue*- oder *Single-Primer*-Methode lokalisiert werden. In künftigen Studien sollte dieser Stamm erneut analysiert werden, da die deutlich erhöhte Menge an extrazellulärem LecB auf einen Regulator der LecB-Sekretion hindeuten könnte. Im Gegensatz zu diesem Stamm konnten 19 Transposonintegrationsorte der weiteren Transposonmutanten, mit 15 verschiedenen Genen identifiziert werden (Tab. 11). Eine anschließende bioinformatische Analyse verfügbarer Transkriptom-Daten (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003) zeigte, dass überraschenderweise keines der durch das Transposon getroffenen Gene QS-reguliert ist. Dies legt nahe, dass die erzielten Ergebnisse nicht auf Basis eines Artefaktes im komplexen QS-Systems verursacht wurden.

4.3.1 Die verschiedenen putativen Sekretionspartner von LecB

Unter den identifizierten Genen, welche möglicherweise an der Sekretion von LecB beteiligt sind, befinden sich die drei zellulären Transporter ExFadLO, *mexY* und PA2204. Der ExFadLO Transporter scheint an dem Export von langkettigen sauerstoffhaltigen Fettsäuren, den oxygenierten Oleinsäurederivaten beteiligt zu sein und ist in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* lokalisiert (Martinez, E. *et al.*, 2013). Neben *ExFadLO* wurde das Gen *mexY*, welches für ein 1.045 Aminosäuren umfassendes Protein der zytoplasmatischen Membran

kodiert, als ein potentieller Sekretionsfaktor von LecB beobachtet (Abb. 22). MexY ist sowohl an der Zellteilung als auch dem Export von Antibiotika beteiligt (Morita *et al.*, 2012) und weist zahlreiche Homologien (>60.000; UniProtKB) zu *multidrug*-Transportern z.B. AcrB, D, F (*E. coli* K12), ArpB (*Pseudomonas putida*), MdtB (*Yersinia pestis*) oder MdtC (*Salmonella enteritidis*) auf. Eine frühere Studie zeigte, dass ein *P. aeruginosa* *mexX*- und *mexY*-defizienter Stamm deutlich weniger OprM-Proteine in der äußeren Membran aufweist. Diese Erkenntnis deutet darauf hin, dass OprM mit dem Exportsystem assoziiert ist (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999). Dies könnte die Verbindung des MexXY-Systems zum Roc1-Regulationssystem sein und indirekt Einfluss auf das c-di-GMP-Level der Zelle nehmen (siehe Kapitel 4.3.2).

Das Gen *PA2204* eines putativen ABC-Transporters wurde ebenfalls in der LecB-Sekretionsstudie beobachtet (Tab. 11). ABC-Transporter besitzen als Strukturelement eine ATP-bindende Kasette, kurz ABC (Davidson & Chen 2004). Die Funktion des *PA2204* wurde als ionotroper Glutamatrezeptor auf Basis eines eukaryotischen Homologie-Modells vorhergesagt (SMART: SM00079). Ionotrope Glutamat Rezeptoren sind eine hochkonservierte Familie von Ligand-gesteuerten Ionenkanälen, die sowohl in Tieren und Pflanzen als auch in Bakterien vorkommen und eine wichtige Rolle in der synaptischen Kommunikation im Nervensystem von Wirbeltieren spielen (Mayer & Armstrong 2004). Zudem konnte in Prokaryoten wie *P. aeruginosa* eine Bindefähigkeit von periplasmatischen (SMART: SM00062) und extrazellulären (Pfam: PF00497) Substraten als Solute-binde Protein vorgeschlagen werden (InterPro). Dies legt eine Lokalisierung im Periplasma und eine Interaktion mit der äußeren Membran nahe, was für ABC-Transporter charakteristisch ist (Davidson & Chen 2004). Zudem enthält das 268 Aminosäuren umfassende Protein (UniProtKB: Q9I1R3) ein N-terminales Signalpeptid für das Sec-Translokon (Position 1-21; SignalP 4.0; Pred-TAT) und konnte im Sekretom von *P. aeruginosa* PA01 einer früheren Studie beobachtet werden. In der Studie wurde der putative ABC-Transporter *PA2204* als möglicher Interaktionspartner von LecA identifiziert (Skoczinski 2010). Ein direkter Hinweis auf die Interaktion zwischen LecB und *PA2204* konnte bisher nicht gefunden werden.

Ferner wurde das Gen *PA3753* identifiziert, welches zu 95,9% mit *dapH* Sequenz identisch und in einem Operon mit *PA3750*, *purT* (*PA3751*), *PA3752* und *PA3754* lokalisiert ist. Das *dapH*-Gen kodiert für die zytoplasmatische *N*-Acetyltransferase DapH, die eine trimere LpxA-

ähnliche Domäne aufweist (IPR011004). UDP-N-Acetylglukosamin Acyltransferasen (LpxA) sind an der Lipid A Biosynthese des LPS beteiligt (Smith, E. W. *et al.*, 2015).

Interessanterweise kodiert das letzte Gen in dem Operon für das Protein PA3750, welches ein nicht charakterisiertes Protein darstellt. Dieses umfasst 249 Aminosäuren und weist eine SGNH Hydrolase-artige Esterase-Domäne auf (IPR013830). Enzyme, welche diese Domäne enthalten, weisen eine Esterase und Lipase-Aktivität auf, zeigen jedoch eine geringe Sequenzhomologie zu echten Lipasen. Möglicherweise ist die gesteigerte Lipase/Esterase-Aktivität eines *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PAT14 Stammes auf eine fehlende Co-Regulation von LecB mit diesem Operon zurückzuführen (Abb. 39). Zudem konnte das Gen *rimO* identifiziert werden, welches ebenfalls einen Einfluss auf die LecB-Sekretion aufweist (Abb. 22). Dieses kodiert für ein konserviertes zytoplasmatisches Protein, dass eine Methylthiotransferase-Aktivität (MTTase) aufweist. Der Zusammenhang von *rimO* mit der LecB Sekretin konnte nicht gefunden werden.

Darüber hinaus wurde in der Hochdurchsatzanalyse das Operon der Hydrolase Fole2 identifiziert, welches eine reduzierte extrazelluläre Menge an LecB aufweist (Abb. 22). Das Gen *foIE2* (PA5539) befindet sich in einem Operon mit *PA5540* und *pyrQ* (PA5541) und kodiert für eine 298 Aminosäure umfassende GTP-Zyklohydrolase (Fole2; UniProtKB: Q9HT35). Während die Proteine PA5540 und PyrQ zytoplasmatisch lokalisiert sind, ist dies für Fole2 unbekannt. Naheliegend ist jedoch ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisierung, da zudem mittels SignalP 4.0 (Petersen *et al.*, 2011) kein Signalpeptid identifiziert werden konnte und das Substrat zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die Fole2 Hydrolase konvertiert GTP zu 7,8-dihydroneopterin 3'-Triphosphat (InterPro: MF_01527_B, UPA00848) und ist in der metabolischen (KEGG-Database: pae01100) und Folsäurebiosynthese (KEGG-Database: pae00790) beteiligt. Aufgrund der Anordnung nachfolgender Gene in einem Operon, könnte das Transposon zudem Einfluss auf diese Gene haben. Das Gen *pyrQ* kodiert ebenfalls für eine Hydrolase (InterPro: PS00483), die PyrQ Dihydroorotase (UniProtKB: Q9HT33) und das Gen *PA5540* für ein nicht charakterisiertes Protein (UniProtKB: Q9HT34), welches zytoplasmatisch lokalisiert ist. Dieses enthält ebenfalls, wie DapH, eine trimere LpxA-ähnliche Domäne, wie sie auch in *E. coli* vorkommt. Das *E. coli* LpxA/GlmU ist das erste Enzym in der Lipid A Biosynthese. Das Lipid A von *P. aeruginosa* ist Bestandteil des Lipopolysaccharides (LPS), welches in der äußeren

Membran lokalisiert und mit der Virulenz von *P. aeruginosa* assoziiert ist (Pier 2007). Erste nicht gezeigte DOT-Blot-Analysen von LPS und LecB zeigten, dass die verwendeten anti-LPS-Antiseren ebenfalls Signale gegen *P. aeruginosa* LecB aufweisen.

Es ist daher möglich, dass das Lektin LecB an die Zuckerstrukturen des LPS bindet. Dies bedarf jedoch weiterer Analysen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass das zuckerbindende-Lektin LecB von *P. aeruginosa* pleiotrope Einflüsse auf die Zelle hat, die teils bekannt und teils unbekannt sind. Es wurden zahlreiche Gene identifiziert, welche zu einer reduzierten extrazellulären Menge LecB führen. Direkte Hinweise auf eine Interaktion von LecB mit diesen konnten nicht ermittelt werden. Diese Daten stellen den Ausgangspunkt weiterführender Analysen für die Aufklärung der Sekretion von LecB dar.

4.3.2 Der mögliche Einfluss des Roc-Systems der *cup*-Gene auf die Sekretion von LecB

Das mELLA-basierte Hochdurchsatzverfahren zur Analyse der extrazellulären LecB-Mengen der Transposon-Bibliothek zeigte, dass ein Regulationssystem von *P. aeruginosa*, das Roc1-Regulationssystem, durch Transposons beeinflusst wurde (Tab. 11). Das Transposon konnte im Gen *rocR* identifiziert werden, zudem wurden in nachfolgenden Analysen zwei weitere Transposons in weiteren Transposonmutanten identifiziert (Daten nicht gezeigt). Eines davon liegt ebenfalls im Gen *rocR* (55_B2_14,9), das andere im Gen *rocS1* (59_B3_9,2). Die Funktion des Roc1-Systems (*regulator of cup*) ist die Regulation der *cupB*- und *cupC*-Gencluster des *P. aeruginosa* PAK Stammes (Kulasekara *et al.*, 2005). Der erste Schritt der Infektion ist die initiale Adhäsion an den Wirt. Vallet und Kollegen zeigten, dass neben dem Flagellum und den Typ-IV-Pili die Cup-Fimbrien eine entscheidende Rolle in der Adhäsion und der Einleitung der Biofilmbildung spielen (Vallet *et al.*, 2001).

Diese wurden 2001 in *P. aeruginosa* entdeckt und nach ihrem Bildungsprozess benannt, dem *chaperone-usher pathway* (Vallet *et al.*, 2001). Die Cup-Fimbrien unterscheiden sich grundlegend von den Typ-IV-Pili (Vallet *et al.*, 2001) und sind in Gram-negativen Bakterien konserviert. Die Gene für die Cup-Fimbrien sind in Clustern organisiert. In *P. aeruginosa* sind fünf *cup*-Fimbrien Gencluster (*cupA-E*) bekannt, wobei der *cupD*-Gencluster ausschließlich

auf der Pathogenitätsinsel PAPI-1 des *P. aeruginosa* Stammes PA14 identifiziert wurde und somit nicht in *P. aeruginosa* PA01 vorhanden ist (He *et al.*, 2004). Der *cupA*-Gencluster scheint für die Adhäsion an unbewegliche Oberflächen und an der Initiierung der Biofilmbildung beteiligt zu sein (Vallet *et al.*, 2001; Vallet *et al.*, 2004). Diese Art der Adhäsion ist Typ-IV-Pili unabhängig (Vallet *et al.*, 2001). Zudem wurde angenommen, dass die Cup-Fimbrien gegenüber den Typ-IV-Pili in frühen Phasen der Adhäsion eine Rolle spielen (Vallet *et al.*, 2001). Die Bedeutung der initialen Adhäsion konnte zudem in homologen Typ-I-Pili von *E. coli* beobachtet werden (Pratt & Kolter 1998). Die Cup-Fimbrien bestehen grundlegend aus mindestens drei Basiselementen, der Fimbrienhauptkomponente, dem Chaperon und einer Lokalisierungseinheit (*usher*). Die Cup-Fimbrienhauptuntereinheit wird im Zytoplasma produziert über das Sec-Translokon des Typ-II-Sekretionssystems ins Periplasma transloziert (Pugsley 1993; Thanassi *et al.*, 1998). Dort wird dieses durch das zugehörige Chaperon gefaltet und vor der Degradation geschützt. Anschließend werden diese zum *usher* transportiert, welches eine Pore für die Assemblierung der Pilusfaser auf der Zelloberfläche bildet (Thanassi *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass der negativ-Regulator MvaT spezifisch den *cupA1*-Promotor herunterreguliert (Vallet *et al.*, 2004). Die Deletion von *mvaT* führt zudem zu einer erhöhten Expression des *cupA*-, wie auch der beiden weiteren *cupB*- und *cupC*-Gencluster und einer deutlich erhöhten Menge an Biofilm (Vallet *et al.*, 2004). Neben der erhöhten Biofilmmenge kann eine Zunahme der Mikrokoloniegröße beobachtet werden (Vallet *et al.*, 2004). Die drei *cupABC*-Gencluster kodieren für unterschiedliche Typen von Adhäsinen, welche möglicherweise die adaptive Anpassungsfähigkeit an unterschiedlichste Oberflächen ermöglichen (Vallet *et al.*, 2001). Eine Überexpression von *mvaT* zeigte eine reduzierte Oberflächenabdeckung gegenüber dem *P. aeruginosa* Referenzstamm (Vallet *et al.*, 2004), da allerdings LecA, welches an der Adhäsion, Biofilmbildung und Zellaggregation beteiligt ist (Wentworth *et al.*, 1991; Lanne *et al.*, 1994; Blanchard *et al.*, 2008; Boukerb *et al.*, 2014) ebenfalls durch MvaT negativ reguliert wird (Diggle *et al.*, 2002), wurde ein *P. aeruginosa mvaT*- und *lecA*-defizienter Stamm untersucht und gezeigt, dass dieser deutlich gesteigerte Oberflächenabdeckung als ein *P. aeruginosa lecA*-defizienter Stamm aufweist (Vallet *et al.*, 2004). Daraus wurde geschlossen, dass weitere Gene an der Biofilmbildung, welche durch MvaT reguliert werden, beteiligt sind (Vallet *et al.*, 2004). Es ist möglich, dass ausschließlich die Zellen, die an einer unbeweglichen Oberfläche lokalisiert sind, eine starke induzierte *cup*-Genexpression

aufweisen, während weiter von der Oberfläche entfernte planktonische und in Biofilmen eingeschlossene Zellen diese nicht exprimieren (Vallet *et al.*, 2004). Dies erklärt warum ein *mvaT*-defizienter Stamm ein erhöhtes Adhäsionsvermögen aufweist, da die *cupA*-Expression (Vallet *et al.*, 2004) sowie die *lecA* nicht inhibiert wird (Diggle *et al.*, 2002; Vallet *et al.*, 2004). Während 2001 dargelegt wurde, dass die *cupB*- und *cupC*-Gencluster keine Auswirkung auf die Adhäsion und Biofilmbildung unter den getesteten Bedingungen aufwiesen (Vallet *et al.*, 2001), konnte durch Mutation des negativ-Regulators MvaT die Expression der beiden Gencluster erhöht werden und ein erhöhter Einfluss auf die Oberflächenbesiedlung und größeren Biofilmen beobachtet werden (Vallet *et al.*, 2004). Alle *cup*-Gencluster, mit Ausnahme des *cupA*-Clusters, welcher durch die CgrABC-Proteine und den negativ-Regulator MvaT reguliert werden (Vallet *et al.*, 2004; Vallet-Gely *et al.*, 2007), werden durch ein Zweikomponentensystem von *P. aeruginosa* reguliert (Mikkelsen *et al.*, 2011). Die Regulierung der *cupB*- und *cupC*-Gencluster übernimmt das Roc1-System des *P. aeruginosa* Stammes (Kulasekara *et al.*, 2005). Das Roc1-System besteht aus einer Sensorkinase (RocS1) und zwei Antwortregulatoren (RocA und RocR). Die RocS1-Sensorkinase ist membranständig an der Zytoplasmamembran verankert und weist sowohl eine periplasmatische als auch zytoplasmatische Domäne auf (Kulasekara *et al.*, 2005), während RocA zytoplasmatisch lokalisiert ist und eine Antwortdomäne hat. RocR ist wie RocS1 in der Zytoplasmamembran verankert und weist eine Phosphodiesterase-Aktivität auf, welche den sekundären c-di-GMP Botenstoff degradiert (Rao *et al.*, 2008). Die Funktion des Systems basiert auf der Aktivierung von RocA1 und RocR1 durch RocS1, wobei die Aktivierung von RocA1 die Expression der *cupC*-Gene induziert und zu einer erhöhten Oberflächenanhaftung des Bakteriums führt, während die Aktivierung von RocR1 die Expression von *cupC*-Genen reprimiert. Durch eine Aktivierung von RocR erhöht sich möglicherweise dessen Affinität zu der Sensorkinase RocS1, wodurch die Phosphorylierung und Aktivierung von RocA1 unterbunden wird (Kulasekara *et al.*, 2005). Durch die Verhinderung der Aktivierung von RocA1 wird die Expression der *cupBC*-Gencluster inhibiert und möglicherweise das c-di-GMP Level durch Hydrolyse von RocR reduziert (Kulasekara *et al.*, 2005). Der genaue Prozess der *cupC*-Expressionsinhibierung durch RocR1 ist bisher unbekannt. Es ist jedoch möglich, dass dies durch den Abbau des c-di-GMP-Levels erfolgt (Kulasekara *et al.*, 2005). Ebenso unbekannt ist, wie die Balance zwischen Aktivierung und Inaktivierung des *cupC*-Genclusters über RocS1 erfolgt. Möglicherweise basiert das Gleichgewicht auf der Menge und Gegenwart

des RocS1-Sensors sowie dessen Kinase- oder Phosphatase-Aktivität (Mikkelsen *et al.*, 2011). Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass der Funktionsverlust von RocR durch das Tn5-Transposon zu einem erhöhten c-di-GMP-Level führt.

Ein erhöhtes c-di-GMP-Level führt zu einer erhöhten Expression von Typ-IV-Pili (Ribbe *et al.*, 2017) und Biofilmen (Merritt *et al.*, 2007), wohin gegen die Expression der Gene des Flagellums reduziert wird (Hickman & Harwood 2008). Zur Verifizierung der Daten wurde der Aktivator des RocR-Effektors, der RocS1-Sensor mittels einer Tn5-Transposonmutante inaktiviert und die Produktion der Biofilmmenge quantifiziert (siehe Anhang: Abb. 41). Dabei zeigte sich, dass ein *P. aeruginosa rocS1*-defizienter Stamm Wildtyp-ähnliche Biofilmmengen aufweist (Abb. 41 B). Daneben wurde die Menge an extrazellulärem LecB eines *P. aeruginosa rocS1*-defizienten Stammes quantifiziert. Die Quantifizierung hatte zum Ergebnis, dass dieser Stamm etwa 34 % weniger extrazelluläres LecB aufweist als der Referenzstamm (Abb. 41 A). Möglicherweise spielt ein weiterer unbekannter Effektor bei der RocS1-abhängigen Regulation der LecB-Sekretion eine Rolle. Dieses Roc1-System konnte zudem als Regulator für die Biofilmbildung im *P. aeruginosa* Stamm PA14 (Kuchma *et al.*, 2005), als Homolog zum BvgSAR-Virulenzregulator von *Bordetella*-Spezies (Arico *et al.*, 1989; Arico *et al.*, 1991; Merkel *et al.*, 1998; Kulasekara *et al.*, 2005) und als *P. aeruginosa* Virulenzfaktor im *Caenorhabditis elegans* Infektionsmodell identifiziert werden (Gallagher & Manoil 2001; Kulasekara *et al.*, 2005). Die Analyse des Roc1-System legt nahe, dass das durch deren Abwesenheit in den Transposonmutanten das c-di-GMP-Level beeinflusst wird, welches möglicherweise einen Einfluss auf die Regulation des Transportprozesses von LecB aufweist. Zudem ist hervorzuheben, dass die extrazelluläre LecB Anwesenheit mit einem weiteren Adhäsionsfaktor, den Cup-Fimbrien, korreliert. In künftigen Experimenten sollte daher geklärt werden, ob ein *P. aeruginosa rocR*-defizienter Stamm ein verändertes *lecB* Expressionsniveau aufweist. Zusätzlich sollten *cupB*-defiziente Stämme analysiert und die Lokalisierung des LecB-Proteins in diesen Stämmen überprüft werden.

4.3.3 Der Einfluss der Typ-IV-Pili auf die Sekretion von LecB

In Kapitel 3.8 wurde bereits beschrieben, dass die Deletion von *lecB* in *P. aeruginosa* pleiotrope Einflüsse hervorruft. Die Sekretomanalyse des *P. aeruginosa* PA01 Referenz- und des *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stammes zeigte, dass zahlreiche Proteine im *lecB*-defizienten PATI4 Stamm in geringeren Mengen vorlagen (Abb. 25, Tab. 12). Eines dieser Proteine das zytoplasmatische NadC ist eine Nicotinat-Nukleotid-Pyrophosphorylase. Dessen Zusammenhang mit LecB ist nicht offensichtlich. Interessant ist jedoch, dass sich das *nadC*-Gen in genetischer Nachbarschaft zum *pilA*-Gen der Typ-IV-Pili befindet. Sonawane und Kollegen zeigten zuvor bereits, dass LecB an der Typ-IV-Pili-Biogenese beteiligt ist (Sonawane *et al.*, 2006). Die Analyse der Transposon-Bibliothek hatte zum Ergebnis, dass ein Transposon, welches die LecB Sekretion beeinträchtigt, im Gen *pilY1* lokalisiert wurde (Tab. 11). Das PilY1-Protein ist essentiell für die Pilus-Assemblierung (Alm *et al.*, 1996b) und wird vom polycistronischen *minor pilin* Operon unter Kontrolle des AlgR-Transkriptionsregulators (Lizewski *et al.*, 2004; Belete *et al.*, 2008), welcher Wachstumsphasen-abhängig ist (Lizewski *et al.*, 2004), kodiert. Die korrekte Pilus-Biogenese ist notwendig für die bakterielle Pilus-vermittelte Adhäsion und *twitching motility* (Sonawane *et al.*, 2006). Eine Mutation in den Pilusgenen *pilB*, *pilC* und *pilY1* führt zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit von *P. aeruginosa* (O'Toole & Kolter 1998). Zwar bilden diese eine einzelne Zellschicht auf abiotischen Oberflächen, allerdings ist eine Mikrokoloniebildung und die daraus resultierende Differenzierung für die Biofilmbildung nicht möglich (O'Toole & Kolter 1998). Die Typ-IV-Pili gelten somit als zentrale Faktoren für die Oberflächenadhäsion und Kolonisierung (O'Toole & Kolter 1998). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die bakterielle *twitching motility* auf dem essentiellen, Calcium-abhängigen Regulator PilY1 basiert (Orans *et al.*, 2010). Neben der *twitching motility* konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Schwärmfähigkeit und Biofilmbildung umgekehrt über einen gemeinsamen Mechanismus reguliert sind (Caiazza *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2007; Merritt *et al.*, 2007). In vielen bakteriellen Spezies, wie auch *P. aeruginosa*, wird die umgekehrte Regulation der Biofilmbildung und Schwärmbewegung über das intrazelluläre c-di-GMP Signalmolekül reguliert (D'Argenio & Miller 2004; Jenal 2004; Simm *et al.*, 2004; Romling *et al.*, 2005). Das PilY1-Protein, welches einen möglichen Einfluss auf die Sekretion von LecB aufweist, inhibiert die bakterielle Schwärmfähigkeit und unterstützt die Biofilmbildung (Kuchma *et al.*, 2012). Dies erfolgt durch eine Interaktion mit der Diguanylatzyklase SadC, welche den

sekundären Botenstoff c-di-GMP synthetisiert (Merritt *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2010), während die BifA Phosphodiesterase den Abbau der c-di-GMP-Levels katalysiert, wodurch die Biofilmbildung reduziert und die Schwärmbewegung wiederaufgenommen wird (Kuchma *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass hohe c-di-GMP Konzentrationen die bakterielle Schwärmbewegung von *P. aeruginosa pel*-unabhängig, inhibieren (Kuchma *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2010). Das PilY1 ist der Dreh- und Angelpunkt für die Regulation des cAMP und c-di-GMP Signalwegs, durch einen oder mehrere unbekannte Liganden (Luo *et al.*, 2015). Durch das Chp-System erfolgt eine Erhöhung des cAMP-Levels, welches eine Vfr-abhängige Transkription des *minor pilin* Operons, worin sich ebenfalls *pilY1* befindet, auslöst (Fuchs *et al.*, 2010a; Luo *et al.*, 2015). Daraus resultiert eine erhöhte PilY1 Expression an der Zelloberfläche, was wiederum als Signal durch PilMNOP-Komplex zur Aktivierung der SadC-Untereinheit führt (Luo *et al.*, 2015). Diese Aktivierung hat ein erhöhtes c-di-GMP Level zur Folge, weshalb die Bewegungsaktivität reduziert und die Sessilität gefördert wird (Luo *et al.*, 2015). Vfr ist ein übergeordneter globaler Transkriptionsregulator, welcher das QS-System (Pesci *et al.*, 1997), die *twitching motility* (Beatson *et al.*, 2002) und das Typ-III-Sekretionssystem (Wolfgang, M. C. *et al.*, 2003) positiv reguliert, während es die Expression der Flagellengene reprimiert (Dasgupta *et al.*, 2002). Die *twitching motility* (TM) von *P. aeruginosa* wird nicht von einem bekannten Zell-Zell-Signalsystem des QS-reguliert (Beatson *et al.*, 2002), das QS-Netzwerk ist jedoch an der Ausbildung der Strukturen, welche für TM notwendig sind beteiligt (Davies *et al.*, 1998). Beatson legte dar, dass Vfr für die Regulation der TM notwendig ist (Beatson *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass PilY1 einen Feedback-Mechanismus aufweist, wodurch die Transkription des eigenen Operons unterbunden wird, in dem PilY1 die Aktivität von Vfr über einen unbekannten Mechanismus reduziert (Luo *et al.*, 2015). Dies hängt möglicherweise mit der Inhibierung des PilJ-Sensors, welcher das cAMP-Level beeinflusst oder mit dem FimS-Regulator durch PilY1, welcher einen Einfluss auf den AlgR-Transkriptionsregulator hat, zusammen (O'Toole & Wong 2016). Zudem konnte eine aktuelle Studie zeigen, dass ein hohes c-di-GMP-Level das cAMP-Level reduziert (Almblad *et al.*, 2015). Der Funktionsverlust von PilY1 hat daher möglicherweise pleiotrope Einflüsse auf das Gleichgewicht verschiedener Botenstoffe wie cAMP- und c-di-GMP. Dies alleine erklärt jedoch nicht die Beobachtung, dass ein *P. aeruginosa lecB*-defizienter Stamm einen Defekt in der Typ-IV-Pili Biogenese aufweist (Sonawane *et al.*, 2006). Möglicherweise gibt es eine Interaktion von LecB mit den Typ-IV-Pili, analog zu dem

FimH-Lektin des uropathogenen *E. coli*, welches an den Typ-I-Pili assoziiert ist und die Adhäsion an eukaryotische und abiotische Oberflächen vermittelt (Old 1972; Hanson & Brinton 1988; Pratt & Kolter 1998).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass durch das Transposon beeinflusste *pilY1*-Operon eine entscheidende Rolle in der Typ-IV-Pilus Biogenese, der bakteriellen Bewegung und der Adhäsionsfähigkeit des Bakteriums spielt. Zudem ist es wahrscheinlich, dass das Transposon im *pilY1*-Gen zu einem Funktionsverlust von PilY1 führt. Dies könnte zur Folge haben, dass Vfr nicht über die Feedbackregulation von PilY1 reprimiert wird und dies zu einer Verschiebung der cAMP- und c-di-GMP-Level mit pleiotropen Einflüsse führt. Dadurch könnte die Sekretion des LecB-Proteins in das extrazelluläre Medium reduziert sein. Es ist zudem nicht auszuschließen, dass LecB über das Typ-IV-Pili-System möglicherweise transportiert wird.

4.3.4 Der putative Zucker-vermittelte Co-Transport von LecB

Eine ältere Studie postulierte, dass möglicherweise für die Freisetzung von LecB die Zelllyse verantwortlich ist (Wentworth *et al.*, 1991). Diese Hypothese kann eine gewisse Menge an freigesetztem Lektin erklären, jedoch konnte die Zelllyse und damit die Freisetzung von periplasmatischem DsbA, welches als Zelllyse-Indikator genutzt wurde, in Kapitel 3.2 nicht beobachtet werden, wohingegen geringe Mengen LecB in der Zytoplasmafraktion (Abb. 14 B) und dem extrazellulären Medium (Abb. 14 C) detektiert wurden. Dies legt einen Sekretionsmechanismus für LecB nahe. Wie dieser Transport funktioniert, konnte bisher nicht gezeigt werden. Es ist jedoch bekannt, dass der Zucker-bindende Loop des LecB für die Translokation vom Zytoplasma an die äußere Membran notwendig ist (Tielker *et al.*, 2005). Eine Mutation im Zucker-bindenden Loop hat allerdings keinen Einfluss auf die Produktion von LecB und weist dieselben zytoplasmatischen Mengen wie das native LecB auf (Tielker *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass die LecB-Sekretion möglicherweise durch einen Transport mit einem Glykoprotein oder einem kohlenhydrathaltigen Liganden erfolgen kann. Erste Hinweise auf einen Kohlenhydrat-abhängigen Transport konnten bereits beobachtet werden. Die Analyse der Transposon-Bibliothek mittels mELLA zeigte, dass die Glykosyltransferase des Flagellums (FgtA) als potentieller Sekretionspartner von LecB identifiziert werden konnte (Tab. 11).

Die zelluläre Funktion des *P. aeruginosa* FgtA-Proteins ist die Glykosylierung des bakteriellen Flagellins. Lange Zeit ist davon ausgegangen worden, dass Protein-Glykosylierungen ein wichtiger posttranslationale Modifikationsprozess von eukaryotischen Zellen ist, allerdings konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass viele sekretierte oder auf der Zelloberfläche lokalisierte Proteine von Bakterien ebenfalls glykosyliert sind (Benz, I. & Schmidt 2002; Nothaft & Szymanski 2010). Die O-Glykosylierung von potentiellen Virulenzfaktoren wie den Pili von *Neisseria gonorrhoeae* (Parge *et al.*, 1995), *Neisseria meningitidis* (Stimson *et al.*, 1995) und einem *P. aeruginosa* 1244 Stamm (Castric 1995) konnte bereits bestätigt werden. Daneben wurde gezeigt, dass die Flagellum-Filamente in verschiedensten bakteriellen Spezies, z.B. *P. aeruginosa* (Brimer & Montie 1998), *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni* (Doig *et al.*, 1996), *Treponema pallidum* (Wyss 1998), *Borrelia burgdorferi* (Ge *et al.*, 1998), *Helicobacter felis* (Josenhans *et al.*, 1999), *Caulobacter crescentus* (Leclerc *et al.*, 1998) und *Agrobacterium tumefaciens* (Deakin *et al.*, 1999) ebenfalls glykosyliert werden. Dies führte zu dem Schluss, dass die Glykosylierung bei Bakterien möglicherweise verbreiteter ist, als in höher entwickelten Zellen (Arora *et al.*, 2001).

Neben den bereits benannten Genen, welche möglicherweise an der Sekretion von LecB beteiligt sind (Tab. 11), wurde das Gen der Glykosyltransferase des Flagellums *fgtA* (*PA1091*) identifiziert, dessen Funktion die Glykosylierung des bakteriellen Flagellins FliC ist. Das Flagellum von *P. aeruginosa* kann in zwei Gruppen (a-Typ und b-Typ) unterteilt werden, basierend auf deren Molekulargewicht (a-Typ: 45-52 kDa (Arora *et al.*, 2004); b-Typ: 53 kDa (Brimer & Montie 1998)) und der posttranslationalen O-Glykosylierung des Flagellins mit Deoxyhexose (Spangenberg *et al.*, 1996; Brimer & Montie 1998; Arora *et al.*, 2000; Arora *et al.*, 2001). Der *P. aeruginosa* Stamm PAK weist a-typische, der Stamm PA01 und 1244 hingegen b-typische O-Glykosylierung des Flagellins auf (Arora *et al.*, 2000; Arora *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2006). Die Glykosylierung des Flagellins spielt dabei eine wichtige Rolle in der Virulenz von *P. aeruginosa* Verbrennungsinfektionen (Arora *et al.*, 2005). Für die Glykosylierung sind sogenannte genetische Inseln verantwortlich, die für das jeweilige System einzigartig sind und nicht zwischen a- und b-Typ getauscht werden können (Brimer & Montie 1998; Arora *et al.*, 2001). Bei dem *P. aeruginosa* PA01 Stamm besteht diese genetische Insel für die Glykosylierung des Flagellins FliC aus den Genen *PA1089*, *PA1090* und *PA1091* die in einem Operon mit *PA1088* kodiert werden (Verma *et al.*, 2006).

Dabei ist die Rolle von *PA1089*, *PA1090* bisher unbekannt. Diese Gene sind jedoch für die korrekte Glykosylierung notwendig, während *PA1088* keine Rolle spielt (Verma *et al.*, 2006). Bekannt ist, dass das b-Typ Flagellin FliC von *P. aeruginosa* PA01 durch die Flagellar Glykosyltransferase FgtA (ehemals RfbC; *PA1091*) glykosyliert wird (Verma *et al.*, 2006). Dabei wird das Flagellin-Monomer an den zwei Serin-Resten Ser191 und Ser195 glykosyliert, weshalb das Molekulargewicht des Flagellins um 709 Da ansteigt (Verma *et al.*, 2006). Das FliC wird anschließend mittels des Typ-III-ähnlichen Sekretionsapparates des Flagellums sekretiert und polymerisiert anschließend am Kopf des Flagellums mit weiteren FliC-Polymeren. Das Filament des Flagellums besteht aus 20.000 FliC-Proteinen und wird abgeschlossen durch das FliD-Protein (Haiko & Westerlund-Wikstrom 2013). Es ist anzunehmen, dass ein Deoxyhexose-Monosaccharid an der Position Ser191 und Ser195 mittels Glykosylierung angefügt und mit einer einzigen Phosphatgruppe von 209 Da verknüpft wird (Verma *et al.*, 2006).

Die in Kapitel 3.7 identifizierte Transposonmutante von *fgtA* zeigte eine verminderte LecB Sekretion. Die Liganden für LecB sind Deoxyhexosen wie L-Fukose, D-Galaktose und D-Mannose (Garber *et al.*, 1987), welche ebenfalls die Substrate von FgtA sind. Dies legt nahe, dass FgtA ein (in)direkter Interaktionspartner von LecB sein könnte und das glykosylierte FliC als putativer Interaktionspartner von LecB in Frage kommt. Um dies zu bestätigen, wurde ein *P. aeruginosa fliC*-defizienter Stamm kultiviert und die Menge an extrazellulärem LecB im Vergleich zum Referenzstamm mittels mELLA ermittelt (Abb. 24). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm eine signifikant reduzierte Menge (-67,7 %) an extrazellulärem LecB aufweist. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Menge an extrazellulärem LecB und FliC hin. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein *P. aeruginosa fliC*-defizienter Stamm an der effizienten Adhäsion an Oberflächen beeinträchtigt ist (Vallet *et al.*, 2001). Allerdings wies eine andere Studie von Suriyanarayanan und Kollegen darauf hin, dass ein *P. aeruginosa fliC*-defizienter Stamm mehr Biofilm als der Referenzstamm aufweist (Suriyanarayanan *et al.*, 2016). Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, da ein *P. aeruginosa fliC*-defizienter Stamm, unter den getesteten Bedingungen, weniger Biofilm als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm aufwies. Dies geht mit der Beobachtung einher, dass ein *P. aeruginosa fliC*-defizienter Stamm signifikant weniger extrazelluläres LecB aufweist (Abb. 24) und dieses für die Biofilmbildung notwendig ist (Tielker *et al.*, 2005). Diese Beobachtungen zusammengefasst deuten darauf hin, dass LecB

möglicherweise die Deoxyhexose von FliC bindet und über den Sekretionsapparat des Flagellums mit FliC co-transportiert wird. Die Analyse der Transposon-Bibliothek zeigte, dass möglicherweise das Flagellum, die Cup-Fimbrien als auch die Typ-IV-Pili an der Sekretion von LecB beteiligt sind. Dies legt nahe, dass die LecB Sekretion nicht unbedingt auf ein Sekretionssystem beschränkt ist. Da das Flagellin von *P. aeruginosa* (Brimer & Montie 1998) und in einigen Stämmen die Typ-IV-Pili glykosyliert sind (Castric 1995), ist es durchaus möglich und am naheliegendsten, dass der Transport von LecB über einen Zucker-vermittelten Co-Transport erfolgt. Dazu wird ein schematisches Modell des Zucker-vermittelten Co-Transportes von LecB mit FliC vorgeschlagen (Abb. 40).

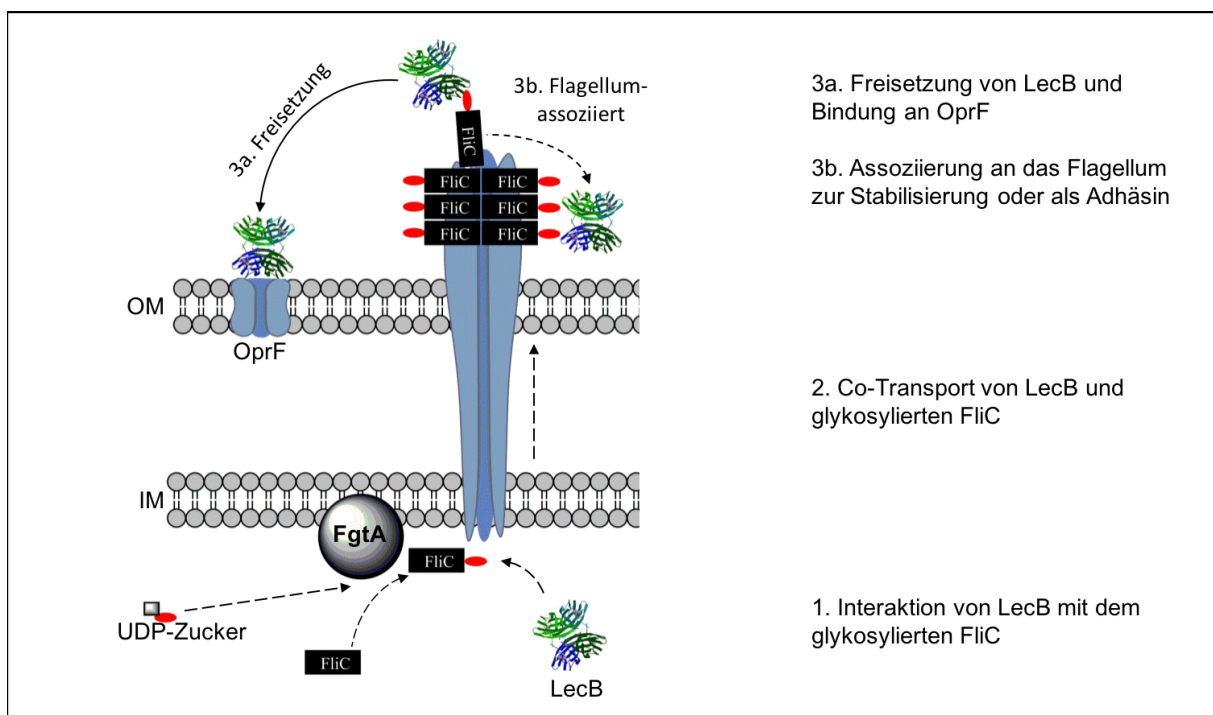


Abbildung 40 Hypothetisches Modell des FliC-vermittelten LecB Co-Transportes. Zunächst wird FliC durch FgtA unter Verwendung eines UDP-aktivierten Zuckers glykosyliert. Anschließend erfolgt die Interaktion von LecB mit dem glykosylierten FliC. Dieser Komplex wird durch den Sekretionskanal des Flagellums über die innere Membran (IM) und äußere Membran (OM) sekretiert. Die exportierten FliC-Monomere polymerisieren an der Spitze des Flagellums und präsentieren das gebundene LecB an der außen Seite. In dieser Situation könnte das an das Flagellum assoziierte LecB als Adhäsion wirken oder die Struktur des Flagellums stabilisieren. Bei Adhäsion des Bakteriums an eine Oberfläche und anschließender Biofilmbildung wird das Flagellin depolymerisiert, wodurch das LecB freigesetzt wird und eine Interaktion mit OprF eingehen könnte.

Zusammengefasst konnte ein Einfluss der Glykosyltransferase des Flagellums auf die Menge an extrazellulärem LecB beobachtet werden. Weitergehende Studien legten nahe, dass das durch die Glykosyltransferase glykosylierte Flagellin an der Sekretion von LecB beteiligt ist. Die Daten wurden zusammengefasst und ein hypothetisches Modell des Zucker-vermittelten Co-Transportes von LecB mit FliC entwickelt (Abb. 40). Um dieses hypothetische Modell zu überprüfen ist es notwendig, Interaktionsstudien von LecB und FliC anzufertigen sowie zu

überprüfen, ob die Glykosylierung von FliC für die Interaktion entscheidend ist. Offen ist die Frage, wie die Interaktion von LecB an OprF zustande kommt, wenn LecB an FliC gebunden wäre. Möglicherweise geht dies mit der Beobachtung einher, dass die Expression des *fliC*-Gens in *P. aeruginosa* Biofilmzellen gegenüber planktonischen Zellen reduziert ist (Garrett *et al.*, 1999). Durch die Adhäsion der Typ-IV-Pili an eine Oberfläche wird das cAMP-Level erhöht und es kommt zu einer Aktivierung des Vfr-Regulators (Luo *et al.*, 2015), welcher zum einen die Transkription der Flagellengene reduziert (Dasgupta *et al.*, 2002) und zum anderen eine PiliY1-abhängige Erhöhung des c-di-GMP Levels zur Folge hat, wodurch die Biofilmbildung induziert wird (Luo *et al.*, 2015). Dadurch wird unter anderem die Bewegungsfähigkeit des Bakteriums reduziert (Luo *et al.*, 2015) und das Flagellin depolymerisiert (Smith, M. F., Jr. *et al.*, 2003; Casilag *et al.*, 2015), wodurch möglicherweise die zuvor gebundenen LecB-Moleküle an der bakteriellen Oberfläche freigesetzt werden und OprF binden. Abschließend ist festzuhalten, dass die Ergebnisse auf einen Zucker-vermittelten Transport von LecB hindeuten, welcher möglicherweise durch die Komplexe zum Aufbau der verschiedenen Adhäsionsstrukturen von *P. aeruginosa* ermöglicht wird. Es konnten Hinweise auf einen möglichen Co-Transport von LecB mit FliC gefunden werden.

5 Zusammenfassung

Das Gram-negative Bakterium *P. aeruginosa* ist opportunistisch humanpathogen und ist an einer Vielzahl von krankenhausessoziierten Infektionen und Infektionen von immunsupprimierten Patienten beteiligt. Der entscheidende Schritt für die erfolgreiche bakterielle Infektion ist die initiale Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle und die Biofilmbildung. Sowohl die Adhäsion als auch die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* wird unter anderem durch das Kohlenhydrat-bindenden Lektin LecB vermittelt, weshalb dieses als potentiell Ziel für die Entwicklung von Pharmazeutika gilt. Daneben ist LecB an der Mobilität des Bakteriums beteiligt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass LecB pleiotrope Einflüsse auf verschiedene Prozesse der Zelle, welche mit der Virulenz-assoziiert sind, aufweist. So konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *lecB* in einem bestehenden *P. aeruginosa* *lecB*-defizienten PATI4 Stamm einen Einfluss auf das Sekretom und die Menge an Biofilmen hat, sowie dass die intra- wie extrazelluläre Esterase-Aktivität beeinflusst wird. Natürlicherweise leben Bakterien zum Großteil eingebettet in Biofilmen und teilen sich ihre Umwelt mit anderen Organismen. Die Analyse der Biofilmbildung von co-kultivierten *P. aeruginosa* und *C. albicans* Stämmen zeigte, dass die Deletion von *lecB*, nicht aber die Gegenwart von gereinigtem LecB, einen Einfluss auf die Menge des Biofilms in Co-Kultivierung aufweist.

Darüber hinaus konnten dieser Arbeit Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss von OprF, welcher ein Interaktionspartner von LecB darstellt, auf *lecB* beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass ein *P. aeruginosa* *oprF*-defizienter Stamm eine etwa 8-fach erhöhte Transkription von *lecB* aufweist und LecB früher (nach 7 h) als der Referenzstamm (nach 48 h) sekretiert. Die extrazelluläre LecB-Menge ist in einem *P. aeruginosa* *oprF*-defizienten Stamm nach 24 h 32-fach erhöht gegenüber dem Referenzstamm.

Für die Aufklärung der Sekretion von LecB wurde ein *P. aeruginosa* PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) Stamm konstruiert und mit dem *plecB*-Expressionsvektor transformiert. Es konnte gezeigt werden, dass der *plecB*-Expressionsvektor eine moderate konstitutive *lecB* Expression aufweist, welche der *lecB* Expression des Referenzstammes ähnelt. Dieser *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor weist eine vom QS-System entkoppelte konstitutive Expression von *lecB* auf und lokalisiert das LecB durch die fehlende Interaktion

mit OprF im extrazellulären Medium. Die extrazelluläre Lokalisierung von LecB in einem *P. aeruginosa oprF*-defizienten Stamm zeigte, dass OprF kein Sekretionspartner von LecB ist. Die extrazelluläre LecB-Menge konnte mit dem in dieser Arbeit entwickelten und etablierten modified Enzyme-Linked Lectin Assay (mELLA-) Hochdurchsatzverfahren, welches eine Quantifizierung von LecB im linearen Bereich zwischen 0,25-62,5 ng/mL ermöglicht, quantifiziert werden. Die Kombination dieses Verfahrens mit dem ebenfalls hier erzeugten *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor, der nach mELLA-Quantifizierung je nach Kultivierungsbedingung, zwischen 26- bis 200-fach mehr LecB im extrazellulären Medium aufweist als der *P. aeruginosa* PA01 Referenzstamm, erwies sich als geeignetes System zur nachfolgenden Analyse der Sekretion von LecB mittels Transposon-Bibliothek.

Es wurde eine Tn5-Transposon-Bibliothek im *P. aeruginosa* PATS1 Stamm mit *plecB*-Expressionsvektor erzeugt, welche $6,5 \times 10^4$ Transposonmutanten umfasst. Diese Bibliothek wurde verwendet, um mithilfe des mELLA nach Stämmen zu suchen, welche eine reduzierte LecB-Sekretion aufweisen, wobei 1,7 % von über 2.800 der untersuchten Transposonmutanten weniger als 15 % extrazelluläre LecB-Menge im Vergleich zum Referenzstamm zeigen. Durch die Identifizierung des Transposonintegrationsortes wurden 15 Gene identifiziert, welche einen Einfluss auf LecB aufweisen könnten. Drei dieser Gene (*fgtA*, *pilY1* und *rocR*) sind direkt oder indirekt an der Adhäsionsfähigkeit von *P. aeruginosa* beteiligt und geben Hinweise auf die Sekretion von LecB.

Die zelluläre Funktion des FgtA ist die Glykosylierung des bakteriellen Flagellins FliC. In dieser Arbeit konnte ein negativer Einfluss auf die extrazelluläre Menge an LecB in weiteren *P. aeruginosa fgtA*- und *fliC*-defizienten Stämmen beobachtet und ein hypothetisches Modell zum Kohlenhydrat-vermittelten Transport von LecB mit FliC abgeleitet werden. Dieses stützt die Hypothese früherer Studien, dass die Zuckerbindung für die Lokalisierung von LecB entscheidend ist und das LecB möglicherweise mit einem kohlenhydrathaltigen Liganden, zum Beispiel einem Glykoprotein wie FliC, co-transportiert wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass LecB pleiotrope Einflüsse aufweist und tragen dazu bei (I) den Sekretionsmechanismus von LecB aufzuklären und (II) erlauben einen tieferen Einblick in die Regulation und Funktion des kohlenhydratbindenden Proteins LecB aus dem humanpathogen *P. aeruginosa*.

6 Summary

The Gram-negative bacterium *P. aeruginosa* is an opportunistic human pathogen involved in a variety of hospital-acquired infections and infections of immunocompromised patients. The essential step for the successful bacterial infection is the initial adhesion of the bacteria to the host cell and the biofilm formation. Both the adhesion and the biofilm formation of *P. aeruginosa* are, beside other effectors, mediated by the carbohydrate-binding lectin LecB. In addition to the adhesion and biofilm formation the lectin is involved in the mobility of the bacteria. Consequently, the LecB is regarded as a potential target for the development of pharmaceuticals.

In this thesis, it was shown that LecB exhibits pleiotropic effects on different processes of the cell, which are associated with the bacterial virulence. Thus, the deletion of *lecB* in an existing *P. aeruginosa* *lecB*-deficient strain has been shown to have an effect on the secretion, the biofilm amount as well as on the intra- and extracellular esterase activity. Since bacteria mostly live in biofilms and share their environment with other organisms, the biofilm formation of co-cultured *P. aeruginosa* and *C. albicans* strains was analysed. The results showed that the deletion of *lecB*, but not exogenously purified LecB, has an influence on the amount of biofilm in co-cultivation.

In addition, the occurrence of a regulatory influence of OprF which is an interaction partner of LecB to *lecB* expression was observed. Accordingly, a *P. aeruginosa* *oprF*-deficient strain has approximately 8-fold increased *lecB* transcription level and it secretes LecB earlier (after 7 h) than the reference strain (after 48 h). The extracellular LecB quantity is 32-fold increased in a *P. aeruginosa* *oprF*-deficient strain after 24 h in contrast to the reference strain. The extracellular localization of LecB in a *P. aeruginosa* *oprF*-deficient strain indicates that OprF is not a secretion partner of LecB.

To elucidate the secretion of LecB, a *P. aeruginosa* *lecB*- and *oprF*-deficient PATS1 ($\Delta lecB \Delta oprF$) strain was constructed and transformed with the *plecB* expression vector. It was shown that the *plecB* expression vector exhibits moderate constitutive *lecB* expression, which is similar to the *lecB* expression of the reference strain. This *P. aeruginosa* PATS1 strain with *plecB* expression vector has a constitutive expression of *lecB* decoupled from the QS-system and localizes the LecB by the lack of interaction with OprF in the

extracellular medium. The extracellular LecB quantity was quantified with the modified enzyme-linked lectin assay (mELLA) high-throughput method, which is developed and established in this work and allows the quantification of LecB in the linear range between 0.25-62.5 ng/ml. Using this method, it was shown that the *P. aeruginosa* PATS1 strain with a *plecB* expression vector, depending on the cultivation condition, had between 26- and 200-fold more LecB in the extracellular medium than the comparable *P. aeruginosa* PA01 reference strain. This method is suitable for the analysis of the LecB secretion.

A Tn5 transposon mutant library of 6.5×10^4 clones was generated in the *P. aeruginosa* PATS1 strain with *plecB* expression vector. This library was used to identify strains with reduced LecB in the supernatant. The mELLA bases screening revealed that 1.7% out of the 2,800 investigated transposon mutants with less than 15% extracellular LecB amount compared to the reference strain. By identifying the transposon integration sites 15 genes potentially involved in LecB secretion were identified. Three of these genes (*fgtA*, *pilY1* and *rocR*) involved in the adhesion of *P. aeruginosa* can likely be functionally linked to LecB.

The cellular function of FgtA is the glycosylation of the bacterial flagellin FliC. In this thesis, a decreased extracellular amount of LecB was observed in additionally tested mutant strains of *P. aeruginosa* being deficient for *fgtA* and *fliC*. Based on our data and previous findings that the sugar binding is critical for the cell localization of LecB we suggest a model of carbohydrate-mediated co-transport of LecB with a glycoprotein, like FliC.

The results of the present study show that LecB has pleiotropic influences and they contribute to (I) elucidating the secretory mechanism of LecB and (II) allow a deeper insight into the regulation and function of the carbohydrate-binding protein LecB of the human pathogen *P. aeruginosa*.

7 Literaturverzeichnis

- Abby, S. S. & Rocha, E. P. (2012).** "The non-flagellar type III secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems." PLoS Genet **8**(9): e1002983.
- Adam, E. C., Mitchell, B. S., Schumacher, D. U., Grant, G. & Schumacher, U. (1997a).** "Pseudomonas aeruginosa II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose." Am J Respir Crit Care Med **155**(6): 2102-2104.
- Adam, E. C., Schumacher, D. U. & Schumacher, U. (1997b).** "Cilia from a cystic fibrosis patient react to the ciliotoxic Pseudomonas aeruginosa II lectin in a similar manner to normal control cilia--a case report." J Laryngol Otol **111**(8): 760-762.
- Adam, J., Pokorna, M., Sabin, C., Mitchell, E. P., Imberty, A. & Wimmerova, M. (2007).** "Engineering of PA-IIL lectin from Pseudomonas aeruginosa - Unravelling the role of the specificity loop for sugar preference." BMC Struct Biol **7**: 36.
- Aizawa, S. I. (2001).** "Bacterial flagella and type III secretion systems." FEMS Microbiol Lett **202**(2): 157-164.
- Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. & Iglewski, B. H. (1997).** "Vfr controls quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **179**(12): 3928-3935.
- 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**(1): 63-67.
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. & Tolker-Nielsen, T. (2006).** "A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms." Mol Microbiol **59**(4): 1114-1128.
- Alm, R. A., Hallinan, J. P., Watson, A. A. & Mattick, J. S. (1996b).** "Fimbrial biogenesis genes of Pseudomonas aeruginosa: pilW and pilX increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and pilY1 encodes a gonococcal PilC homologue." Molecular Microbiology **22**(1): 161-173.
- Alm, R. A. & Mattick, J. S. (1996a).** "Identification of two genes with prepilin-like leader sequences involved in type 4 fimbrial biogenesis in Pseudomonas aeruginosa." J Bacteriol **178**(13): 3809-3817.
- Almblad, H., Harrison, J. J., Rybtke, M., Groizeleau, J., Givskov, M., Parsek, M. R. & Tolker-Nielsen, T. (2015).** "The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in Pseudomonas aeruginosa Is Inhibited by Cyclic Di-GMP." J Bacteriol **197**(13): 2190-2200.
- 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**(17): 3389-3402.

Andre, S., Kaltner, H., Manning, J. C., Murphy, P. V. & Gabius, H. J. (2015). "Lectins: getting familiar with translators of the sugar code." Molecules **20**(2): 1788-1823.

Arico, B., Miller, J. F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R. & Rappuoli, R. (1989). "Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(17): 6671-6675.

Arico, B., Scarlato, V., Monack, D. M., Falkow, S. & Rappuoli, R. (1991). "Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species." Mol Microbiol **5**(10): 2481-2491.

Arora, S. K., Bangera, M., Lory, S. & Ramphal, R. (2001). "A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(16): 9342-9347.

Arora, S. K., Dasgupta, N., Lory, S. & Ramphal, R. (2000). "Identification of two distinct types of flagellar cap proteins, FliD, in *Pseudomonas aeruginosa*." Infect Immun **68**(3): 1474-1479.

Arora, S. K., Neely, A. N., Blair, B., Lory, S. & Ramphal, R. (2005). "Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections." Infection and Immunity **73**(7): 4395-4398.

Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. (1997). "A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner." J Bacteriol **179**(17): 5574-5581.

Arora, S. K., Wolfgang, M. C., Lory, S. & Ramphal, R. (2004). "Sequence polymorphism in the glycosylation island and flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **186**(7): 2115-2122.

Arts, J., van Bortel, R., Filloux, A., Tommassen, J. & Koster, M. (2007). "Export of the pseudopilin XcpT of the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system via the signal recognition particle-Sec pathway." J Bacteriol **189**(5): 2069-2076.

Atlas, R. M. (2010). Handbook of Microbiological Media. Washington, D.C., ASM Press.

Averhoff, B. & Friedrich, A. (2003). "Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria." Arch Microbiol **180**(6): 385-393.

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**(11): 1305-1313.

Avichezer, D., Gilboa-Garber, 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**(1): 11-20.

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**(32): 23023-23027.

Azghani, A. O., Idell, S., Bains, M. & Hancock, R. E. W. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture." Microb Pathog **33**(3): 109-114.

Bagos, P. G., Nikolaou, E. P., Liakopoulos, T. D. & Tsirigos, K. D. (2010). "Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models." Bioinformatics **26**(22): 2811-2817.

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**(10): 4481-4487.

Balasingham, S. V., Collins, R. F., Assalkhou, R., Homberset, H., Frye, S. A., Derrick, J. P. & Tonjum, T. (2007). "Interactions between the lipoprotein PilP and the secretin PilQ in *Neisseria meningitidis*." J Bacteriol **189**(15): 5716-5727.

Ball, C. A., Dolinski, K., Dwight, S. S., Harris, M. A., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Scafe, C. R., Sherlock, G., Binkley, G.,

Jin, H., Kaloper, M., Orr, S. D., Schroeder, M., Weng, S., Zhu, Y., Botstein, D. & Cherry, J. M. (2000). "Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces* genome database." Nucleic Acids Res **28**(1): 77-80.

Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A. & Tommassen, J. (1992). "Protein Secretion in *Pseudomonas Aeruginosa* - Characterization of 7 Xcp Genes and Processing of Secretory Apparatus Components by Prepilin Peptidase." Molecular Microbiology **6**(9): 1121-1131.

Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991). "Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*." Cell **67**(3): 581-589.

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**(4): 1089-1098.

Barondes, S. H. (1988). "Bifunctional properties of lectins: lectins redefined." Trends Biochem Sci **13**(12): 480-482.

Bartels, K. M. (2004). Lektin B aus *Pseudomonas aeruginosa*. Evaluierung des Anwendungspotentials als "Affinitäts-Tags". Diplomarbeit, Ruhr-Universität-Bochum.

Bartels, K. M. (2009). Lokalisierung und Funktion des Lectins B aus *Pseudomonas aeruginosa*. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.

- Bartels, K. M., Funken, H., Knapp, A., Brocker, M., Bott, M., Wilhelm, S., Jaeger, K. E. & Rosenau, F. (2011). "Glycosylation is required for outer membrane localization of the lectin LecB in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **193**(5): 1107-1113.
- Bassetti, M., Righi, E. & Viscoli, C. (2008). "*Pseudomonas aeruginosa* serious infections: mono or combination antimicrobial therapy?" Curr Med Chem **15**(5): 517-522.
- Baynham, P. J., Brown, A. L., Hall, L. L. & Wozniak, D. J. (1999). "Pseudomonas aeruginosa AlgZ, a ribbon-helix-helix DNA-binding protein, is essential for alginate synthesis and *algD* transcriptional activation." Mol Microbiol **33**(5): 1069-1080.
- Bazire, A., Shioya, K., Soum-Soutera, E., Bouffartigues, E., Ryder, C., Guentas-Dombrowsky, L., Hemery, G., Linossier, I., Chevalier, S., Wozniak, D. J., Lesouhaitier, O. & Dufour, A. (2010). "The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **192**(12): 3001-3010.
- Beachey, E. H. (1980). Bacterial adherence. London, Chapman and Hall.
- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Sargent, J. L., Levesque, R. C. & Mattick, J. S. (2002). "Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **184**(13): 3605-3613.
- Bebrone, C., Moali, C., Mahy, F., Rival, S., Docquier, J. D., Rossolini, G. M., Fastrez, J., Pratt, R. F., Frere, J. M. & Galleni, M. (2001). "CENTA as a chromogenic substrate for studying beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **45**(6): 1868-1871.
- 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 **250**(4): 1513-1524.
- Belete, B., Lu, H. & Wozniak, D. J. (2008). "*Pseudomonas aeruginosa* AlgR regulates type IV pilus biosynthesis by activating transcription of the *fimU-pilVWXYZ1Y2E* operon." J Bacteriol **190**(6): 2023-2030.
- Bellido, F., Finnen, R. L., Martin, N. L., Siehnel, R. J. & Hancock, R. E. W. (1992). Function and structure of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF. Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology. E. Galli, S. Silver und B. Witholt. Washington, DC, American Society for Microbiology: 170-176.
- Benz, I. & Schmidt, M. A. (2002). "Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria." Mol Microbiol **45**(2): 267-276.
- Benz, R. & Hancock, R. E. W. (1981). "Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes." Biochim Biophys Acta **646**(2): 298-308.
- Bergeron, J. R. C., Fernandez, L., Wasney, G. A., Vuckovic, M., Reffuveille, F., Hancock, R. E. W. & Strynadka, N. C. J.

(2016). "The Structure of a Type 3 Secretion System (T3SS) Ruler Protein Suggests a Molecular Mechanism for Needle Length Sensing." Journal of Biological Chemistry **291**(4): 1676-1691.

Berka, R. M. & Vasil, M. L. (1982). "Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization." J Bacteriol **152**(1): 239-245.

Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T. (2000). "The Tat protein export pathway." Mol Microbiol **35**(2): 260-274.

Beuth, J., Ko, H. L., Schroten, H., Solter, J., Uhlenbruck, G. & Pulverer, G. (1987a). "Lectin mediated adhesion of *Streptococcus pneumoniae* and its specific inhibition *in vitro* and *in vivo*." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **265**(1-2): 160-168.

Beuth, J., Ko, H. L., Uhlenbruck, G. & Pulverer, G. (1987b). "Lectin-Mediated Bacterial Adhesion to Human-Tissue." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **6**(5): 591-593.

Beuth, J., Stoffel, B., Ko, H. L., Jeljaszewicz, J. & Pulverer, G. (1995). "Mistellektin-1: neue therapeutische Perspektiven in der Onkologie." Oncology Research and Treatment **18**: 36-40.

Beuth, J., Stoffel, B. & Pulverer, G. (1996). "Inhibition of bacterial adhesion and infections by lectin blocking." Adv Exp Med Biol **408**: 51-56.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for

screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.

Bitter, W. (2003). "Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane." Arch Microbiol **179**(5): 307-314.

Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., de Cock, H. & Tommassen, J. (1998). "Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **27**(1): 209-219.

Blanchard, B., Nurisso, A., Hollville, E., Tetaud, C., Wiels, J., Pokorna, M., Wimmerova, M., Varrot, A. & Imbert, A. (2008). "Structural basis of the preferential binding for globo-series glycosphingolipids displayed by *Pseudomonas aeruginosa* lectin I." J Mol Biol **383**(4): 837-853.

Blanka, A., Schulz, S., Eckweiler, D., Franke, R., Bielecka, A., Nicolai, T., Casilag, F., Duvel, J., Abraham, W. R., Kaefer, V. & Haussler, S. (2014). "Identification of the alternative sigma factor SigX regulon and its implications for *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity." J Bacteriol **196**(2): 345-356.

Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2005). "Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." J Bacteriol **187**(11): 3898-3902.

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 U S A **100**(6): 3027-3030.

Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983). "Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*." Rev Infect Dis **5**(2): 279-313.

Boechat, A. L., Kaihami, G. H., Politi, M. J., Lepine, F. & Baldini, R. L. (2013). "A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*." PLoS One **8**(12): e84775.

Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D. J. & Parsek, M. R. (2010). "*Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix." Mol Microbiol **75**(4): 827-842.

Boteva, R. N., Bogoeva, V. P. & Stoitsova, S. R. (2005). "PA-I lectin from *Pseudomonas aeruginosa* binds acyl homoserine lactones." Biochim Biophys Acta **1747**(2): 143-149.

Bouffartigues, E., Gicquel, G., Bazire, A., Bains, M., Maillot, O., Vieillard, J., Feuilloley, M. G., Orange, N., Hancock, R. E. W., Dufour, A. & Chevalier, S. (2012). "Transcription of the *oprF* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent mainly on the SigX sigma factor and is sucrose induced." J Bacteriol **194**(16): 4301-4311.

Bouffartigues, E., Moscoso, J. A., Duchesne, R., Rosay, T., Fito-Boncompagni, L., Gicquel, G., Maillot, O., Benard, M., Bazire, A., Brenner-Weiss, G., Lesouhaitier, O., Lerouge, P., Dufour, A.,

Orange, N., Feuilloley, M. G., Overhage, J., Filloux, A. & Chevalier, S. (2015). "The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level." Front Microbiol **6**: 630.

Boukerb, A. M., Rousset, A., Galanos, N., Mear, J. B., Thepaut, M., Grandjean, T., Gillon, E., Cecioni, S., Abderrahmen, C., Faure, K., Redelberger, D., Kipnis, E., Dessein, R., Havet, S., Darblade, B., Matthews, S. E., de Bentzmann, S., Guery, B., Cournoyer, B., Imbert, A. & Vidal, S. (2014). "Antiadhesive Properties of Glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection." J Med Chem **57**(24): 10275-10289.

Boyd, A. & Chakrabarty, A. M. (1994). "Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*." Appl Environ Microbiol **60**(7): 2355-2359.

Boyd, W. C. & Shapleigh, E. (1954). "Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins)." Science **119**(3091): 419.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Bradley, D. E. (1973). "Basic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail." J Virol **12**(5): 1139-1148.

Bradley, D. E. (1980). "A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili:

twitching motility." Can J Microbiol **26**(2): 146-154.

Brencic, A. & Lory, S. (2009). "Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA." Mol Microbiol **72**(3): 612-632.

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." Journal of Bacteriology **180**(12): 3209-3217.

Brinkman, F. S., Schoofs, G., Hancock, R. E. W. & De Mot, R. (1999). "Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*." J Bacteriol **181**(16): 4746-4754.

Brok, R., Van Gelder, P., Winterhalter, M., Ziese, U., Koster, A. J., de Cock, H., Koster, M., Tommassen, J. & Bitter, W. (1999). "The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity." J Mol Biol **294**(5): 1169-1179.

Brown, M. R., Allison, D. G. & Gilbert, P. (1988). "Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?" J Antimicrob Chemother **22**(6): 777-780.

Burkinshaw, B. J. & Strynadka, N. C. (2014). "Assembly and structure of the T3SS." Biochim Biophys Acta **1843**(8): 1649-1663.

Burrows, L. L. (2012). "*Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action." Annu Rev Microbiol **66**: 493-520.

Büttner, D. (2012). "Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **76**(2): 262-310.

Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M. R., Anderson, E. M., Lam, J. S. & Wozniak, D. J. (2009). "Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production." Mol Microbiol **73**(4): 622-638.

Caballero, A. R., Moreau, J. M., Engel, L. S., Marquart, M. E., Hill, J. M. & O'Callaghan, R. J. (2001). "*Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases." Anal Biochem **290**(2): 330-337.

Caiazza, N. C., Merritt, J. H., Brothers, K. M. & O'Toole, G. A. (2007). "Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14." J Bacteriol **189**(9): 3603-3612.

Caldwell, C. C., Chen, Y., Goetzmann, H. S., Hao, Y., Borchers, M. T., Hassett, D. J., Young, L. R., Mavrodi, D., Thomashow, L. & Lau, G. W. (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis." Am J Pathol **175**(6): 2473-2488.

- Casilag, F., Lorenz, A., Krueger, J., Klawonn, F., Weiss, S. & Haussler, S. (2015). "The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA To Prevent Flagellin-Mediated Immune Recognition." Infect Immun **84**(1): 162-171.
- Castric, P. (1995). "*pilO*, a gene required for glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin." Microbiology **141** (Pt 5): 1247-1254.
- Castric, P., Cassels, F. J. & Carlson, R. W. (2001). "Structural characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin glycan." J Biol Chem **276**(28): 26479-26485.
- CFF, C. F. F. (2016). Cystic Fibrosis Foundation patient registry 2015 annual data report. Cystic Fibrosis Foundation.
- Chapon-Herve, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A. & Bally, M. (1997). "Regulation of the *xcp* secretion pathway by multiple *quorum-sensing* modulons in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **24**(6): 1169-1178.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerova, M., Guery, B. P. & Faure, K. (2009). "Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands." Infect Immun **77**(5): 2065-2075.
- Chen, C. P., Song, S. C., Gilboa-Garber, N., Chang, K. S. & Wu, A. M. (1998). "Studies on the binding site of the galactose-specific agglutinin PA-IL from *Pseudomonas aeruginosa*." Glycobiology **8**(1): 7-16.
- Chiang, P., Habash, M. & Burrows, L. L. (2005). "Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus ATPases involved in twitching motility." J Bacteriol **187**(3): 829-839.
- Chiang, P., Sampaleanu, L. M., Ayers, M., Pahuta, M., Howell, P. L. & Burrows, L. L. (2008). "Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU." Microbiology **154**(Pt 1): 114-126.
- 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**(2): 297-301.
- Conibear, T. C., Willcox, M. D., Flanagan, J. L. & Zhu, H. (2012). "Characterization of protease IV expression in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates." J Med Microbiol **61**(Pt 2): 180-190.
- 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**(4): 321-332.
- Costerton, J. W. (1999). "Introduction to biofilm." Int J Antimicrob Agents **11**(3-4): 217-221; discussion 237-219.

- Costerton, J. W. & Anwar, H. (1994).** *Pseudomonas aeruginosa*: the microbe and the pathogen. *Pseudomonas aeruginosa* infections and treatment. A. L. Balth und R. P. Smith. New York, Marcel Dekker, Inc.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** "Microbial biofilms." *Annu Rev Microbiol* **49**: 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* **284**(5418): 1318-1322.
- Couto, N., Schooling, S. R., Dutcher, J. R. & Barber, J. (2015).** "Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms." *J Proteome Res* **14**(10): 4207-4222.
- Craig, L., Pique, M. E. & Tainer, J. A. (2004).** "Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity." *Nat Rev Microbiol* **2**(5): 363-378.
- Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A. S., Pique, M. E., Yeager, M., Egelman, E. H. & Tainer, J. A. (2006).** "Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions." *Mol Cell* **23**(5): 651-662.
- Cripps, A. W., Dunkley, M. L., Taylor, D. C., Cousins, S. & Clancy, R. L. (1995).** "Immunity to *Pseudomonas aeruginosa* induced by OprF following intestinal immunization." *Adv Exp Med Biol* **371B**: 761-763.
- Cross, A., Allen, J. R., Burke, J., Duce, G., Harris, A., John, J., Johnson, D., Lew, M., MacMillan, B., Meers, P. & et al. (1983).** "Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends." *Rev Infect Dis* **5 Suppl 5**: S837-845.
- Cryz, S. J., Jr., Pitt, T. L., Furer, E. & Germanier, R. (1984).** "Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* **44**(2): 508-513.
- D'Argenio, D. A. & Miller, S. I. (2004).** "Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger." *Microbiology* **150**(Pt 8): 2497-2502.
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. & Toussaint, B. (1999).** "Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system." *Infect Immun* **67**(11): 6164-6167.
- Darzens, A. (1994).** "Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*." *Mol Microbiol* **11**(1): 137-153.
- Dasgupta, N., Ferrell, E. P., Kanack, K. J., West, S. E. & Ramphal, R. (2002).** "*fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein." *J Bacteriol* **184**(19): 5240-5250.

- Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. (2003). "Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." J Bacteriol **185**(3): 1027-1036.
- Davidson, A. L. & Chen, J. (2004). "ATP-binding cassette transporters in bacteria." Annu Rev Biochem **73**: 241-268.
- Davies, D. G. & Geesey, G. G. (1995). "Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture." Appl Environ Microbiol **61**(3): 860-867.
- 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**(5361): 295-298.
- de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. & Lewandowski, Z. (1994). "Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport." Biotechnol Bioeng **43**(11): 1131-1138.
- de Bentzmann, S., Varrot, A. & Imberty, A. (2014). "Monitoring lectin interactions with carbohydrates." Methods Mol Biol **1149**: 403-414.
- de Boer, H. A., Comstock, L. J. & Vasser, M. (1983). "The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(1): 21-25.
- de Groot, A., Koster, M., Gerard-Vincent, M., Gerritse, G., Lazdunski, A., Tommassen, J. & Filloux, A. (2001). "Exchange of Xcp (Gsp) secretion machineries between *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas alcaligenes*: species specificity unrelated to substrate recognition." J Bacteriol **183**(3): 959-967.
- de Kievit, T., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L. & Iglewski, B. H. (1999). "RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **181**(7): 2175-2184.
- 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**(4): 1865-1873.
- Deakin, W. J., Parker, V. E., Wright, E. L., Ashcroft, K. J., Loake, G. J. & Shaw, C. H. (1999). "*Agrobacterium tumefaciens* possesses a fourth flagelin gene located in a large gene cluster concerned with flagellar structure, assembly and motility." Microbiology **145** (Pt 6): 1397-1407.
- Diggle, S. P., Stacey, R. E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P. & Winzer, K. (2006). "The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*." Environ Microbiol **8**(6): 1095-1104.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Camara, M. & Williams, P. (2003). "The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the *quorum sensing* hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and

can be produced in the absence of LasR." Mol Microbiol **50**(1): 29-43.

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**(10): 2576-2586.

Doig, P., Kinsella, N., Guerry, P. & Trust, T. J. (1996). "Characterization of a post-translational modification of *Campylobacter* flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety." Mol Microbiol **19**(2): 379-387.

Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." Clin Microbiol Rev **15**(2): 167-193.

Doolittle, R. F. (1986). Of urfs and orfs: A primer on how to analyze derived amino acid sequences. Mill Valley, California, University Science Books.

Döring, G. & Hoiby, N. (1983). "Longitudinal study of immune response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens in cystic fibrosis." Infect Immun **42**(1): 197-201.

Döring, G., Obernesser, H. J. & Botzenhart, K. (1981). "Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Effect of two proteases on human immunoglobulins IgG, IgA and secretory IgA (author's transl)." Zentralbl Bakteriell A **249**(1): 89-98.

Dotsch, A., Becker, T., Pommerenke, C., Magnowska, Z., Jansch, L. & Haussler, S. (2009). "Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2522-2531.

Duchene, M., Schweizer, A., Lottspeich, F., Krauss, G., Marget, M., Vogel, K., von Specht, B. U. & Domdey, H. (1988). "Sequence and transcriptional start site of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F gene." J Bacteriol **170**(1): 155-162.

Duguid, J. P., Smith, I. W., Dempster, G. & Edmunds, P. N. (1955). "Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*." J Pathol Bacteriol **70**(2): 335-348.

Dunn, S. D. (1986). "Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies." Anal Biochem **157**(1): 144-153.

Economou, A. (1999). "Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway." Trends Microbiol **7**(8): 315-320.

Eierhoff, T., Bastian, B., Thuenauer, R., Madl, J., Audfray, A., Aigal, S., Juillot, S., Rydell, G. E., Muller, S., de Bentzmann, S., Imberty, A., Fleck, C. & Romer, W. (2014). "A lipid zipper triggers bacterial invasion." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(35): 12895-12900.

- Engel, L. S., Hobden, J. A., Moreau, J. M., Callegan, M. C., Hill, J. M. & O'Callaghan, R. J. (1997). "Pseudomonas deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(8): 1535-1542.
- Espinosa-Urgel, M. (2003). "Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms." J Bacteriol **185**(3): 699-700.
- Farinha, M. A., Conway, B. D., Glasier, L. M., Ellert, N. W., Irvin, R. T., Sherburne, R. & Paranchych, W. (1994). "Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice." Infect Immun **62**(10): 4118-4123.
- Ferrell, E., Carty, N. L., Colmer-Hamood, J. A., Hamood, A. N. & West, S. E. (2008). "Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *ptxR* by Vfr." Microbiology **154**(Pt 2): 431-439.
- Filloux, A. (2004). "The underlying mechanisms of type II protein secretion." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 163-179.
- Filloux, A., Michel, G. & Bally, M. (1998). "GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*." FEMS Microbiol Rev **22**(3): 177-198.
- Finck-Barbancon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M., Wu, C., Mende-Mueller, L. & Frank, D. W. (1997). "ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury." Mol Microbiol **25**(3): 547-557.
- Fito-Boncompagni, L., Chapalain, A., Bouffartigues, E., Chaker, H., Lesouhaitier, O., Gicquel, G., Bazire, A., Madi, A., Connil, N., Veron, W., Taupin, L., Toussaint, B., Cornelis, P., Wei, Q., Shioya, K., Deziel, E., Feuilloley, M. G., Orange, N., Dufour, A. & Chevalier, S. (2011). "Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF." Infect Immun **79**(3): 1176-1186.
- Flemming, H. C. & Wingender, J. (2001). "Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects." Water Sci Technol **43**(6): 1-8.
- Francetic, O., Buddelmeijer, N., Lewenza, S., Kumamoto, C. A. & Pugsley, A. P. (2007). "Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system." J Bacteriol **189**(5): 1783-1793.
- Frank, D. W. (1997). "The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **26**(4): 621-629.
- Friedman, L. & Kolter, R. (2004a). "Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms." Mol Microbiol **51**(3): 675-690.
- Friedman, L. & Kolter, R. (2004b). "Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix." J Bacteriol **186**(14): 4457-4465.

- Frost, L. S. & Paranchych, W. (1977).** "Composition and molecular weight of pili purified from *Pseudomonas aeruginosa* K." J Bacteriol **131**(1): 259-269.
- Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Jones, A. K., Fulcher, N. B., Urbanowski, M. L., Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2010a).** "The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms." J Bacteriol **192**(14): 3553-3564.
- Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Klem, E. R., Fehr, A. R., Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2010b).** "In vitro and in vivo characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase CpdA, required for cAMP homeostasis and virulence factor regulation." J Bacteriol **192**(11): 2779-2790.
- Funken, H., Bartels, K. M., Wilhelm, S., Bocker, M., Bott, M., Bains, M., Hancock, R. E. W., Rosenau, F. & Jaeger, K. E. (2012).** "Specific association of lectin LecB with the surface of *Pseudomonas aeruginosa*: role of outer membrane protein OprF." PLoS One **7**(10): e46857.
- Gabius, H. J., Andre, S., Kaltner, H. & Siebert, H. C. (2002).** "The sugar code: functional lectinomics." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 165-177.
- Gacesa, P. (1998).** "Bacterial alginate biosynthesis--recent progress and future prospects." Microbiology **144** (Pt 5): 1133-1143.
- Gallagher, L. A. & Manoil, C. (2001).** "*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning." J Bacteriol **183**(21): 6207-6214.
- 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**(9): 3000-3009.
- Gambello, M. J., Kaye, S. & Iglewski, B. H. (1993).** "LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression." Infect Immun **61**(4): 1180-1184.
- Garber, N., Guempel, U., Belz, A., Gilboa-Garber, N. & Doyle, R. J. (1992).** "On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose." Biochim Biophys Acta **1116**(3): 331-333.
- Garber, N., Guempel, U., Gilboa-Garber, N. & Royle, R. J. (1987).** "Specificity of the fucose-binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa*." FEMS Microbiol Lett **48**(3): 331.
- Garrett, E. S., Perlegas, D. & Wozniak, D. J. (1999).** "Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU)." J Bacteriol **181**(23): 7401-7404.
- Ge, Y., Li, C., Corum, L., Slaughter, C. A. & Charon, N. W. (1998).** "Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*." J Bacteriol **180**(9): 2418-2425.

- Ghafoor, A., Hay, I. D. & Rehm, B. H. (2011).** "Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture." Appl Environ Microbiol **77**(15): 5238-5246.
- Gicquel, G., Bouffartigues, E., Bains, M., Oxaran, V., Rosay, T., Lesouhaitier, O., Connil, N., Bazire, A., Maillot, O., Benard, M., Cornelis, P., Hancock, R. E. W., Dufour, A., Feuilloy, M. G., Orange, N., Deziel, E. & Chevalier, S. (2013).** "The extra-cytoplasmic function sigma factor sigX modulates biofilm and virulence-related properties in *Pseudomonas aeruginosa*." PLoS One **8**(11): e80407.
- Gilboa-Garber, N. (1972a).** "Inhibition of broad spectrum hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* by D-galactose and its derivatives." FEBS Lett **20**(2): 242-244.
- Gilboa-Garber, N. (1972b).** "Purification and properties of hemagglutinin from *Pseudomonas aeruginosa* and its reaction with human blood cells." Biochim Biophys Acta **273**(1): 165-173.
- Gilboa-Garber, N. (1982).** "*Pseudomonas aeruginosa* lectins." Methods Enzymol **83**: 378-385.
- Gilboa-Garber, N. (1997).** "Multiple aspects of *Pseudomonas aeruginosa* lectins." Nova Acta Leopoldina **301**: 153-177.
- Gilboa-Garber, N. & Garber, N. C. (1992).** Microbial lectins. Glycoconjugates: Composition, Structure and Function. J. H. Allan und K. E. C. New York, Dekker, M.: 541-591.
- Gilboa-Garber, N., Katcoff, D. J. & Garber, N. C. (2000).** "Identification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL." FEMS Immunol Med Microbiol **29**(1): 53-57.
- 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**(1): 93-95.
- Gilboa-Garber, N., Mizrahi, L. & Garber, N. (1977).** "Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*." Can J Biochem **55**(9): 975-981.
- Gilboa-Garber, N., Sudakevitz, D. & Levene, C. (1999).** "A comparison of the Aplysia lectin anti-I specificity with human anti-I and several other I-detecting lectins." Transfusion **39**(10): 1060-1064.
- Gilboa-Garber, N., Sudakevitz, D., Sheffi, M., Sela, R. & Levene, C. (1994).** "PA-I and PA-II lectin interactions with the ABO(H) and P blood group glycosphingolipid antigens may contribute to the broad spectrum adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tissues in secondary infections." Glycoconj J **11**(5): 414-417.
- Giltner, C. L., Habash, M. & Burrows, L. L. (2010).** "*Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV pili." J Mol Biol **398**(3): 444-461.
- Glick, J. & Garber, N. (1983).** "The intracellular localization of *Pseudomonas*

aeruginosa lectins." J Gen Microbiol **129**(10): 3085-3090.

Goers, L., Freemont, P. & Polizzi, K. M. (2014). "Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level." J R Soc Interface **11**(96).

Golovanov, A. P., Balasingham, S., Tzitzilonis, C., Gault, B. T., Lian, L. Y., Homberset, H., Tonjum, T. & Derrick, J. P. (2006). "The solution structure of a domain from the *Neisseria meningitidis* lipoprotein PilP reveals a new beta-sandwich fold." J Mol Biol **364**(2): 186-195.

Gooderham, W. J. & Hancock, R. E. W. (2009). "Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*." FEMS Microbiol Rev **33**(2): 279-294.

Gotoh, N., Wakebe, H., Yoshihara, E., Nakae, T. & Nishino, T. (1989). "Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane." J Bacteriol **171**(2): 983-990.

Govan, J. R. & Deretic, V. (1996). "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*." Microbiol Rev **60**(3): 539-574.

Griffin, B. A., Adams, S. R. & Tsien, R. Y. (1998). "Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells." Science **281**(5374): 269-272.

Gupta, R., Jung, E. & Brunak, S. (2004). "Prediction of N-glycosylation sites in human proteins." In preparation.

Gustke, H., Kleene, R., Loers, G., Nehmann, N., Jaehne, M., Bartels, K. M., Jaeger, K. E., Schachner, M. & Schumacher, U. (2012). "Inhibition of the bacterial lectins of *Pseudomonas aeruginosa* with monosaccharides and peptides." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(2): 207-215.

Guttenplan, S. B. & Kearns, D. B. (2013). "Regulation of flagellar motility during biofilm formation." FEMS Microbiol Rev **37**(6): 849-871.

Hahn, H. P. (1997). "The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review." Gene **192**(1): 99-108.

Haiko, J. & Westerlund-Wikstrom, B. (2013). "The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence." Biology (Basel) **2**(4): 1242-1267.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.

Hancock, R. E. W., Decad, G. M. & Nikaido, H. (1979). "Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01." Biochim Biophys Acta **554**(2): 323-331.

Hancock, R. E. W., Irvin, R. T., Costerton, J. W. & Carey, A. M. (1981). "*Pseudomonas aeruginosa* outer

membrane: peptidoglycan-associated proteins." J Bacteriol **145**(1): 628-631.

Hancock, R. E. W. & Nikaido, H. (1978). "Outer membranes of gram-negative bacteria. XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier." J Bacteriol **136**(1): 381-390.

Hancock, R. E. W. & Speert, D. P. (2000). "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment." Drug Resist Updat **3**(4): 247-255.

Hanson, M. S. & Brinton, C. C., Jr. (1988). "Identification and characterization of *E. coli* type-1 pilus tip adhesion protein." Nature **332**(6161): 265-268.

Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luirink, J. & de Cock, H. (2001). "The early interaction of the outer membrane protein phoe with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane." J Biol Chem **276**(22): 18804-18811.

Hauser, A. R. (2009). "The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection." Nat Rev Microbiol **7**(9): 654-665.

Hauser, A. R. (2011). "*Pseudomonas aeruginosa*: so many virulence factors, so little time." Crit Care Med **39**(9): 2193-2194.

Hayashi, S. & Wu, H. C. (1990). "Lipoproteins in bacteria." J Bioenerg Biomembr **22**(3): 451-471.

He, J., Baldini, R. L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M. & Rahme, L. G. (2004). "The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2530-2535.

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**(4): 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**(15): 3803-3815.

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**(4): 2008-2017.

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** (Pt 10): 2395-2407.

- Hickman, J. W. & Harwood, C. S. (2008).** "Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor." Mol Microbiol **69**(2): 376-389.
- Hoang, H. H., Nickerson, N. N., Lee, V. T., Kazimirova, A., Chami, M., Pugsley, A. P. & Lory, S. (2011).** "Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries." MBio **2**(6).
- Hobbs, M., Collie, E. S., Free, P. D., Livingston, S. P. & Mattick, J. S. (1993).** "PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **7**(5): 669-682.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979).** "Chromosomal genetics of *Pseudomonas*." Microbiol Rev **43**(1): 73-102.
- Hughes, D. T. & Sperandio, V. (2008).** "Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts." Nature Reviews Microbiology **6**(2): 111-120.
- Hung, C. S., Bouckaert, J., Hung, D., Pinkner, J., Widberg, C., DeFusco, A., Augustine, 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." Mol Microbiol **44**(4): 903-915.
- Hynes, S. O., Teneberg, S., Roche, N. & Wadstrom, T. (2003).** "Glycoconjugate binding of gastric and enterohepatic *Helicobacter* spp." Infect Immun **71**(5): 2976-2980.
- Iglewski, B. H. & Kabat, D. (1975).** "NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(6): 2284-2288.
- 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**(2): 221-228.
- Irie, Y., Starkey, M., Edwards, A. N., Wozniak, D. J., Romeo, T. & Parsek, M. R. (2010).** "*Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA." Mol Microbiol **78**(1): 158-172.
- Irvin, R. T. & Bautista, D. L. (1999).** "Hope for the post-antibiotic era?" Nat Biotechnol **17**(1): 20.
- Ishimoto, K. S. & Lory, S. (1989).** "Formation of pilin in *Pseudomonas aeruginosa* requires the alternative sigma factor (RpoN) of RNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(6): 1954-1957.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. V. & Manoil, C. (2003).** "Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14339-14344.

- Jaeger, K. E., Kharazmi, A. & Hoiby, N. (1991). "Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function *in vitro*." Microb Pathog **10**(3): 173-182.
- 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 Cataly B: Enzymatic.
- Jarrell, K. F. & McBride, M. J. (2008). "The surprisingly diverse ways that prokaryotes move." Nat Rev Microbiol **6**(6): 466-476.
- Jenal, U. (2004). "Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria?" Curr Opin Microbiol **7**(2): 185-191.
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2012). "The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiol Mol Biol Rev **76**(1): 46-65.
- Johansson, E. M., Crusz, S. A., Kolomiets, E., Buts, L., Kadam, R. U., Cacciarini, M., Bartels, K. M., Diggle, S. P., Camara, M., Williams, P., Loris, R., Nativi, C., Rosenau, F., Jaeger, K. E., Darbre, T. & Reymond, J. L. (2008). "Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB." Chem Biol **15**(12): 1249-1257.
- Jones, C. J., Newsom, D., Kelly, B., Irie, Y., Jennings, L. K., Xu, B., Limoli, D. H., Harrison, J. J., Parsek, M. R., White, P. & Wozniak, D. J. (2014). "ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*." PLoS Pathog **10**(3): e1003984.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J., Birdsall, M., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J., Golby, P., Reeves, P. J., Stephens, S. & et al. (1993). "The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*." EMBO J **12**(6): 2477-2482.
- Josenhans, C., Ferrero, R. L., Labigne, A. & Suerbaum, S. (1999). "Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes of *Helicobacter felis*." Mol Microbiol **33**(2): 350-362.
- Kanack, K. J., Runyen-Janecky, L. J., Ferrell, E. P., Suh, S. J. & West, S. E. (2006). "Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein." Microbiology **152**(Pt 12): 3485-3496.
- Karuppiyah, V. & Derrick, J. P. (2011). "Structure of the PilM-PilN inner membrane type IV pilus biogenesis complex from *Thermus thermophilus*." J Biol Chem **286**(27): 24434-24442.
- Karuppiyah, V., Hassan, D., Saleem, M. & Derrick, J. P. (2010). "Structure and oligomerization of the PilC type IV pilus biogenesis protein from *Thermus thermophilus*." Proteins **78**(9): 2049-2057.

- Kawamoto, A., Morimoto, Y. V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K. T., Kato, T. & Namba, K. (2013). "Common and distinct structural features of *Salmonella* injectisome and flagellar basal body." Sci Rep **3**: 3369.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003a). "Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Mol Microbiol **50**(1): 61-68.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003b). "Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants." Mol Microbiol **48**(6): 1511-1524.
- Klinger, J. D., Straus, D. C., Hilton, C. B. & Bass, J. A. (1978). "Antibodies to proteases and exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis: Demonstration by radioimmunoassay." J Infect Dis **138**(1): 49-48.
- Knowles, T. J., Scott-Tucker, A., Overduin, M. & Henderson, I. R. (2009). "Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly." Nat Rev Microbiol **7**(3): 206-214.
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. & Pechere, J. C. (2000). "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili." J Bacteriol **182**(21): 5990-5996.
- Kolomiets, E., Swiderska, M. A., Kadam, R. U., Johansson, E. M., Jaeger, K. E., Darbre, T. & Reymond, J. L. (2009). "Glycopeptide dendrimers with high affinity for the fucose-binding lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*." ChemMedChem **4**(4): 562-569.
- Koo, J., Tammam, S., Ku, S. Y., Sampaleanu, L. M., Burrows, L. L. & Howell, P. L. (2008). "PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus secretin." J Bacteriol **190**(21): 6961-6969.
- Koster, M., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000). "Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria." Int J Med Microbiol **290**(4-5): 325-331.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1994). "pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector." Biotechniques **16**(5): 800-802.
- Kuchma, S. L., Ballok, A. E., Merritt, J. H., Hammond, J. H., Lu, W., Rabinowitz, J. D. & O'Toole, G. A. (2010). "Cyclic-di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa*: the *pilY1* gene and its impact on surface-associated behaviors." J Bacteriol **192**(12): 2950-2964.
- Kuchma, S. L., Brothers, K. M., Merritt, J. H., Liberati, N. T., Ausubel, F. M. & O'Toole, G. A. (2007). "BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14." J Bacteriol **189**(22): 8165-8178.

- Kuchma, S. L., Connolly, J. P. & O'Toole, G. A. (2005). "A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **187**(4): 1441-1454.
- Kuchma, S. L., Griffin, E. F. & O'Toole, G. A. (2012). "Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility." J Bacteriol **194**(19): 5388-5403.
- Kulasekara, H. D., Ventre, I., Kulasekara, B. R., Lazdunski, A., Filloux, A. & Lory, S. (2005). "A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial *cup* genes." Mol Microbiol **55**(2): 368-380.
- Kulshin, V. A., Zahringer, U., Lindner, B., Jager, K. E., Dmitriev, B. A. & Rietschel, E. T. (1991). "Structural characterization of the lipid A component of *Pseudomonas aeruginosa* wild-type and rough mutant lipopolysaccharides." Eur J Biochem **198**(3): 697-704.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- 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." Glycoconjugate Journal **11**(4): 292-298.
- 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**(6): 1137-1146.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. & Kong, F. (2004). "The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection." Trends Mol Med **10**(12): 599-606.
- 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**(1): 133-142.
- Lazar, S. W. & Kolter, R. (1996). "SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins." J Bacteriol **178**(6): 1770-1773.
- Leclerc, G., Wang, S. P. & Ely, B. (1998). "A new class of *Caulobacter crescentus* flagellar genes." J Bacteriol **180**(19): 5010-5019.
- Lecoutere, E., Verleyen, P., Haenen, S., Vandersteegen, K., Noben, J. P., Robben, J., Schoofs, L., Ceyssens, P. J., Volckaert, G. & Lavigne, R. (2012). "A theoretical and experimental proteome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Microbiologyopen **1**(2): 169-181.
- Lee, K. K., Sheth, H. B., Wong, W. Y., Sherburne, R., Paranchych, W., Hodges, R. S., Lingwood, C. A., Krivan, H. & Irvin, R. T. (1994). "The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit." Mol Microbiol **11**(4): 705-713.

Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. (2007). "A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production." Mol Microbiol **65**(6): 1474-1484.

Leighton, T. L., Buensuceso, R. N., Howell, P. L. & Burrows, L. L. (2015). "Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function." Environ Microbiol **17**(11): 4148-4163.

Lengeler, K. B., Tielker, D. & Ernst, J. F. (2008). "Protein-O-mannosyltransferases in virulence and development." Cell Mol Life Sci **65**(4): 528-544.

Lesman-Movshovich, E., Lerrer, B. & Gilboa-Garber, N. (2003). "Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* lectins by human milk glycans." Can J Microbiol **49**(3): 230-235.

Lewenza, S., Falsafi, R. K., Winsor, G., Gooderham, W. J., McPhee, J. B., Brinkman, F. S. & Hancock, R. E. W. (2005). "Construction of a mini-Tn5-luxCDABE mutant library in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a tool for identifying differentially regulated genes." Genome Res **15**(4): 583-589.

Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. & Ausubel, F. M. (2006). "An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(8): 2833-2838.

Liener, E., Sharon, N. & Goldstein, I. J. (1986). The Lectins. London, Academic Press.

Liu, P. V. (1973). "Exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Factors That Influence the Production of Exotoxin A." J Infect Dis **128**(4): 506-513.

Liu, P. V. (1974). "Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*." J Infect Dis **130 Suppl**(0): S94-99.

Livermore, D. M. (1995). "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clin Microbiol Rev **8**(4): 557-584.

Lizewski, S. E., Schurr, J. R., Jackson, D. W., Frisk, A., Carterson, A. J. & Schurr, M. J. (2004). "Identification of AlgR-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by use of microarray analysis." J Bacteriol **186**(17): 5672-5684.

Loris, R., Tielker, D., Jaeger, K. E. & Wynn, L. (2003). "Structural basis of carbohydrate recognition by the lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*." J Mol Biol **331**(4): 861-870.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Lu, H. M., Motley, S. T. & Lory, S. (1997). "Interactions of the components of the general secretion pathway: role of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin subunits in complex formation and extracellular protein secretion." Molecular Microbiology **25**(2): 247-259.

Lundell, D. L. & Narula, S. K. (1994). "Structural elements required for receptor recognition of human interferon-gamma." Pharmacol Ther **64**(1): 1-21.

Luo, Y., Zhao, K., Baker, A. E., Kuchma, S. L., Coggan, K. A., Wolfgang, M. C., Wong, G. C. & O'Toole, G. A. (2015). "A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors." MBio **6**(1).

Lutz, F., Elsabagh, H., Hartmann, J., Hitz, M., Lindemann, H., Seeger, W., Seifer, S. & Xiong, G. (1992). Poreforming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin as a pathogenic factor. Cystic fibrosis, basic and clinical research. N. Hoiby und S. S. Pedersen. Amsterdam, Excerpta Medica: 121-131.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist." Microbes Infect **2**(9): 1051-1060.

Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K. & Wozniak, D. J. (2009). "Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix." PLoS Pathog **5**(3): e1000354.

Ma, L., Lu, H., Sprinkle, A., Parsek, M. R. & Wozniak, D. J. (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide." J Bacteriol **189**(22): 8353-8356.

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**(1-2): 223-233.

Mah, T. F. & O'Toole, G. A. (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents." Trends Microbiol **9**(1): 34-39.

Mahajan-Miklos, S., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (2000). "Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts." Mol Microbiol **37**(5): 981-988.

Maier, B., Potter, L., So, M., Long, C. D., Seifert, H. S. & Sheetz, M. P. (2002). "Single pilus motor forces exceed 100 pN." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16012-16017.

Maier, R. M. & Soberon-Chavez, G. (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications." Appl Microbiol Biotechnol **54**(5): 625-633.

Manning, P. A., Pugsley, A. P. & Reeves, P. (1977). "Defective growth functions in mutants of *Escherichia coli* K12 lacking a major outer membrane protein." J Mol Biol **116**(2): 285-300.

Marotte, K., Sabin, C., Preville, C., Moume-Pymbock, M., Wimmerova, M., Mitchell, E. P., Imberty, A. & Roy, R. (2007). "X-ray structures and thermodynamics of the interaction of PA-III from *Pseudomonas aeruginosa* with disaccharide derivatives." ChemMedChem **2**(9): 1328-1338.

Marquart, M. E., Caballero, A. R., Chomnawang, M., Thibodeaux, B. A.,

- Twining, S. S. & O'Callaghan, R. J. (2005).** "Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(10): 3761-3768.
- Marques, C. N., Davies, D. G. & Sauer, K. (2015).** "Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid." Pharmaceuticals (Basel) **8**(4): 816-835.
- Martinez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D. N. (1999).** "LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components." Mol Microbiol **34**(2): 317-326.
- Martinez, E., Estupinan, M., Pastor, F. I., Busquets, M., Diaz, P. & Manresa, A. (2013).** "Functional characterization of ExFadLO, an outer membrane protein required for exporting oxygenated long-chain fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*." Biochimie **95**(2): 290-298.
- Matsukawa, M. & Greenberg, E. P. (2004).** "Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." J Bacteriol **186**(14): 4449-4456.
- Matsuyama, S., Tajima, T. & Tokuda, H. (1995).** "A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane." EMBO J **14**(14): 3365-3372.
- Matsuyama, S., Yokota, N. & Tokuda, H. (1997).** "A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*." EMBO J **16**(23): 6947-6955.
- Mattick, J. S. (2002).** "Type IV pili and twitching motility." Annu Rev Microbiol **56**: 289-314.
- Mayer, M. L. & Armstrong, N. (2004).** "Structure and function of glutamate receptor ion channels." Annu Rev Physiol **66**: 161-181.
- McCoy, W. F., Bryers, J. D., Robbins, J. & Costerton, J. W. (1981).** "Observations of fouling biofilm formation." Can J Microbiol **27**(9): 910-917.
- Merkel, T. J., Barros, C. & Stibitz, S. (1998).** "Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*." J Bacteriol **180**(7): 1682-1690.
- Merril, C. R. (1990).** "Gel-staining techniques." Methods Enzymol **182**: 477-488.
- Merritt, J. H., Brothers, K. M., Kuchma, S. L. & O'Toole, G. A. (2007).** "SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function." J Bacteriol **189**(22): 8154-8164.
- Merz, A. J., So, M. & Sheetz, M. P. (2000).** "Pilus retraction powers bacterial twitching motility." Nature **407**(6800): 98-102.
- Mewe, M., Tielker, D., Schonberg, 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 **119**(8): 595-599.
- Mikkelsen, H., Sivaneson, M. & Filloux, A. (2011).** "Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*." Environ Microbiol **13**(7): 1666-1681.
- Minamino, T., Imada, K. & Namba, K. (2008).** "Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly." Mol Biosyst **4**(11): 1105-1115.
- Mirelman, D. & Ofek, I. (1986).** Introduction to microbial lectins and agglutinins. Microbial lectins and agglutinins. D. Mirelman. New York, John Wiley: 1-19.
- Misic, A. M., Satyshur, K. A. & Forest, K. T. (2010).** "*P. aeruginosa* PilT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor." J Mol Biol **400**(5): 1011-1021.
- 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**(12): 918-921.
- Mitchell, E. P., Sabin, C., Snajdrova, L., Pokorna, M., Perret, S., Gautier, C., Hofr, C., Gilboa-Garber, N., Koca, J., Wimmerova, M. & Imberty, A. (2005).** "High affinity fucose binding of *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III: 1.0 Å resolution crystal structure of the complex combined with thermodynamics and computational chemistry approaches." Proteins **58**(3): 735-746.
- Morita, Y., Tomida, J. & Kawamura, Y. (2012).** "MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*." Front Microbiol **3**: 408.
- Morita, Y., Tomida, J. & Kawamura, Y. (2014).** "Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials." Front Microbiol **4**: 422.
- Morton, L. H. G. & Surman, S. B. (1994).** "Biofilms in biodeterioration — a review." International Biodeterioration & Biodegradation **34**(3): 203-221.
- Mrzkova, J., Malinowska, L. & Wimmerova, M. (2017).** "Step-By-Step In Vitro Mutagenesis: Lessons From Fucose-Binding Lectin PA-III." Methods Mol Biol **1498**: 399-419.
- 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**(8): 841-847.
- Murray, T. S. & Kazmierczak, B. I. (2006).** "FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **188**(19): 6995-7004.
- Nestorovich, E. M., Sugawara, E., Nikaido, H. & Bezrukov, S. M. (2006).** "*Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel." J Biol Chem **281**(24): 16230-16237.
- Nguyen, Y., Sugiman-Marangos, S., Harvey, H., Bell, S. D., Charlton, C. L.,**

- Junop, M. S. & Burrows, L. L. (2015).** "*Pseudomonas aeruginosa* minor pilins prime type IVa pilus assembly and promote surface display of the PilY1 adhesin." J Biol Chem **290**(1): 601-611.
- Nicas, T. I. & Hancock, R. E. W. (1983).** "*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant." J Bacteriol **153**(1): 281-285.
- Nickel, J. C., Wright, J. B., Ruseska, I., Marrie, T. J., Whitfield, C. & Costerton, J. W. (1985).** "Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter *in vitro*." Eur J Clin Microbiol **4**(2): 213-218.
- Nikaido, H. & Vaara, M. (1985).** "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability." Microbiol Rev **49**(1): 1-32.
- Nothaft, H. & Szymanski, C. M. (2010).** "Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever." Nat Rev Microbiol **8**(11): 765-778.
- Noverr, M. C. & Huffnagle, G. B. (2004).** "Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites." Infect Immun **72**(11): 6206-6210.
- Nunn, D., Bergman, S. & Lory, S. (1990).** "Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, and *pilD*, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili." J Bacteriol **172**(6): 2911-2919.
- O'Toole, G. A. (2004).** "Microbiology: Jekyll or hide?" Nature **432**(7018): 680-681.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).** "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." Molecular Microbiology **30**(2): 295-304.
- O'Toole, G. A. & Wong, G. C. (2016).** "Sensational biofilms: surface sensing in bacteria." Curr Opin Microbiol **30**: 139-146.
- Obernesser, H. J., Doring, G. & Botzenhart, K. (1981).** "Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Purification and characterization of two exoproteases (author's transl)." Zentralbl Bakteriol A **249**(1): 76-88.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995).** "Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6424-6428.
- Ofek, I., Hasty, D. L. & Sharon, N. (2003).** "Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems." FEMS Immunol Med Microbiol **38**(3): 181-191.
- Ohman, D. E. & Chakrabarty, A. M. (1981).** "Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate." Infect Immun **33**(1): 142-148.
- Okuda, S. & Tokuda, H. (2011).** "Lipoprotein sorting in bacteria." Annu Rev Microbiol **65**: 239-259.
- Old, D. C. (1972).** "Inhibition of the interaction between fimbrial

haemagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates." J Gen Microbiol **71**(1): 149-157.

Olsen, G. J., Woese, C. R. & Overbeek, R. (1994). "The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology." J Bacteriol **176**(1): 1-6.

Orans, J., Johnson, M. D., Coggan, K. A., Sperlazza, J. R., Heiniger, R. W., Wolfgang, M. C. & Redinbo, M. R. (2010). "Crystal structure analysis reveals *Pseudomonas* PilY1 as an essential calcium-dependent regulator of bacterial surface motility." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(3): 1065-1070.

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**(2): 277-284.

Palleroni, N. J. (1993). "*Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **64**(3-4): 231-251.

Paranchych, W., Sastry, P. A., Frost, L. S., Carpenter, M., Armstrong, G. D. & Watts, T. H. (1979). "Biochemical studies on pili isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO." Can J Microbiol **25**(10): 1175-1181.

Parge, H. E., Forest, K. T., Hickey, M. J., Christensen, D. A., Getzoff, E. D. & Tainer, J. A. (1995). "Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution." Nature **378**(6552): 32-38.

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**(5111): 1127-1130.

Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P. & Saier, M. H., Jr. (2003). "Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella." Microbiology **149**(Pt 11): 3051-3072.

Pearson, J. P., Feldman, M., Iglewski, B. H. & Prince, A. (2000). "*Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection." Infect Immun **68**(7): 4331-4334.

Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1994). "Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 197-201.

Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1995). "A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1490-1494.

Pellicic, V. (2008). "Type IV pili: *e pluribus unum*?" Mol Microbiol **68**(4): 827-837.

Perret, S., Sabin, C., Dumon, C., Pokorna, M., Gautier, C., Galanina, O., Ilia, S., Bovin, N., Nicaise, M., Desmadril, M., Gilboa-Garber, N., Wimmerova, M., Mitchell, E. P. & Imberty, A. (2005).

"Structural basis for the interaction between human milk oligosaccharides and the bacterial lectin PA-III of *Pseudomonas aeruginosa*." Biochem J **389**(Pt 2): 325-332.

Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. (1997). "Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **179**(10): 3127-3132.

Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T., Camara, M., Haas, D. & Williams, P. (2001). "The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **183**(22): 6676-6683.

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nat Methods **8**(10): 785-786.

Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. C. & Heijnen, J. J. (1998). "Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach." Biotechnol Bioeng **58**(1): 101-116.

Pier, G. B. (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity." Int J Med Microbiol **297**(5): 277-295.

Pohlschroder, M., Ghosh, A., Tripepi, M. & Albers, S. V. (2011). "Archaeal type IV pilus-like structures--evolutionarily

conserved prokaryotic surface organelles." Curr Opin Microbiol **14**(3): 357-363.

Pratt, L. A. & Kolter, R. (1998). "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." Mol Microbiol **30**(2): 285-293.

Price, B. M., Galloway, D. R., Baker, N. R., Gilleland, L. B., Staczek, J. & Gilleland, H. E., Jr. (2001). "Protection against *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection in mice by genetic immunization against outer membrane protein F (OprF) of *P. aeruginosa*." Infect Immun **69**(5): 3510-3515.

Pruitt, B. A., Jr., McManus, A. T., Kim, S. H. & Goodwin, C. W. (1998). "Burn wound infections: current status." World J Surg **22**(2): 135-145.

Pugsley, A. P. (1993). "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria." Microbiol Rev **57**(1): 50-108.

Puskas, A., Greenberg, E. P., Kaplan, S. & Schaefer, A. L. (1997). "A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol **179**(23): 7530-7537.

Ramsey, D. M. & Wozniak, D. J. (2005). "Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis." Mol Microbiol **56**(2): 309-322.

Rao, F., Yang, Y., Qi, Y. & Liang, Z. X. (2008). "Catalytic mechanism of cyclic di-

- GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **190**(10): 3622-3631.
- Rashid, M. H. & Kornberg, A. (2000).** "Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4885-4890.
- Rawling, E. G., Brinkman, F. S. & Hancock, R. E. (1998).** "Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association." J Bacteriol **180**(14): 3556-3562.
- Reales-Calderón, J. A., Corona, F., Monteoliva, L., Gil, C. & Martínez, J. L. (2015).** "Quantitative proteomics unravels that the post-transcriptional regulator Crc modulates the generation of vesicles and secreted virulence determinants of *Pseudomonas aeruginosa*." Data in Brief **4**: 450-453.
- Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A. & Haas, D. (1997).** "The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase." Mol Microbiol **24**(2): 309-319.
- Reisner, A., Hoiby, N., Tolker-Nielsen, T. & Molin, S. (2005).** "Microbial pathogenesis and biofilm development." Contrib Microbiol **12**: 114-131.
- Ribbe, J., Baker, A. E., Euler, S., O'Toole, G. A. & Maier, B. (2017).** "Role of Cyclic Di-GMP and Exopolysaccharide in Type IV Pilus Dynamics." J Bacteriol **199**(8).
- Ricci, D. P. & Silhavy, T. J. (2012).** "The Bam machine: a molecular cooper." Biochim Biophys Acta **1818**(4): 1067-1084.
- Richard, P., Le Floch, R., Chamoux, C., Pannier, M., Espaze, E. & Richet, H. (1994).** "*Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains." J Infect Dis **170**(2): 377-383.
- Richardson, P. D. & Steiner, M. (1995).** Principles of Cell Adhesion, CRC Press Inc.
- Rini, J. M. (1995).** "Lectin structure." Annu Rev Biophys Biomol Struct **24**: 551-577.
- Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. (1995).** "Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin." Infect Immun **63**(12): 4868-4876.
- Romling, U., Gomelsky, M. & Galperin, M. Y. (2005).** "C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system." Mol Microbiol **57**(3): 629-639.
- Rosenau, F., Isenhardt, S., Gdynia, A., Tielker, D., Schmidt, E., Tielen, P., Schobert, M., Jahn, D., Wilhelm, S. & Jaeger, K. E. (2010).** "Lipase LipC affects motility, biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas*

aeruginosa." Fems Microbiology Letters **309**(1): 25-34.

Rosenau, F. & Jaeger, K. (2000). "Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion." Biochimie **82**(11): 1023-1032.

Roy-Burman, A., Savel, R. H., Racine, S., Swanson, B. L., Revadigar, N. S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D. W. & Wiener-Kronish, J. P. (2001). "Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections." J Infect Dis **183**(12): 1767-1774.

Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A. & Dwek, R. A. (2001). "Glycosylation and the immune system." Science **291**(5512): 2370-2376.

Rukholm, G., Mugabe, C., Azghani, A. O. & Omri, A. (2006). "Antibacterial activity of liposomal gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa*: a time-kill study." Int J Antimicrob Agents **27**(3): 247-252.

Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A., Iglewski, B. H. & Hamood, A. N. (1999). "Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections." Infect Immun **67**(11): 5854-5862.

Ryder, C., Byrd, M. & Wozniak, D. J. (2007). "Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." Curr Opin Microbiol **10**(6): 644-648.

Sabin, C., Mitchell, E. P., Pokorna, M., Gautier, C., Utille, J. P., Wimmerova, M. & Imberty, A. (2006). "Binding of different monosaccharides by lectin PA-III from *Pseudomonas aeruginosa*: thermodynamics data correlated with X-ray structures." FEBS Lett **580**(3): 982-987.

Sadovskaya, I., Brisson, J. R., Lam, J. S., Richards, J. C. & Altman, E. (1998). "Structural elucidation of the lipopolysaccharide core regions of the wild-type strain PAO1 and O-chain-deficient mutant strains AK1401 and AK1012 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5." Eur J Biochem **255**(3): 673-684.

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**(4839): 487-491.

Saiman, L., Ishimoto, K., Lory, S. & Prince, A. (1990). "The effect of piliation and exoproduct expression on the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial monolayers." J Infect Dis **161**(3): 541-548.

Sakai, D., Horiuchi, T. & Komano, T. (2001). "Atpase activity and multimer formation of PilQ protein are required for thin pilus biogenesis in plasmid R64." J Biol Chem **276**(21): 17968-17975.

Salit, I. E. & Gotschlich, E. C. (1977a). "Hemagglutination by purified type I *Escherichia coli* pili." J Exp Med **146**(5): 1169-1181.

- Salit, I. E. & Gotschlich, E. C. (1977b). "Type I *Escherichia coli* pili: characterization of binding to monkey kidney cells." J Exp Med **146**(5): 1182-1194.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition." Cold Spring Harbor Laboratory Press U.S.
- Satyshur, K. A., Worzalla, G. A., Meyer, L. S., Heiniger, E. K., Aukema, K. G., Mistic, A. M. & Forest, K. T. (2007). "Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility." Structure **15**(3): 363-376.
- 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**(4): 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**(21): 7312-7326.
- Savvides, S. N. (2007). "Secretion superfamily ATPases swing big." Structure **15**(3): 255-257.
- Scanlin, T. F. & Glick, M. C. (2001). "Glycosylation and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Respir Res **2**(5): 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**(9): 5243-5248.
- Schirm, M., Arora, S. K., Verma, A., Vinogradov, E., Thibault, P., Ramphal, R. & Logan, S. M. (2004). "Structural and genetic characterization of glycosylation of type a flagellin in *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Bacteriology **186**(9): 2523-2531.
- Schoner, R. G., Ellis, L. F. & Schoner, B. E. (1985). "Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone." Nat Biotechnol: 151-154.
- Schulz, S., Eckweiler, D., Bielecka, A., Nicolai, T., Franke, R., Dotsch, A., Hornischer, K., Bruchmann, S., Duvel, J. & Haussler, S. (2015). "Elucidation of sigma factor-associated networks in *Pseudomonas aeruginosa* reveals a modular architecture with limited and function-specific crosstalk." PLoS Pathog **11**(3): e1004744.
- 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." Journal of Bacteriology **185**(7): 2066-2079.
- Semmler, A. B., Whitchurch, C. B., Leech, A. J. & Mattick, J. S. (2000). "Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas*

- aeruginosa*." Microbiology **146** (Pt 6): 1321-1332.
- Semmler, A. B., Whitchurch, C. B. & Mattick, J. S. (1999).** "A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **145** (Pt 10): 2863-2873.
- Shaanan, B., Lis, H. & Sharon, N. (1991).** "Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose." Science **254**(5033): 862-866.
- Sharon, N. (1984).** Lectin-like bacterial adherence to animal cells Attachment of organisms to the gut mucosa. E. C. Baedeker. USA, CRC Press. **1**: 129-147.
- Sharon, N. (1987).** "Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease." FEBS Lett **217**(2): 145-157.
- Sharon, N. & Ofek, I. (2000).** "Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases." Glycoconj J **17**(7-9): 659-664.
- Sharon, N. & Ofek, I. (2002).** "Fighting infectious diseases with inhibitors of microbial adhesion to host tissues." Crit Rev Food Sci Nutr **42**(3 Suppl): 267-272.
- Shen, D. K., Filopon, D., Chaker, H., Boullanger, S., Derouazi, M., Polack, B. & Toussaint, B. (2008).** "High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites." Microbiology **154**(Pt 8): 2195-2208.
- Sheth, H. B., Lee, K. K., Wong, W. Y., Srivastava, G., Hindsgaul, O., Hodges, R. S., Paranchych, W. & Irvin, R. T. (1994).** "The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence beta GalNAc(1-4)beta Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2." Mol Microbiol **11**(4): 715-723.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M. & Parsek, M. R. (2006).** "The impact of *quorum sensing* and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional." Mol Microbiol **62**(5): 1264-1277.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Romling, U. (2004).** "GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility." Mol Microbiol **53**(4): 1123-1134.
- 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**: 640-659.
- Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983).** "A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria." Nat Biotech **1**(9): 784-791.
- Sivaraman, T., Kumar, T. K., Jayaraman, G. & Yu, C. (1997).** "The mechanism of 2,2,2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation." J Protein Chem **16**(4): 291-297.
- Skerker, J. M. & Berg, H. C. (2001).** "Direct observation of extension and retraction of

type IV pili." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6901-6904.

Skoczinski, P. (2010). Cellular localisation of LecA and identification of putative LecA ligands in *Pseudomonas aeruginosa*. Bachelor of Science, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Skropeta, D. (2009). "The effect of individual N-glycans on enzyme activity." Bioorg Med Chem **17**(7): 2645-2653.

Smith, E. W., Zhang, X., Behzadi, C., Andrews, L. D., Cohen, F. & Chen, Y. (2015). "Structures of *Pseudomonas aeruginosa* LpxA Reveal the Basis for Its Substrate Selectivity." Biochemistry **54**(38): 5937-5948.

Smith, M. F., Jr., Mitchell, A., Li, G., Ding, S., Fitzmaurice, A. M., Ryan, K., Crowe, S. & Goldberg, J. B. (2003). "Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells." J Biol Chem **278**(35): 32552-32560.

Smith, R. S., Harris, S. G., Phipps, R. & Iglewski, B. (2002). "The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo." J Bacteriol **184**(4): 1132-1139.

Sonawane, A., Jyot, J. & Ramphal, R. (2006). "*Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins." Infection and Immunity **74**(12): 7035-7039.

Spangenberg, C., Heuer, T., Burger, C. & Tummli, B. (1996). "Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*." FEBS Lett **396**(2-3): 213-217.

Speert, D. P. (2002). "Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*." Front Biosci **7**: e354-361.

Starnbach, M. N. & Lory, S. (1992). "The *fliA* (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis." Mol Microbiol **6**(4): 459-469.

Stehling, E. G., Silveira, W. D. & Leite Dda, S. (2008). "Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections." Braz J Infect Dis **12**(1): 86-88.

Steuer, M. K., Beuth, J., Hofstadter, F., Probst, L., Ko, H. L., Pulverer, G. & Strutz, J. (1995). "Blood group phenotype determines lectin-mediated adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human outer ear canal epithelium." Zentralbl Bakteriologie **282**(3): 287-295.

Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms." Lancet **358**(9276): 135-138.

Stewart, P. S., Peyton, B. M., Drury, W. J. & Murga, R. (1993). "Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Appl Environ Microbiol **59**(1): 327-329.

- Stickler, D. (1999).** "Biofilms." Curr Opin Microbiol **2**(3): 270-275.
- Stimson, E., Virji, M., Makepeace, K., Dell, A., Morris, H. R., Payne, G., Saunders, J. R., Jennings, M. P., Barker, S., Panico, M. & et al. (1995).** "Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose." Mol Microbiol **17**(6): 1201-1214.
- Stoitsova, S. R., Boteva, R. N. & Doyle, R. J. (2003).** "Binding of hydrophobic ligands by *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin." Biochim Biophys Acta **1619**(2): 213-219.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., 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, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. & Olson, M. V. (2000).** "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-964.
- Strom, M. S. & Lory, S. (1987).** "Mapping of export signals of *Pseudomonas aeruginosa* pilin with alkaline phosphatase fusions." J Bacteriol **169**(7): 3181-3188.
- Strom, M. S. & Lory, S. (1993).** "Structure-function and biogenesis of the type IV pili." Annu Rev Microbiol **47**: 565-596.
- Strom, M. S., Nunn, D. & Lory, S. (1991).** "Multiple roles of the pilus biogenesis protein PilD: involvement of PilD in excretion of enzymes from *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **173**(3): 1175-1180.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).** "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- Stuer, W., Jaeger, K. E. & Winkler, U. K. (1986).** "Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **168**(3): 1070-1074.
- Sudakevitz, D. & Gilboa-Garber, N. (1982).** "Effect of *Pseudomonas aeruginosa* lectins on phagocytosis of *Escherichia coli* strains by human polymorphonuclear leucocytes." Microbios **34**(137-38): 159-166.
- Sudakevitz, D., Kostlanova, N., Blatman-Jan, G., Mitchell, E. P., Lerrer, B., Wimmerova, M., Katcoff, D. J., Imberty, A. & Gilboa-Garber, N. (2004).** "A new *Ralstonia solanacearum* high-affinity mannose-binding lectin RS-IIL structurally resembling the *Pseudomonas aeruginosa* fucose-specific lectin PA-IIL." Mol Microbiol **52**(3): 691-700.
- Sugawara, E., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M. & Nikaido, H. (2006).** "*Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations." J Biol Chem **281**(24): 16220-16229.
- Sugawara, E. & Nikaido, H. (1994).** "OmpA Protein of *Escherichia coli* Outer-Membrane Occurs in Open and Closed Channel Forms." Journal of Biological Chemistry **269**(27): 17981-17987.

Suriyanarayanan, T., Periasamy, S., Lin, M. H., Ishihama, Y. & Swarup, S. (2016). "Flagellin FliC Phosphorylation Affects Type 2 Protease Secretion and Biofilm Dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." PLoS One **11**(10): e0164155.

Swanson, A. F. & Kuo, C. C. (1991). "Evidence that the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* is glycosylated." Infect Immun **59**(6): 2120-2125.

Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L. J. & von Mering, C. (2017). "The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible." Nucleic Acids Res **45**(D1): D362-D368.

Szymanski, C. M. & Wren, B. W. (2005). "Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens." Nat Rev Microbiol **3**(3): 225-237.

Tammam, S., Sampaleanu, L. M., Koo, J., Sundaram, P., Ayers, M., Chong, P. A., Forman-Kay, J. D., Burrows, L. L. & Howell, P. L. (2011). "Characterization of the PilN, PilO and PilP type IVa pilus subcomplex." Mol Microbiol **82**(6): 1496-1514.

Thanassi, D. G., Saulino, E. T. & Hultgren, S. J. (1998). "The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway." Curr Opin Microbiol **1**(2): 223-231.

Thibodeaux, B. A., Caballero, A. R., Dajcs, J. J., Marquart, M. E., Engel, L. S. &

O'Callaghan, R. J. (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* protease IV: a corneal virulence factor of low immunogenicity." Ocul Immunol Inflamm **13**(2-3): 169-182.

Thomas, R. J. & Brooks, T. J. (2004). "Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to human respiratory epithelial cells." Microb Pathog **36**(2): 83-92.

Tielker, D. (2001). Klonierung, Überexpression, Reinigung und physiologische Charakterisierung zweier Lektine aus *Pseudomonas aeruginosa*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität-Bochum.

Tielker, D. (2005). Physiologie und Biotechnologie des Lectins B aus *Pseudomonas aeruginosa*. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.

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**(Pt 5): 1313-1323.

Toder, D. S., Gambello, M. J. & Iglewski, B. H. (1991). "*Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*." Mol Microbiol **5**(8): 2003-2010.

Totten, P. A., Lara, J. C. & Lory, S. (1990). "The *rpoN* gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is required for expression of diverse genes, including the flagellin gene." J Bacteriol **172**(1): 389-396.

- Totten, P. A. & Lory, S. (1990).** "Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK." J Bacteriol **172**(12): 7188-7199.
- Traidej, M., Caballero, A. R., Marquart, M. E., Thibodeaux, B. A. & O'Callaghan, R. J. (2003).** "Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV expressed in *Pseudomonas putida*." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(1): 190-196.
- Turnbull, L., Toyofuku, M., Hynen, A. L., Kurosawa, M., Pessi, G., Petty, N. K., Osvath, S. R., Carcamo-Oyarce, G., Gloag, E. S., Shimon, R., Omasits, U., Ito, S., Yap, X., Monahan, L. G., Cavaliere, R., Ahrens, C. H., Charles, I. G., Nomura, N., Eberl, L. & Whitchurch, C. B. (2016).** "Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms." Nat Commun **7**: 11220.
- Ungar, D. (2009).** "Golgi linked protein glycosylation and associated diseases." Semin Cell Dev Biol **20**(7): 762-769.
- Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T. & Jaeger, K. E. (2001).** "DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **183**(2): 587-596.
- Vallet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Camara, M., Ventre, I., Lory, S., Lazdunski, A., Williams, P. & Filloux, A. (2004).** "Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial *cup* gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT." J Bacteriol **186**(9): 2880-2890.
- 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 U S A **98**(12): 6911-6916.
- Vallet-Gely, I., Sharp, J. S. & Dove, S. L. (2007).** "Local and global regulators linking anaerobiosis to *cupA* fimbrial gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **189**(23): 8667-8676.
- Verma, A., Arora, S. K., Kuravi, S. K. & Ramphal, R. (2005).** "Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response." Infect Immun **73**(12): 8237-8246.
- Verma, A., Schirm, M., Arora, S. K., Thibault, P., Logan, S. M. & Ramphal, R. (2006).** "Glycosylation of b-type flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*: Structural and genetic basis." Journal of Bacteriology **188**(12): 4395-4403.
- vfa. (2016).** "Einführung neuer Antibiotika in Deutschland." from <https://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/woran-wir-forschen/neue-antibiotika-den-vorsprung-wahren.html>.
- 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 Padiatr **213**(5): 285-287.

- von Specht, B. U., Gabelsberger, J., Knapp, B., Hundt, E., Schmidt-Pilger, H., Bauernsachs, S., Lenz, U. & Domdey, H. (2000). "Immunogenic efficacy of differently produced recombinant vaccines candidates against *Pseudomonas aeruginosa* infections." J Biotechnol **83**(1-2): 3-12.
- Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J., Mols, M. & Tommassen, J. (2003). "Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly." Science **299**(5604): 262-265.
- 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**(7): 2080-2095.
- Watanabe, K., Honjo, E., Tsukamoto, T. & Funatsu, G. (1992). "Fluorescence studies on the interaction of adenine with ricin A-chain." FEBS Lett **304**(2-3): 249-251.
- Webb, J. S., Thompson, L. S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M. & Kjelleberg, S. (2003). "Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." J Bacteriol **185**(15): 4585-4592.
- Wehbi, H., Portillo, E., Harvey, H., Shimkoff, A. E., Scheurwater, E. M., Howell, P. L. & Burrows, L. L. (2011). "The peptidoglycan-binding protein FimV promotes assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin." J Bacteriol **193**(2): 540-550.
- Weimer, E. T., Lu, H. P., Kock, N. D., Wozniak, D. J. & Mizel, S. B. (2009). "A Fusion Protein Vaccine Containing OprF Epitope 8, OprI, and Type A and B Flagellins Promotes Enhanced Clearance of Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*." Infection and Immunity **77**(6): 2356-2366.
- 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**(5038): 1608-1615.
- Wentworth, J. S., Austin, F. E., Garber, N., Gilboa-Garber, N., Paterson, C. A. & Doyle, R. J. (1991). "Cytoplasmic lectins contribute to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*." Biofouling **4**(1-3): 99-104.
- Westbrock-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrenner, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R. & Stover, C. K. (1999). "Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability." Antimicrob Agents Chemother **43**(12): 2975-2983.
- Whitchurch, C. B., Hobbs, M., Livingston, S. P., Krishnapillai, V. & Mattick, J. S. (1991). "Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria." Gene **101**(1): 33-44.
- Whitchurch, C. B., Leech, A. J., Young, M. D., Kennedy, D., Sargent, J. L., Bertrand, J. J., Semmler, A. B., Mellick, A. S., Martin,

- P. R., Alm, R. A., Hobbs, M., Beatson, S. A., Huang, B., Nguyen, L., Commolli, J. C., Engel, J. N., Darzins, A. & Mattick, J. S. (2004). "Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **52**(3): 873-893.
- Whitchurch, C. B. & Mattick, J. S. (1994). "Characterization of a gene, pilU, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **13**(6): 1079-1091.
- 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**(6858): 860-864.
- Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999). "Identification of genes controlled by *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13904-13909.
- Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K. E. (1999). "A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **181**(22): 6977-6986.
- Williams, D. C., Van Frank, R. M., Muth, W. L. & Burnett, J. P. (1982). "Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins." Science **215**(4533): 687-689.
- Wimpenny, W. T. & Colasanti, R. (1997). "A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models." FEMS Microbiol Ecol **22**: 1-16.
- Wingender, J., Neu, T. R. & Flemming, H.-C. (1999). What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function. J. Wingender, T. R. Neu und H.-C. Flemming. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 1-19.
- 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-acetyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9427-9431.
- Winson, M. K., Swift, S., Hill, P. J., Sims, C. M., Griesmayr, G., Bycroft, B. W., Williams, P. & Stewart, G. S. (1998). "Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs." FEMS Microbiol Lett **163**(2): 193-202.
- Winther-Larsen, H. C., Wolfgang, M., Dunham, S., van Putten, J. P., Dorward, D., Lovold, C., Aas, F. E. & Koomey, M. (2005). "A conserved set of pilin-like molecules controls type IV pilus dynamics and organelle-associated functions in *Neisseria gonorrhoeae*." Mol Microbiol **56**(4): 903-917.
- Winther-Larsen, H. C., Wolfgang, M. C., van Putten, J. P., Roos, N., Aas, F. E., Egge-Jacobsen, W. M., Maier, B. & Koomey, M. (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae*: effects of pilin

subunit composition on function and organelle dynamics." J Bacteriol **189**(18): 6676-6685.

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." Journal of Bacteriology **182**(22): 6401-6411.

Wolfgang, M., van Putten, J. P., Hayes, S. F., Dorward, D. & Koomey, M. (2000). "Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili." EMBO J **19**(23): 6408-6418.

Wolfgang, M. C., Lee, V. T., Gilmore, M. E. & Lory, S. (2003). "Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway." Dev Cell **4**(2): 253-263.

Wood, L. F., Leech, A. J. & Ohman, D. E. (2006). "Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Roles of sigma (AlgT) and the AlgW and Prc proteases." Mol Microbiol **62**(2): 412-426.

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**(9): 3469-3478.

Woodruff, W. A. & Hancock, R. E. W. (1988). "Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein

F-deficient mutants after *in vitro* and *in vivo* insertion mutagenesis of the cloned gene." J Bacteriol **170**(6): 2592-2598.

Woodruff, W. A. & Hancock, R. E. W. (1989). "*Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein." J Bacteriol **171**(6): 3304-3309.

Woodruff, W. A., Parr, T. R., Jr., Hancock, R. E. W., Hanne, L. F., Nicas, T. I. & Iglewski, B. H. (1986). "Expression in *Escherichia coli* and function of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F." J Bacteriol **167**(2): 473-479.

World-Health-Organization (2017). GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS. Global priority pathogens list. E. Tacconelli und N. Magrini, World Health Organization.

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 U S A **100**(13): 7907-7912.

Wretling, B. & Pavlovskis, O. R. (1981). "The role of proteases and exotoxin A in the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* infections." Scand J Infect Dis Suppl **29**: 13-19.

Wu, L., Estrada, O., Zaborina, O., Bains, M., Shen, L., Kohler, J. E., Patel, N., Musch, M. W., Chang, E. B., Fu, Y. X.,

- Jacobs, M. A., Nishimura, M. I., Hancock, R. E. W., Turner, J. R. & Alverdy, J. C. (2005). "Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*." Science **309**(5735): 774-777.
- 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**(5): 754-764.
- Wyss, C. (1998). "Flagellins, but not endoflagellar sheath proteins, of *Treponema pallidum* and of pathogen-related oral spirochetes are glycosylated." Infect Immun **66**(12): 5751-5754.
- Xu, B. & Wozniak, D. J. (2015). "Development of a Novel Method for Analyzing *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility and Its Application to Define the AmrZ Regulon." PLoS One **10**(8): e0136426.
- Yahr, T. L., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1996a). "Genetic relationship between the 53- and 49-kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **178**(5): 1412-1419.
- Yahr, T. L. & Frank, D. W. (1994). "Transcriptional organization of the trans-regulatory locus which controls exoenzyme S synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **176**(13): 3832-3838.
- Yahr, T. L., Goranson, J. & Frank, D. W. (1996b). "Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway." Mol Microbiol **22**(5): 991-1003.
- Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. (1998). "ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13899-13904.
- Yanagihara, K., Tomono, K., Kaneko, Y., Miyazaki, Y., Tsukamoto, K., Hirakata, Y., Mukae, H., Kadota, J., Murata, I. & Kohno, S. (2003). "Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis." J Med Microbiol **52**(Pt 6): 531-535.
- Yasuda, Y., Ikeda, S., Sakai, H., Tsukuba, T., Okamoto, K., Nishishita, K., Akamine, A., Kato, Y. & Yamamoto, K. (1999). "Role of N-glycosylation in cathepsin E. A comparative study of cathepsin E with distinct N-linked oligosaccharides and its nonglycosylated mutant." Eur J Biochem **266**(2): 383-391.
- Yoon, S. S., Hennigan, R. F., Hilliard, G. M., Ochsner, U. A., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., Allen, H. L., DeKievit, T. R., Gardner, P. R., Schwab, U., Rowe, J. J., Iglewski, B. H., McDermott, T. R., Mason, R. P., Wozniak, D. J., Hancock, R. E. W., Parsek, M. R., Noah, T. L., Boucher, R. C. & Hassett, D. J. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis." Dev Cell **3**(4): 593-603.

8 Computerprogramme, Onlinedienste und Datenbanken

Programme

CloneManager CmSuite 9	(Scientific & Educational Software)
EndNote X6, X7	(Thomson Reuters)
Office 2010-2016	(Microsoft)
AIDA (Advanced Image Data Analyzer) V4.18	(Raytest Isotopenmessgeräte GmbH)
ChemStar Imager Professional	(Intas)

Onlinedienste und Datenbanken

http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/	Mehrfach-Sequenz-Alignment
http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi	Primer3
https://string-db.org/	Protein-Protein-Interaktions- Netzwerk (Szklarczyk <i>et al.</i> , 2017)
https://www.pseudomonas.com	<i>Pseudomonas</i> -Datenbank
http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP	Signalsequenz-Vorhersage
http://www.fr33.net/seqedit.php	Sequenzeditor
http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/	Tm-Kalkulator

9 Anhang

Die vorherigen Ergebnisse haben darauf hingedeutet, dass *rocR* bzw. *rocS1* möglicherweise einen Einfluss auf die Sekretion von LecB haben (Tab. 11). Da die Transposonmutante von *rocR* bereits mittels mELLA untersucht wurde, wurde ebenfalls ein Stamm mit einer Deletion von *rocS1* benötigt. Dazu wurde eine Transposonmutante des *P. aeruginosa* PA14 Stammes von der *Havard Medical School* zur Überprüfung der Hypothese bezogen (Liberati *et al.*, 2006). Diese Stämme wurden kultiviert und die Menge an extrazellulärem LecB mittels mELLA quantifiziert (Abb. 41 A).

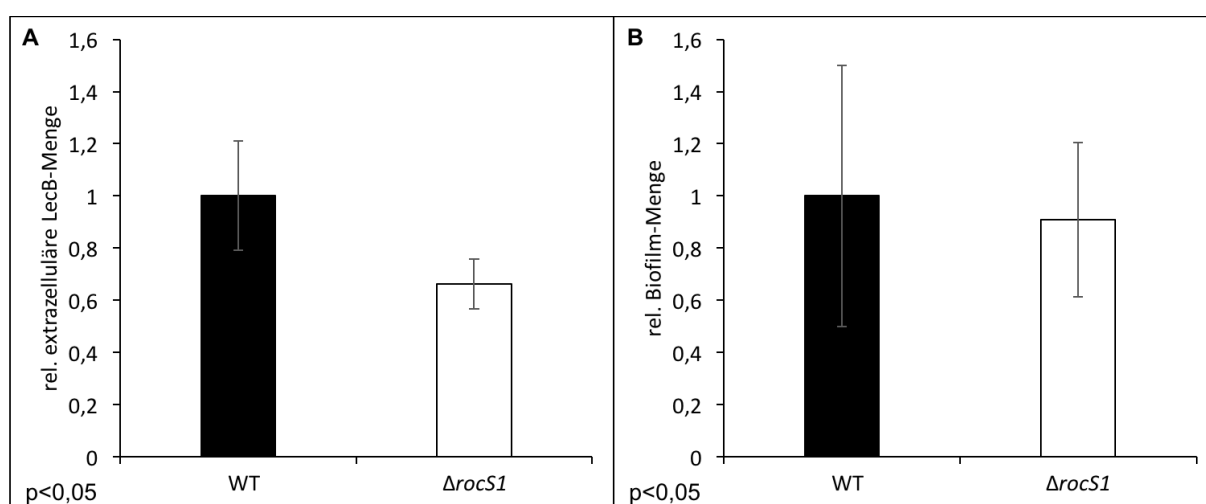


Abbildung 41 Der Einfluss der Deletion von *rocS1* auf die Sekretion von LecB und die Biofilmbildung. (A) Quantifizierung von extrazellulärem LecB mittels mELLA. Dazu wurden HK aus ÜK auf O.D._{580 nm} = 0,05 inokuliert und für 24 h kultiviert (LB-Medium, 650 UpM, 37°C). Anschließend wurde die Gesamtzellzahl mittels Messung der optischen Dichte bei 580 nm Wellenlänge ermittelt, die Zellen sedimentiert (15 min, 4.000 x g, RT) und die Überstände für den mELLA (2.16) verwendet (n=4) (B) Quantifizierung von Biofilmen mittels Kristallviolett färbung. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme auf O.D._{580 nm} = 1,0 inokuliert und für 24 h in Mikrotiterplatten kultiviert (LB-Medium, 37°C). Anschließend folgte die Kristallviolett färbung (2.25) der Biofilme (n=6). Die in diesem Versuchsteil verwendeten Stämme und Transposonmutanten basieren auf dem *P. aeruginosa* PA14 Referenzstamm.

Es konnte ein Einfluss der Deletion von *rocS1* mittels mELLA auf die extrazelluläre Menge LecB ermittelt werden (Abb. 41 A). Dem entgegen konnte kein Einfluss auf die Biofilmbildung beobachtet werden (Abb. 41 B).

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt. Ich habe keinen Doktorgrad an einer anderen Hochschule erworben oder zu erwerben versucht.

Düsseldorf, den _____

Tobias Schwabroch