

INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND BIOLOGIE
ARBEITSGRUPPE FÜR PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE

CHARAKTERISIERUNG DER
LIPOPOLYSACCHARID-BINDUNGSEIGENSCHAFTEN VON
ADHÄSIONSPROTEINEN AUS *SALMONELLA*-BAKTERIOPHAGEN

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
„DOCTOR RERUM NATURALIUM“ (DR. RER. NAT)
IN DER WISSENSCHAFTSDISZIPLIN
„PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE“

VORGELEGT VON

ANDREAS SCHMIDT

GEBOREN AM 29. SEPTEMBER 1982 IN KRASNOJARSK, RUSSLAND



UNIVERSITÄT POTSDAM

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT

POTSDAM, JANUAR 2015

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-79529

<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-79529>

ZUSAMMENFASSUNG

Die Interaktionen von komplexen Kohlenhydraten und Proteinen sind ubiquitär. Sie spielen wichtige Rollen in vielen physiologischen Prozessen wie Zelladhäsion, Signaltransduktion sowie bei viralen Infektionen. Die molekularen Grundlagen der Interaktion sind noch nicht komplett verstanden. Ein Modellsystem für Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen besteht aus Adhäsionsproteinen (Tailspikes) von Bakteriophagen, die komplexe Kohlenhydrate auf bakteriellen Oberflächen (O-Antigen) erkennen. Das Tailspike-Protein (TSP), das in dieser Arbeit betrachtet wurde, stammt aus dem Bakteriophagen 9NA (9NATSP). 9NATSP weist eine hohe strukturelle Homologie zum gut charakterisierten TSP des Phagen P22 (P22TSP) auf, bei einer niedriger sequenzieller Ähnlichkeit. Die Struktur der beiden Tailspikes ist bekannt, sodass sie ein geeignetes System für vergleichende Bindungsstudien darstellen, um die strukturellen Grundlagen für die Unterschiede der Spezifität zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *ELISA-like tailspike adsorption assay* (ELITA) etabliert, um Binderpaare aus TSPs und O-Antigen zu identifizieren. Dabei wurden 9NATSP und P22TSP als Sonden eingesetzt, deren Bindung an die intakten, an die Mikrotiterplatte adsorbierten Bakterien getestet wurde. Beim Test einer Sammlung aus 44 *Salmonella*-Stämmen wurden Stämme identifiziert, die bindendes O-Antigen exprimieren. Gleichzeitig wurden Unterschiede in der Bindung der beiden TSPs an *Salmonella*-Stämme mit gleichem O-Serotyp beobachtet. Die Ergebnisse der ELITA-Messung wurden qualitativ durch eine FACS-basierte Bindungsmessung bestätigt. Zusätzlich ermöglichte die FACS-Messung bei Stämmen, die teilweise modifizierte O-Antigene herstellen, den Anteil an Zellen mit und ohne Modifikation zu erfassen.

Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-basierten Interaktionsmessungen wurden eingesetzt, um Bindungsaffinitäten für eine TSP-O-Antigen Kombination zu quantifizieren. Dafür wurden zwei Methoden getestet, um die Oligosaccharide auf einem SPR-Chip zu immobilisieren. Zum einen wurden die enzymatisch hergestellten O-Antigenfragmente mit einem bifunktionalen Oxaminadapter derivatisiert, der eine primäre Aminogruppe für die Immobilisierung bereitstellt. Ein Versuch, diese Oligosaccharidfragmente zu immobilisieren, war jedoch nicht erfolgreich. Dagegen wurde das nicht derivatisierte Polysaccharid, bestehend aus repetitivem O-Antigen und einem konservierten Kernsaccharid, erfolgreich auf einem SPR-Chip immobilisiert. Die Immobilisierung wurde durch Interaktionsmessungen mit P22TSP bestätigt. Durch die Immobilisierung des Polysaccharids sind somit quantitative SPR-Bindungsmessungen mit einem polydispersen Interaktionspartner möglich.

Eine Auswahl von *Salmonella*-Stämmen mit einer ausgeprägt unterschiedlichen Bindung von 9NATSP und P22TSP im ELITA-Testsystem wurde hinsichtlich der Zusammensetzung des O-Antigens mittels HPLC, Kapillargelelektrophorese und

MALDI-MS analysiert. Dabei wurden nicht-stöchiometrische Modifikationen der O-Antigene wie Acetylierung und Glucosylierung detektiert. Das Ausmaß der Glucosylierung korrelierte negativ mit der Effizienz der Bindung und des Verdaus durch die beiden TSPs, wobei der negative Effekt bei 9NATSP weniger stark ausgeprägt war als bei P22TSP. Dies stimmt mit den Literaturdaten zu Infektivitätsstudien mit 9NA und P22 überein, die mit Stämmen mit vergleichbaren O-Antigenvarianten durchgeführt wurden. Die Korrelation zwischen der Glucosylierung und Bindungseffizienz konnte strukturell interpretiert werden.

Auf Grundlage der O-Antigenanalysen sowie der Ergebnisse der ELITA- und FACS-Bindungstests wurden die *Salmonella*-Stämme Brancaster und Kalamu identifiziert, die annähernd quantitativ glucosyliertes O-Antigen exprimieren. Damit eignen sich diese Stämme für weiterführende Studien, um die Zusammenhänge zwischen der Spezifität und der Organisation der Bindestellen der beiden TSPs zu untersuchen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Membranaufbau der gramnegativen Bakterien	1
1.1.1 Bedeutung der gramnegativen Bakterien am Beispiel von <i>Sal-</i> <i>monella</i>	1
1.1.2 Lipopolysaccharid	1
1.1.3 O-Antigen	2
1.1.4 Struktur der O-Antigene O2, O4, O4,5 und O9	4
1.1.5 Struktur der O-Antigene O3,10 und O11	5
1.1.6 Nicht-stöchiometrische Modifikationen von O-Ag	5
1.2 Adhäsionsproteine der Bakteriophagen	6
1.2.1 Viren	6
1.2.2 Bakteriophagen P22 und 9NA	8
1.2.3 Adhäsionsproteine (Tailspikes) der Bakteriophagen P22 und 9NA	9
1.3 O-Ag und Tailspikes als Modell für Protein-Kohlenhydrat Interaktionen	12
1.3.1 Protein-Kohlenhydrat Interaktionssysteme in der Natur	12
1.3.2 Wechselwirkungen bei Protein-Kohlenhydrat Interaktionen . .	13
1.3.3 Interaktionen bei Bindung von P22TSP an O-Ag-Fragmente der Serogruppen O2, O4 und O9	15
1.4 Aufgabenstellung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Puffer	17
2.1.3 Standards und Kits	19
2.1.4 Enzyme	19
2.1.5 Plasmide, Vektoren und Primer	19
2.1.6 Medien und Antibiotika	19
2.1.7 Bakterienstämme	20
2.1.8 Geräte	21
2.1.8.1 Spektrophotometer	21

2.1.8.2	Zentrifugen und Rotoren	21
2.1.8.3	HPLC, FPLC, Detektoren, Säulen	22
2.1.8.4	Sonstige Geräte	22
2.1.9	Wissenschaftliche Software	22
2.1.10	Sonstige Materialien	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	24
2.2.1.2	Transformation von Bakterien	24
2.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.2.1.4	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA	24
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.2.1.6	Klonierung der Fusionskonstrukte der Tailspikes mit N-terminalen TwinStrep-tags	25
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	25
2.2.2.1	Expression rekombinanter Tailspike-Proteine	25
2.2.2.2	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.2.3	Kohlenhydrat-bezogene Methoden	27
2.2.3.1	Herstellung von Lipopolysaccharid	27
2.2.3.2	Herstellung von Polysaccharid	27
2.2.3.3	De-O-Acetylierung von Polysaccharid	28
2.2.3.4	Verdau von Polysaccharid durch Tailspikes	28
2.2.3.5	Derivatisierung der Oligosaccharidfragmente mit dem bi-funktionalen Oxaminadapter für Oberflächenplasmonresonanz-Messungen	28
2.2.3.6	Derivatisierung der Oligosaccharidfragmente mit APTS für die Kapillargelelektrophorese	28
2.2.3.7	Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mit intaktem Polysaccharid	29
2.2.3.8	Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mit 3RU-Fragmenten	29
2.2.3.9	<i>Matrix-assisted laser-desorbtion ionization mass spectrometry</i>	29
2.2.3.10	ELITA-Messung	30
2.2.3.11	Floureszenz-Durchflusszytometrie (FACS)	30
2.2.3.12	Kapillargelelektrophorese	31
2.2.3.13	¹ H-Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) der derivatisierten Oligosaccharidfragmente	31

3	Ergebnisse	32
3.1	Bindung von 9NATSP und P22TSP an <i>Salmonella</i> -Stämme	32
3.1.1	Prinzipielles Vorgehen bei Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen einem TSP und dem O-Ag	32
3.1.2	ELITA-basierter Bindungstest mit 9NATSP	33
3.1.2.1	Funktionsweise von ELITA	33
3.1.2.2	Auswahl der <i>Salmonella</i> -Stämme	35
3.1.2.3	Unterschiedliche Bindung von 9NATSP an die getesteten <i>Salmonella</i> -Stämme	37
3.1.2.4	Grenzen und Fehler	39
3.1.2.5	Kontrolle der Spezifität der beobachteten Bindung	41
3.1.3	P22TSP und 9NATSP differenzieren im ELITA zwischen <i>Salmonella</i> -Stämmen	42
3.1.4	Interaktionsmessung an immobilisiertem Polysaccharid mittels Oberflächenplasmonresonanz	44
3.1.4.1	Einsatz von 3RU-Fragmenten für Oberflächenplasmonresonanz-Experimente	44
3.1.4.2	Verwendung von intaktem Polysaccharid für Oberflächenplasmonresonanz-Experimente	46
3.1.5	FACS Bindungstest mit 9NATSP und P22TSP	49
3.2	Charakterisierung der O-Ag ausgewählter <i>Salmonella</i> -Stämme	54
3.2.1	Degradation von O-Ag durch P22TSP und 9NATSP	54
3.2.2	Einfluss der O-Acetylierung von O-Ag auf Degradation durch TSP	57
3.2.3	Einfluss der Glucosylierung von O-Ag auf Degradation durch TSP	60
3.2.4	Die Zusammensetzung der O-Ag Fragmente wird durch die Serotypisierung nicht vollständig repräsentiert	64
4	Diskussion	67
4.1	Identifizierung der <i>Salmonella</i> -Stämme mit bindenden O-Ag-Varianten	67
4.1.1	Technische Aspekte des ELITA-Bindungstests	67
4.1.2	9NATSP und P22TSP differenzieren im ELITA-Test zwischen <i>Salmonella</i> -Stämmen gleicher Serogruppen	70
4.1.2.1	Keine Bindung der TSPs an die Stämme der Serogruppen O1,9,46,27, O3,10 und O11	70
4.1.2.2	Heterogene Bindung an Stämme der Serogruppe O4(,5)	71
4.1.2.3	9NATSP erkennt Stämme der Serogruppe O2 effektiver als P22TSP – Strukturelle Ursachen der Präferenz	72

4.1.2.4	Bewertung von ELITA als Identifizierungsmethode	75
4.1.3	FACS-Test	76
4.1.4	Vergleich von FACS-Bindungsmessung und ELITA	76
4.1.4.1	Detektion unterschiedlicher Zellpopulationen mit FACS	77
4.1.4.2	Zellaggregation im FACS	78
4.1.4.3	Informationsgehalt und die technischen Aspekte der FACS- und ELITA-Messungen	79
4.2	Quantifizierung der Bindung aus ELITA/FACS mittels SPR	80
4.2.1	Immobilisierung von Polysaccharid für Oberflächenplasmonre- sonanz-basierte Interaktionsmessungen	80
4.2.2	Immobilisierung von derivatisierten Oligosaccharidfragmenten für Oberflächenplasmonresonanz-basierte Interaktionsmessungen	83
4.3	Effekte der nicht-stöchiometrischen Modifikationen des O-Ags auf das Bindungsverhalten von 9NATSP und P22TSP	84
4.3.1	Methoden zur Analyse der Produktprofile aus einem O-Ag- Verdau durch TSPs	84
4.3.2	Produktprofile von 9NATSP und P22TSP beim Verdau des nicht-modifizierten O4-Ags	86
4.3.3	Effekt der Acetylierung auf Bindung und katalytische Aktivität von 9NATSP und P22TSP	87
4.3.4	Effekt der Glucosylierung auf Bindung und die katalytische Aktivität von 9NATSP und P22TSP	91
4.4	Zusammenfassende Diskussion	97
Literatur		99
Anhang		110
Danksagung		114

Abkürzungsverzeichnis

(k)bp	(kilo)basenpaaren (Länge der Nukleinsäurefragmente)
(v/v)	Volumenanteil
(w/v)	Gewichtsanteil
3D	dreidimensional
Å	Ångström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
Abe	Abequose
APC	Allophycocyanin
APTS	1-Aminopyren-3,6,8-Trisulfonsäure
BSA	Kalbsserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
CBM	<i>carbohydrate binding module</i>
CE	Kapillargelelektrophorese (<i>capillary gel electrophoresis</i>)
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELITA	<i>ELISA-like tailspike adsorption</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	FACS-Kanal, in dem die direkte Lichtstreuung erfasst wird (<i>front scatter channel</i>)
Gal	Galactose
ggf.	gegebenenfalls
GlcN	Glucosamin
h	Stunde(n)
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
Hep	L-Glycero-D-Mannoheptose
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
Kdo	3-Desoxy-D-manno-octuronsäure (2-Keto-3-desoxy-octonat)
LB	Luria-Bertani Medium
LiF	Laser-induzierte Fluoreszenzdetektor
LPS	Lipopolysaccharid

MALDI-MS	<i>Matrix-assisted laser-desorbtion ionization mass spectrometry</i>
Man	Mannose
MES	2-(N-morpholino)-ethylsulfonylsäure
min	Minute(n)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
O-Ag	O-Antigen
OD _{600 nm}	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Par	Paratose
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDB	Proteindatenbank (http://www.rcsb.org/pdb/)
PS	Polysaccharid
psi	Pfund pro Quadratzoll (<i>pounds per square inch</i>)
r.m.s.d.	mittlere quadratische Abweichung (<i>root mean square deviation</i>)
r.u.	<i>response units</i> (Änderung des Brechungsindex bei SPR)
Rha	Rhamnose
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RU	repetitive Untereinheit
S.	<i>Salmonella</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
SSC	FACS-Kanal, in dem die seitliche Lichtstreuung erfasst wird (<i>side scatter channel</i>)
Tab.	Tabelle
TSP(s)	Tailspike-Protein(e)
TSPwt	der katalytisch aktive Wildtyp eines Tailspike-Proteins
Tyv	Tyvelose
ÜN	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Membranaufbau der gramnegativen Bakterien

1.1.1 Bedeutung der gramnegativen Bakterien am Beispiel von *Salmonella*

Bakterien sind essentiell für Menschen (z. B. als Darmkommensalen), können aber auch pathologische Zustände verursachen. Nach dem Aufbau der bakteriellen Membranen werden grampositive und gramnegative Bakterien unterschieden. Zu den gramnegativen Bakterien gehört die Familie *Enterobacteriaceae*, zu der die sehr gut charakterisierte Art *Escherichia coli* zählt sowie die *Salmonella*-Gattung. Dabei handelt es sich um stäbchenförmige, meist peritrich begeißelte, fakultativ anaerobe Bakterien (Giannella, 1996). Die medizinisch bedeutendste Art, *Salmonella enterica*, schließt mehr als 2500 Subspezies ein (Grimont und Weill, 2007). Diese sind weltweit für tausende Fälle von Salmonellose und *Typhus abdominalis* (typhoides Fieber) verantwortlich, mit teilweise tödlichem Ausgang. In Deutschland wurden nach Angaben des Robert-Koch-Instituts im Jahr 2013 90 Fälle des typhoiden Fiebers sowie etwa 2000 Salmonellose-Fälle gemeldet (Robert-Koch-Institut, 2014).

1.1.2 Lipopolysaccharid

Die äußere Membran gramnegativer Bakterien ist doppelschichtig und asymmetrisch aufgebaut. Während die innere Schicht der äußeren Membran durch Phospholipide gebildet wird, besteht die äußere Schicht aus Lipopolysaccharid (LPS) (Rietschel u. a., 1994). Das LPS kann seinerseits in drei Bestandteile unterteilt werden: Lipid A, Kernsaccharid und das O-Antigen (O-Ag), wobei das Kernsaccharid mit dem gebundenen O-Ag in dieser Arbeit als Polysaccharid (PS) bezeichnet wird (Abb. 1.1 a). Der überwiegend hydrophobe Lipid A-Teil integriert das LPS in die Membran. Lipid A ist aus zwei phosphorylierten Glucosaminresten (GlcN) und veresterten Fettsäureketten aufgebaut (Raetz und Whitfield, 2002). Die beiden Phosphat-Gruppen an den GlcN-Resten können zusätzlich durch Phosphoethanolamin oder 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose modifiziert sein. Darüber hinaus wurden für *Salmonellen* native Modifikationen der Fettsäureketten beschrieben (Trent u. a., 2001; Gibbons u. a., 2000). Lipid A ist ein charakteristisches Merkmal gramnegativer Bakterien und löst bei der Freisetzung aus der Membran eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems aus (Morrison und Ryan, 1987). Die resultierenden inflammatorischen Effekte führen schließlich zum septischen Schock.

Am GlcN-Rest von Lipid A ist das strukturell konservierte Kernsaccharid gebunden, das unter anderem drei L-Glycero-D-Mannoheptose-Reste (Hep) sowie zwei

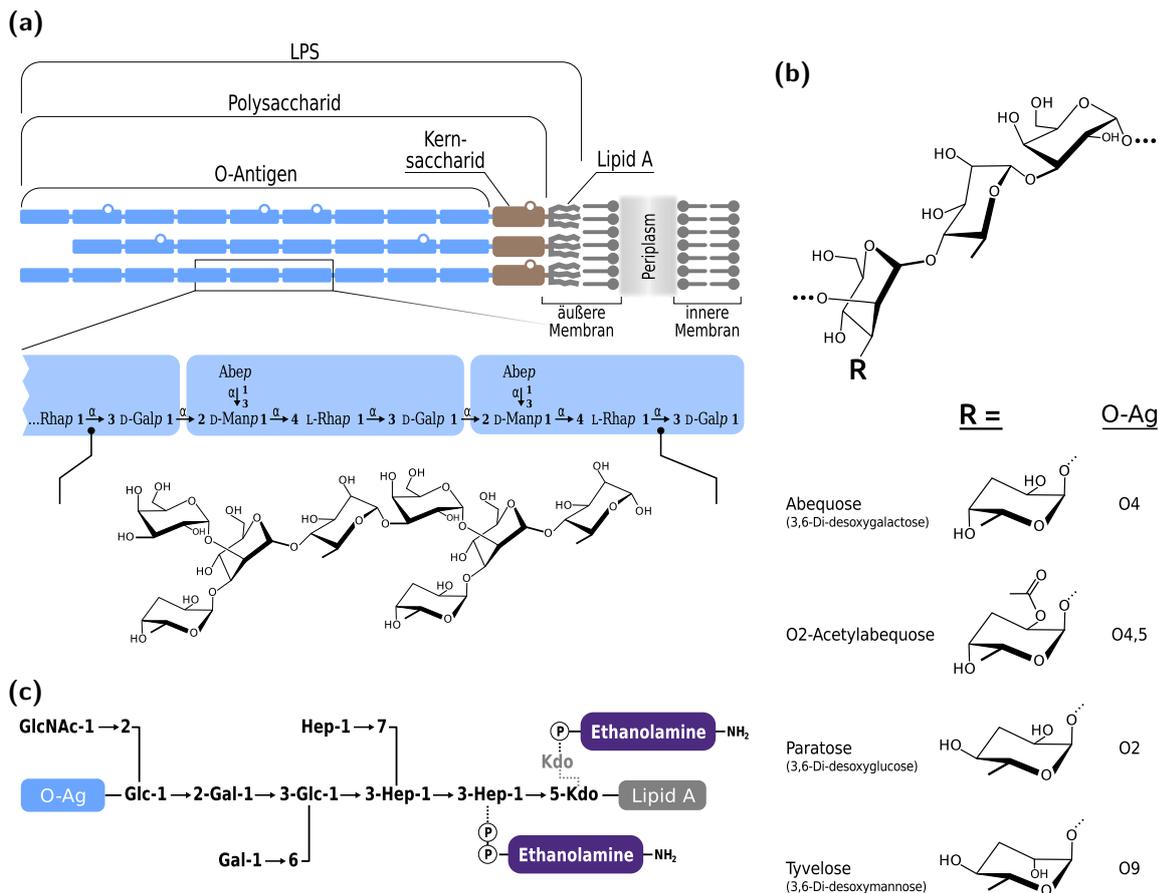


Abbildung 1.1: (a) Schematischer Membranaufbau gramnegativer Bakterien, z. B. *Salmonella*. Das O-Ag aus repetitiven Untereinheiten (blau), Kernsaccharid (braun) und Lipid A bilden die äußere Schicht der äußeren Membran. Die Kreise repräsentieren nicht-stöchiometrische Modifikationen am O-Ag und am Kernsaccharid. Eine detaillierte Zusammensetzung der biologischen repetitiven Untereinheiten des O-Ag O4 ist als Vergrößerung gezeigt. Darunter ist die Struktur des Hauptprodukts nach dem enzymatischen Verdau mit P22TSP bzw. 9NATSP abgebildet. (b) O-Ag Varianten O2, O4, O4,5 und O9 mit den jeweiligen Didesoxyseitenketten. (c) Struktur des Kernsaccharids (nach Raetz und Whitfield, 2002) mit den optionalen nicht-stöchiometrischen Modifikationen durch Phosphoethanolamin. Ein Kdo-Rest (grau) mitsamt der möglichen Modifikation wird bei der Präparation von Polysaccharid abgespalten. Der modifizierte Hep-Rest verbleibt nach der Präparation und enthält eine primäre Aminogruppe. (Abep = Abequose (3,6-Dideoxygalactopyranose), Manp = Mannopyranose, Rhap = Rhamnopyranose, Galp = Galactopyranose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin, Hep = L-Glycero-D-Mannoheptose, Kdo = 3-Desoxy-D-manno-octuronsäure)

3-Desoxy-D-manno-octuronsäuren (Kdo) enthält (Abb. 1.1 c). Während die Kohlenhydratzusammensetzung des Kernsaccharids weitgehend konserviert ist, sind nicht-stöchiometrische Modifikationen, vor allem Substitutionen mit Ethanolamin bzw. Phosphoethanolamin an Kdo und Hep, möglich (Raetz und Whitfield, 2002).

1.1.3 O-Antigen

Die äußere Schicht von LPS besteht aus O-Ag-Ketten. Dabei handelt es sich um repetitive, oft verzweigte Polysaccharide, mit einer für den jeweiligen Stamm spezifischen Zusammensetzung und Verknüpfung einzelner Kohlenhydratreste. Historisch bedingt, wird das O-Ag zur Identifizierung bzw. Systematisierung der *Salmonella*-

Bakterien mittels des Kaufmann-White-Le Minor-Schemas herangezogen (Grimont und Weill, 2007). Eine Infektion mit einem bakteriellen Stamm führt normalerweise zur Bildung von Antikörpern bzw. Antisera, die die O-Ag-Struktur des Stammes erkennen. Somit erlauben die isolierten Antikörper eine Zuordnung der unbekanntesten Stämme einer Serogruppe, die so genannte Serotypisierung. So werden in dieser Arbeit *Salmonella*-Stämme eingesetzt, die den Serogruppen O2, O4, O4,5 und O9 zuzuordnen sind. Die Identifizierung der Bakterien anhand des O-Ags ist nur innerhalb einer Gattung sinnvoll, da ein bestimmtes O-Ag bei mehreren Gattungen beobachtet werden kann (B. Liu u. a., 2013; Li u. a., 2011; Katzenellenbogen u. a., 2009). Daher werden neben dem O-Ag weitere Oberflächenstrukturen wie Flagellen (H1/H2-Antigen) sowie Kapselbestandteile (K-Antigen) für eine präzisere Charakterisierung benutzt. Eine zusätzliche Komplexität kommt zustande, wenn Stämme zwei O-Ag produzieren. So wurden einige *Salmonella*-Stämme beschrieben, die neben dem chromosomal-kodierten O-Ag verschiedene O-Ag produzieren, deren Biosynthese auf einem Plasmid kodiert wird (Keenleyside u. a., 1994). Theoretisch ist sogar die Expression von Hybrid-O-Ag mit Determinanten von O4 und O9 in einer O-Ag-Kette möglich, wie es für künstlich hergestellte *Salmonella*-Stämme gezeigt wurde (Weintraub u. a., 1992). Ein weiteres Phänomen, das für zusätzliche Variabilität des O-Ags sorgt, ist die Phasenvariation (van der Woude und Bäumlner, 2004; Patterson u. a., 2012). Damit wird das Vermögen von Bakterienzellen beschrieben, abhängig von äußeren Bedingungen aber auch scheinbar spontan und in hoher Frequenz ($> 10^{-5}$ pro Zelle und Generation) ihre Genexpression zu verändern. Dies schließt auch die Möglichkeit mit ein, die Zusammensetzung des O-Ags zu verändern (Broadbent, Davies und Woude, 2010). Angesichts der Komplexität gewinnen in letzter Zeit molekularbiologische Methoden zur Identifizierung bzw. Zuordnung von Bakterien wie Sequenzierung, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, Chip/Mikroarray, Oberflächenplasmonresonanz-basierte Methoden sowie Massenspektrometrie an Bedeutung (Cox u. a., 2014; Mazumdar u. a., 2010; Seng u. a., 2009). In dieser Arbeit wird für die Bezeichnung der *Salmonella*-Stämme durchgehend die Nomenklatur von Le Minor und Popoff in Kurzform verwendet, nach der die vollständige Bezeichnung eines Stammes wie z. B. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* Serovar Typhimurium mit *Salmonella* Typhimurium angegeben wird (F. W. Brenner u. a., 2000).

Die Anzahl der repetitiven Untereinheiten (RU) in einer O-Ag-Kette ist von Stamm zu Stamm unterschiedlich (Raetz und Whitfield, 2002). Es sind O-Ag-Längen von 1 RU bis zu 100 RU bekannt. Da die Länge der O-Ag-Ketten nicht restriktiv reguliert wird, erhält man bei der Isolierung von LPS bzw. PS immer ein polydisperses Gemisch. Ähnlich wie die Zusammensetzung des O-Ags kann sich auch die Länge der O-Ag-Ketten dynamisch verändern, z. B. aufgrund der Phasenvariabilität (Cota, Blanc-Potard und Casadesús, 2012). Dennoch gibt es in der Regel eine für den

jeweiligen Stamm charakteristische, bevorzugte Länge von O-Ag. Bei Stämmen, die keine oder nur eine RU exprimieren, spricht man von „rauen“ Stämmen. Die Präsenz und die Länge der O-Ag-Ketten beeinflusst das Überlebensvermögen der Bakterien in verschiedenen Nischen sowie ihre Virulenz (Licht u. a., 1996; Lyman, Steward und Roantree, 1976). Darüber hinaus ist die Anfälligkeit der rauen Bakterienstämme für einige Antibiotika und antibakterielle Peptide erhöht (Gänzle, Hertel und Hammes, 1999).

1.1.4 Struktur der O-Antigene O2, O4, O4,5 und O9

Die Strukturen der biologischen RU der *Salmonella*-Serogruppen O2, O4, O4,5 und O9 sind in Abb. 1.1b gezeigt. Der lineare Teil der Kette wird aus einem Trisaccharid gebildet, bestehend aus Mannopyranose (Man), Rhamnopyranose (Rha) und Galactopyranose (Gal). Diese Struktur ist den vier genannten Serovaren gemeinsam und bildet einen komplexen O-Ag-Faktor O12 (Knirel und Valvano, 2011; Raetz und Whitfield, 2002). D. h. die Serovaren O2, O4, O4,5 und O9 werden durch ein anti-O12-Serum erkannt. Die Determinanten der Serogruppen, in diesem Fall 3,6-Didesoxyhexosen, sind α -1–3 an den Man-Rest gebunden. Beim O2-Ag handelt es sich um eine Paratose (Par) bzw. 3,6-Didesoxyglucose. Dieses Antigen wird in der Regel beim Stamm *Salmonella* Paratyphi A beobachtet, der paratyphoides Fieber verursacht. Das O9-Ag ist durch eine Tyvelose (Tyv) bzw. eine 3,6-Didesoxymannose charakterisiert. Typische Vertreter dieser O-Serogruppe wären die Stämme *Salmonella* Enteritidis. Die O-Ag-Varianten O4 und O4,5 sind durch eine Abequose (Abe) – eine 3,6-Didesoxyglucose – als Seitenkette ausgezeichnet (Hellerqvist u. a., 1968). Eine O-Acetylierung der Abequose an der Position C2 unterscheidet das O4,5-Ag vom O4-Ag. Bei der letzteren Modifikation variiert der Ausmaß der Acetylierung. Es handelt sich dabei um eine nicht-stöchiometrische Modifikation, die gesondert im Abschnitt 1.1.6 erläutert wird.

Einen Sonderfall stellen die beiden in der Arbeit eingesetzten *Salmonella* Typhi-Stämme dar. Die Typhi-Stämme gehören zu der Serogruppe O9 und exprimieren neben dem O-Ag das kapsuläre Vi-Antigen (Wetter u. a., 2012), wobei eine Serotypisierung am Robert-Koch-Institut das O-Ag dieser Stämme als 12₁, 12₃ (und zusätzlich 12₂ beim Stamm T4) charakterisierte. Das Typhi-Serovar ist an den Mensch und höhere Primaten als Wirte angepasst. Die Expression des Vi-Antigens (Vi = Virulenz) ist nicht essentiell für die Pathogenität, erhöht jedoch die Virulenz des Stamms (Looney und Steigbigel, 1986; J. D. Robbins und J. B. Robbins, 1984). So können Vi-Antigen-exprimierende Stämme innerhalb einiger Zellen des Immunsystems überleben (Hirose u. a., 1997). Es wird vermutet, dass der beobachtete Effekt auf die Abschirmung des O-Ags zurückzuführen ist. Folglich kann die Expression des Vi-Antigens die Serotypisierung erschweren bzw. die Bindung von O-Ag-bindenden

Proteinen negativ beeinflussen.

1.1.5 Struktur der O-Antigene O3,10 und O11

Ergänzend zu den genannten Serovaren wurden in dieser Arbeit *Salmonella*-Stämme der Serogruppen O3,10 und O11 eingesetzt. Der lineare Teil des O3,10-Ag besteht aus einem Trisaccharid (Man-Rha-Gal), ähnlich zu den im Abschnitt 1.1.4 eingeführten O-Ag-Varianten. Ein Unterschied liegt in der Verknüpfung zwischen den biologischen RU: während RU der Serovaren O2, O4(,5) und O9 α -1–2 glycosidisch verknüpft sind, liegt beim O-Ag O3,10 eine α -1–6-Verknüpfung zwischen den Gal- und Man-Resten vor. Des Weiteren fehlt dem O3,10-Ag eine Didesoxy-Abzweigung an der Mannose. Bei einigen Stämmen der Serogruppe O3,10 wurde eine Glucosylierung der Galactose beobachtet (Knirel und Valvano, 2011). Die α -1–6-Verknüpfung zwischen den RU beim O3,10-Ag resultiert in einer signifikanten Änderung der dreidimensionalen (3D) Struktur gegenüber O2-, O4- und O9-Ag. Dafür spricht unter anderem die fehlende Kreuzreaktivität der Antiseren (Grimont und Weill, 2007). So zeigt das anti-O12-Serum, das den linearen Teil von O2, O4 und O9-Ag (Man-Rha-Gal) erkennen soll, trotz gleicher Zusammensetzung keine Reaktivität gegenüber dem O3,10-Ag.

1.1.6 Nicht-stöchiometrische Modifikationen von O-Ag

Die zusätzliche Diversität der O-Ag kommt durch nicht-stöchiometrische Modifikationen zustande. Zu den häufigsten O-Ag-Modifikationen der Art *Salmonella enterica* zählen Acetylierung und Glucosylierung. Die modifizierenden Enzyme können chromosomal oder Plasmid-kodiert sein, aber auch auf eine Infektion durch Bakteriophagen zurückgeführt werden. Wie der Name impliziert, ist durch die Aktivität der beteiligten Enzyme nicht das gesamte O-Ag bzw. nicht jede RU betroffen. Vielmehr kann das Ausmaß der Modifizierung stammabhängig sein, aber auch mit den Wachstumsbedingungen zusammenhängen.

Ein Beispiel für eine Bakteriophagen-bedingte Serokonversion, welche die Zusammensetzung bzw. Struktur eines O-Ags verändert, ist eine Glucosylierung des O4-Ags infolge der Infektion mit dem Phagen P22. Das O-Ag wird dabei an der Galactose an Position C6 glucosyliert (Lüderitz, Staub und Westphal, 1966). Alternativ kann das O4-Ag an der Galactose an Position C4 glucosyliert werden, was auf eine chromosomal-kodierte Glucosyltransferase im Gencluster ^{LT2} *gtrABC1* zurückgeht (Kim und Ryu, 2012; Nikaido u. a., 1971). Auch die O-Acetylierung als eine nicht-stöchiometrische Modifikation ist an mehreren Positionen möglich. Wollin, Stocker und Lindberg (1987) beschreiben für *Salmonella Typhimurium* eine Acetylierung von Rha, an den Positionen 3 und 4, die anscheinend infolge einer Infektion mit den Phagen A3 oder A4 auftritt. Diese beeinflusst zwar nicht die Zugehörigkeit zum

Pocken, Hepatitis etc. Bei einer ungünstigen Mutation können auch virale Erreger von zunächst nicht lebensbedrohlichen Erkrankungen ein erhöhtes Gefahrenpotential entwickeln, wie die Grippeepidemien in den Jahren 2003 bis 2014 gezeigt haben (Freidl u. a., 2014; Webster und Govorkova, 2014). Einige humanpathogene Viren wurden als Oncoviren charakterisiert, die nach einer Infektion zur Transformation und Entartung der Zellen und folglich zum Krebs führen (Lin, L. Y. King und Chung, 2014; R. Rosales und C. Rosales, 2014).

Gleichzeitig können Viren in der Medizin und Biotechnologie eingesetzt werden. So wird aktuell an Viren als Vektoren für die Gentherapie geforscht, wobei einige darauf basierende Medikamente in den klinischen Studien sind oder bereits eine Marktzulassung erreicht haben (Kaufmann u. a., 2013). Eine weitere Gruppe von Viren, den sogenannten oncolytischen Viren, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Diese haben das Potential, selektiv entartete Zellen zu infizieren und zu töten und eignen sich somit potentiell zur Krebsbekämpfung (Pol u. a., 2014; Woller u. a., 2014).

Viren der Prokaryonten, als Bakteriophagen bzw. Phagen bezeichnet, werden als zahlenmäßig die häufigsten Spezies auf dem Planeten vermutet (Chibani-Chennoufi u. a., 2004). Sie wurden zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Twort und d'Herelle zum ersten mal beschrieben (Duckworth, 1976). Den Phagen wird eine ökologische Bedeutung zugeschrieben, da sie Bakterienpopulationen in ihren biologischen Nischen kontrollieren (Johnke u. a., 2014; Shapiro, Kushmaro und A. Brenner, 2010; Fuhrman und Schwalbach, 2003). Zusätzlich spielen die Phagen eine Rolle beim Austausch genetischer Information und können damit unter anderem die Weitergabe von Resistenzen beeinflussen (Brüssow, Canchaya und Hardt, 2004). Neben ihrer biologischen Rolle haben Bakteriophagen potentielle Einsatzgebiete in der Biotechnologie, Lebensmittelindustrie und in der Medizin (Yosef u. a., 2014; Petty u. a., 2007; Swimmer u. a., 1992; Clackson u. a., 1991).

Angesichts der wachsenden Zahl von Bakterienstämmen mit multiplen Antibiotikaresistenzen, wächst der Bedarf an alternativen Behandlungsmethoden bakterieller Infektionen (Álvarez-Fernández u. a., 2012; Mihu und Martinez, 2011; Harper und Enright, 2011). Daher wird an Bakteriophagen als natürlichen anti-mikrobiellen Agenzien geforscht. Anders als die meisten Antibiotika zeigen Bakteriophagen eine hohe Spezifität, was sowohl als Vorteil, aber auch als Nachteil betrachtet werden kann: die einerseits sehr selektive Eliminierung der pathogenen Bakterien, erfordert für jeden Pathogen einen spezifischen Bakteriophagen (Pirnay u. a., 2011). Da bei einer Behandlung primär eine Inaktivierung der Bakterien angestrebt wird, werden in erster Linie lytische Phagen in Betracht gezogen. Diese haben den Vorteil, ihre Wirte unmittelbar nach der Infektion und anschließender Vermehrung zu lysieren (Yosef u. a., 2014). Gleichzeitig kann die Zellyse zu einer Freisetzung des LPS von der bakteriellen Oberfläche führen, was in einem septischen Schock resultieren kann

(Morrison und Ryan, 1987). Eine Strategie, dies zu vermeiden, besteht in der Entwicklung Lysis-defizienter Bakteriophagen (Paul u. a., 2011). Als problematisch erweist sich auch die Größe der Phagenpartikel. Zum einen ist die Aufnahme der Phagen und der Transport zum infizierten Gewebe erschwert, zum anderen können die Phagen aufgrund ihrer Größe eine Immunantwort initiieren, was einen wiederholten Einsatz ausschließt (Yosef u. a., 2014). Ein alternativer Einsatz als antibakterielles Mittel, bei dem die Immunantwort keine Rolle spielt, setzt auf eine Sensibilisierung der multiresistenten Bakterien durch temperente Phagen (Edgar u. a., 2012). Bei diesem Ansatz werden Bakterien auf Oberflächen mit temperenten Phagen lysogenisiert. Dadurch werden Gene eingeschleust, die Bakterien hochempfindlich für bestimmte chemische Substanzen machen, die anschließend zur Inaktivierung der Bakterien eingesetzt werden können.

Des Weiteren finden Bakteriophagen Verwendung in der Diagnostik (Rabsch, 2007). So werden auf Bakteriophagen basierte Zuordnungssysteme für einige Gattungen der *Enterobacteriaceae*, darunter *Salmonella*, seit Mitte des 20. Jahrhunderts eingesetzt (Liesegang u. a., 2002; Lilleengen, 1950). Ein ursprünglich von Lilleengen begründetes System, das später durch Felix und Callow sowie von Anderson erweitert wurde, erlaubt es, mehr als 300 *Salmonella*-Stämme zu identifizieren (Rabsch u. a., 2002; E. S. Anderson u. a., 1977; Felix und Callow, 1943). Neben Kaufmann-White-Le Minor-System wird daher das Phagen-basierte System in der Typisierung der *Salmonella*-Isolate eingesetzt.

1.2.2 Bakteriophagen P22 und 9NA

Seit der Entdeckung der Bakteriophagen wurden mehrere Möglichkeiten zur Klassifizierung der Bakteriophagen vorgeschlagen, darunter genetisch (Rohwer und Edwards, 2002) und morphologisch (Bradley, 1967). In dieser Arbeit wurden Adhäsionsproteine der Bakteriophagen P22 und 9NA eingesetzt (Zinder und Lederberg, 1952; Wilkinson, Gemski und Stocker, 1972). Beide Bakteriophagen gehören zur Ordnung *Caudovirales*. Bakteriophagen dieser Ordnung zeichnen sich durch eine Schwanz-Struktur aus sowie dadurch, dass ihr Genom in Form einer linearen, doppelsträngigen DNA vorliegt (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Murthy und Chakravorty, 1998). DNA-Hybridisierungsexperimente legen nahe, dass P22 und 9NA nicht direkt verwandt sind (Murthy und Chakravorty, 1998).

Der Bakteriophage P22 gehört morphologisch zu den *Podoviridae*, da er über einen kurzen, nicht kontraktilen Schwanz verfügt (Ackermann, 2001). Er infiziert *Salmonella enterica* O-Serotypen O2, O4(,5) und O9 (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). P22 ist ein temperenter Bacteriophage und kann einen lysogenen oder lytischen Vermehrungszyklus einschlagen. Der lytische Zyklus unterscheidet sich nicht von dem anderer lytischer Bakteriophagen wie 9NA.

Beim lysogenen Vermehrungszyklus wird die Phagen-DNA entweder ins Genom der *Salmonellen* integriert oder verbleibt episomal, ohne dass die viralen Gene exprimiert werden (Fortier und Sekulovic, 2013). In diesem Fall wird die integrierte Phagen-DNA bzw. der Prophage bei der Replikation der Bakterienzellen verdoppelt. Die Lysogenisierung wirkt sich unter anderem auf die Zusammensetzung des O-Ags der infizierten Bakterien: Die repetitive Untereinheit des O-Ags wird um ein Glucose ergänzt, die α -1-6-glycosidisch an Galactose gebunden wird (Lüderitz, Staub und Westphal, 1966; Wollin, Stocker und Lindberg, 1987). Dies resultiert in einer Serokonversion der lysogenisierten *Salmonella*-Stämme, die eine zusätzliche Serospezifität O1 bzw. eine chemisch äquivalente Serospezifität O12₁ erhalten. Es wird angenommen, dass diese Modifikation eine Superinfektion der bereits mit P22 infizierten Bakterien verhindern soll (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Gleichzeitig verleiht diese Modifikation des O-Ags eine Infektoinsresistenz gegenüber Bakteriophagen A2 und A3 (Wollin, Stocker und Lindberg, 1987).

Der Bakteriophage 9NA ist morphologisch ein *Siphovirus*, mit einem langen, nicht-kontraktilen Schwanz (Andres, Roske u. a., 2012). 9NA hat ein ähnliches Wirtsspektrum wie der Phage P22 und infiziert *Salmonella*-Stämme der O-Serogruppen O2, O4(,5) und O9, ist aber im Unterschied zu P22 nicht temperent (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981). Bemerkenswert ist, dass 9NA auch Bakterienstämme infizieren kann, die durch P22 lysogenisiert sind (Wilkinson, Gemski und Stocker, 1972). Gleichzeitig kann der Bakteriophage keine *Salmonella*-Stämme infizieren, die eine O12₂-Serospezifität zeigen und demnach eine Glucose an der Galactose-Position C4 tragen (Mäkelä, 1973).

1.2.3 Adhäsionsproteine (Tailspikes) der Bakteriophagen P22 und 9NA

Das Genom beider Bakteriophagen enthält offene Leserahmen für Adhäsionsproteine, die so genannten Tailspikes (TSPs) (Casjens und Thuman-Commike, 2011). Die beiden TSPs weisen eine Reihe von strukturellen Gemeinsamkeiten auf. Sowohl das TSP aus P22 (P22TSP) als auch aus 9NA (9NATSP) bilden im nativen Zustand Homotrimere (Seckler u. a., 1989; Andres, Roske u. a., 2012). Korrelierend mit der Lokalisation der Tailspikes auf der viralen Oberfläche, ist P22TSP thermisch stabil sowie SDS- und Protease-resistent (Schuler und Seckler, 1998; Seckler u. a., 1989). Strukturell weisen die TSPs drei Domänen auf (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996; Andres, Roske u. a., 2012). Die N-terminale Domäne verankert das Protein an der Basisplatte und damit am viralen Partikel (Abb. 1.3; Lander u. a., 2009; Tang u. a., 2005). In dieser Arbeit wurden Proteinkonstrukte mit deletierten N-terminalen Abschnitten eingesetzt. Das Δ N-Konstrukt von P22TSP enthielt die Aminosäuren 113–666, das 9NATSP-Konstrukt bestand aus Aminosäuren 131–673. Das Fehlen der N-terminalen Domäne hat keinen Einfluss auf Bindungseigenschaften und Aktivität

der TSPs (U. Baxa, Cooper u. a., 2001; U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996; Danner u. a., 1993). Alle im Folgenden aufgeführten Informationen beziehen sich auf die ΔN -Konstrukte beider TSPs, wenn es nicht anders vermerkt ist.

Das mittlere Teil beider TSPs ist überwiegend in Form einer parallelen, rechtsgängigen β -Helix organisiert und beinhaltet eine Bindungsstelle für den Wirtsrezeptor pro TSP-Monomer (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996; Steinbacher, S. Miller u. a., 1997; Andres, Roske u. a., 2012). Die rechtsgängige β -Helix wurde bei mehreren Oligosaccharid-bindenden bzw. -prozessierenden Proteinen und speziell Adhäsionsproteinen beobachtet (Barbirz u. a., 2008; Müller u. a., 2008; Leiman und Molineux, 2008; Yoder, Keen und Journak, 1993). Im Fall von P22TSP und 9NATSP handelt es sich bei den Rezeptoren um LPS bzw. O-Ag-Ketten der *Salmonella*-Serogruppen O2, O4(,5) und O9 (Lüderitz, Staub und Westphal, 1966; Eriksson, Svenson u. a., 1979; Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981). Bei drei Bindungsstellen pro nativem TSP-Trimer und sechs Tailspikes pro Phagenpartikel sind es 18 Bindungsstellen pro einen Phagenpartikel. Die hohe Anzahl der Bindungsstellen erhöht die Avidität, was in einer quasi-irreversiblen Adhäsion der Phagen an die Wirtszellen resultiert (U. Baxa, Cooper u. a., 2001; U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Gleichzeitig zeigen die Experimente von Israel, T. F. Anderson und Levine (1967), dass mindestens drei funktionsfähige TSPs pro Phagenpartikel für eine Infektion nötig sind.

Neben der Bindung von O-Ag besitzen beide TSPs eine Rhamnosidase-Aktivität gegenüber dem O-Ag. D. h. P22TSP und 9NATSP spalten die α -1–3-glycosidische Bindung zwischen der Rhamnose und der Galactose im linearen Teil der O-Ag-Ketten der Serogruppen O2, O4 und O9. Die für die Spaltung benötigten Aminosäurereste in P22TSP sind E359, D392 und D395 basierend auf kristallographischen Daten sowie auf Experimenten mit einzeln mutierten Aminosäuren (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996; U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Die in dieser Arbeit für Bindungsexperimente eingesetzte Variante von P22TSP enthält eine Substitution von Aspartat an der Position 392 durch Asparagin (D392N). Diese Substitution reduziert die hydrolytische Aktivität von P22TSP um den Faktor 30 000, bei gleichbleibender Affinität zum O-Ag (U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Bei 9NATSP wurden durch ein 3D-*alignment* an die Struktur des P22TSPs die katalytisch aktiven Aminosäuren D392, D402 und D408 identifiziert (Andres, Roske u. a., 2012). Ein Austausch dieser Aminosäuren durch die entsprechenden Säureamid-Varianten resultiert in einem Verlust der katalytischen Aktivität von 9NATSP. Das Hauptprodukt von P22TSP bei der Inkubation mit LPS oder PS *in vitro* ist ein Oktasaccharid aus zwei RU des O-Ags (Andres, Ulrich Baxa u. a., 2010; Eriksson, Svenson u. a., 1979; Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Im Unterschied zu einer biologischen RU, die am nicht reduzierenden Ende mit einer Mannose beginnt und am reduzierenden Ende mit einer Galactose endet, verschiebt sich der Raster bei TSP-Produkten, so dass die RU der Produkte am nicht

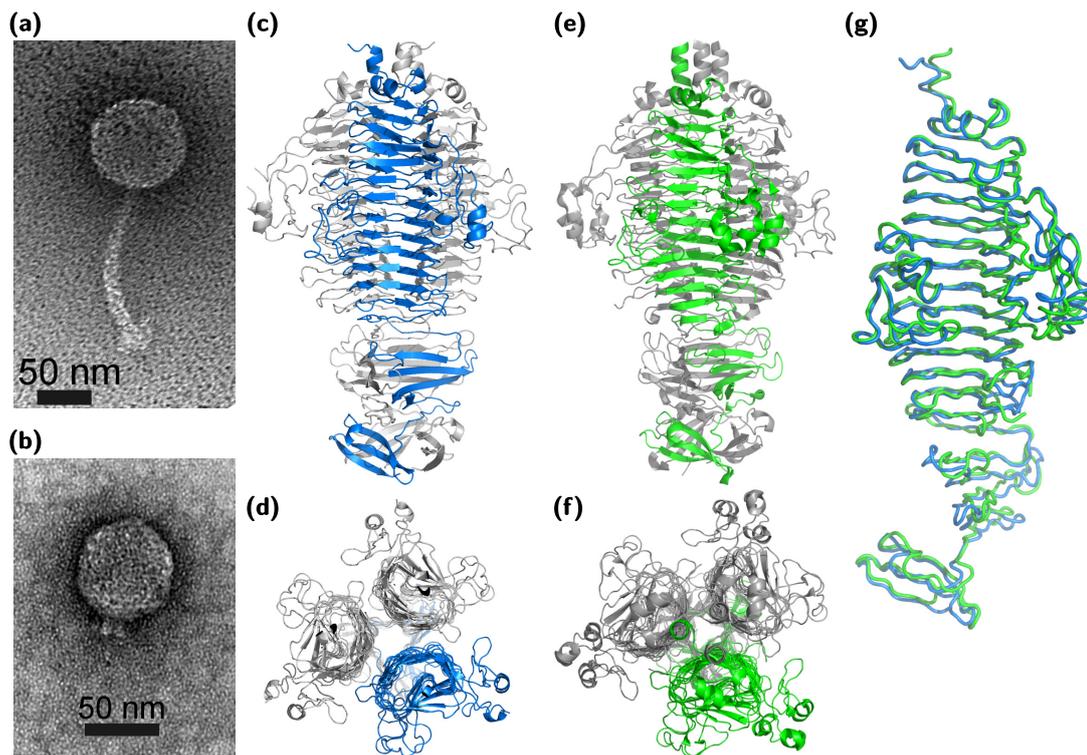


Abbildung 1.3: (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriophagen 9NA (b) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriophagen P22 (c) Struktur des Tailspikes aus 9NA (PDB: 3RIQ) dargestellt als Trimer, mit einer Proteinkette in blau. Seitenansicht entlang der Trimerisierungsachse sowie (d) Ansicht vom N-Terminus. (e) Struktur des Tailspikes aus P22 (PDB: 3TH0) mit einer Proteinkette in grün. Seitenansicht entlang der Trimerisierungsachse. (f) Ansicht vom N-Terminus (g) 3D-*alignment* der C $_{\alpha}$ -Atome beider TSP-Monomere mittels CEALIGN (via PyMOL) liefert eine mittlere quadratische Abweichung (r.m.s.d.) von 2,5 Å.

reduzierenden Ende mit einer Galactose startet und mit einer Mannose abschließt. Neben dem Hauptprodukt aus 2RU werden geringe Mengen längerer O-Ag-Produkte, bestehend aus drei oder vier RU, gebildet.

Ein globales Sequenz-*alignment* (NEEDLE, EMBO) der beiden TSPs auf DNA-Ebene liefert eine Ähnlichkeit etwa 40 %, während *alignment* auf Proteinebene eine Identität von 35 % und eine Ähnlichkeit von 51 % liefert (McWilliam u. a., 2013; Goujon u. a., 2010). Trotz der geringen sequenziellen Homologie, zeigen 9NATSP und P22TSP eine strukturelle Ähnlichkeit (Andres, Roske u. a., 2012). Ein struktureller dreidimensionaler (3D) *alignment* beider TSPs ohne den N-terminalen Teil liefert eine mittlere quadratische Abweichung (*root mean square deviation*, r.m.s.d.) von 2,54 Å (CEALIGN via PyMOL; Schrödinger, LLC, 2010; Shindyalov und Bourne, 1998).

Die strukturelle Ähnlichkeit korreliert mit der ähnlichen Bindungs- bzw. Substratspezifität, denn beide TSPs erkennen das O-Ag der gleichen *Salmonella*-Serogruppen. Gleichzeitig zeigen P22TSP und 9NATSP unterschiedliche Präferenzen bezüglich der Glucosylierung an den Galactose-Positionen C4 und C6, die jeweils den Serotypen O12₂ und O12₁ zugeordnet werden: P22TSP zeigt eine niedrigere Umsatzrate bei

O₄,O₁₂₁ als bei der nicht glucosylierten Variante O₄,₁₂ (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). 9NATSP setzt die O-Serotypen O₄,₁₂ und O₄,₁₂₁ ähnlich effektiv um (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981). Bei der Glucosylierung des O-Ags an der Galactose an Position C4 haben beide TSPs umgekehrte Präferenzen, so dass P22TSP das O-Ag vom Serotyp O₁₂₂ ähnlich effektiv wie die nicht glucosylierte Form umsetzt, während 9NATSP basierend auf den Infektions- und Verdauexperimenten mit dem O-Ag O₁₂₂ weitgehend inkompatibel ist (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979; Mäkelä, 1973).

1.3 O-Ag und Tailspikes als Modell für Protein-Kohlenhydrat Interaktionen

1.3.1 Protein-Kohlenhydrat Interaktionssysteme in der Natur

Verglichen mit anderen Biopolymeren, wie Nukleinsäuren und Proteinen, bieten Kohlenhydrate eine höhere strukturelle Vielfalt. Zum Einen werden mehr verschiedene Monosaccharide als Bausteine eingesetzt: speziell in bakteriellen Polysacchariden wurden etwa 100 unterschiedliche Monosaccharide identifiziert (Koenig u. a., 2010). Hinzu kommt die Tatsache, dass Kohlenhydrate verzweigte Polymere bilden können. Schließlich sind unterschiedliche Konfigurationen der an der glycosidischen Bindung beteiligten Kohlenstoffatome möglich, was weder bei einer Peptidbindung in Proteinen noch bei einer Phosphodiesterbindung in der DNA möglich ist. So sind bei Polymeren aus sechs Bausteinen für Nukleinsäuren, Aminosäuren und Hexosen theoretisch jeweils 4096, $6,4 \times 10^6$ und $1,44 \times 10^{15}$ Strukturen möglich (Gabijs u. a., 2011). Diese hohe strukturelle Diversität bietet eine Plattform für Prozesse, denen eine selektive Erkennung von Strukturen zugrunde liegt. Zum Beispiel präsentieren die meisten eukaryontischen und prokaryontischen Zellen komplexe Kohlenhydrate auf ihrer Oberfläche (Curry und Adamson, 2012; Koenig u. a., 2010; X. Wang und Quinn, 2010). Diese spielen bei Prozessen wie Zelladhäsion, Signaltransduktion, Immunantwort, sowie bei Infektionsvorgängen eine wichtige Rolle (Clark, 2013; Crocker, Paulson und Varki, 2007; Sato u. a., 2012).

Das Repertoire an Kohlenhydrat-bindenden Proteinen ist entsprechend vielfältig: Neben bereits eingeführten viralen Adhäsionsproteinen stellen Lektine und Antikörper zwei wichtige Gruppen dar. Daneben wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, die eine katalytische Aktivität gegenüber Kohlenhydraten aufweisen (Boraston, 2005). Diese sind modular aufgebaut aus einem katalytisch aktiven Modul sowie einem Kohlenhydrat-bindendem Modul (CBM). Die Topologien der Bindungsstellen und die jeweiligen Bindungsmodi korrelieren mit den Substraten bzw. den physiologischen Funktionen jeweiliger Kohlenhydrat-bindender Proteine.

Lektine sind ubiquitär vorkommende Proteine, die typischerweise Mono- bis Trisaccharide binden und auf die Erkennung der Kohlenhydrate auf Zelloberflächen spezialisiert sind (Gabiuss u. a., 2011). Die Erkennung der Kohlenhydrate erfolgt über flache Bindestellen mit wenigen Interaktionen, was zu einer mäßigen Affinität mit Gleichgewichtsdissociationskonstanten (K_D) im millimolaren Bereich führt (Weis und Drickamer, 1996). Die niedrige Affinität wird kompensiert, indem einerseits divalente Kationen wie Calcium in die Bindungsstelle integriert werden (Andersen und Moestrup, 2014). Andererseits besitzen Lektine mehrere Bindestellen pro Molekül und binden multivalente Liganden, wodurch eine hohe Avidität *cluster glycoside effect* erreicht wird (Weis und Drickamer, 1996).

Die Bindungsstellen vieler Antikörper erkennen in der Regel Oligosaccharide aus drei bis sechs Monosacchariden (Stanfield u. a., 2014; Nagae u. a., 2013; Zdanov u. a., 1994). Im Unterschied zu den Bindungsstellen der Lektine sind die Erkennungsstellen der Antikörper oft als tiefe Furchen aufgebaut, sodass mehr Interaktionen pro Kohlenhydrat möglich sind und die Desolvatisierung des Oligosaccharids einen Beitrag zur Affinität leistet (Cygler, Rose und D. Bundle, 1991). Dadurch erreichen Antikörper deutlich höhere Affinitäten als Lektine mit K_D -Werten im nanomolaren Bereich (Gerstenbruch u. a., 2010).

Die CBM umfassen Proteine, die sowohl auf eine Bindung von kurzen Oligosacchariden als auch auf eine Bindung von Polysacchariden spezialisiert sind (Boraston u. a., 2004). Da ein Teil dieser betreffender Polysaccharide unlöslich ist, sind die Bindestellen der CBM oft flach aufgebaut, um kristalline Polysaccharide binden zu können. Dabei tragen aromatische Aminosäureseitenketten oft essentiell zur Bindung bei (Boraston u. a., 2004). Die Bindungsstellen der CBM erreichen K_D -Werte im mikromolaren Bereich.

1.3.2 Wechselwirkungen bei Protein-Kohlenhydrat Interaktionen

Bei der Interaktion zwischen Kohlenhydraten und Proteinen sind grundsätzlich die gleichen Wechselwirkungen wie bei Protein-Protein-Interaktionen möglich (Weis und Drickamer, 1996). Dazu gehören ionische Wechselwirkungen bei geladenen Kohlenhydraten, polare Wechselwirkungen und in einem geringeren Umfang hydrophobe Wechselwirkungen (Abb. 1.3). Da die in dieser Arbeit eingesetzten Kohlenhydrate keine geladenen Gruppen tragen, wird diese Interaktionsart nicht näher erläutert. Auch der Fall einer Koordinierung von divalenten Kationen (z. B. Ca^{2+} oder Mg^{2+}) trifft auf die eingesetzten Kohlenhydrate nicht zu (U. Baxa, Cooper u. a., 2001; Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996; Eriksson und Lindberg, 1977).

Die polaren Wechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrücken (H-Brücken) spielen eine besondere Rolle bei Kohlenhydraten, da diese naturgemäß über viele Hydroxylgruppen verfügen. Die Orientierung der Hydroxylgruppen ist Epimer-

spezifisch und erlaubt daher die Unterscheidung ähnlicher Monosaccharide bei einer Interaktion (Gabiuss u. a., 2011). Auch in Oligo- bzw. Polysacchariden ist die 3D-Orientierung der Hydroxylgruppen charakteristisch und trägt wesentlich zur Spezifität bei Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen bei (Bush, Martin-Pastor und Imberty, 1999). Neben den direkten H-Brücken zwischen Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate und H-Brückendonor- und Akzeptorgruppen der Proteine, werden oft über ein Wassermolekül vermittelte H-Brücken beobachtet (Andres, Gohlke u. a., 2013; Broecker u. a., 2012; Clarke u. a., 2001). Bei dieser Art von H-Brücken können koordinierte Wassermoleküle als ein Teil der Proteinoberfläche betrachtet werden (Andres, Gohlke u. a., 2013; Binder u. a., 2012; Carla Mattos, 2002).

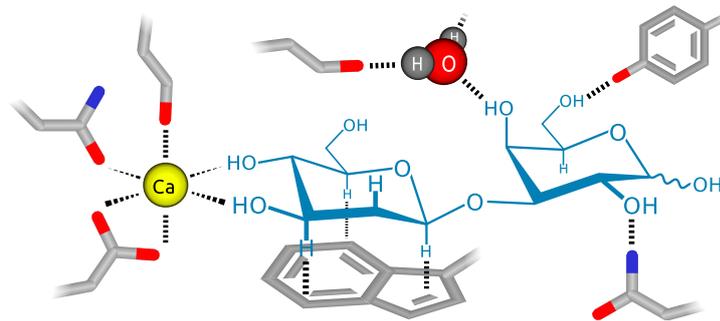


Abbildung 1.4: Darstellung möglicher Protein-Kohlenhydrat Wechselwirkungen. Bindungsstellen der Lektine enthalten oft koordinierte divalente Kationen, z. B. Ca^{2+} (gelb). Direkte H-Brücken sind mit Donor-/Akzeptorgruppen der polaren und geladenen Aminosäureseitenketten (*stick*-Darstellung) möglich. Indirekte bzw. über ein Wassermolekül (Kugeldarstellung) vermittelte H-Brücken sind typisch für Interaktionssysteme aus Protein und Kohlenhydrat. Ein Spezialfall der H-Brücken stellt die hydrophobe Stapelung (*hydrophobic stacking*) dar. Dabei interagieren Wasserstoffatome des Kohlenhydrats auf der hydrophoben Seite des Hexosenrings mit den π -Elektronen der aromatischen Aminosäureseitenketten, hier mit Tryptophan (*stick*-Darstellung) als Beispiel abgebildet. Im Unterschied zu klassischen hydrophoben Interaktionen trägt die hydrophobe Stapelung einen partiellen Richtcharakter.

Die hydrophoben Interaktionen tragen bei Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen signifikant zur Affinität bei (Bush, Martin-Pastor und Imberty, 1999). Dabei ist neben den Van-der-Waals Wechselwirkungen die Desolvatisierung der hydrophoben Oberflächenbereiche die treibende Kraft. Einerseits geht man davon aus, dass die OH- H_2O -Interaktion energetisch weitgehend vergleichbar mit der H_2O - H_2O -Interaktion ist und somit keinen energetischen Nettobeitrag zur Interaktion beiträgt. Gleichzeitig gibt es mehrere Hinweise darauf, dass eine Desolvatisierung der polyamphiphilen Oberflächen, wie es bei Kohlenhydraten der Fall ist, sowohl enthalpisch als auch entropisch günstig sein kann (Chavelas und García-Hernández, 2009; Lemieux, 1996). Einen Spezialfall der hydrophoben Interaktionen stellt die sogenannte hydrophobe Stapelung (engl. *hydrophobic stacking*) dar (Wimmerová u. a., 2012; Schantz u. a., 2012). Bei dieser Art der Interaktion wechselwirken Ringprotonen auf der hydrophoben Seite des Kohlenhydratrings mit π -Elektronenwolken aromatischer Aminosäureseitenketten (Abb. 1.3) (G. Gilli und P. Gilli, 2009; Carmen Fernández-Alonso u. a., 2005). Auch wenn daran überwiegend hydrophobe Oberflächen beteiligt sind, zeigt die Interaktion

zum Teil Richtungscharakteristika der H-Brücken (Carmen Fernández-Alonso u. a., 2005). Damit trägt hydrophobe Stapelung gleichermaßen zur Affinität und Spezifität bei.

1.3.3 Interaktionen bei Bindung von P22TSP an O-Ag-Fragmente der Serogruppen O2, O4 und O9

Die Bindungsstelle von P22TSP und die thermodynamischen Bindungseigenschaften der Bindung wurden detailliert charakterisiert (Steinbacher, S. Miller u. a., 1997; U. Baxa, Cooper u. a., 2001; U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Die Kristallstrukturen von P22TSP mit Oligosaccharidfragmenten der O-Serogruppen O2, O4 und O9 deuten darauf hin, dass die Bindungsstelle mindestens 2 RU der O2 Ag fasst, wobei sechs der acht Kohlenhydratreste an der Bindung beteiligt sind. Dies resultiert in K_D -Werten zwischen $3 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$, abhängig vom O-Serotyp des Oligosaccharidfragments (Andres, Gohlke u. a., 2013; U. Baxa, Cooper u. a., 2001).

Bei der Bindung der O-Ag-Fragmente durch P22TSP werden alle zuvor erläuterten Wechselwirkungen beobachtet. Es werden mehrere direkte H-Brücken zu polaren und geladenen Aminosäureseitenketten gebildet (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996; Andres, Gohlke u. a., 2013). Hinzu kommen mehrere wasservermittelte H-Brücken. Bei der Bindung werden bis zu 800 \AA^2 und damit über 50 % des Oligosaccharids und bis zu 300 \AA^2 der Proteinoberfläche desolvatisiert (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Diese Fläche ist annähernd proportional zu der Menge an Wasser, die bei der Bindung verdrängt wird (Lee und Richards, 1971). Darüber hinaus wurden für die Bindung von P22TSP an Oligosaccharidfragmente der Serogruppen O4 und O9 hohe negative Werte für die Änderung der Wärmekapazität von $-1,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ bis $-2,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ gemessen (U. Baxa, Cooper u. a., 2001). Die ΔC_p wird hauptsächlich auf die Reorganisierung der H-Brückennetze bzw. die Desolvatisierung der hydrophoben Oberflächen bei der Interaktion zurückgeführt (Cooper, 2000). Schließlich trägt die hydrophobe Stapelung zur Bindung der Oligosaccharidfragmente bei.

Die Bindungsmodi der Oligosaccharidfragmente der O-Serogruppen O4 und O9 sind nahezu identisch, während sich die Bindung von Oligosaccharidfragmenten der O-Serogruppe O2 von den beiden anderen Serotypen unterscheidet (Andres, Gohlke u. a., 2013; Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Dabei liegt der Unterschied in der Bindung der Didesoxyhexosen (Abequose, Tyvelose und Paratose), die für die jeweilige Serospezifität verantwortlich sind. Im Fall der Abequose (O4) und Tyvelose (O9) gehen unterschiedliche Hydroxylgruppen die H-Brücken mit Protein ein, wobei die Orientierung und die Positionen der restlichen Kohlenhydratreste in beiden Fällen gleich ist (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Außerdem werden durch die Tyvelose zwei Wassermoleküle koordiniert. Dies ermöglicht eine breitere Substratspezifität für P22TSP und damit eine breitere Wirtsspezifität für den Phagen.

Bei der Bindung der Oligosaccharidfragmente der O-Serogruppe O2 durch P22TSP weicht die Position mehrerer Kohlenhydratreste am nicht reduzierenden Ende von den Positionen in den Komplexen mit O4 und O9 ab (Andres, Gohlke u. a., 2013). Als Grund hierfür wird einerseits die Orientierung der OH-Gruppen der Paratose und andererseits zwei konservierte Wassermoleküle in der Didesoxyhexose-Bindetasche vermutet. Die H-Brückenbindung der Paratose sowie die sterische Hinderung durch die Wassermoleküle bewirken, dass die gebundene Konformation des Oligosaccharidfragments von der berechneten, energetisch günstigsten Konformation in der Lösung abweicht (Lütteke, Frank und von der Lieth, 2005; Bush, Martin-Pastor und Imberty, 1999). Dies geht mit einer niedrigeren Affinität der Bindung an O2-Oligosaccharidfragment einher, mit einem etwa um den Faktor 15 niedrigeren K_D -Wert verglichen mit der Bindung an O4- und O9-Oligosaccharidfragmente.

1.4 Aufgabenstellung

Die molekularen Grundlagen der Interaktion zwischen Proteinen und Kohlenhydraten sind noch nicht komplett verstanden. Daher besteht ein Bedarf nach geeigneten Modellsystemen für Protein-Kohlenhydrat Interaktionen. Adhäsionsproteine (Tailspikes) aus Bakteriophagen, die an Kohlenhydratstrukturen auf bakteriellen Oberflächen binden, stellen in vielerlei Hinsicht geeignete Systeme dar, um Interaktion im Detail zu untersuchen. Gleichzeitig ist die Charakterisierung nicht nur als Modellsystem interessant, sondern auch in Bezug auf die Wirtsspezifität der Phagen.

Ein Ziel der Arbeit war die Etablierung einer Methode mit einem mittleren bis hohen Durchsatz, mit der man Binderpaare aus Tailspikes und Kohlenhydratstrukturen auf bakteriellen Oberflächen identifizieren kann. Bei dieser Prozedur, sollten intakte Zellen zum Einsatz kommen, um zeit- und arbeitsintensive Reinigungsschritte für Kohlenhydrate zu vermeiden. Anschließend an die Identifizierung der Binderpaare sollte eine Reihe von analytischen Methoden getestet werden, mit der die Bindung der identifizierten Interaktionspartner in erster Näherung (semi-)quantitativ charakterisiert werden kann, bevor detaillierte biophysikalische Messungen durchgeführt werden.

Als Modellproteine sollten Tailspikes aus den Bakteriophagen 9NA und P22 eingesetzt werden. Diese strukturell homologen Proteine weisen einerseits eine ähnliche Spezifität auf, zeigen aber unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber der glucosylierten Varianten des Substrats. Eine weitere Aufgabe bestand daher in der Identifizierung der *Salmonella*-Stämme, die eine glucosylierte O-Ag-Variante exprimiert. Hierfür sollten die getesteten Stämme hinsichtlich der Zusammensetzung des O-Ags charakterisiert werden, um einen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung bzw. Struktur der O-Ag und dem beobachteten Bindungsverhalten der beiden eingesetzten TSPs abzuleiten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Standardchemikalien von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und wiesen den Reinheitsgrad *pro analysi* auf.

Coomassie Brilliantblau, Serva, Heidelberg

Strep-Tactin konjugiert mit CromeoTM 488, IBA, Göttingen

2.1.2 Puffer

PBS	16 mM Na ₂ HPO ₄ 4 mM KH ₂ PO ₄ 115 mM NaCl pH 7,4
PBS-T	1×PBS 0,2 % Tween 20
FACS-Puffer	1×PBS 0,5 % Kalbsserumalbumin (BSA)
TEC	50 mM Tris/HCl NaCl 5 mM EDTA pH 7,6
Citrat-Puffer	Citrat pH 6,0
TAE-Puffer	50 mM Tris/Acetat 50 mM EDTA
10×DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerol 0,25 % (w/v) Xylencyanol 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
4×PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl 0,8 % (w/v) SDS pH 8,8
2×PAGE-Sammelgelpuffer	250 mM Tris/HCl 0,4 % SDS pH 6,8

PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,8
5×Protein-Probenpuffer	200 mM Tris/HCl 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerol 5 mM Dithiothreitol 0,5 mg mL ⁻¹ Bromphenolblau pH 6,8
PAGE-Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie-Blue R
PAGE-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure
PS-Verdaupuffer	10 mM Ammoniumacetat
Fixierlösung 1	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Fixierlösung 2	0,5 % (v/v) Glutardialdehyd 1 g L ⁻¹ Na ₂ S ₂ O ₃ in Fixierlösung 1
Silber-Färbelösung	0,145 % (w/v) AgNO ₃ 0,009 25 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung	25 g L ⁻¹ Na ₂ CO ₃ 0,0148 % (v/v) Formaldehyd
Stoplösung	50 mM EDTA pH 8,0
CE-Puffer	25 mM Lithiumacetat 0,4 % (w/v) Polyethylenoxid pH 4,75
MES-Puffer	50 mM 2-(N-morpholino)-ethylsulfonysäure pH 5,0
SPR-Immobilisierungspuffer	10 mM Acetat pH 5,0
SPR-Messpuffer	50 mM Phosphat pH 7,1
SPR-Regenerationspuffer 1	50 mM Borsäure 1 M NaCl pH 9,0
SPR-Regenerationspuffer 2	10 mM Natronlauge

2.1.3 Standards und Kits

200–30 kDa Proteinmarker (HMW), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

70–4 kDa Proteinmarker (LMW), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

1 kbp / 100 bp DNA-Marker, New England Biolabs, Frankfurt am Main

1–4- β -D-Mannohexaose, Megazyme, Gernsheim

1–4- β -D-Xylopentaose, Megazyme, Gernsheim

Adrenocorticotropin-Hormon (ACTH)-Fragment 18-39, Phoenix Pharmaceuticals Inc, Burlingame, USA

QIAquick Gel Extraction Kit, Quiagen, Hilden

QIAprep Spin Miniprep Kit, Quiagen, Hilden

QIAquick PCR Purification Kit, Quiagen, Hilden

Streptactin-Starter-Kit IBA, Göttingen

Quick Ligation Kit, New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen, New England Biolabs, Frankfurt am Main

Benzoase, Novagen (Merck), Darmstadt

Pfu Plus! DNA Polymerase, Roboklon, Berlin

2.1.5 Plasmide, Vektoren und Primer

pET-11d/e, pET-23a, Novagen (Merck), Darmstadt

pPR-IBA102-StrepTag, IBA, Göttingen

2.1.6 Medien und Antibiotika

LB-Medium 10 g L⁻¹ Bacto-Trypton, 5 g L⁻¹ Bacto Yeast Extract, 10 g L⁻¹ NaCl, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert. Zur Herstellung der Kulturplatten wurde 1,5 % (w/v) Bacto Agar zugesetzt.

SOC-Medium 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 10 mM Glucose, Mg²⁺ und Glucose wurden sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren des Mediums zugesetzt.

Antibiotika
(Stammlösungen) 100 g L⁻¹ Ampicillin (1000×)
10 g L⁻¹ Kanamycin (200×)
238,3 g L⁻¹ Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (1000×)
Die Stammlösungen wurden mit Wasser angesetzt, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.1.7 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene (La Jolla, CA, USA) (Bullock et al., 1987): <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] ^c
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen (über Merck, Darmstadt) (Dubendorff und Studier, 1991b; Dubendorff und Studier, 1991a): F- <i>ompT hsdS_B</i> (r _B - m _B -) <i>gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> DH5α	Invitrogen (Karlsruhe): F- φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k -, m _k ⁺) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E. coli</i> HTD2158	LPS-produzierender (glatter) Stamm, O-Serogruppe: O18A1, (Barbirz u. a., 2008; Dhillon u. a., 1998)

<i>Salmonella</i> -Stamm	RKI-Nummer	O-Ag	H1-Ag	H2-Ag
Paratyphi A	13-02615	2	a	–
Paratyphi A	13-02749	2	a	–
Paratyphi A	13-02369	1,2	a	–
Agona	13-02623	4	f,g,s	–
Brancaster	13-03023	4	z29	–
Brandenburg	13-01155	4	l,v	e,n,z15
Brandenburg	13-03007	4	l,v	e,n,z15
Brandenburg	13-02696	4	l,v	e,n,z15
Bredeney	13-01714	4	l,v	1,7
Chester	13-02636	4	e,h	e,n,x
Derby	13-03043	4	f,g	–
Heidelberg	13-00586	4	r	1,2
Indiana	13-03022	4	z	1,7
Kalamu	13-02835	4	z4,z24	–
Paratyphi B	13-01872	4	b	1,2
Paratyphi B	13-02924	4	b	1,2
Typhimurium	13-01225	4	i	–
Typhimurium	13-02608	4	i	–
Wien	13-02411	4	b	l,w
Abony	13-00008	4,5	b	e,n,x
Heidelberg	13-00308	4,5	r	1,2

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

<i>Salmonella</i> -Stamm	RKI-Nummer	O-Ag	H1-Ag	H2-Ag
Paratyphi B	13-01093	4,5	b	1,2
Paratyphi B	13-01583	4,5	b	1,2
Paratyphi B	13-02022	4,5	b	1,2
Typhimurium	06-01900	4,5	(Referenzstamm)	
Typhimurium	DB7136	4,5		
Typhimurium		5:i.1,2	–	–
Typhimurium	13-01230	–	i	–
Typhimurium	13-02297	–	i	–
Bad Langensalza	13-03014	9	g,m	–
Eastbourne	13-02939	9	e,h	1,5
Gallinarum	08-01911	9	–	–
Hamburg (BNI)	13-02970	9	g,m	–
Hamburg (BNI)	13-02971	9	g,m	–
subspez. II	13-00799	9	l,w	e,n,x
Enteritidis	13-03072	9,12	g,m	–
subspez. II	564	1,9,12,46,27	lz13,z28	z39
subspez. II	565	1,9,12,46,27	y	z39
Anatum	13-00188	3,10	e,h	1,6
Anatum	13-00661	3,10	e,h	1,6
Stendal	11-07456	11	l,v	1,2
Rubislaw	12-05093	11	r	e,n,x
Typhi	T4	12 ₁ ,12 ₂ ,12 ₃	–	–
Typhi	T2	12 ₁ ,12 ₃	–	–

2.1.8 Geräte

2.1.8.1 Spektrophotometer

Cary 50 UV-VIS
 Agilent 8453 UV-Vis
 Pharmacia Biotech Ultrospec 1000

Varian, Darmstadt
 Agilent, Waldbronn
 GE Healthcare, Freiburg

2.1.8.2 Zentrifugen und Rotoren

Ultrazentrifuge SORVALL RC28S/26plus
 Centrifuge 5403
 Tischzentrifuge Biofuge pico
 SS-34, GSA, SLA3000

Kendro, Langenselbold
 Eppendorf, Hamburg
 Heraeus, Hanau
 Kendro Laboratory Products,
 Newton, USA
 Sorvall, Buckinghamshire,
 England

F28/50

2.1.8.3 HPLC, FPLC, Detektoren, Säulen

Shimadzu HPLC SCL10A VP/LC10AD VP	Shimadzu GmbH, Duisburg
Äkta Purifier HPLC	GE Healthcare, Freiburg
Photodiodenarray-Detektor SPD M10A VP	Shimadzu GmbH, Duisburg
Refraktometer Optilab DSP	Wyatt Technology, Dernbach
Refraktometer RID-10a	Shimadzu GmbH, Duisburg
HiLoad 26/60 Superdex 30 pg	GE Healthcare, Freiburg
Tricorn 30/100 Peptide	GE Healthcare, Freiburg
Äkta FPLC	GE Healthcare, Freiburg
Selbstgepackte Ionenaustauschersäule (DE52)	GE Healthcare, Freiburg
Hydrophobe-Interaktion (HIC)-Säule	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad 26/60 Superdex 200 pg	GE Healthcare, Freiburg

2.1.8.4 Sonstige Geräte

Massenspektrometer Bruker Microflex	Bruker, Bremen
Kapillarelektrophorese ProteomeLab PA 800	Beckman Coulter, Krefeld
SPR BiacoreJ	Biacore Life Sciences (GE Healthcare), Freiburg
Dokumentationsanlage Gel Doc 2000	Bio-rad, München
Dokumentationsanlage ImageScanner III	GE Healthcare, Freiburg
Mikrotiterplatten-Scanner TECAN Sunrise	Tecan, Crailsheim
Durchflusscytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
NMR-Spektrometer Avance III 600 MHz	Brucker, Billerica, USA
Inkubationsschüttler Innova 42	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Innova 2300	Eppendorf, Hamburg
French-Press SLM-Aminco	Polytec, Waldbronn
Sanopuls GM70	Bandelin Electronic, Berlin
Sterilbank HERA safe	Heraeus, Hanau
Lyophilisierungsanlage VaCi 5/II	Zirbus, Bad Grund
Speedvac RVC 2-18 C	Hrist, Osterode
Laborwaage KERN 434	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Feinwaage Sartorius BP 121 S	Sartorius, Göttingen
Mikrotiterplattenschüttler Titramax 101	Heidolph, Schwabach
T-Professional TRIO Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter 597	WTW, Weilheim
Bad-Thermostat CC-K12/PilotONE	Huber, Offenburg

2.1.9 Wissenschaftliche Software

QtiPlot/SciDaVis, Mmass, FlowJo, PyMOL, LabScan, PlasmaDNA, SerialCloner

2.1.10 Sonstige Materialien

Microtiterplatte, (96), Nunc MAXI-SORP	Thermo Scientific, Schwerte
Kunststoffküvetten uv/vis	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 mL/2,0 mL LoBind	Eppendorf, Hamburg
sonstige Reaktionsgefäße	VWR, Darmstadt
DE52-Cellulose	Whatman, Dassel
Dialyseschläuche	Spectrum Labs, Houston, USA
Ultrafiltrationsmembranen	Millipore, Schwalbach

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

E. coli Stämme zu Klonierungszwecken, Proteinexpression und zum Erstellen von Glycerinkulturen wurden als Flüssigkulturen bei 37 °C in LB-Medium mit ggf. zugesetzten Antibiotika kultiviert. Die Flüssigkulturen wurden mit einer *E. coli* oder *Salmonella enterica* Einzelkolonie von LB-Agarplatten angeimpft und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Zur längeren Lagerung (über 3 Tage) wurden Glycerinkulturen hergestellt, indem Bakterien mit 17,5 % (v/v) Glycerin versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert wurden. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgte bei –80 °C.

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

Die kompetenten *E. coli* XL1-blue (Klonierung, Vervielfältigung der Plasmid-DNA) oder *E. coli* BL21 (DE3) (Proteinexpression) wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100 ng Plasmid-DNA oder 5–20 µL Ligationsansatz wurden die Bakterien für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec wurde die Proben erneut für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Ansätze wurden mit 500 µL auf 37 °C vorgewärmten SOC-Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. Zwischen 50 und 200 µL wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die LB-Agarplatten wurden ÜN im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde in *E. coli* XL1blue vervielfältigt und das Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Die resultierende Plasmid-DNA wurde anschließend mit 20–50 µl H₂O oder Kit-Elutionspuffer eluiert. Die DNA-Konzentration und Reinheit der Präparation wurden spektroskopisch über die Extinktion bei 260 nm und 280 nm erfasst. Die Plasmid-DNA wurde bei –20 °C gelagert.

2.2.1.4 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau erfolgte mit Restriktionsendokukleasen (New England Biolabs) mit dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer. Pro Ansatz wurden 2–20 µg DNA mit der empfohlenen Menge Restriktionsenzym versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gegebenenfalls mittels eines QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert und gereinigt.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurden Agarosegele im Konzentrationsbereich von 0,8–1,5 % (w/v) eingesetzt. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in TAE-Puffer geschmolzen und vor dem Erstarren mit ca. $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ethidiumbromid versetzt. Zum Beladen der Gele wurden die DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 90 V.

2.2.1.6 Klonierung der Fusionskonstrukte der Tailspikes mit N-terminalen TwinStrep-tags

Die katalytisch inaktiven Varianten von P22TSP und 9NATSP lagen als Expressionskonstrukte in Vektoren pET23a (9NATSP) und pTSF (P22TSP) vor. Als Akzeptorplasmid wurde pPR-IBA102 eingesetzt, der eine N-terminale TwinStrep-Sequenz zur Verfügung stellt. pET23a-9NATSP und pPR-IBA102 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Bst*BI nach Herstellerangaben verdaut. Für Klonierung von P22TSP wurden Plasmide pTSF-P22TSP und pPR-IBA102 mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I HF und *Hind*III HF nach Herstellerangaben verdaut. Die resultierenden Fragmente wurden über Agarosegelelektrophorese unter Einsatz des QIAquick Gel Extraction Kits gereinigt. Die Plasmidfragmente mit Sequenzen, die für das jeweilige Δ N-Konstrukt der inaktiven TSP-Mutante kodieren, wurden mit den Fragmenten des Akzeptorplasmids pPR-IBA102 ligiert. Die Ligation erfolgte mit dem QuickLigation-Kit nach Herstellerangaben. Die resultierenden Konstrukte wurden in *E. coli* vervielfältigt und im Bereich der für TSPs kodierenden Sequenz sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz).

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Expression rekombinanter Tailspike-Proteine

Die N-terminal mit TwinStrep-tag markierten TSPs wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Eine Vorkultur wurde mit transformierten Bakterien angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkultur wurde mit 10 ml Vorkultur pro Liter versetzt und beim Erreichen einer $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ von etwa 1,0 mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte ÜN bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 5000 rpm (Rotor: SLA3000) und 4 °C pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in $1 \times \text{TEC}$ resuspendiert und mittels zwei Zyklen French Press bei 1250 psi aufgeschlossen. In dem nachfolgenden Zentrifugationsschritt von 1 h bei 4 °C und 18 000 rpm (Rotor: SS-34) wurden die Zelldebris abgetrennt. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine inklusive des Zielproteins. Als nächstes

wurde eine Fällung mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung durchgeführt. Die TSPs im Pellet wurden mitsamt der mitgefällten Proteine gegen $1\times$ TEC dialysiert. Anschließend erfolgte die Proteinreinigung über drei Chromatographieschritte. Die eingesetzten Materialien und Bedingungen sind in der Tab. 2.3 zusammengefasst. Die

Tabelle 2.3: Chromatographieschritte bei der Reinigung der N-terminal mit einem TwinStrep-tag markierten Proteinkonstrukte von 9NATSP und P22TSP. Die Elutionsgradienten für Ionenaustauscherchromatographie und hydrophobe Interaktionschromatographie sind mit der jeweils eingesetzten Richtung angegeben.

	9NATSP	P22TSP
Ionenaustauschchromatographie (DE52, selbst gepackt)	0–0,5 M NaCl in $1\times$ TEC	0–0,2 M NaCl in $1\times$ TEC
Hydrophobe Interaktionenchromatographie (Phenylsepharose FF)	0,5–0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2–0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Größenausschlusschromatographie (HiLoad 26/60 Superdex 200pg)	0,2 M Harnstoff in $1\times$ TEC	

einzelnen Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert. Die gereinigten Proteine wurden mit einer gesättigten Ammoniumsulfat Lösung ausgefällt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytischen Auftrennung von Proteingemischen wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt (J. King und Laemmli, 1971). Die Sammelgele enthielten 5 % (w/v) Acrylamid, die Trenngele 12 % (w/v) Acrylamid. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und gegebenenfalls bis zu 15 min bei 100°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in zwei Schritten mit 90 V für das Sammelgel und 150 V für das Trenngel. Zur Visualisierung der Proteine nach SDS-PAGE wurden zwei Färbemethoden eingesetzt.

Für die Beurteilung der Homogenität eines gereinigten Tailspikes wurde Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick, 1988 eingesetzt. Die Gele wurden für 15 min in Fixierlösung 1 und anschließend für 30 min Fixierlösung 2 geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser je 5 min wurden die Gele für weitere 30 min in Silber-Färbelösung geschwenkt. Anschließend folgte die Entwicklung der Gele in Entwickler-Lösung. Die Reaktion wurde in der Stopplösung beendet.

Restlichen SDS-Gele wurden mit Coomassie-Farbstoff gefärbt. Dazu wurden die Gele in der PAGE-Färbelösung erwärmt und anschließend mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfärben wurden die Gele in 10 % Essigsäure (PAGE-Entfärbelösung) erwärmt und bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3 Kohlenhydrat-bezogene Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid wurde mittels Phenol-Extraktion hergestellt (Barbirz u. a., 2008). Zur Isolierung und Reinigung von Lipopolysaccharid wurde eine 7 l Flüssigkultur $\ddot{U}N$ angezogen. Die Zellen wurden durch Zugabe von Phenol zu einer Endkonzentration von 1 % (w/v) inaktiviert und durch Zentrifugation geerntet. Resultierende Zellpellets wurden in 80 mL Wasser resuspendiert und mit einem Äquivalenzvolumen 90 % (w/v) vorgewärmtem Phenol in Wasser versetzt. Diese Mischung wurde 30 min bei 65-69 C gerührt, gekühlt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen. Der LPS-haltigen Lösung wurde 1 M Tris-HCl-Puffer zu einer Endkonzentration von 50 mM Tris-HCl hinzugefügt. Anschließend wurde die Wasserphase zweimal mit jeweils einem Äquivalenzvolumen Chloroform ausgeschüttelt. Nachdem der restliche Chloroform wurde mit Druckluft ausgetrieben, wurde die LPS-Lösung lyophilisiert, in Wasser aufgenommen und durch Ethanol-fällung gereinigt. Zur Aufbewahrung wurde das LPS lyophilisiert.

2.2.3.2 Herstellung von Polysaccharid

Das Polysaccharid wurde mittels Essig-sauren Spaltung hergestellt (U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Hierzu wurde eine 7 l Flüssigkultur $\ddot{U}N$ angezogen. Die Zellen wurden durch Zugabe von Phenol zu einer Endkonzentration von 1 % (w/v) inaktiviert und geerntet. Resultierende Zellpellets wurden in 80 ml Wasser aufgenommen und mit 20 ml 98 % (v/v) Essigsäure versetzt. Diese Mischung wurde in einem Wasserbad-Thermostat für 1,5 h bei 99 °C inkubiert und gelegentlich gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt und 20 min bei 4 °C und 8000 rpm (Rotor: GSA) zentrifugiert. Der Polysaccharid-haltige Überstand wurde aufgehoben. Das Zellpellet wurde wie oben beschrieben erneut mit Essig inkubiert und zentrifugiert. Beide Polysaccharid-haltige Überstände wurde vereinigt und mindestens 3 Tage gegen fließend Wasser (vollentsalzt) in Dialyseschläuchen mit einer Ausschlussgrenze von 3500 kDa dialysiert. Die resultierende Lösung wurde ggf. eingeeengt, auf 10 mM NH_4HCONH_3 eingestellt und $\ddot{U}N$ mit aktivierter DE52-Matrix geschüttelt oder alternativ mittels einer DE52-Säule chromatographiert. Anschließend wurde die Lösung filtriert und lyophilisiert. Nach dem Resuspendieren wurden restliche Proteine durch Fällungsschritte mit 90 % Ethanol $\ddot{U}N$ bei SI-40°C entfernt. Die Qualität bzw. die Reinheit der Präparation wurde Spektrophotometrisch kontrolliert.

2.2.3.3 De-O-Acetylierung von Polysaccharid

Das lyophilisierte Polysaccharid wurde in Wasser aufgenommen, mit einer Konzentration von 10 bis 20 g l⁻¹. Die Polysaccharidlösung wurde mit Ammoniumhydroxid versetzt, Endkonzentration 12,5 % (v/v). Die De-O-Acetylierung erfolgte 16 h bei 37 °C. Das de-O-acetylierte Polysaccharid wurde anschließend ausgiebig gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

2.2.3.4 Verdau von Polysaccharid durch Tailspikes

Für den Verdau wurden 10 mg lyophilisiertes Polysaccharid in 900 µl H₂O gelöst und mit 100 µl 50 mM Ammoniumacetat versetzt. Nach Zugabe von einem Tailspike auf eine Endkonzentration von 100 µg ml⁻¹ wurde das Polysaccharid etwa 16 h bei 37 °C unter Schwenken verdaut. Anschließend wurden Tailspike und die nicht verdauten PS-Moleküle mit 90 % Ethanol bei -40 °C gefällt. Nach 20 min Zentrifugation bei 12000×g und 4 °C wurde der Überstand mit Oligosaccharidfragmenten in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die Oligosaccharidfragmente wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.5 Derivatisierung der Oligosaccharidfragmente mit dem bi-funktionalen Oxaminadapter für Oberflächenplasmonresonanz-Messungen

Die Derivatisierung der Oligosaccharidfragmente am reduzierenden Ende mit einem bi-funktionalen Oxaminadapter erfolgte in Anlehnung an Bohorov u. a. (2006), mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Prof. Carlo Unverzagt (Universität Bayreuth). Das Oxaminadapter wurde in einem 40-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Zunächst wurde Oxaminadapter in 50 mM Acetatpuffer, pH 7,75 gelöst und auf pH 4,5 eingestellt. Durch die Zugabe von Oligosaccharidfragmenten aus 2RU oder 3RU zu einer Endkonzentration von 35 mM wurde die Reaktion gestartet. Die Derivatisierung erfolgte bei 37 °C. Anschließend wurden die Reaktionsansätze lyophilisiert in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat aufgenommen und mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Dabei wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 30-Säule eingesetzt. Die entstandenen Produkte wurden mittels MALDI-MS und ¹H-NMR analysiert.

2.2.3.6 Derivatisierung der Oligosaccharidfragmente mit APTS für die Kapillargelelektrophorese

Für die Analytik mittels Kapillargelelektrophorese wurden Oligosaccharidfragmente mit 1-Aminopyren-3,6,8-Trisulfonsäure (APTS) derivatisiert (Chen, Dobashi und Evangelista, 1998). Oligosaccharidfragmente aus einem LPS-Verdau von ursprünglich

125 µg Lipopolysaccharid lagen in getrockneter Form vor. Diese wurden mit 1,5 µl 200 mM APTS-Stammlösung aufgenommen und mit 1,5 µl Natriumcyanoborhydrid in Tetrahydrofuran versetzt. Nach der Inkubation ÜN bei 37 °C (lichtgeschützt) wurde die Reaktion durch Zugabe von 97 µl H₂O gestoppt. Proben wurden lichtgeschützt bei -40 °C aufbewahrt.

2.2.3.7 Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mit intaktem Polysaccharid

BiacoreJ stellt zwei Flusszellen (Kanäle) zur Verfügung. Auf dem Kanal 1 wurde das PS immobilisiert, während der Kanal 2 als Referenzkanal fungierte. Es wurde ein Polycarboxylat-Hydrogel Chip C30m (Xantec) eingesetzt. Die Immobilisierung des Polysaccharids erfolgte in 10 mM Acetatpuffer bei einer Temperatur von 20 °C. Nach der Aktivierung durch 0,2 M EDC und 0,1 M NHS in MES-Puffer wurden zwei sukzessive Injektionen einer etwa 30 mg mL⁻¹ PS-Lösung (aus *Salmonella* Typhimurium DB7136, de-O-acetyliert) in 10 mM Acetatpuffer bei einer mittleren Flussrate durchgeführt. Anschließend wurde die Oberfläche mit 1 M Ethanolamin inaktiviert. Beim Referenzkanal wurde die Oberfläche analog mit EDC/NHS aktiviert und unmittelbar danach mit 1 M Ethanolamin inaktiviert. Die Bindung von TSPs wurde bei 20 °C in SPR-Messpuffer als Laufpuffer untersucht. Dazu wurden 100 µg mL⁻¹ TSP-Lösungen injiziert und die Änderung im Brechungsindex verfolgt.

2.2.3.8 Oberflächenplasmonresonanz-Messungen mit 3RU-Fragmenten

Zur Immobilisierung der derivatisierten 3RU-Fragmente wurde ein SPR-Chip C150d (Xantec) eingesetzt. Die Chip-Oberfläche wurde mit 0,2 M EDC und 0,05 M NHS aktiviert, gefolgt von drei sukzessiven Injektionen von 300 mM 3RU je 15 min bei niedriger Flussrate. Nach einem ÜN-Waschschritt bei niedriger Flussrate ging die Anzahl der *response units* auf das Ausgangsniveau. Anschließend wurde die Oberfläche mit 1 M Ethanolamin inaktiviert. Die Oberfläche wurde durch die Injektion einer 50 mM P22TSP-Lösung getestet.

2.2.3.9 Matrix-assisted laser-desorption ionization mass spectrometry

Lyophilisierete Oligosaccharidfragmente wurden unmittelbar vor der Messung mit H₂O auf eine Endkonzentration von 2 bis 10 mg ml⁻¹ eingestellt. Es wurde DHB/DMA-Matrix nach Ropartz u. a., 2011 eingesetzt: 100 mg ml⁻¹ Dihydroxybenzoesäure in H₂O, Acetonitril, Dimethylanilin (1:1:0,02). Der Oligosaccharidprobe wurden zunächst drei Standards beigemischt: Xylopentaose, Mannohexaose und Adrenocorticotropin-Hormon (ACTH)-Fragment 18-39. Anschließend wurden 0,4 µl des Gemisches mit 0,4 µl Matrix direkt auf dem MALDI-Proben-träger zusammengefügt und kristallisiert. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte im positiven Ionenmodus. Die

erhaltenen Spektren wurden über Software MMass entauscht, quadratisch kalibriert und ausgewertet.

2.2.3.10 ELITA-Messung

Die ELITA-Messung des kompletten Satzes aus 43 *Salmonella*-Stämmen erfolgte am Robert-Koch Institut (Wernigerode) mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. Wolfgang Rabsch. Bakterielle Kulturen wurden bis zum Erreichen von OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 1,3 bei 37 °C inkubiert. Bakterien wurden zwei mal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS auf OD₆₀₀ eingestellt. Es wurden 190 µl der Zellsuspension pro Kavität einer Microtiterplatte verteilt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es wurden vier Replikate pro Stamm verarbeitet. Die Zellsuspension wurde abgenommen. Die adsorbierten Zellen wurden zur Inaktivierung für 30 min mit 200 µl einer 2 %-iger Phenol-Lösung in PBS behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 205 µl PBS gewaschen. Die Wände der Microtiterplatte wurden mit 210 µl einer 2 %-iger BSA-Lösung in PBS abgesättigt, um unspezifische Bindung von Komponenten der anschließenden ELITA-Messung zu minimieren. Schließlich wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C aufbewahrt.

Als Tailspike-Sonden wurden die N-terminal mit einem TwinStrep tag markierten, katalytisch inaktiven Konstrukte der Tailspikes aus Bakteriophagen 9NA und P22 eingesetzt. Alle Angaben verstehen sich pro Kavität einer 96-Mikrotiterplatte. 190 µl der 5 µg ml⁻¹ TSP-Sonde in TEC wurden 15 min–20 min mit den adsorbierten Bakterien inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl PBS und einem Waschschrift mit PBS-T (je 4 min pro Waschschrift) wurden 190 µl des Streptactin-HRP-Konjugats, 1:10000 verdünnt in PBS-T+300 mM NaCl hinzugegeben. Nach 15 min Inkubation wurden die Ansätze erneut dreimal mit 200 µl PBS-T+300 mM NaCl und einmal mit 210 µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 200 µl 1 mg mL⁻¹ O-Phenylendiamin inkl. 0,03 % H₂O₂ in 50 mM Citrat-Puffer, pH 6,0 (nicht länger als 5 min). Schließlich wurde die Reaktion mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Proben wurden sofort bei 492 nm vermessen.

2.2.3.11 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS)

In Anlehnung an die ELISA-Messung wurden die Bakterien bis OD₆₀₀ = 0,8 – 1,2 angezogen, 30 min mit 1 % Phenol in PBS inaktiviert und zweimal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden Aliquots mit umgerechnet 0,2 OD_{600 nm}-Einheiten 30 min mit 5 µg mL⁻¹ TSP in PBS inkubiert, mit PBS-T sowie mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienzellen mit einem Gemisch aus 5 µM Streptactin-Chromeo-Konjugat

und 12,5 μM SytoRed-Farbstoff in FACS-Puffer 1 h gefärbt. Während SytoRed für eine unspezifische Färbung intakter Zellen eingesetzt wurde, detektiert Streptactin-Chromeo-Konjugat das an Zellen gebundene TSP. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und mit FACS-Puffer auf eine Konzentration eingestellt, bei der während der Messung weniger als 1000 Ereignisse pro Sekunde erfasst wurden. Es wurden 20000 Ereignisse im SSC-Kanal (seitliche Streuung, vgl. Tabelle 2.4) als Grundlage für die Messung ausgewählt. Die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe SytoRed und Chromeo wurden jeweils in den Kanälen APC-A (Anregung: 633 nm/Detektion: 661 nm) und FITC-A (Anregung: 488 nm/ Detektion: 530 nm) detektiert. Die Daten wurden mit der Software „FlowJo“ ausgewertet.

Tabelle 2.4: Zuordnung der FACS-Detektionskanäle

Kanal	Farbstoff	Funktion
FSC	–	direkte Lichtstreuung \approx Partikelgröße
SSC	–	seitliche Lichtstreuung \approx Granularität
APC	SytoRed	zur unspezifischen Färbung der Zellen
FITC	(Streptactin-)Chromeo	Nachweis von TSP über TwinStrep-tag

2.2.3.12 Kapillargelelektrophorese

Die APTS-derivatisierten Oligosaccharidfragmente wurden einheitlich mit Wasser verdünnt, sodass die maximale Intensität der Peaks in allen Ansätzen die Obergrenze von 100 relativen Fluoreszenzeinheiten nicht überschritt. Es kam eine 50 $\mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$ -Kapillare mit einer N-CHO-Beschichtung (Beckman Coulter) mit CE-Puffer als Laufpuffer zum Einsatz. Die Injektionszeit betrug 15 s, die angelegte Spannung 30 kV.

2.2.3.13 ^1H -Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) der derivatisierten Oligosaccharidfragmente

Die lyophilisierten Oligosaccharidfragmente wurden in D_2O aufgenommen. Die Konzentration der Oligosaccharidfragmente betrug 4,0–10,8 mg mL^{-1} . Die Messung erfolgte in einem 600 MHz NMR-Spektrometer (Bruker) und wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Kleinpeter von Herrn Dr. M. Heydenreich (Universität Potsdam) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Bindung von 9NATSP und P22TSP an *Salmonella*-Stämme der Serogruppen A, B und D

3.1.1 Prinzipielles Vorgehen bei Identifizierung von Wechselwirkungen zwischen einem TSP und dem O-Ag

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Identifizierung komplexer Kohlenhydrate als Bindungspartner von Tailspike-Proteinen (TSPs) aus Bakteriophagen etabliert. Eine Reinigung von Kohlenhydraten, die auf der bakteriellen Oberfläche exprimiert werden, ist ein zeitintensiver Prozess. Aus diesem Grund wurden zwei Techniken angewandt, um geeignete Kohlenhydrate direkt auf der Bakterienoberfläche zu detektieren. Eine der Techniken basiert prinzipiell auf einem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), wobei anstelle eines Primärantikörpers ein TwinStrep-tag markiertes TSP eingesetzt wird. Der Nachweis von gebundenem TSP erfolgt mittels eines Streptactin-Konjugats. Da im eingesetzten System keine Antikörper verwendet werden, wird es nicht als ELISA sondern als ELITA (*ELISA-like tailspike adsorption*) bezeichnet. Während ELITA auf der Bindung an immobilisierte Bakterien beruht, bleiben bei der zweiten eingesetzten Methode, der Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*), beide Interaktionspartner in Lösung.

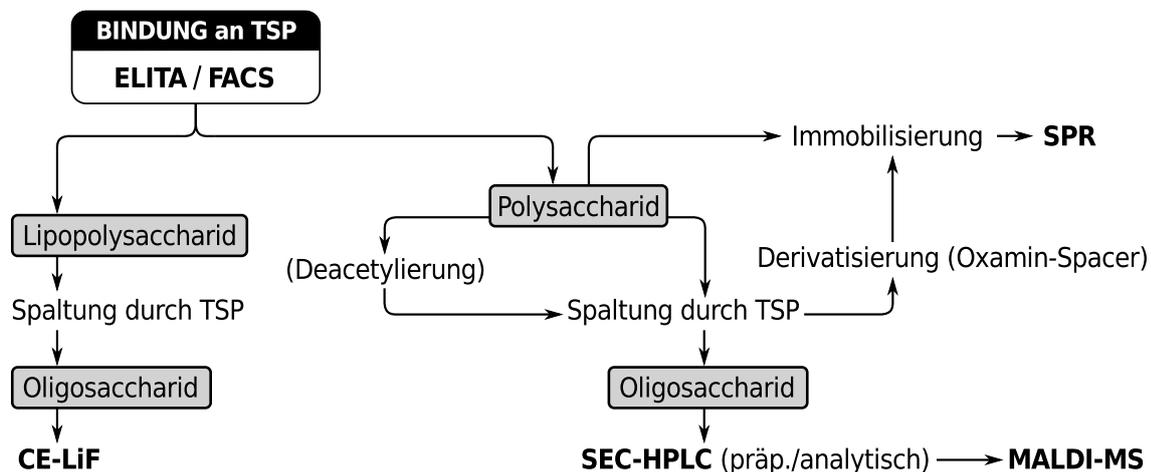


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Verfahrens: Durch ELITA (*ELISA-like tailspike adsorption*) und FACS (*fluorescence activated cell sorting*) werden Bakterienstämme identifiziert, die Substrate viraler Adhäsionsproteine bzw. Tailspikes (TSP) auf der Oberfläche exprimieren. Lipopolysaccharid (LPS) und Polysaccharid (PS) aus identifizierten Stämmen werden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und der daraus resultierenden Effekte auf die Interaktion analysiert. Die analytischen Verfahren sind fett hervorgehoben.

Nachdem das Bindungsverhalten von TSPs an ganzen Bakterien charakterisiert wurde, wurden Tests mit isoliertem Lipopolysaccharid (LPS) und Polysaccharid

(PS) durchgeführt. Die angewandten Verfahren (Abb. 3.1) sollen dazu dienen, die in ELITA und FACS identifizierten Binderpaare näher zu beschreiben. Im nächsten Schritt wurde daher die Rhamnosidase-Aktivität der TSPs an isoliertem LPS und PS getestet, da dieser Prozess bei Wildtyp-TSPs (TSPwt) unmittelbar an die Bindung von LPS bzw. PS gekoppelt ist. Für das System aus PS und katalytisch aktiven TSPs wurde zudem das Verhalten von unbehandelten und chemisch O-deacetylierten PS-Varianten verglichen. Der Hintergrund hierfür ist, dass für das O-Antigen (O-Ag) als Teil von PS bzw. LPS, das durch TSP gebunden wird, zwei mögliche Positionen für O-Acetylierung beschrieben wurden. Beide können potentiell mit der Bindung eines TSPs interferieren und die Produktverteilung nach katalytischer Spaltung durch ein TSP beeinflussen. Für die Analyse der Produktverteilungen wurden zwei Methoden eingesetzt, die die Auftrennung der Oligosaccharidfragmente abhängig von ihrer Größe erlauben: Die Oligosaccharidfragmente aus der Spaltung von PS durch TSPs wurden mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) aufgetrennt (Abb. 3.1). Diese Methode wurde sowohl präparativ als auch analytisch eingesetzt. Beim präparativen Einsatz wurden die gereinigten Oligosaccharide nach der HPLC mittels MALDI-MS hinsichtlich ihrer Zusammensetzung analysiert. Die zweite Methode, mit der Produktprofile nach der Spaltung von LPS durch TSPs erfasst wurden, war Kapillargelelektrophorese (*capillary gel electrophoresis*, CE) mit einem Laser-induzierten Fluoreszenzdetektor (LiF).

Des Weiteren wurde mit dem isolierten PS ein Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-basiertes Bindungsexperiment durchgeführt. Das Ziel war es, ein schnelles und teilweise parallelisierbares System für eine quantitative Charakterisierung der Bindung zwischen PS und TSP zu etablieren. Dabei wurde das PS in voller Länge auf einer Chipoberfläche immobilisiert. Diese Versuchsanordnung mit PS als Ligand und TSP als Analyt löst die Problematik mit dem PS-Einsatz bei SPR-Experimenten: Das Problem liegt dabei in der polydispersen Natur der PS-Präparationen, die PS-Ketten unterschiedlicher Länge enthalten. Dadurch ist es unmöglich, die molare Konzentration einer PS-Lösung zu bestimmen, die für eine Berechnung der kinetischen und thermodynamischen Parameter der Bindung benötigt wird. Der Einsatz von PS als einen immobilisierten Liganden umgeht dieses Problem und stellt das immobilisierte PS für Messungen mit mehreren TSPs zur Verfügung.

3.1.2 ELITA-basierter Bindungstest mit 9NATSP

3.1.2.1 Funktionsweise von ELITA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ELITA eingesetzt, um beispielhaft Bakterienstämme zu identifizieren, deren O-Ag von 9NATSP gebunden wird. Dazu wurden die Bakterien auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert. Dieser Schritt erfolgte

unspezifisch und basierte auf den Bindungseigenschaften der eingesetzten Mikrotiterplatte. Die adsorbierten Bakterien wurden mit einer 9NATSP-Sonde inkubiert, die die Funktion eines Primärantikörpers im klassischen ELISA übernahm. Das 9NATSP wurde zu diesem Zweck in zweierlei Hinsicht modifiziert: Zum einen wurde das Protein um einen N-terminalen TwinStrep-tag ergänzt, eine Peptidsequenz, die sowohl eine affinitätsbasierte Reinigung des Proteins als auch seinen Nachweis ermöglicht. Zum anderen wurde die Mutation D408N in 9NATSP eingefügt, die im Verlust der katalytischen Aktivität von 9NATSP resultiert. Das 9NATSP_wt spaltet das gebundene O-Ag, wodurch das 9NATSP bei ELITA-Bindungstests von der Oberfläche der adsorbierten Bakterien freigesetzt wird. Die an Bakterien gebundene 9NATSP-Sonde wurde über den TwinStrep-tag mittels eines Streptactin-Konjugats nachgewiesen, eines Proteins, das für eine spezifische und hochaffine Bindung an Strep-tag bzw. TwinStrep-tag optimiert ist (Schmidt u. a., 2013). Das gebundene Streptactin-Konjugat wurde seinerseits über die Farbreaktion eines daran gekoppelten Enzyms, der Meerrettichperoxidase, quantifiziert.

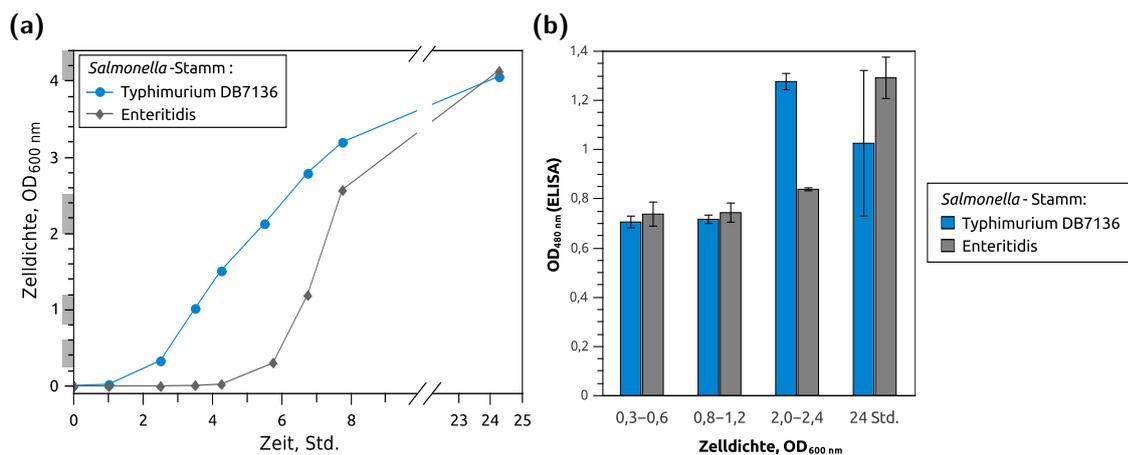


Abbildung 3.2: Optimierung der Wachstumsbedingungen von Bakterienkulturen für ELITA. **(a)** Ein optimaler Wachstumszeitpunkt sollte ermittelt werden, bei dem Bakterien aus einer Flüssigkultur für ELITA eingesetzt werden. Es wurden zwei *Salmonella*-Stämme, Typhimurium DB7136 (Serogruppe O4,5) und Enteritidis (Serogruppe O9), in einer Flüssigkultur angezogen. Beim Erreichen der Zelldichten, die auf der y-Achse mit vier grauen Balken markiert sind, wurden Aliquots entnommen und für ELITA eingesetzt. Unabhängig vom Wachstumszeitpunkt wurden für die Adsorption an die Mikrotiterplatte gleiche Mengen an Bakterien eingesetzt. Die Ergebnisse der vier ELITA-Messungen für beide Stämme mit P22TSP sind in **(b)** dargestellt. Der letzte Zeitpunkt für die Zellernte wurde nach 24 h der Zellkultivierung festgelegt.

Die Zusammensetzung des O-Ags hängt unter anderem von Wachstumsbedingungen der Bakterien ab und sie kann sich im Verlauf der Zellkultivierung z. B. hinsichtlich der Acetylierung verändern (Zandomenighi u. a., 2012). Um die daraus resultierende, potentielle Variabilität bei ELITA zu begrenzen, wurde in Vorversuchen ein optimaler Zeitpunkt für die Zellernte identifiziert (Abb. 3.2). Zu diesem Zweck wurden zwei Modellstämme getestet: *Salmonella* Typhimurium DB7136 aus der

Serogruppe O4,5 und *Salmonella* Enteritidis aus der Serogruppe O9. Die Stämme wurden in einer Flüssigkultur angezogen und beim Erreichen von definierten Zelldichten geerntet und für ELITA eingesetzt. Es wurden Zelldichten von 0,3–0,6, 0,8–1,2 und 2,0–2,4 getestet, bezogen auf die Werte der optischen Dichte bei 600 nm. Der letzte getestete Aliquot wurde unabhängig von der erreichten Zelldichte nach 24 h der Kultivierung abgenommen. Für alle Proben wurden pro Kavität der Mikrotiterplatte gleiche Mengen an Bakterien adsorbiert. Die ELITA-Ergebnisse zeigten konsistente Ergebnisse für Zelldichten unter 2,0 (Abb. 3.2b). Mit fortschreitendem Wachstum der Kultur zeigte ELITA teilweise höhere Extinktionswerte, aber auch höhere Abweichungen zwischen den eingesetzten Stämmen. Speziell bei den Aliquots nach der 24-stündigen Kultivierung können die enthaltenen Zelltrümmer für zusätzliche Schwankungen verantwortlich sein. Daher wurde der optimale Punkt für die Zellernte auf eine Zelldichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,8 - 1,2$ festgelegt.

3.1.2.2 Auswahl der *Salmonella*-Stämme

Die Auswahl der Stämme für ELITA richtete sich nach mehreren Kriterien: Der überwiegende Teil der getesteten *Salmonella*-Stämme gehört zu den Serogruppen O(1),2, O4(,5) und O9(,12₁,12₂,12₃). Stämme aus diesen Serogruppen wurden als Wirte des Bakteriophagen 9NA beschrieben, sodass eine Bindung von 9NATSP an das O-Ag dieser Stämme wahrscheinlich war (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Wollin, Stocker und Lindberg, 1987). Für den Referenzstamm *Salmonella* Typhimurium DB7136 wurde bereits die Bindung von isoliertem LPS an 9NATSP gezeigt (Andres, Roske u. a., 2012).

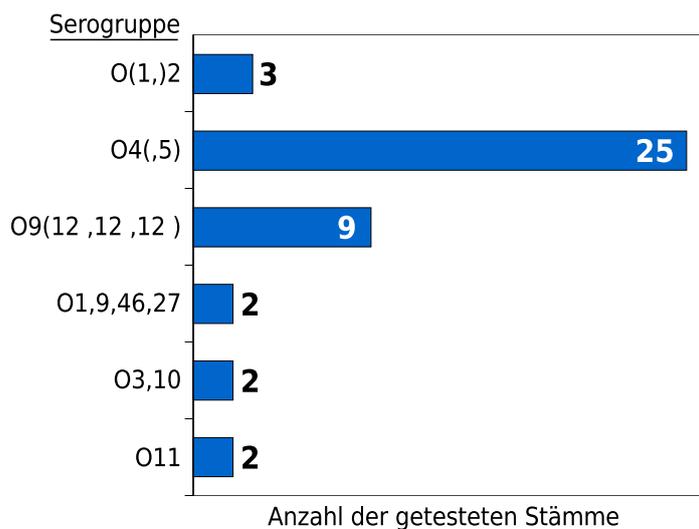


Abbildung 3.3: Die Verteilung der für ELITA eingesetzten *Salmonella*-Stämme. Die Anzahl der Stämme innerhalb der Serogruppen O(1),2, O4(,5) und O9(,12₁,12₂,12₃) orientiert sich an der Gesamtzahl der katalogisierten Stämme dieser Serogruppen (Grimont und Weill, 2007). Stämme der Serogruppen O9,46,27, O3,10 und O3,11 wurden als Kontrollen eingesetzt, weil diese Serogruppen nicht als Wirte des Bakteriophagen 9NATSP gelten. Da für diese Stämme keine Bindung zu erwarten war, wurden jeweils nur zwei Stämme für ELITA eingesetzt.

Die Anzahl der getesteten Stämme innerhalb einer Serogruppe orientierte sich an der Anzahl der katalogisierten klinischen Isolate (Grimont und Weill, 2007). Daher gehören die meisten getesteten Stämme der Serogruppe O4(,5) an (Abb. 3.3). Bei

den Serogruppen O(1,)2 und O9,(12₁,12₂,12₃) wurden jeweils 3 bzw. 9 Stämme getestet. Aus den Serogruppen O1,9,12,46,27, O3,10 und O11 wurden jeweils zwei Stämme für ELITA eingesetzt. Bakterien dieser Serogruppen gehören nicht zu den Wirten des 9NA's und fungierten als Negativkontrollen. Das O-Ag dieser Stämme ähnelt in der Zusammensetzung den O-Ag-Varianten der Serogruppen O(1,)2, O4,(5) und O12,(12₁,12₂,12₃) (Tab. 3.1). Bei allen Serogruppen mit der Ausnahme von O11 besteht der lineare Teil des O-Ags aus Mannose, Rhamnose und Galactose. Der strukturelle Unterschied resultiert aus der Identität der Seitenketten und aus unterschiedlichen Verknüpfungen der repetitiven Untereinheiten zwischen Galactose und Mannose: α -1–2 bei den potentiell bindenden Serogruppen bzw. α -1–6 bei den Kontrollserogruppen O1,9,12,46,27 und O3,10 (Tab. 3.1). Einen Spezialfall stellen beide Stämme mit dem O-Ag O1,9,12,46,27 dar. Diese haben die gleiche Struktur des O-Ags wie das O9,12₁-Ag, unterscheiden sich jedoch in der glycosidischen Bindung zwischen Galactose und Mannose (α -1–6 statt α -1–2) als Folge der Lysogenisierung durch den Bakteriophagen P27 oder Aktivierung chromosomaler Transferasen (Grimont und Weill, 2007). Zusätzlich kann die Mannose in einer α - oder β -Konfiguration vorliegen. Das O-Ag der Serogruppe O11 unterscheidet sich von dem der restlichen Serogruppen durch einen N-Acetylglucosamin-Rest im linearen Teil sowie die α -1–3-Verknüpfung der repetitiven Untereinheiten. Für die drei Kontrollserogruppen wurde die Anzahl der katalogisierten Stämme und damit ihre medizinische Relevanz nicht berücksichtigt. Zusätzlich wurde ein LPS-produzierender *E. coli*-Stamm HTD2158 als Negativkontrolle getestet. Dieser Stamm ist durch das O-Ag O18A1 charakterisiert und unterscheidet sich in der Struktur grundlegend von den *Salmonella*-Stämmen (Barbirz u. a., 2008).

Tabelle 3.1: *Salmonella*-Serogruppen, die im ELITA getestet wurden. Die Strukturen der O-Antigene stammen aus der *Bacterial carbohydrate structure*-Datenbank (<http://csdb.glycoscience.ru>, Stand: 14.09.2014). Eine biologische repetitive Untereinheit des O-Ags ist dargestellt. Die grau markierte Glucose bei der Serogruppe O2/O1,2 ist für die O1-Spezifität verantwortlich. Die Rhamnose kann teilweise acetyliert vorliegen. Im Fall der Serogruppe O3,10 bedeutet die graue Markierung der Glucose, dass dieser Rest nicht bei allen Stämmen der Serogruppe beobachtet wurde. Das O-Ag der Serogruppen O1,2, O2, O4, O4,5, O9 und O9,12₁,12₂,12₃ kommt als Interaktionspartner von 9NATSP infrage. Die restlichen Serogruppen fungieren als Negativkontrollen.

Serogruppe	O-Ag Struktur	Quellen
O2/O1,2	$\begin{array}{c} \text{Parp} \\ \downarrow \alpha_3^1 \\ \alpha \rightarrow 2 \text{ D-Manp } 1 \xrightarrow{\alpha} 4 \text{ L-Rhap } 1 \xrightarrow{\alpha} 3 \text{ D-Galp } 1 \\ \text{Ac} \\ \\ \text{Glc} \\ \downarrow \alpha_6^1 \end{array}$	Andres, Gohlke u. a. (2013) Konadu u. a. (1996)
O4	$\begin{array}{c} \text{Abep} \\ \downarrow \alpha_3^1 \\ \alpha \rightarrow 2 \text{ D-Manp } 1 \xrightarrow{\alpha} 4 \text{ L-Rhap } 1 \xrightarrow{\alpha} 3 \text{ D-Galp } 1 \\ \text{Ac} \\ \\ \text{Glc} \\ \downarrow \alpha_6^1 \end{array}$	Curd, D. Liu und P. R. Reeves (1998) Wollin, Stocker und Lindberg (1987)

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Tabelle 3.1: *Salmonella*-Serogruppen, die im ELITA getestet wurden. (Fortsetzung)

Serogruppe	O-Ag Struktur	Quelle
O4,5	$\begin{array}{c} \text{Ac-Abep} \\ \alpha \downarrow_3^1 \\ \alpha \rightarrow 2 \text{ D-Manp } 1 \alpha \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } 1 \alpha \rightarrow 3 \text{ D-Galp } 1 \end{array}$	Zandomenighi u. a. (2012)
O9	$\begin{array}{c} \text{Tyvp} \\ \alpha \downarrow_3^1 \\ \alpha \rightarrow 2 \text{ D-Manp } 1 \alpha \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } 1 \alpha \rightarrow 3 \text{ D-Galp } 1 \end{array}$	U. Baxa, Cooper u. a. (2001) Curd, D. Liu und P. R. Reeves (1998)
O9,12 ₁ ,12 ₂ ,12 ₃	$\begin{array}{c} \text{Tyvp} \\ \alpha \downarrow_3^1 \\ \alpha \rightarrow 2 \text{ D-Manp } 1 \alpha \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } 1 \alpha \rightarrow 3 \text{ D-Galp } 1 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Glc} \\ \alpha \downarrow_{4/6}^1 \\ \text{D-Galp } 1 \end{array}$ Wollin, Eriksson und Lindberg (1981)
O1,9,12,46,27	$\begin{array}{c} \text{Tyvp} \\ \alpha \downarrow_3^1 \\ \alpha \rightarrow 6 \text{ D-Manp } 1 \alpha/\beta \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } 1 \alpha \rightarrow 3 \text{ D-Galp } 1 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Glc} \\ \alpha \downarrow_6^1 \\ \text{D-Galp } 1 \end{array}$ Szafranek u. a. (2006) Nghiêm u. a. (1992)
O3,10	$\begin{array}{c} \alpha \rightarrow 6 \text{ D-Manp } 1 \alpha \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } 1 \alpha \rightarrow 3 \text{ D-Galp } 1 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Glc} \\ \alpha \downarrow_4^1 \\ \text{D-Galp } 1 \end{array}$ Knirel und Valvano (2011)
O11	$\begin{array}{c} \text{Manp} \\ \alpha \downarrow_4^1 \\ \alpha \rightarrow 3 \text{ D-Galp } 1 \alpha \rightarrow 4 \text{ L-Rhap } 1 \alpha \rightarrow 3 \text{ D-GlcNAc } 1 \end{array}$	B. Liu u. a. (2013)

Alle getesteten Stämme wurden aus einer Bibliothek der humanen *Salmonella*-Isolate (Robert Koch-Institut, Wernigerode) ausgewählt. Eine vollständige Liste ist im Anhang zu finden. Die Zuordnung der Stämme zu jeweiligen Serotypen wurde im Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für *Salmonellen* und andere bakterielle Enteritiserreger am Robert Koch-Institut vorgenommen. Eine Reihe von Stämmen der Serogruppe O4 bzw. O4,5, die für die nähere Charakterisierung ausgewählt wurden, wurden nachträglich serotypisch verifiziert. Damit wurde ausgeschlossen, dass diese zwischenzeitlich durch eine Bakteriophageninfektion verändert wurden.

3.1.2.3 Unterschiedliche Bindung von 9NATSP an die getesteten *Salmonella*-Stämme

Das primäre Ziel des ELITA-Experiments bestand darin, zwischen *Salmonella*-Stämmen zu unterscheiden, deren O-Ag durch 9NATSP gebunden wird, und den Stämmen mit nicht bindendem O-Ag. Bei der ELITA-Messung wurde eine Bindung der 9NATSP-Sonde an 86 % der *Salmonella*-Stämme der Serogruppen O2, O4, O4,5, O9 und O9,12₁,12₂,12₃ detektiert (Abb. 3.4). Die zwei getesteten *Salmonella*-Stämme vom Serotyp O2 zeigten im Schnitt eine vergleichbare Bindung von 9NATSP mit dem Referenzstamm *Salmonella* Typhimurium DB7136. Der Stamm *Salmonella*

Paratyphi A mit dem O-Ag O1,2, das eine zusätzliche Glucosylierung trägt, zeigte die schwächste Bindung innerhalb der Gruppe O(1,)2. Fast alle Stämme der Serogruppe O9 bzw. O9,12₁,12₂,12₃ wurden durch die 9NATSP-Sonde gebunden. Die Ausnahme stellt der Stamm *Salmonella* Bad Langensalza dar. Bei diesem Stamm wurden Extinktionswerte an der Nachweisgrenze detektiert, vergleichbar mit den Werten des Kontrollstamms *E. coli* HTD2158. Somit zeigte der Stamm *Salmonella* Bad Langensalza keine Bindung durch 9NATSP, obwohl er als O-Ag-tragend serotypisiert vorlag. Die am stärksten vertretene Serogruppe O4 bzw. O4,5 zeigte bei 20 von 25 Stämmen eine Bindung von 9NATSP. Fünf Stämme dieser Serogruppe zeigten keine oder eine minimale Bindung. Unter den nicht-bindenden Stämmen befinden sich zwei *Salmonella* Typhimurium-Stämme mit den Nummern 13-01230 und 13-02297. Beide Stämme ließen sich nicht eindeutig O-serotypisieren, was zusammen mit den Ergebnissen des Bindungstests auf eine Abschirmung bzw. reduzierte Zugänglichkeit des O-Ags hindeuten kann.

Bei keinem *Salmonella*-Stamm der Kontrollserogruppen O3,10 und O11 wurde eine Bindung der 9NATSP-Sonde beobachtet. Auch die zwei Stämme der Serogruppe O1,9,46,27 zeigten trotz struktureller Ähnlichkeit zum Serotyp O9,12₁,12₃ keine Bindung von 9NATSP. Das bedeutet, die α -1-6-glycosidische Bindung zwischen den repetitiven Einheiten des O-Ags und die β -Konfiguration der Mannose resultieren in einer Struktur, die nicht durch 9NATSP erkannt wird. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mit dem ELITA eine Unterscheidung zwischen Stämmen mit bindenden O-Ag-Varianten und nicht-bindenden Stämmen möglich ist.

Daneben zeigte die 9NATSP-Sonde ein unterschiedliches Bindungsverhalten innerhalb der Serogruppen. Für die drei getesteten Stämme der Serogruppe O(1,)2 wurden Differenzen von etwa 30% beobachtet, die nach dem doppelten t-Test ($p \leq 0,01, n = 4$) statistisch signifikant sind. Die Stämme der Serogruppe O9 liegen im ähnlichen Bereich zwischen 80 und 170% der Bindung des Referenzstamms *Salmonella* Typhimurium DB7136. Auch für die *Salmonella* Typhi-Stämme T2 und T4 wurde im ELITA unterschiedliche Bindung von 9NATSP. Das O-Ag dieser Stämme besitzt O9 als Grundstruktur. Die Unterschiede zum O9 und untereinander kommen durch die Glucosylierungen des O-Ags an der Galactose zustande. Sowohl der T2- als auch der T4-Stamm besitzen eine O12₁-Spezifität, die durch eine Glucosylierung der Galactose an der Position C6 zustande kommt. Der Unterschied zwischen den beiden Stämmen besteht in der zusätzlichen O12₂-Spezifität des Stamms *Salmonella* Typhi T4. Das bedeutet, dass bei diesem Stamm eine Glucosylierung des O-Ags an der Galactose-Position C4 vorliegt. Daraus resultiert, dass 9NATSP die Glucosylierung der Galactose an der Position C6 toleriert, während die Glucosylierung an der Position C4 mit der Bindung von 9NATSP interferiert. Dieser Zusammenhang wurde bereits für die Spaltung des isolierten Polysaccharids (PS) durch den kompletten

Bakteriophagen 9NA gezeigt (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981). Da 9NA nur über eine Art von TSP verfügt, sind die Aktivitätsdaten von Wollin, Eriksson und Lindberg (1981) auf 9NATSP übertragbar.

Auch die Serogruppe O4(,5) zeigte im ELITA ein heterogenes Bindungsverhalten der 9NATSP-Sonde. Bei den O4-Stämmen ist die Bandbreite der detektierten Bindung groß: von relativ schwacher Bindung bei Agona, Brandenburg 13-03007 und Indiana (unter 50 % des Referenzstamms) bis hin zum Dreifachen des Bindungssignals der Referenz wie im Fall von Paratyphi B 13-02924. Die Stämme mit der O4,5-Spezifität zeichnen sich durch eine Acetylierung der ABequose aus. Diese Stämme zeigten eine relativ stabile Bindung von 9NATSP auf dem Niveau des Referenzstamms Typhimurium DB7136, der ebenfalls O4,5-Ag exprimiert. Eine Schlussfolgerung ist, dass die Acetylierung der ABequose keinen negativen Einfluss auf die Bindung von 9NATSP hat. Außerdem bestätigt das ähnliche Bindungsverhalten der Stämme vom Serotyp O4,5, dass methodenbedingte Schwankungen bei ELITA gering sind. Das bedeutet wiederum, dass die bei anderen Stämmen erfassten Unterschiede tatsächlich auf ihre biologischen Eigenschaften zurückzuführen sind.

Die beobachteten Unterschiede der Bindung von 9NATSP repräsentieren die Heterogenität der Bakterienstämme: die Zusammensetzung des O-Ags bzw. das Ausmaß der nicht-stöchiometrischen Modifikationen, die durchschnittliche Länge der O-Ag-Ketten, die Expression weiterer Komponenten auf der Zelloberfläche etc. Das bedeutet, neben der reinen Unterscheidung zwischen den Stämmen mit bindendem O-Ag und den nicht-bindenden Stämmen ist ELITA sensitiv für verschiedene Struktureigenschaften der bakteriellen Oberfläche.

3.1.2.4 Grenzen und Fehler

Die erfassten Daten aus 4-fachen Ansätzen zeigten durchschnittlich Standardabweichungen im Bereich von 10–15 % der Messwerte. Bei einigen Ansätzen mit prozentual höheren Standardabweichungen handelt es sich um Kontrollansätze mit sehr niedrigen Signalintensitäten. Einer der Gründe für die beobachtete Streuung der Daten liegt in der biologischen Heterogenität der Proben. Bei den bindenden Stämmen lagen die meisten absoluten Extinktionswerte bei 492 nm zwischen 0,1 und 1,0 und damit im linearen Detektionsbereich. Die Extinktionswerte der nicht-bindenden Stämme (*E. coli* HTD2158, *Salmonella*-Serotypen O3,10 und O11) lagen unterhalb von 0,07. Bei dem Kontrollansatz ohne Bakterien, bei dem lediglich eine Absättigung der Wände der Mikrotiterplatte mit BSA erfolgte, wurden ca. 20–50 % höhere Extinktionswerte als bei Ansätzen mit nicht bindenden Bakterienstämmen detektiert. Die beobachtete Extinktion geht auf eine unspezifische Bindung des Streptactin-Konjugats zurück. Das zeigt, dass die Absättigung der Mikrotiterplatte mit Bakterien effektiver erfolgte als mit BSA.

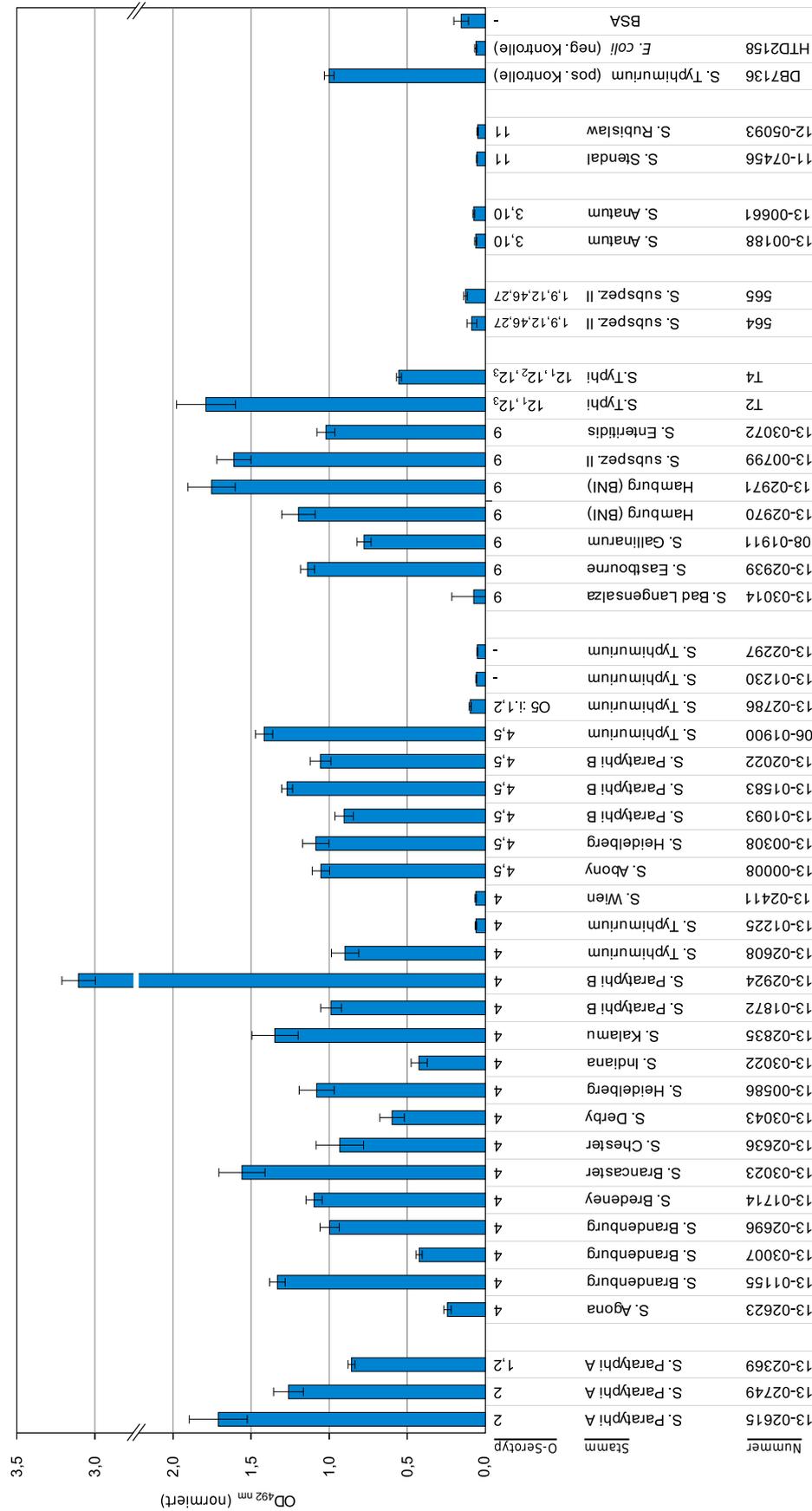


Abbildung 3.4: ELISA-Messung der Bindung von 9NATSP an *Salmonella* (S.-)Stämme der Serovare O2, O4, O4:5, O9, O3,10, O11 und O9,46,27. *E. coli* HTD2158 wurde als Kontrolle eingesetzt. Die an Mikrotiterplatten adsorbierten Bakterien wurden mit 9NATSP als Sonde inkubiert. Das gebundene 9NATSP wurde über einen TwinStrep-tag nachgewiesen. Zum Nachweis wurde ein Konjugat aus Streptactin und Meerrettichperoxidase eingesetzt, das über eine Farbreaktion bei 492nm quantifiziert wurde. Die Extinktionswerte wurden auf *Salmonella*-Typhimurium DB7136 normiert. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier Ansätzen pro Stamm. Die Beschriftung enthält (von oben nach unten) den Serotyp, die Stammbezeichnung und die Stammnummer der Stammsammlung des Robert-Koch-Instituts.

3.1.2.5 Kontrolle der Spezifität der beobachteten Bindung

Um die Spezifität der beobachteten Bindung von 9NATSP an das O-Ag zu testen, wurde ein Kontrollexperiment mit ausgewählten Stämmen durchgeführt. Nach der Adsorption der Bakterien an die Mikrotiterplatte wurde das O-Ag durch die Inkubation mit der katalytisch aktiven Form von 9NATSP (9NATSPwt) abgespalten bzw. abgebaut. In der anschließenden ELITA-Messung zeigten die behandelten Ansätze keine nennenswerten Signale im Gegensatz zu den nicht behandelten Ansätzen (Abb. 3.5). Die ausbleibende Bindung, die auf eine Degradierung des O-Ags durch das 9NATSPwt zurückzuführen ist, bestätigt die Spezifität der Bindung von 9NATSP an das O-Ag der adsorbierten Bakterien. Theoretisch wäre der gleiche Effekt durch eine Abschir-

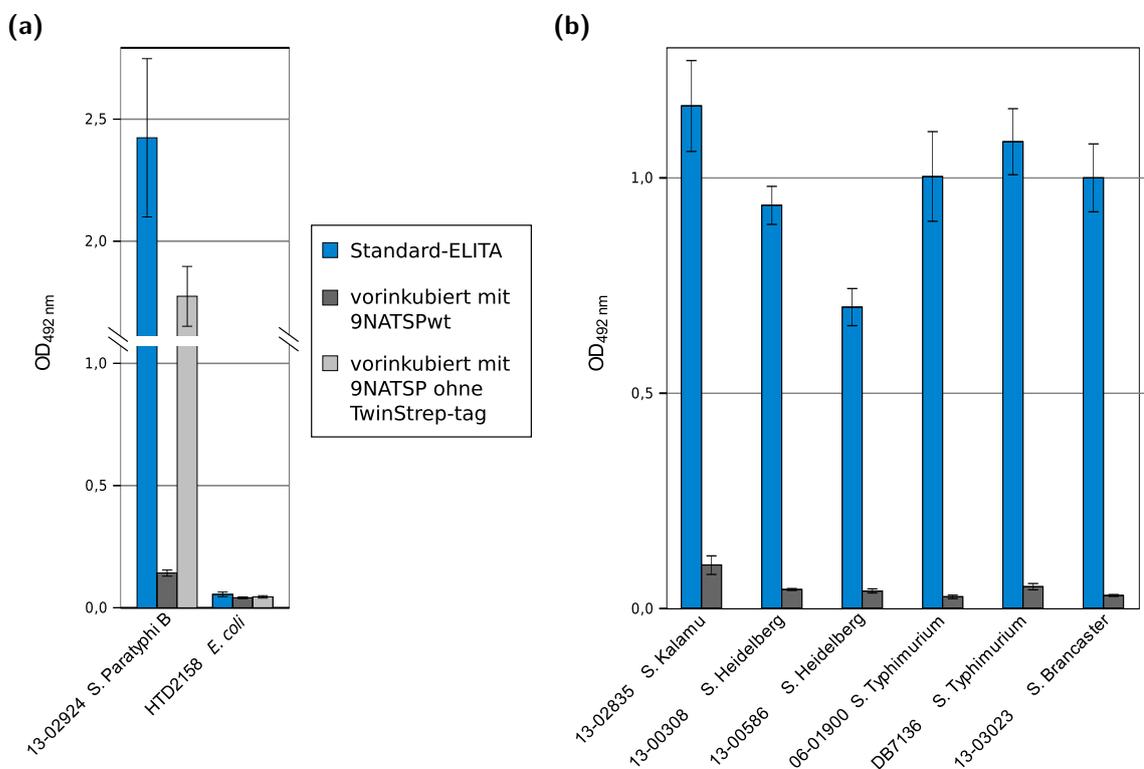


Abbildung 3.5: ELITA-Bindungstest zur Kontrolle der Spezifität der Bindung von 9NATSP an das O-Ag. Die auf einer Mikrotiterplatte adsorbierten Bakterien wurden vor dem ELITA mit einer katalytisch aktiven Form von 9NATSP (9NATSPwt) inkubiert (dunkelgrau). 9NATSPwt baut das O-Ag auf der bakteriellen Oberfläche ab, was eine darauf folgende Bindung der 9NATSP-Sonde verhindert. Anschließend erfolgte die ELITA-Messung nach Protokoll. Zusätzlich wurde bestätigt, dass die beobachteten Effekte auf den O-Ag-Abbau und nicht auf eine Abschirmung durch das gebundene 9NATSPwt zurückzuführen sind. Dazu wurden Ansätze mit einer katalytisch inaktiven 9NATSP-Variante ohne TwinStrep-tag anstelle des 9NATSPwt vorbehandelt (hell grau, nur in (a)). Die blauen Balken zeigen Ansätze ohne Vorbehandlung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus vier Ansätzen.

mung des O-Ag durch das 9NATSPwt möglich. Um dies auszuschließen, wurden Kontrollansätze mit dem katalytisch inaktiven 9NATSP ohne TwinStrep-tag anstelle des 9NATSPwt's vorinkubiert. Im Anschluss daran lieferten die Ansätze im ELITA Signale, die um 20 bis 40 % niedriger waren als die Signale der nicht vorbehandelten

Proben. Dies geht auf die partielle Abschirmung des O-Ag zurück, so dass weniger TwinStrep-markiertes TSP binden kann. Gleichzeitig deutet der beobachtete Effekt darauf hin, dass das O-Ag nicht komplett abgeschirmt wird, bzw. dass ein Teil des gebundenen TSP durch die Waschschriffe wieder entfernt wird. Das eingesetzte 9NATSP-Konstrukt ohne TwinStrep-tag ist hinsichtlich seiner Bindungseffizienz äquivalent zur TwinStrep-tag markierten 9NATSP-Sonde. Das bedeutet, dass der Waschschriff nach der Inkubation mit dem TSP potentiell verkürzt werden kann, um das Wegwaschen des TSPs zu minimieren und damit die maximale Signalintensität zu erreichen. Dafür spricht auch, dass das TSP bei Vorversuchen eine vernachlässigbare unspezifische Bindung an die Mikrotiterplatte zeigte und folglich intensives Waschen nach der Inkubation mit dem TSP nicht nötig ist.

3.1.3 P22TSP und 9NATSP differenzieren im ELITA zwischen *Salmonella*-Stämmen

Der ELITA-Bindungstest wurde analog mit P22TSP anstelle von 9NATSP durchgeführt. P22TSP ist ein strukturelles Homolog von 9NATSP aus dem Bakteriophagen P22. Beide Bakteriophagen weisen annähernd gleiche Wirtsspezifität auf, was entsprechend für eine ähnliche Rezeptorspezifität der TSPs spricht (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Daher ist ein direkter Vergleich der Bindungseffizienz der beiden Adhäsionsproteine interessant. Mit P22TSP wurde der gleiche Satz der Bakterienstämme wie mit 9NATSP getestet. Eine komplette Gegenüberstellung der Ergebnisse beider TSPs ist im Anhang zu finden. Die eingesetzten *Salmonella*-Kontrollstämme der Serogruppen O3,10 und O11 sowie der *E. coli*-Stamm HTD 2158 zeigen keine Bindung durch die P22TSP-Sonde. Die meisten *Salmonella*-Stämme der Serogruppen O4 und O9 zeigten eine Bindung von P22TSP, d. h. auch mit P22TSP als Sonde war eine Identifizierung der Stämme möglich, die bindendes O-Ag exprimieren. Ähnlich wie bei 9NATSP wurde eine variable Bindung von P22TSP an unterschiedliche Stämme innerhalb der Serogruppen O4(,5) und O9(,12₁,12₂,12₃) detektiert. Einige Stämme aus den Serogruppen O4 und O9 zeigten keine oder eine vergleichsweise schwache Bindung durch P22TSP. Gleichzeitig wurde bei mehreren Stämmen eine unterschiedliche Bindung von 9NATSP und P22TSP beobachtet. Eine Auswahl solcher Stämme ist in der Abb. 3.6 dargestellt. Die drei getesteten Stämme der Serogruppe O1(,2) zeigten eine Bindung von P22TSP an der Nachweisgrenze der ELITA. Beim 9NATSP zeigten die gleichen Stämme eine Bindung auf dem Niveau des Referenzstamms *Salmonella* Typhimurium DB7136. Das bedeutet, dass die fehlende Bindung der P22TSP-Sonde kein Artefakt des Versuchsaufbaus ist. Auch eine eingeschränkte Zugänglichkeit des O-Ags oder eine reduzierte Länge der O-Ag-Ketten scheiden als Ursache für die fehlende Bindung aus, da diese auch die Bindung durch 9NATSP verhindern würden. Die beobachte-

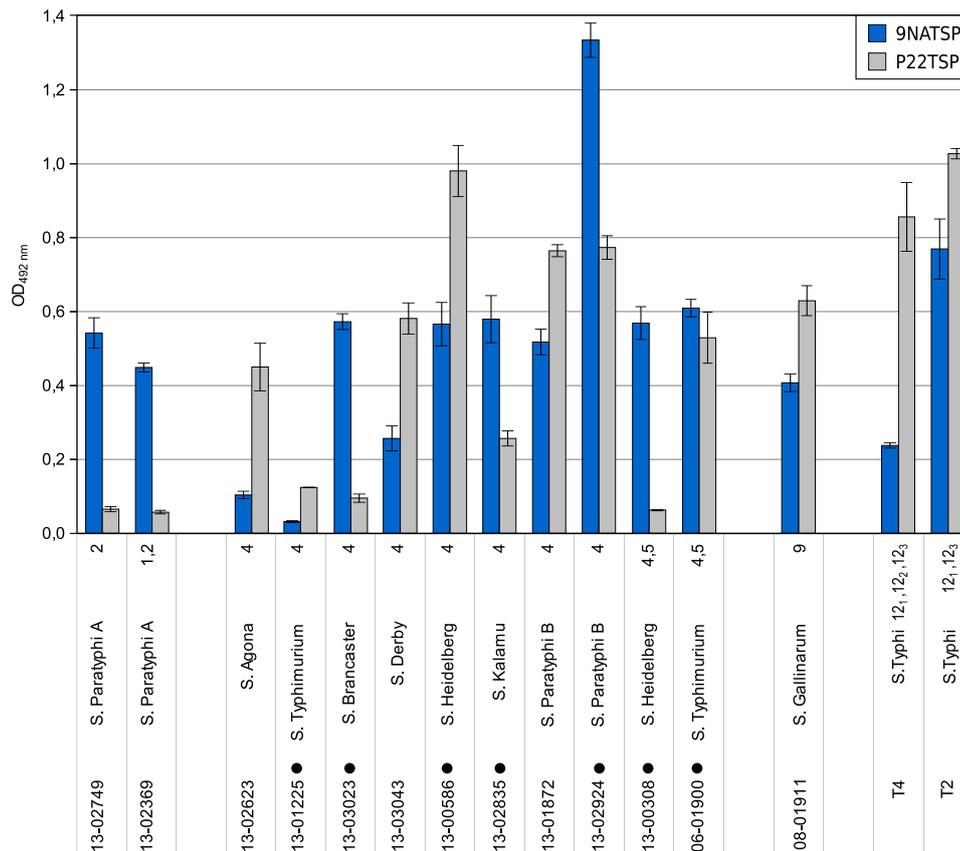


Abbildung 3.6: ELITA-Messung der Bindung von P22TSP (hell grau) und der Vergleich zur Bindung von 9NATSP (blau). Analog zu der Messung mit dem 9NATSP wurden adsorbierte Bakterien mittels P22TSP detektiert. Das gebundene P22TSP wurde über einen TwinStrep-tag colorimetrisch bei 492 nm nachgewiesen. Die Extinktionswerte wurden nicht normiert. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier Ansätzen. Die Stammnummer entsprechen der Stammsammlung des Robert Koch-Instituts. Die (●)-markierten Stämme wurden aufgrund der beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung von O-Ag analysiert.

ten Unterschiede gehen vielmehr auf die abweichenden Bindungseigenschaften der getesteten TSPs zurück. Auch die am stärksten vertretene Serogruppe O4(,5) zeigt teilweise eine gegensätzliche Bindung für 9NATSP und P22TSP. Dabei ist kein direkter Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit zu einem O-Serotyp (O4 oder O4,5) und der Bindung des jeweiligen TSPs erkennbar. Ein Beispiel dafür wären die *Salmonella*-Stämme Agona und Brancaster (Abb. 3.6). Beide sind durch das O4-Ag charakterisiert und zeigten deutliche Präferenzen für P22TSP im Fall von Agona und für 9NATSP im Fall von Brancaster. Auch die beiden gezeigten O4,5-Stämme liefern ein unterschiedliches Bindungsverhalten. *Salmonella* Heidelberg 13-00308 band 9NATSP vergleichbar mit dem Referenzstamm *Salmonella* Typhimurium DB7136. Beim P22TSP wurde für den Stamm Heidelberg 13-00308 keine Bindung beobachtet. Bei *Salmonella* Typhimurium (06-01900), das ebenfalls das O4,5-Antigen exprimiert, bestand dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden TSPs, wie es auch für den Referenzstamm *Salmonella* Typhimurium DB7136 beobachtet wurde. Die beobachteten Unterschiede deuten auf eine Heterogenität der O-Ag der getesteten Stämme hin, die nicht durch die Serotypisierung erfasst wird.

Die Stämme der Serogruppe O9 haben ähnliche Ergebnisse für beide TSPs mit einer tendenziell besseren Bindung durch P22TSP erzielt. Bei den *Salmonella* Typhi-Stämmen T2 und T4 wurde mit P22TSP eine annähernd gleiche Bindung beobachtet, wohingegen 9NATSP den Stamm T2 präferierte. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von P22TSP durch die Expression des O₁₂₂-O-Ags, das beide Stämme unterscheidet, nicht beeinträchtigt wird. Ein ähnliches Verhalten wurde beobachtet, als die Produktion von Oligosaccharidfragmenten aus dem O-Ag der Serogruppe O_{4,12}₂ durch die Bakteriophagen 9NA und P22 untersucht wurde (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981): Die Anwesenheit von 12₂ zeigte keinen Effekt auf die Aktivität von P22, während die Aktivität von 9NA um den Faktor 10 bis 20 reduziert wurde. Sowohl 9NA als auch P22 verfügen über jeweils eine Art TSP, das das O-Ag bindet und spaltet. Das bedeutet, die Ergebnisse von Wollin, Eriksson und Lindberg gehen auf die Unterschiede zwischen 9NATSP und P22TSP zurück. Somit deuten die ELITA-Daten auf Unterschiede in der Architektur der Bindungsstellen von P22TSP und 9NATSP hin. Diese machen das 9NATSP sensitiv für die Glucosylierung der Galactose an der Position C4, während P22TSP diese Art der Glucosylierung toleriert.

3.1.4 Interaktionsmessung an immobilisiertem Polysaccharid mittels Oberflächenplasmonresonanz

3.1.4.1 Einsatz von 3RU-Fragmenten für Oberflächenplasmonresonanz-Experimente

Im nächsten Schritt wurde ein System für die quantitative Charakterisierung der Binderpaare aus dem ELITA-Experiment aufgestellt. Zu diesem Zweck wurde Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-basierte Messung ausgewählt, um Bindungsparameter für des Interaktionssystem aus dem isoliertem O-Ag und dem TSP zu erfassen. Beim diesem System ist die Verfügbarkeit der isolierten Kohlenhydrate der limitierende Faktor. Aus diesem Grund sollten die Kohlenhydrate und nicht das TSP als Ligand auf einer SPR-Chipoberfläche immobilisiert werden. Als Modell wurde das O-Ag aus dem Referenzstamm *Salmonella* Typhimurium DB7136 eingesetzt. Kristallographische Daten eines Komplexes aus P22TSP und den O-Ag-Fragmenten aus *Salmonella* Enteritidis zeigen, dass die Bindungsstelle von P22TSP ein Oligosaccharidfragment aus 2RU umfasst (U. Baxa, Cooper u. a., 2001). Um sterische Hinderung zu vermeiden, wurde für die Interaktionsmessungen das Oligosaccharidfragment mit einer zusätzlichen RU (3RU) enzymatisch hergestellt und gereinigt. Der eingesetzte Chip verfügte über eine Polycarboxylathydrogel-Matrix mit hoher Dichte der Carboxylgruppen (C150D, Xantec). Für die Immobilisierung auf diesem Chip muss der Ligand über primäre Aminogruppen verfügen. Da 3RU-Fragment keine Aminogruppen enthält, wurde zuerst eine Derivatisierung mit einem bifunktionalen

Oxaminadapter vorgenommen (Abb. 3.7a). Der Oxaminadapter stellt die benötigte primäre Aminogruppe zur Verfügung. Die Derivatisierung erfolgt selektiv am reduzierenden Ende des Oligosaccharids, wobei die zyklische Form des Kohlenhydratrests beibehalten wird (Bohorov u. a., 2006). Dadurch bleibt die dreidimensionale Struktur des 3RU-Fragments unverändert. Dies wiederum ist die Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Bindung, die in ELITA und SPR-Experimenten beobachtet wird. Die erfolgte Derivatisierung wurde mittels MALDI-MS und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrometrie kontrolliert (Abb. 3.7b und 3.7c). Das Massenspektrum zeigt beim derivatisierten 3RU-Fragment eine Verschiebung der Massen aller Fragmente um 72,03 kDa, verglichen mit den Massen des nicht derivatisierten 3RU-Fragments. Diese Massendifferenz entspricht der Masse des Oxaminadapters abzüglich der Masse des freigesetzten Wassermoleküls. Die $^1\text{H-NMR}$ -Messung zeigt beim derivatisierten 3RU zusätzliche Signale im Bereich von 2,6 bis 3,2 ppm. Die Signale um 3,2 ppm wurden aufgrund der chemischen Verschiebung und des komplexen Kopplungsverhaltens den Protonen der Ethylgruppe des Oxaminadapters zugeordnet. Die Signale um 2,7 ppm gehen auf die Protonen der Methylgruppe zurück. Die beobachtete Aufspaltung in zwei Signale

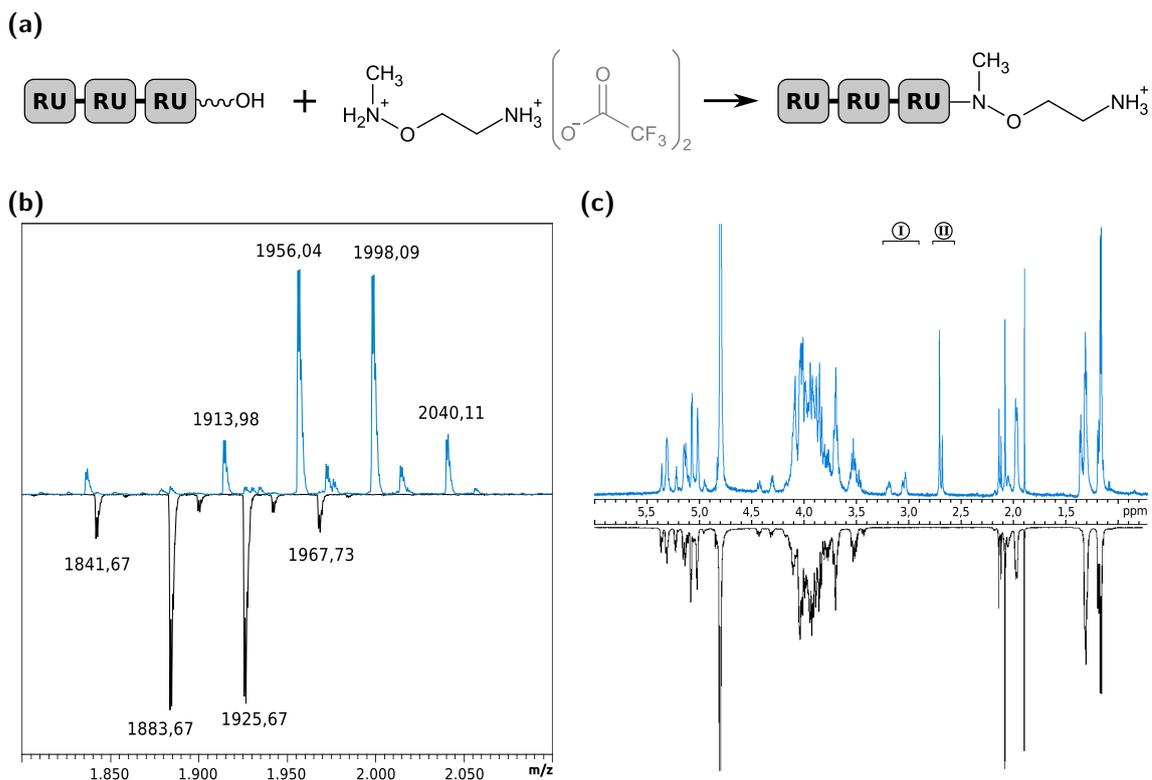


Abbildung 3.7: (a) Derivatisierung des 3RU-Fragments mit einem bifunktionalen Oxaminadapter. Die involvierte OH-Gruppe bildet das reduzierende Ende des Oktasaccharids. Nach der Derivatisierung verfügt das Molekül über eine primäre Aminogruppe. (b) Massenspektrum des 3RU-Fragments vor (schwarz) und nach (blau) der Derivatisierung mit dem Oxaminadapter. Die zusätzliche Masse des Oxaminadapters nach Derivatisierung beträgt 72,03 Da. (c) $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des 3RU-Fragments vor (schwarz) und nach (blau) der Derivatisierung. Die Bereiche I und II markieren zusätzliche Signale im Spektrum des derivatisierten 3RU-Fragments.

wurde als α - und β -konfigurierte Verknüpfung des Oxaminadapters an die Rhamnose interpretiert. Die Protonen der Aminogruppe sind durch Deuteriumionen des Lösungsmittels austauschbar und liefern daher keine Signale. Das ^1H -NMR-Spektrum deutet darauf hin, dass die Struktur des Oxaminadapters in der derivatisierten 3RU-Probe vorhanden ist.

Bei der anschließenden Immobilisierung des derivatisierten 3RU-Fragments konnte keine für die Messungen mit TSP ausreichenden Mengen an 3RU immobilisiert werden. Ein möglicher Grund liegt in der fehlenden Anreicherung von 3RU an der Oberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen beim Immobilisieren. Zusätzlich stellte die Kinetik der Immobilisierungsreaktion in Verbindung mit der geringen verfügbaren Menge des derivatisierten 3RU-Fragments ein potentiell Problem dar.

3.1.4.2 Verwendung von intaktem Polysaccharid für Oberflächenplasmonresonanz-Experimente

Als Alternative zur Bindungsmessung von TSPs an 3RU-Oligosaccharidfragmente wurde deren Bindung an das isolierte PS getestet. Auch für diese Messung wurde das PS als Ligand immobilisiert. Ein zusätzlicher Aspekt der PS-Immobilisierung war es, dass beim Einsatz von PS als Analyt keine quantitative Auswertung der SPR-Daten möglich ist. Der Grund hierfür ist, dass eine genaue Konzentration der Bindungsstellen in einer PS-Lösung unbekannt ist. Dafür ist die variable Länge der PS-Ketten verantwortlich, sodass immer ein polydisperses Gemisch vorliegt. Durch die Immobilisierung der PS-Ketten auf einer Chipoberfläche wurde das Problem gelöst, da für die Auswertung der Daten eines SPR-Experiments die Konzentration des immobilisierten Liganden, in diesem Fall PS, nicht nötig ist. Zusätzlich werden nicht-stöchiometrische Modifikationen bzw. ihr Einfluss auf die Bindung von TSPs erfasst. Im Unterschied zu den Oligosaccharidfragmenten erfordert die Herstellung von PS keine enzymatische Spaltung. Das bedeutet, die Zusammensetzung der 3RU-Fragmente wird durch die Präferenz des eingesetzten Enzyms bzw. eines katalytisch aktiven TSPs mitbestimmt. Das komplette PS hingegen wird bei der Reinigung nicht vorselektiert, sodass die Zusammensetzung des isolierten PS die auf der bakteriellen Oberfläche präsentierte Zusammensetzung widerspiegelt.

Nach der sauren Spaltung des Polysaccharids bei der Präparation verbleibt neben dem O-Ag das Kernsaccharid. Dieses kann durch Phosphoethanolamin nicht-stöchiometrisch modifiziert vorliegen (Tamayo u. a., 2005; Raetz und Whitfield, 2002; Kanipes u. a., 2001). Die primäre Aminogruppe von Ethanolamin wurde benutzt, um PS mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS)/1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid (EDC) auf einer Polycarboxylat SPR-Chipoberfläche zu immobilisieren (Gedig, 2008). Die Immobilisierung wurde für das aus dem Referenzstamm Typhimurium DB7136 isolierte PS getestet (Abb. 3.8a). Nach einem Immobilisierungszyklus

wurden ca. 2100 zusätzliche *response units* (r.u.) detektiert. Der SPR-Referenzkanal wurde analog mit EDC und NHS aktiviert und anschließend ohne PS-Injektion mit Ethanolamin gesättigt. Die erfolgreiche Immobilisierung von PS wurde durch eine Injektion von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ P22TSP getestet. Die Injektion von P22TSP resultierte

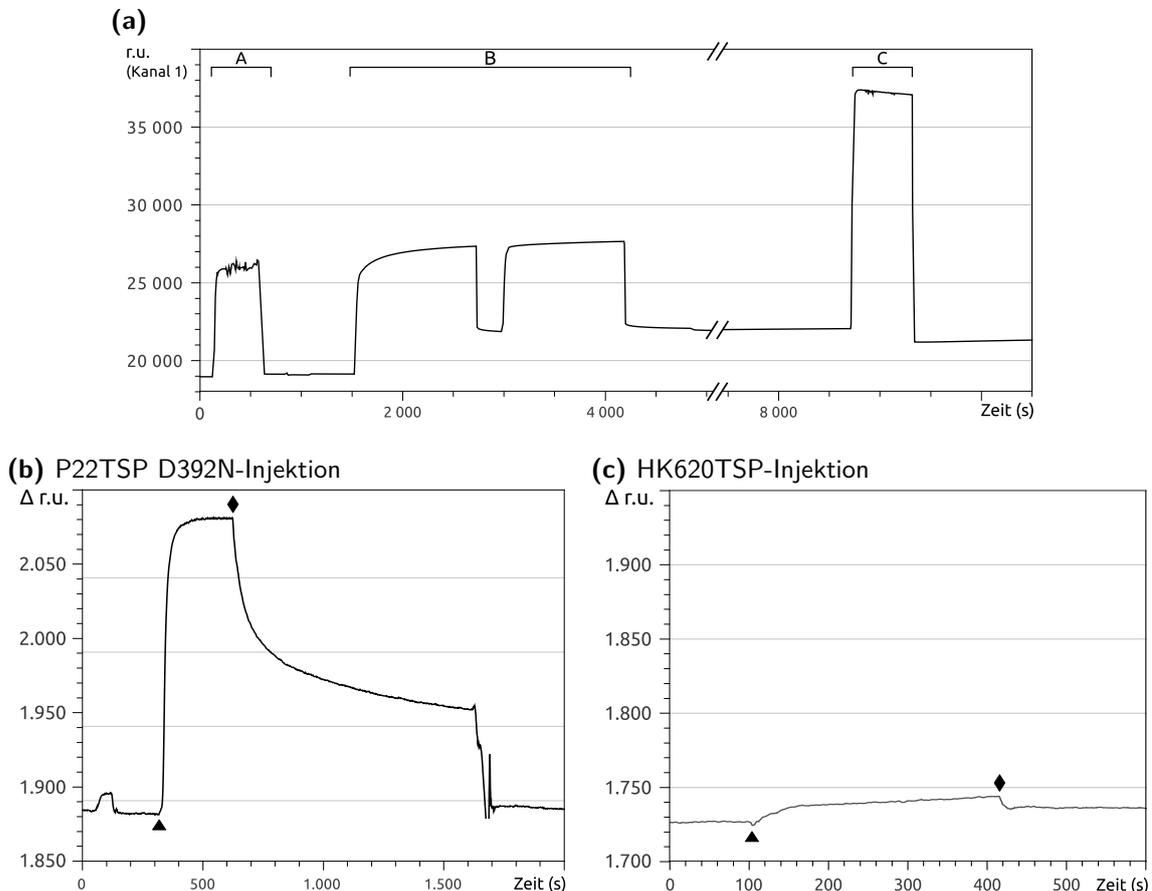


Abbildung 3.8: (a) Deacetyliertes, nicht-derivatisiertes PS aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 wurde auf einer Chipoberfläche mit linearem Polycarboxylat-Hydrogel (C150D, Xantec) immobilisiert. Der Bereich „A“ markiert die Aktivierung der Chip-Oberfläche mit 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid/N-Hydroxysuccinimid; der Bereich „B“ umfasst zwei Injektionen des PS. Der Bereich „C“ zeigt die Absättigung der Oberfläche mit Ethanolamin. Nach den Schritten „A“, „B“ und „C“ wurde eine Differenz von etwa 2100 *response units* (r.u.) gemessen. (b) Die Beschichtung der Oberfläche wurde getestet, indem $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ P22TSP injiziert wurde. Gezeigt ist die Differenz zwischen Kanal 1 mit dem immobilisierten PS und Kanal 2 als Referenz. Beim Referenzkanal handelt es sich um eine aktivierte und anschließend mit Ethanolamin abgesättigte Oberfläche. (c) Um die Spezifität der unter (b) beobachteten Interaktion zu testen, wurde ein TSP aus dem Bakteriophagen HK620 injiziert (HK620TSP , $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). HK620TSP weist eine Spezifität für *E. coli* O-Ag O18A1 auf. Analog zu (b) ist die Differenz vom PS-beschichteten Kanal 1 und Referenzkanal 2 gezeigt. (▲ und ◆ bei (b) und (c) markieren jeweils den Start und das Ende einer TSP-Injektion.)

in einer Bindung von etwa 200 ru im Sättigungsbereich der Injektion (Abb. 3.8b). Die Spezifität der Bindung von P22TSP wurde durch die Injektion eines weiteren TSPs kontrolliert (Abb. 3.8c). Bei diesem handelt es sich um ein TSP aus dem Bakteriophagen HK620 (HK620TSP). Das HK620TSP bindet spezifisch an das O-Ag O18A1 aus *E. coli*. Dieses unterscheidet sich beträchtlich vom immobilisierten PS aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 hinsichtlich der Zusammensetzung und der

Struktur. Daher kann HK620TSP als eine Negativkontrolle für die Bindungsmessung zwischen P22TSP und *Salmonella*-PS eingesetzt werden. Die Injektion von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ HK620TSP führte zur Bindung von etwa 20 r u, was ca. 10 % des Bindungssignals bei der P22TSP-Injektion ausmacht. Diese unspezifische Bindung kann auf die veränderten Oberflächeneigenschaften des PS-Kanals gegenüber dem Referenzkanal zurückgeführt werden: z. B. auf eine höhere Dichte der Oberflächenmatrix aufgrund der zusätzlichen PS-Ketten.

Leider konnte keine quantitative Charakterisierung der Interaktion durchgeführt werden. Neben der detektierten Differenz zwischen dem PS-Kanal und dem Referenzkanal bei der Injektion von P22TSP, wurden auf beiden Kanälen hohe absolute Anstiege der Signale vermessen (nicht gezeigt). Dies deutet auf eine unspezifische Bindung von P22TSP und HK620TSP an die Chipoberfläche hin. Aus dem gleichen Grund war die Regeneration der Oberfläche nach einer P22TSP-Injektion problematisch. Nach dem Injektionsstop wurde die Basislinie auch unter Einsatz milder Regenerationsbedingungen (1 M NaCl in 100 mM Borsäure, pH 9) nicht erreicht. Die alternativ eingesetzte Lösung mit 10 mM NaOH regenerierte die Oberfläche effektiv, reduzierte aber gleichzeitig die Anzahl der immobilisierten Einheiten auf dem PS-Kanal. Der Einsatz dieser Regenerationslösung setzte die Anzahl der verfügbaren PS-Ketten sukzessiv herab und machte das System für mehrfache Messungen ungeeignet. Die Zerstörung des Polycarboxylat-Hydrogels durch 10 mM NaOH scheidet als eine Ursache aus, da dieses im pH-Bereich 1–13 stabil ist. Die Behandlung von LPS mit 0,01 M NaOH für 20 min kann serologische Eigenschaften von LPS verändern (Čižnár und Shands, 1970). In den meisten Studien, bei denen LPS mit NaOH behandelt wurde, wurden jedoch höhere Konzentrationen, Temperaturen und Inkubationszeiten eingesetzt: 0,1 M–0,25 M NaOH bei 37 °C–100 °C für 1 h–3 h (Warren, Kowalski und Wallas, 1977; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Diese Publikationen berichten von der Spaltung der Esterbindungen der Fettsäuren am Lipid A und der Spaltung der Phosphodiesterbindungen. Das Ethanolamin, über das die Immobilisierung erfolgte, ist über eine Phosphodiesterbindung an das PS gebunden. Wenngleich beim SPR-Experiment mildere Regenerationsbedingungen eingesetzt wurden, kann die Spaltung der Phosphodiesterbindung für den Rückgang der immobilisierten PS-Menge verantwortlich sein.

Neben der unspezifischen Bindung an die Chipoberfläche kann eine hohe Dichte an Bindungsstellen der Grund für eine ineffektive Regeneration sein. Eine PS-Kette bietet aufgrund des repetitiven Aufbaus des O-Ags mehrere Bindungsstellen für ein TSP. Mehrere PS-Ketten, die in einer unmittelbaren räumlichen Nähe immobilisiert werden, resultieren daher in einer hohen lokalen Konzentration der Bindungsstellen und folglich in einer sehr langsamen Dissoziation der TSPs. Dies und die unspezifischen Interaktionen mit der Chipoberfläche spielten eine Rolle bei der Regenerationspro-

blematik. Die genannten Effekte lassen sich unter dem Begriff Oberflächeneffekte zusammenfassen. Da diese auch bei einer ELITA-Messung potentiell eine Rolle spielen könnten, wurde eine nicht-oberflächenbasierte Methode angewandt, mit der die Bindung von Proteinen auf der Zelloberfläche erfasst werden kann: die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie.

3.1.5 FACS Bindungstest mit 9NATSP und P22TSP

Im Unterschied zu einem ELITA bleiben bei der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie (FACS) alle Interaktionspartner in Lösung. Damit lassen sich ELITA-bezogene Oberflächeneffekte wie die eingeschränkte Zugänglichkeit und ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten einzelner Stämme an eine Mikrotiterplatte ausschließen. Für die FACS-Experimente wurden die gleichen TSP-Konstrukte wie bei ELITA eingesetzt. Der Ablauf des FACS-Experiments ähnelt dem des ELITA-Tests: Die phenolinaktivierten Bakterien wurden mit einer TSP-Sonde inkubiert und anschließend mehrfach gewaschen. Die gebundenen TSP-Sonden werden mittels eines fluoreszenzmarkierten Streptactin-Konjugats nachgewiesen. Der Chromeo-Fluoreszenzfarbstoff am Streptactin wurde im Fluoreszeinisothiocyanat-A-Fluoreszenzkanal (FITC-A) des FACS-Geräts gemessen. Da FITC-A der einzige benutzte Fluoreszenzkanal ist, wird dieser im Folgenden generell als Fluoreszenzkanal referenziert. Weitere für die Auswertung relevante Parameter der Messung sind Größe und Granularität der Zellen bzw. Bakterien. Die Größe der Bakterien wird im FSC-Kanal (*front scatter*) durch direkte Lichtstreuung bzw. Lichtabsorption erfasst. Die Granularität beschreibt, wie rau die Oberfläche der detektierten Partikel ist, und wird über seitliche Streuung im SSC-Kanal (*side scatter*) erfasst.

Die getesteten Stämme sind in der Tabelle 3.2 aufgelistet. Die Auswertung der TSP-Bindung erfolgte bezogen auf 2D-Punkteauftragungen, bei denen Signale im FSC-Kanal gegen die Signale des Fluoreszenzkanals aufgetragen wurden. Dabei wurde ein Bereich definiert, der eine Reihe von Kriterien erfüllt: Im Fluoreszenzkanal enthält der Bereich weniger als 0,7% der Zellen der Kontrollansätze ohne TSP. Die bei diesen Ansätzen gemessene Fluoreszenz erfasst die Autofluoreszenz der Zellen, die nicht auf eine gebundene TSP-Sonde zurückzuführen ist. In den FSC- und SSC-Kanälen schließt der definierte Bereich Zellen aus, die in beiden Kanälen eine Intensität über 10^3 aufweisen und daher als Zellaggregate interpretiert werden. Die zweite Bedingung (FSC/SSC) schloss je nach Ansatz zwischen 0,7% und 37% der Zellen bei der Berechnung der TSP-Bindung aus. Würde man auch größere Zellaggregate berücksichtigen, wären bei einigen Ansätzen höhere Bindungseffizienzen der TSP-Sonden zu erwarten.

Standardmäßig werden bei einem FACS-Experiment Zellen bzw. in diesem Fall Bakterien mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Auf diese Weise wer-

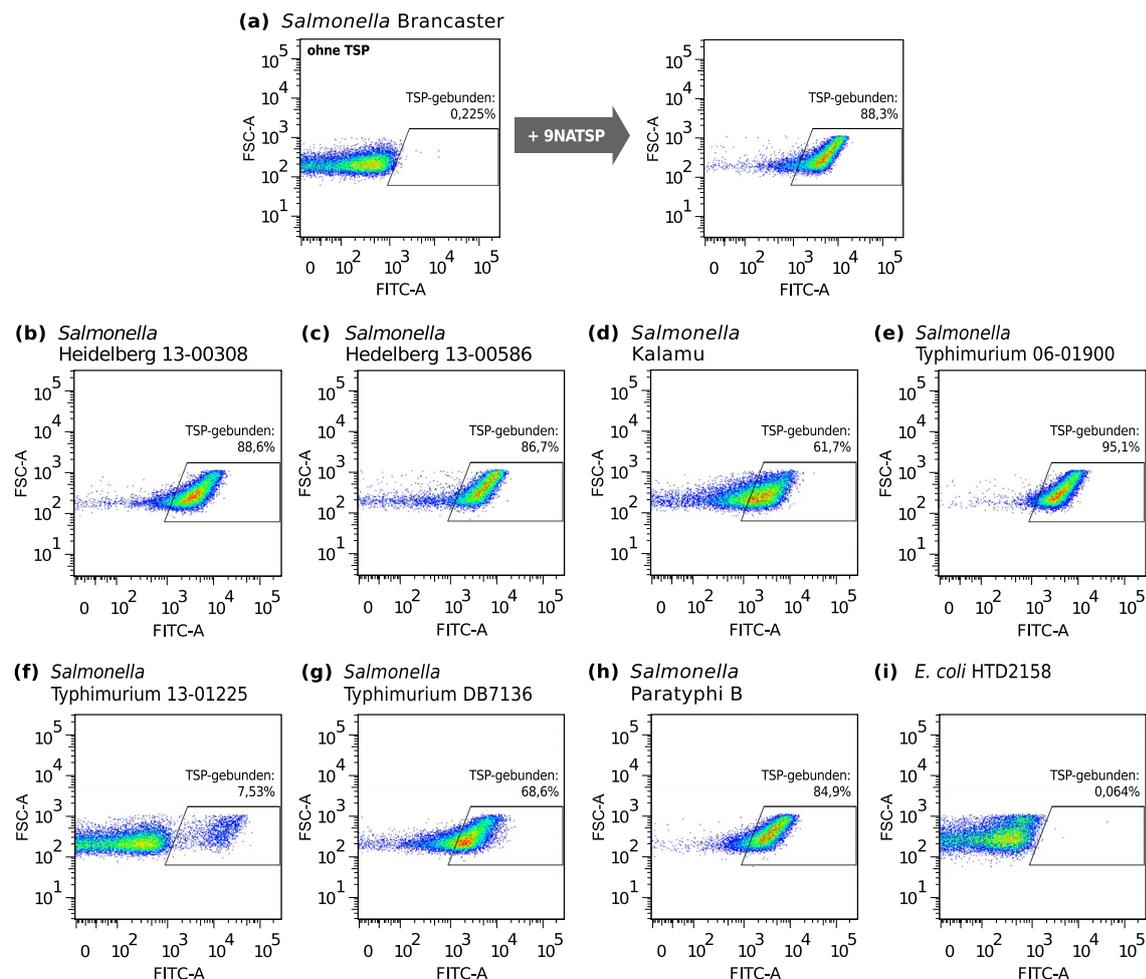


Abbildung 3.9: FACS-basierte Messung der Bindung von 9NATSP an *Salmonella*-Stämme sowie den *E. coli* Stamm HTD2158. Die Ansätze wurden mit 9NATSP und anschließend mit dem Streptactin-Konjugat inkubiert, das an Fluoreszenzfarbstoff Chromeo (FITC-A-Kanal) gebunden ist. Pro Ansatz wurden 20000 Ereignisse (Zellen) im FSC-Kanal erfasst. **(a)** In den SSC/FSC-Auftragung wurde ein Bereich mit intakten Zellen definiert. Die FSC/FITC-A-Auftragung enthält nur Zellen aus diesem Bereich. Der Bereich „TSP-gebunden“ erfasst Zellen, die eine Fluoreszenzintensität über der Intensität des Kontrollansatzes in **(i)** aufweisen und somit durch mehrere TSP-Moleküle gebunden sind. Diese Bereiche wurden für die Auswertung der Ansätze **(b)** bis **(h)** eingesetzt.

den unter anderem intakte oder lebende Zellen von den Zelltrümmern unterschieden. Daher wurden die *Salmonella*-Stämme und der Kontrollstamm *E. coli* HTD2158 mit dem Farbstoff SytoRed gefärbt, der für die Färbung von *E. coli* geeignet ist (Comas und Vives-Rego, 1997). Bei der Messung wurde eine ineffiziente Färbung der *Salmonella*-Zellen mit dem Farbstoff SytoRed beobachtet (< 20%), so dass der SytoRed-Kanal bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurde. Der Stamm *E. coli* HTD2158 wurde hingegen mit einer Effizienz über 90 % gefärbt.

Die Kontrollansätze ohne die TSP-Sonde zeigten keine unspezifische Färbung mit dem Streptactin-Chromeo-Konjugat (Daten im Anhang). Die Bindungsdaten der gemessenen *Salmonella*-Stämme sind unterschiedlich hinsichtlich der Bindung durch die beiden TSPs und stimmen qualitativ mit den ELITA-Daten überein (Tab. 3.2). Damit wäre die unterschiedliche Bindung beider TSP an Bakterien

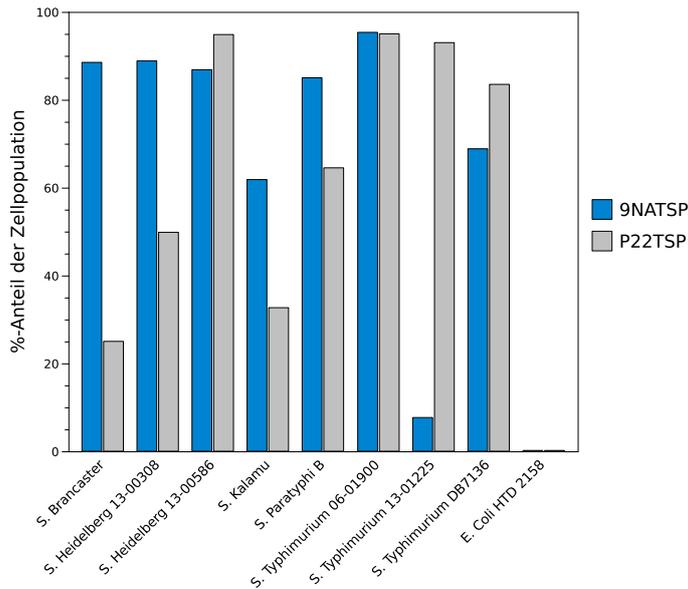


Abbildung 3.10: FACS-basierte Bindungsdaten für 9NATSP (blau) und P22TSP (hellgrau). Die Bakterienzellen wurden mit einem der beiden TSPs inkubiert. Das gebundene TSP wurde durch Streptactin-Chromeo-Konjugat im FITC-A-Fluoreszenzkanal detektiert. Gezeigt sind prozentuale Anteile der Zellpopulation, die Kriterien der beiden definierten Intensitätsfenster erfüllen (siehe Abb. 3.9): Größe/Granularität und Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal. Letzteres korreliert mit der Menge an gebundenem TSP.

des jeweiligen Stamms mit beiden Methoden bestätigt. Die *Salmonella*-Stämme Brancaster und Heidelberg 13-00308 zeigten eine deutliche Präferenz für 9NATSP mit jeweils 3,5-fach und 2-fach höheren Werten als P22TSP. Bei beiden Ansätzen wurden etwa 90 % der Zellpopulation durch 9NATSP gebunden. Auch der Stamm *Salmonella* Kalamu zeigte für 9NATSP eine bessere Bindung als für P22TSP mit entsprechend 60 % und 30 % der Zellpopulation, gebunden durch ein TSP. Der Stamm *Salmonella* Typhimurium 13-01225 zeigte keine Bindung für 9NATSP, wie es bereits bei ELITA-Messungen beobachtet wurde. Für P22TSP zeigte der gleiche Stamm eine Bindung bei etwa 90 % der Zellpopulation. *Salmonella* Heidelberg 13-00586 zeigte eine minimale Präferenz für P22TSP, die geringer als bei ELITA ausfiel. Der Stamm zeigte für beide TSPs eine annähernd vollständige Färbung der Zellpopulation, was ein Hinweis auf eine unzureichende Stringenz der Waschschritte sein kann. *Salmonella* Typhimurium 06-01900 zeigte für beide TSP eine vergleichbar hohe Bindungseffizienz in Übereinstimmung mit den ELITA-Ergebnissen. Der Stamm *E. coli* HTD2158, der als eine Negativkontrolle eingesetzt wurde, zeigte keine Interaktion mit den TSPs.

Zusätzlich zu den Bindungseffizienzen beider TSPs wurden weitere Unterschiede zwischen den Stämmen beobachtet. Einige Ansätze zeigten nach Inkubation mit einem TSP deutlich zwei Populationen, während bei anderen nur eine Verschiebung des einzigen Intensitätsmaximums beobachtet wurde (Abb. 3.11). Zwei Zellpopulationen können theoretisch durch eine bi-phasische Kultur zustande kommen, wenn die Zellen tatsächlich zwei unterschiedliche O-Ag exprimieren. Eine breite Intensitätsverschiebung, bezogen auf die ungebundenen Zellen ohne Aufspaltung, wäre dagegen zu erwarten, wenn das O-Ag unterschiedlich stark modifiziert ist. In diesem Fall würde die gesamte Zellpopulation einen geeigneten Rezeptor exprimieren, der aber je nach Ausmaß der Modifikation unterschiedlich effektiv gebunden wird. Die

Tabelle 3.2: Gegenüberstellung der Ergebnisse der FACS- und der ELITA-Experimente. Für das FACS-Experiment ist der prozentuale Anteil der TSP-gebundenen Zellen angegeben. Für das ELITA-Experiment sind Extinktionswerte aufgeführt. Es ist anzumerken, dass im Unterschied zu einer FACS-Messung die nicht-bindenden Zellen beim ELITA-Test nicht erfasst werden. Das macht einen direkten Vergleich mit den FACS-Daten unmöglich. Daher kann lediglich die Tendenz verglichen werden, welches der TSPs ein besserer Interaktionspartner für den jeweiligen *Salmonella*-Stamm ist. Die Werte für ein TSP, das bei jeweiliger Messmethode eine effektivere Bindung zeigte, sind fett hervorgehoben.

<i>Salmonella</i> -Stamm (wenn nicht anders vermerkt)	FACS, % geb.		ELITA, Ext. _{492 nm}	
	9NATSP	P22TSP	9NATSP	P22TSP
Brancaster	88,3	24,9	0,57	0,1
Heidelberg 13-00308	88,6	49,7	0,57	0,06
Heidelberg 13-00586	86,7	94,6	0,57	0,98
Kalamu	61,7	32,5	0,58	0,26
Paratyphi B	84,9	64,3	1,34	0,77
Typhimurium 06-01900	95,1	94,8	0,61	0,53
Typhimurium 13-01225	7,5	92,9	0,03	0,12
Typhimurium DB7136	68,6	83,4	0,52*	0,46*
<i>E. coli</i> HTD2158	0,06	0,08	0,03	0,04

* Unterschied ist nicht signifikant nach einem zweiseitigen t-Test ($p > 0,17$, $n=4$). Daher ist die Bindung für P22TSP und 9NATSP an *Salmonella* Typhimurium DB7136 beim ELITA vergleichbar.

Verteilung der unterschiedlich modifizierten O-Ag-Formen wäre als Verteilung der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Interessanterweise wird dieser Effekt nicht bei beiden TSP im gleichen Ansatz beobachtet. Meistens zeigt P22TSP zwei Zellpopulationen und zwar bei den Stämmen Brancaster, Heidelberg 13-00308, Kalamu sowie minimal bei Paratyphi B (Abb. 3.11). Alle Stämme, die für beide FACS-Messungen eingesetzt wurden, verhalten sich diesbezüglich in beiden Messungen gleich. Ebenfalls

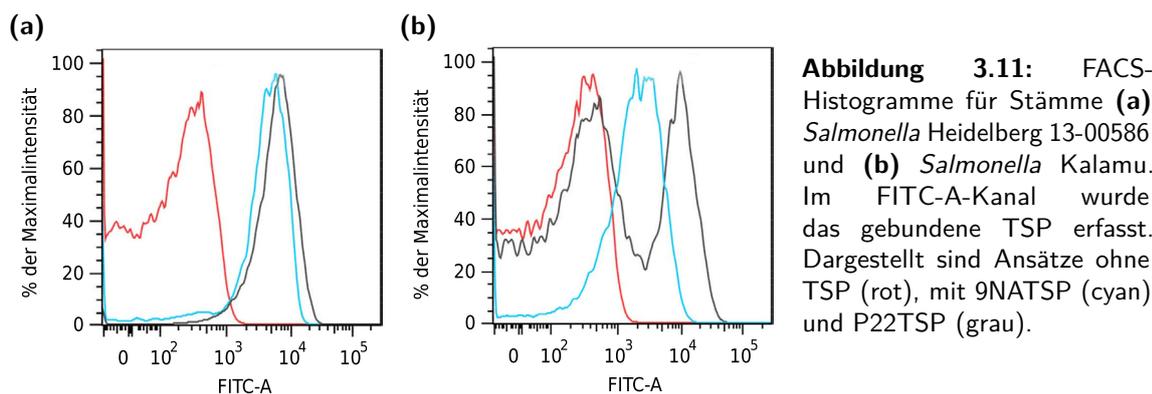


Abbildung 3.11: FACS-Histogramme für Stämme (a) *Salmonella* Heidelberg 13-00586 und (b) *Salmonella* Kalamu. Im FITC-A-Kanal wurde das gebundene TSP erfasst. Dargestellt sind Ansätze ohne TSP (rot), mit 9NATSP (cyan) und P22TSP (grau).

gilt für alle Ansätze, bei denen P22TSP zwei Zellpopulationen zeigt, dass für sie 9NATSP als ein effektiverer Bindungspartner identifiziert wurde (Tab. 3.3). Eine mögliche Erklärung wäre, dass P22TSP eine restriktivere Spezifität gegenüber einer O-Ag-Modifikation aufweist. So würde 9NATSP je nach Ausmaß der Modifikation mehr oder weniger effektiv binden, was sich in einer gleichmäßigen Verschiebung

des Intensitätsmaximums äußern würde. P22TSP dagegen bindet sehr effektiv nur einen Teil der Zellpopulation und zeigt kaum Bindung an die restlichen Zellen. Eine Acetylierung der ABequose als eine potentielle Modifikation des O-Ags (O4,5 Serotyp) scheidet aus, da keine Korrelation zwischen Serotyp und FACS-Daten beobachtet wurde (Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: Bei FACS-Messungen mit P22TSP wurde tendenziell eine Aufspaltung in zwei klare Zellpopulationen (gebunden/ungebunden) beobachtet. Aufgelistet sind jeweils effektivere Binder, die bei ELITA/FACS-Messungen für den jeweiligen Stamm identifiziert wurden. Die dritte Spalte enthält Angaben zum TSP, für das im FACS zwei Zellpopulationen beobachtet wurden. In der letzten Spalte sind Angaben zum O-Ag erfasst (Serotypisierung).

<i>Salmonella</i> -Stamm	effektivere Bindung durch (ELITA/FACS-basiert)	zwei Populationen in FACS	O-Ag
Brancaster	9NATSP	P22TSP	4
Heidelberg 13-00308	9NATSP	P22TSP	4,5
Heidelberg 13-00586	P22TSP	–	4
Kalamu	9NATSP	P22TSP	4
Paratyphi B	9NATSP	P22TSP ¹	4
Typhimurium 06-01900	vergleichbar	–	4
Typhimurium 1225	P22TSP	9NATSP ²	4
Typhimurium DB7136	vergleichbar	–	4,5

1 starke Bindung, sehr schwach ausgeprägte Trennung der Zellpopulationen

2 sehr schwache Bindung, klar abgetrennte Zellpopulationen

Des Weiteren zeigen einige Datensätze einen diagonalen Verlauf (Anhang, Abb. A.2 und A.3). Die Tatsache, dass man dieses Verhalten in den FSC- und SSC-Kanälen beobachtet, spricht eher für Bildung größerer Zellaggregate. Diese würden einerseits für eine stärkere Lichtstreuung sorgen (diagonaler Datenverlauf bei FSC-gegen-SSC Auftragung) und andererseits ein höheres Fluoreszenzsignal pro Partikel aufweisen (diagonaler Verlauf bei der Auftragung gegen Fluoreszenzkanäle, z. B. FITC-A). Die Bildung größerer Zellaggregate könnte unter anderem auf eine Quervernetzung durch TSP und/oder Streptactin-Konjugat zurückgeführt werden. Dafür spricht, dass sowohl TSP als auch Streptactin-Konjugat mehrere potentielle Bindungsstellen pro Molekül aufweisen. Um dies zu testen, wurden zusätzliche Messungen des *Salmonella* Paratyphi B-Stamms durchgeführt, bei denen TSP mit und ohne TwinStrep-tag eingesetzt wurden. Beim Einsatz von TSP ohne TwinStrep-tag ist keine Bindung des Streptactin-Chromeo-Konjugats möglich. Damit ist eine Streptactin-bedingte Zellaggregation/Quervernetzung ausgeschlossen. Tatsächlich wird in den Ansätzen ohne TwinStrep-tag deutlich weniger Aggregation beobachtet als in den korrelierenden Ansätzen mit TwinStrep-tag (Abb. 3.12 a). Das schließt die Assoziation mit TSPs als alleinige Ursache für Zellaggregation aus und impliziert den Einfluss von Streptactin. Gleichzeitig wurde beim Kontrollansatz mit *E. coli* (Abb. 3.12 b) und einigen *Salmonella*-Stämmen (siehe Anhang) eine Aggregation unabhängig von der

Anwesenheit von TSPs oder Streptactin beobachtet. Hier können zelleigene Proteine auf der bakteriellen Oberfläche (z. B. FimH) eine Autoaggregation auslösen (Schembri, Christiansen und Klemm, 2001).

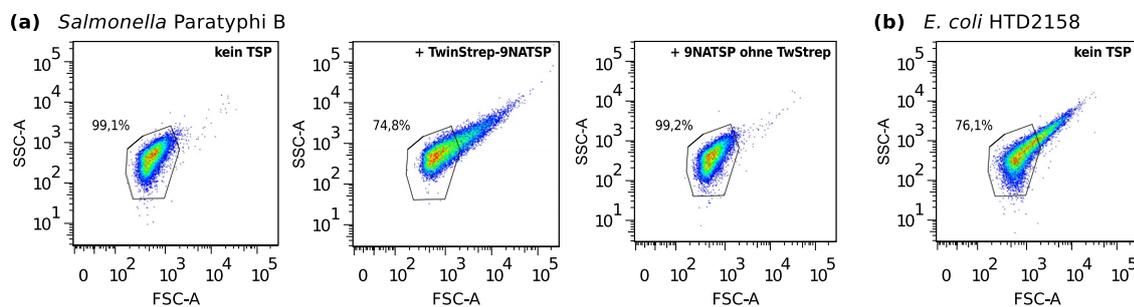


Abbildung 3.12: (a) Im FACS-Experiment wurde bei einigen Ansätzen ein diagonaler Verlauf bei Auftragung von direkter Streuung (FSC) und seitlicher Streuung (SSC) beobachtet. Da dies ein Hinweis auf erfolgte Zellaggregation ist, wurde der Einfluss des TwinStrep-tag/Streptactin-Systems auf die Zellaggregation getestet. Dazu wurde eine FACS-Messung mit einem N-terminal TwinStrep-tag-markierten 9NATSP und einem 9NATSP ohne TwinStrep-tag durchgeführt. (b) Der Stamm *E. coli* HTD2158 zeigt Autoaggregation in Abwesenheit von TSP.

3.2 Charakterisierung der O-Ag ausgewählter *Salmonella*-Stämme

3.2.1 Degradation von O-Ag durch P22TSP und 9NATSP

Die Bindung eines TSPs an einen Rezeptor ist ein initialer Schritt einer Phageninfektion. Neben der Erkennung geeigneter Rezeptoren auf der Wirtsoberfläche besitzen P22TSP und 9NATSP katalytische Aktivität. Beide TSPs hydrolysieren die O-glycosidische Bindung zwischen der Rhamnose und der Galactose im O-Ag und produzieren auf diese Weise Oligosaccharidfragmente aus 2RU als Hauptprodukt (Andres, Gohlke u. a., 2013; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Ausgehend von den Unterschieden, die in den Bindungstests zwischen verschiedenen *Salmonella*-Stämmen und zwischen beiden TSPs beobachtet wurden, wurde die katalytische Aktivität der TSPs gegenüber isoliertem PS untersucht. Dazu wurde das PS mit einem der beiden TSP inkubiert. Längere Oligosaccharidfragmente und TSP wurden ausgefällt, und die verbliebenen kürzeren Oligosaccharidprodukte wurden mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt.

Die Chromatogramme der Produkte für die *Salmonella*-Stämme Heidelberg 13-00586, Kalamu und Paratyphi B sind in der Abb. 3.13 dargestellt. Der Stamm *Salmonella* Heidelberg 13-00586 zeigte eine ähnliche Produktverteilung für beide TSPs. Das höchste Signal mit einer Retentionszeit von etwa 28,5 min kann aufgrund des Laufverhaltens der Standards (Abb. 3.13d) einem 2RU-Fragment zugeordnet werden. Beide TSPs produzierten demnach 2RU als Hauptprodukt. Die Intensität der 2RU-Peaks

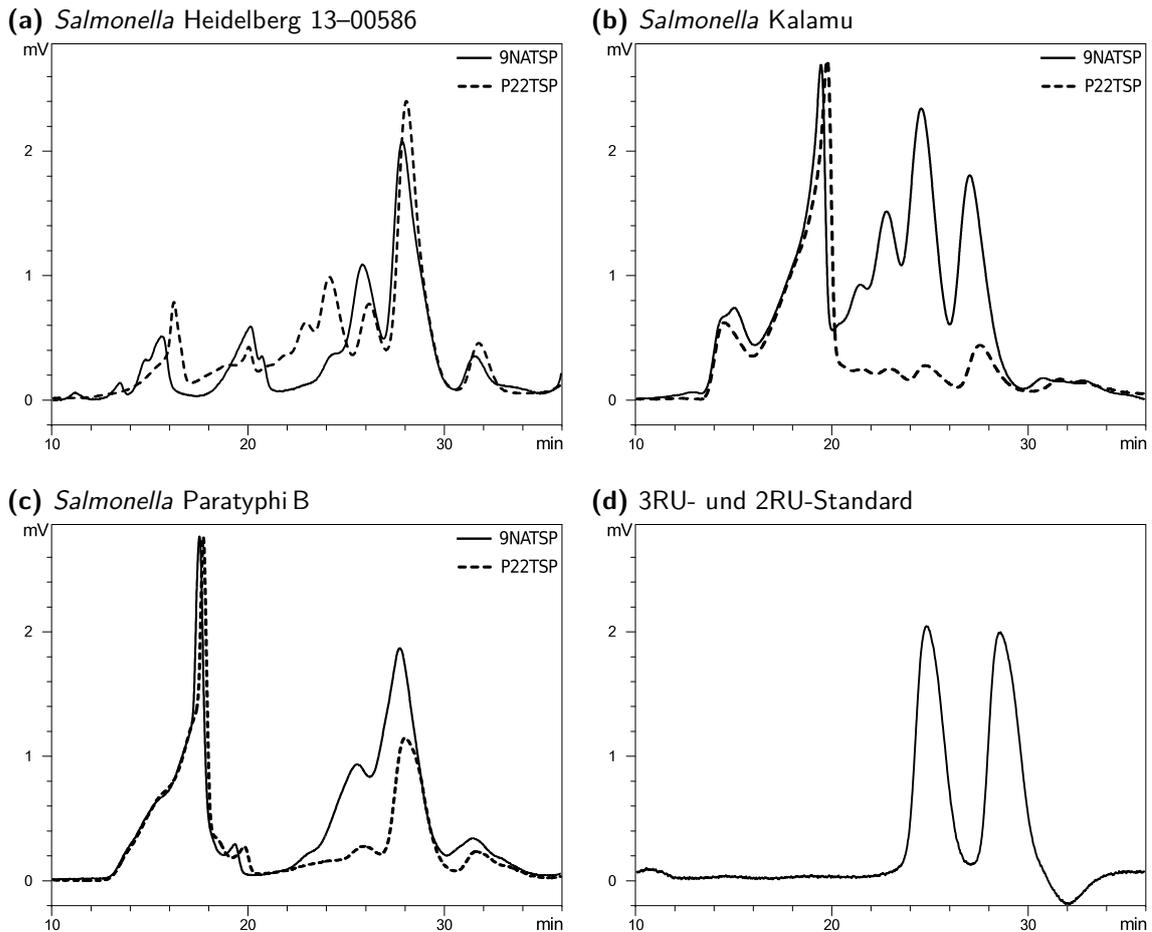


Abbildung 3.13: (a) bis (c) PS-Abbauprofile von 9NATSP (—) und P22TSP (- - -). Nach Inkubation von PS mit einem TSP und anschließender Fällung nicht verdauter PS-Moleküle wurden die entstandenen Oligosaccharidprodukte chromatographisch aufgetrennt. Die Detektion der Kohlenhydrate erfolgte refraktometrisch. (d) Chromatogramm eines 1:1-Gemisches der Standards 3RU und 2RU. Beide Standards entsprechen dem O4-Ag und wurden massenspektrometrisch verifiziert.

für die Ansätze mit 9NATSP und P22TSP ist annähernd gleich, mit einem minimalen Unterschied zugunsten von P22TSP. Dies korreliert mit den Ergebnissen der FACS-Bindungsmessung, die P22TSP als einen minimal besseren Binder charakterisierten. Gleichzeitig kann keine Aussage bezüglich der Signifikanz des beobachteten Unterschieds von etwa 10% getroffen werden, da keine Normierung vorgenommen wurde. Neben dem Hauptprodukt produzierten die beiden TSPs längere Oligosaccharidfragmente. Dabei werden bei der Inkubation mit dem P22TSP detektierbare Mengen von 4RU und 5RU gebildet, mit den Retentionszeiten um jeweils ca. 24 ml und 23 ml.

Die Produktverteilung nach dem Verdau von PS aus *Salmonella* Kalamu zeigte deutliche Unterschiede zu *Salmonella* Heidelberg 13-00586. Das höchste Signal sowohl beim 9NATSP- als auch beim P22TSP-Ansatz wurde zwischen 17 und 20 min detektiert. Aufgrund der kurzen Retentionszeit wurde es den Oligosaccharidfragmenten mit mehr als 7 RU zugeordnet. Da die Auflösung der eingesetzten Säule in

diesem Bereich begrenzt ist, ist keine genaue Aussage bezüglich der Kettenlängen enthaltener PS-Fragmente möglich. Das Auftreten dieser Signale kann ein Ergebnis der unvollständigen Umsetzung des PS sein. In diesem Fall können die Signale auf eine langsamere Kinetik der PS-Spaltung hinweisen. Alternativ kann es sich um Fragmente handeln, die aufgrund von Modifikationen kein Substrat für das jeweilige TSP darstellen. Da es sich dabei vermutlich um nicht hydrolysierte PS-Fragmente handelt, die in allen Präparationen vorkamen, eignen sich diese als interne Standards. Beide Stämme zeigten vergleichbare Intensitäten dieser PS-Fragmente für die Ansätze mit 9NATSP und P22TSP. Dies erlaubt einen direkten Vergleich der Intensitäten für kürzere Oligosaccharidprodukte (2RU, 3RU) zwischen den Ansätzen mit 9NATSP und P22TSP. Der Verdau mit 9NATSP lieferte ähnliche Mengen von 2RU- und 3RU-Fragmenten und darüber hinaus verhältnismäßig hohe Mengen längerer Fragmente mit 4 RU und 5 RU. Auch an dieser Stelle deuten die längeren Oligosaccharidprodukte auf eine unvollständige Umsetzung des PS hin. Obwohl beide Stämme zur Serogruppe O4 gehören, soll es zwischen den O-Ag-Strukturen beider Stämme Unterschiede geben, die in der beobachteten Verschiebung der Produktverteilung resultieren. Die Produktverteilungen deuten darauf hin, dass das O-Ag des Stamms Kalamu ein schlechteres Substrat für 9NATSP darstellt, als das O-Ag aus dem Stamm Heidelberg 13-00586. Ähnliches ging aus den Ergebnissen der FACS-Messung hervor, während ELITA-Ergebnisse beide Stämme als gleich gute Binder für 9NATSP charakterisierten.

Die Verschiebung der Produktverteilung zugunsten der Oligosaccharidfragmente mit 3 RU und 4 RU kann auf eine nicht-stöchiometrische Modifikation zurückgehen. Ist ein Abschnitt aus 2 RU modifiziert und daher unzugänglich für ein TSP, erfolgt die Spaltung an der nächsten Rhamnose, was in einem verlängerten Oligosaccharidprodukt resultiert. Gleichzeitig könnten sich die strukturellen Unterschiede auf die Umsatzgeschwindigkeit bzw. Kinetik der PS-Spaltung auswirken. In diesem Fall wäre bei längeren Inkubationszeiten für den Stamm *Salmonella* Kalamu die gleiche Produktverteilung zu erwarten wie für den Stamm *Salmonella* Heidelberg 13-00586. Die Produktprofile in der Abb. 3.13 resultierten aus den Experimenten mit ca. 18 h Inkubationszeit, so dass man von einem annähernd vollständigen Umsatz ausgehen kann.

Beim Vergleich der beiden TSPs in Bezug auf das Kalamu O-Ag, lieferte P22TSP deutlich weniger Produkte aller Längen als 9NATSP. Das gleiche Verhalten wurde in Bezug auf die Bindung beider TSPs bei ELITA- und FACS-Messungen beobachtet, die 9NATSP als einen deutlich besseren Binder für den Stamm *Salmonella* Kalamu identifizierten als P22TSP.

Das Produktprofil des Stamms *Salmonella* Paratyphi B zeigte ähnlich wie der Stamm *Salmonella* Kalamu ein Signal für Oligosaccharidfragmente mit mehr als

7 RU. Das Signal mit der Retentionszeit zwischen 14 und 18 min hat die gleiche Intensität bei den Ansätzen mit P22TSP und 9NATSP. Es kann analog zu den Kalamu-Ansätzen als interner Standard betrachtet werden, was den Vergleich der Intensitäten restlicher Signale zwischen 9NATSP und P22TSP erlaubt. Beide TSPs lieferten 2RU als Hauptprodukt sowie geringere Anteile von 3RU. Das Verhältnis der Intensitäten der 2RU-Peaks deutet darauf hin, dass 9NATSP das O-Ag aus *Salmonella* Paratyphi B effizienter umsetzen kann als P22TSP. Dies korreliert wiederum mit beiden Bindungstests, bei denen 9NATSP eine deutlich bessere Bindung an die Bakterien dieses Stamms zeigte als P22TSP. Auffällig ist bei diesem Ansatz eine schlechtere Auflösung der kurzen Oligosaccharidfragmente, trotz vergleichbarer Intensitäten der Signale bei allen getesteten Stämmen. Die schlechtere Trennung von 2RU und 3RU bei Paratyphi B und die Form der Signale kann ein Hinweis darauf sein, dass die Peaks jeweils mehrere Oligosaccharidfragmente unterschiedlicher Zusammensetzung enthalten könnten. Der Größenunterschied dieser Fragmente würde unterhalb der Auflösungsgrenze des eingesetzten Verfahrens liegen. Ausgehend von der Trennung von 2RU und 3RU, die sich durch vier Kohlenhydrate unterscheiden, ist ein Unterschied von einem bis zwei Kohlenhydraten möglich.

Die Ergebnisse des PS-Verdaus für die *Salmonella* Stämme Heidelberg 13-00586, Kalamu und Paratyphi B korrelieren weitgehend mit den Daten der Bindungstests. Wurde für eine Kombination aus einem Stamm und einem TSP eine bessere Bindung bei den ETITA- und FACS-Experimenten beobachtet, resultierte der Verdau in einem höheren Anteil kürzerer Produkte, vor allem 2RU. Ferner legen die Ergebnisse nahe, dass die beobachteten Unterschiede in der Bindung und Spaltung von PS auf strukturelle Unterschiede der PS bzw. der O-Ag zurückgehen, die nicht allein durch die Serotypisierung erklärt werden. Für detaillierte Aussagen reicht die Auflösung der angewandten Methode nicht aus, daher wurden alternative analytische Verfahren wie die Kapillargelelektrophorese und die MALDI-MS eingesetzt.

3.2.2 Einfluss der O-Acetylierung von O-Ag auf Degradation durch TSP

Die Verdauprofile des PS der *Salmonella*-Stämme Heidelberg 13-00586, Kalamu und Paratyphi B zeigten unterschiedliches Verhalten von P22TSP und 9NATSP. Dieses kann unter anderem auf nicht-stöchiometrische Modifikationen des O-Ags zurückgehen. Eine solche Modifikation ist die O-Acetylierung der Abequose, die für die O5-Spezifität verantwortlich ist. Der Ausmaß der Acetylierung variiert von Stamm zu Stamm und hängt unter anderem von Wachstumsbedingungen ab (Zandomenighi u. a., 2012). Die O-Acetylierung der Abequose kann chemisch entfernt werden, was serologisch aus einem O4,5-Ag ein O4-Ag macht. Daher wurde das Verhalten von P22TSP in Bezug auf das PS aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 in seiner ursprünglichen Form O4,5 und nach der Deacetylierung des isolierten PS untersucht.

Die Acetylierung wurde mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisierung Massenspektrometrie (MALDI-MS) kontrolliert. Mit dieser Methode ist es bedingt möglich, die Zusammensetzung der Oligosaccharide inklusive nicht-stöchiometrischer Modifikationen zu bestimmen. Die Aussagen bezüglich der Verknüpfungen einzelner Monosaccharide sowie genaue Unterscheidung verschiedener Hexosen ist dagegen nicht möglich. Daher erfolgte die Zuordnung einzelner Peaks über die kalkulierten Massen der Oligosaccharidfragmente, die für die jeweilige Serogruppe in der Literatur beschrieben sind (<http://csdb.glycoscience.ru>, Stand: 14.09.2014; Toukach u. a., 2007). Darüber hinaus kann relative Intensität einzelner Peaks semi-quantitative Aussagen liefern (Szájli, Fehér und Medzihradzsky, 2008; El-Hawiet, Kitova und Klassen, 2012), die u. a. das Ausmaß einzelner Modifikationen wiedergeben. Die Intensitäten werden unter der Annahme ausgewertet, dass die nicht-stöchiometrischen Modifikationen des O-Ags das Ionisierungsverhalten der Oligosaccharidfragmente nicht beeinflussen. Längere PS-Ketten sind aufgrund ihres mangelhaften Ionisierungsverhaltens für MALDI-MS ungeeignet. Aus diesem Grund wurde die Deacetylierung des PS aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 über enzymatisch generierte Oligosaccharidfragmente kontrolliert (Abb. 3.14a). Dafür wurde das isolierte, deacetylierte PS mit P22TSP verdaut. Die entstandenen Oligosaccharidfragmente mit einer Länge von etwa 2RU wurden aufgereinigt und mittels MALDI-MS charakterisiert. Zum Vergleich wurde nicht deacetyliertes PS aus dem gleichen Stamm analog behandelt und vermessen.

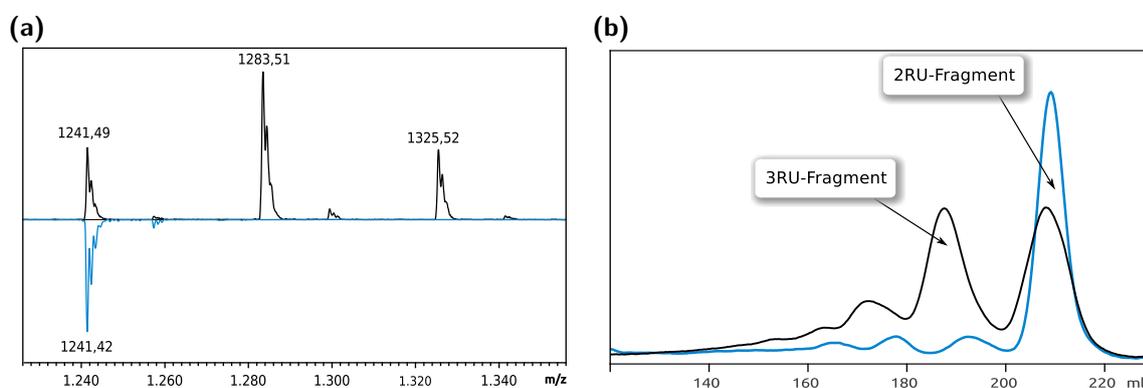


Abbildung 3.14: (a) MALDI-Massenspektren der 2RU-Fractionen nach dem Verdau des PS durch P22TSP. Das verdaute PS zeigte die O4,5-Serospezifität, die auf eine O-Acetylierung der ABequose zurückzuführen ist (schwarz). Ein Teil der gleichen PS-Präparation wurde vor dem Verdau chemisch de-O-acetyliert (blau). (b) Effekt der O-Acetylierung der ABequose auf die Produktverteilung von P22TSP. Das PS aus einem O4,5-Stamm wurde mit P22TSP verdaut (schwarz), und die entstandenen Oligosaccharidfragmente wurden mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Alternativ wurde das PS vor dem P22TSP-Verdau chemisch de-O-acetyliert (blau).

Das Massenspektrum des Hauptprodukts nach dem Verdau des nicht deacetylierten PS aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 mit P22TSP zeigt Signale für drei Oligosaccharidfragmente mit einer Massendifferenz von jeweils 42,01 Da. Aufgrund der geringen Massendifferenz wurden die drei Oligosaccharidfragmente durch die ein-

gesetzte Größenausschlusschromatographie nicht aufgetrennt. Die detektierte Masse von 1241,49 Da korreliert mit einer berechneten Masse von 2RU plus der Masse eines Natriumions (Na^+) 1241,45 Da. Die Bildung von Na- und Kaliumaddukten entspricht dem Ionisierungsverhalten neutraler Kohlenhydrate bei MALDI-MS (Harvey, 2009). Die beiden zusätzlichen Massen 1283,51 Da und 1325,52 Da entsprechen einem einfach acetylierten 2RU-Fragment (eine der beiden RU acetyliert) und einem doppelt acetylierten 2RU-Fragment (beide RU mit jeweils einer Acetylgruppe). Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Serotypisierung des Stamms als O4,5. Das MALDI-Massenspektrum des Produkts aus dem Verdau des de-O-acetylierten PS zeigt keine Peaks für die acetylierten Oligosaccharidfragmente. Die Produktprofile von dem unbehandeltem PS (O4,5) und dem chemisch de-O-acetyliertem Polysaccharid (O4) aus *Typhimurium* DB7136 zeigten unterschiedliche Verteilungen zwischen Fragmenten mit 2 RU, 3 RU und 4 RU (Abb. 3.14b). Die De-O-Acetylierung resultiert in einer Verschiebung zugunsten kürzerer Oligosaccharidfragmente: es wird hauptsächlich 2RU gebildet, was auf eine effektivere Umsetzung des O-Ags hindeutet. Da das deacetylierte O-Ag dem des Serotyps O4 entspricht, stellt das O4-Antigen ein besseres Substrat für P22TSP als das O4,5-Antigen dar. Die Struktur des Komplexes aus P22TSP und einem gebundenen 2RU-Fragment zeigt mehrere Interaktionen mit Dideoxyhexosen, im Fall des O4-Antigens mit der Abequose. Eine O-Acetylierung der Abequose, wie sie beim O4,5-Antigen vorliegt, würde mit der Bindung interferieren, was sich negativ auf die hydrolytische Aktivität von P22TSP auswirken könnte.

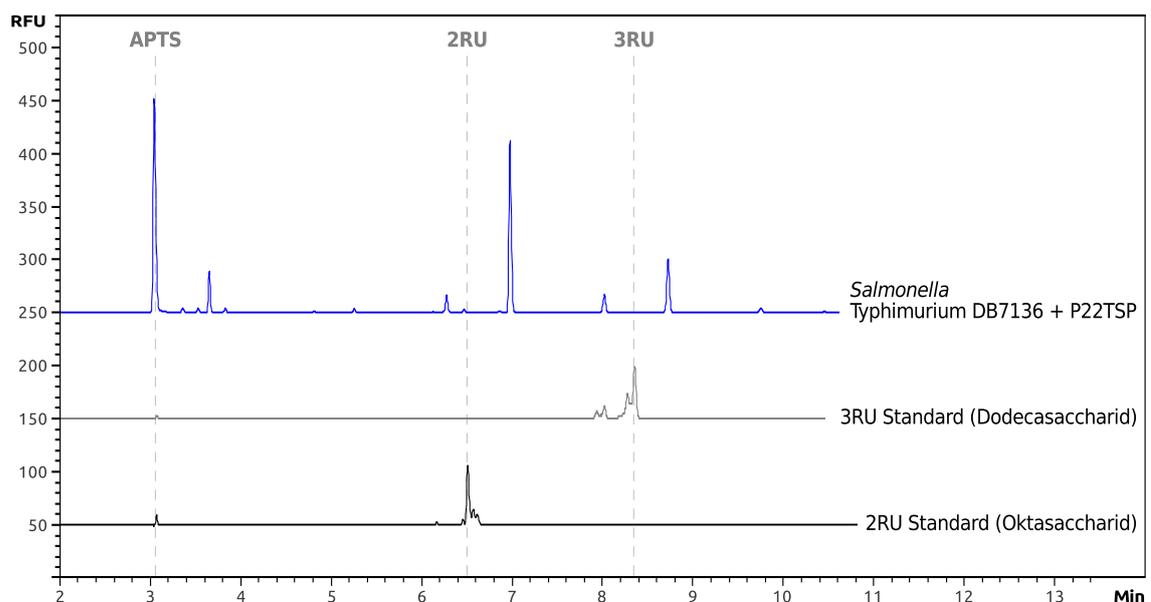


Abbildung 3.15: Elektropherogramme der Produkte nach einem LPS-Verdau mit P22TSP. Das isolierte LPS des Stamms *Salmonella* Typhimurium DB7136 wurde mit einer katalytisch aktiven Form von P22TSP inkubiert und die entstandenen Oligosaccharidfragmente mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt (blau). 2RU-Standard (schwarz) und 3RU-Standard (grau) aus dem PS der Serogruppe O4 markieren die Laufpositionen beider Oligosaccharidfragmente.

Die für die Analytik der Produktprofile eingesetzte analytische (vgl. Abb. 3.13, S. 55) und präparative Abb. 3.14b Größenausschlusschromatographie erlaubt keine Trennung der acetylierten und nicht acetylierten Oligosaccharidfragmente. Daher wurde für die Erfassung weiterer Produktprofile Kapillargelelektrophorese (CE) eingesetzt. Diese Methode bietet eine höhere Auflösung gegenüber der Größenausschlusschromatographie sowie einen höheren Durchsatz, wodurch mehr Stämme getestet werden konnten. Diesmal wurde die katalytische Aktivität gegenüber isoliertem LPS untersucht, obwohl der Einsatz des PS auch möglich wäre. Die aufgereinigten LPS wurden mit der katalytisch aktiven Form von P22TSP inkubiert. Analog zu den Ansätzen mit PS wurden lange LPS-Fragmente sowie die Fragmente bestehend aus Lipid A und Kernsaccharid ausgefällt. Die entstandenen Oligosaccharidprodukte wurden mit einem negativ geladenen Fluoreszenzfarbstoff derivatisiert (Chen, Dobashi und Evangelista, 1998). Dieser stellt die nötige negative Ladung zur Verfügung und erlaubt gleichzeitig Detektion der Oligosaccharidfragmente mittels Fluoreszenz. Anschließend wurden die markierten Oligosaccharidfragmente mittels CE untersucht (Abb. 3.15). Für die Zuordnung der Signale wurden zwei Oligosaccharidfragmente mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dabei handelt es sich um zuvor präparierte und doppelt chromatographierte 2RU- und 3RU-Fragmente aus dem de-O-acetyliertem O4,5-Ag. Die Identität der Fragmente wurde massenspektrometrisch verifiziert.

Der Verdau von LPS aus dem laborinternen Referenzstamm *Salmonella* Typhimurium DB7136 mit P22TSP zeigte zwei Hauptprodukte. Die beiden Signale wurden mit einer Verzögerung von etwa einer Minute detektiert, verglichen mit den Standards für 2RU und 3RU. Der Stamm Typhimurium DB7136 gehört zum Serotyp O4,5 und unterscheidet sich vom Serotyp O4 der Standards durch eine Acetylierung der Abequose. Daher kann man annehmen, dass die detektierte Verzögerung auf die Acetylierung der Oligosaccharidfragmente zurückzuführen ist. Der zweite Stamm vom gleichen Serotyp O4,5 ist *Salmonella* Heidelberg 13-00308. Auch dieser zeigt eine Verschiebung des Signals für das Oligosaccharid mit 2RU, obwohl ein geringerer Unterschied zum Typhimurium-Stamm DB7136 besteht (vgl. Abb. 3.16, S. 62). Vergleicht man das Produktprofil des Stamms Typhimurium DB7136 mit denen der restlichen Stämme in der Abb. 3.16, fällt auf, dass nur beim Stamm DB7136 verhältnismäßig viel vom längeren Oligosaccharidfragment mit 3RU produziert wurde. Damit kann die vermehrte Produktion längerer Fragmente auf die Acetylierung des O-Ags zurückgeführt werden.

3.2.3 Einfluss der Glucosylierung von O-Ag auf Degradation durch TSP

Ein Auswahl der *Salmonella*-Stämme der Serogruppe O4(,5) aus der RKI-Sammlung wurde mit beiden TSPs verdaut, um katalytische Aktivität mit den Bindungsdaten

aus dem ELITA- und dem FACS-Experiment zu vergleichen. Die Produktprofile sind in der Abb. 3.16 für 9NATSP und P22TSP zusammengefasst. Einige Ansätze wurden analog zum Stamm *Salmonella* Typhimurium DB7136 analysiert: das isolierte PS wurde verdaut und die Oligosaccharidprodukte mit 2 RU, falls diese vorhanden waren, mittels MALDI-MS charakterisiert. Auf diese Weise sollten Korrelationen zwischen der Zusammensetzung des O-Ag bzw. der Oligosaccharidfragmente und der Produktverteilung der beiden TSPs untersucht werden.

Der Stamm *Salmonella* Heidelberg 13-00308 zeigte keine Produkte nach der Inkubation mit P22TSP, während Inkubation mit 9NATSP ein Signal lieferte, das dem Oligosaccharidfragment mit 2RU zuzuordnen ist. Ein ähnliches Verhalten beider TSPs wurde im ELITA-Experiment beobachtet, bei dem das P22TSP eine sehr schwache Bindung an der Nachweisgrenze aufwies. Auch im Fall von *Salmonella* Brancaster verhielt sich P22TSP ähnlich: Es zeigte eine deutlich schwächere Bindung als 9NATSP bei ELITA- und FACS-Messung (vgl. Abb. 3.6, S. 43 und Abb. 3.10, S. 51). Dies korreliert mit den detektierten Produktmengen nach der Inkubation von Brancaster-LPS mit beiden TSPs (Abb. 3.16). Darüber hinaus wurde für das Signal mit dem Hauptprodukt des Verdaus eine Verschiebung im Laufverhalten gegenüber dem 2RU-Standard beobachtet, ähnlich wie es bei O4,5-Stämmen Heidelberg 13-00308 und Typhimurium DB7136 der Fall war (Abb. 3.17). Gleichzeitig wurde der Stamm *Salmonella* Brancaster als O4 serotypisiert, was eine Acetylierung der ABequose ausschließt. Infrage kämen eine Acetylierung an einer Position des O-Ags, die durch die eingesetzten Antikörper nicht erfasst wird, oder eine andere Modifikation des O4-Antigens. Das Massenspektrum des Hauptprodukts nach dem Verdau von PS aus *Salmonella* Brancaster mit 9NATSP zeigt neben dem Signal für ein 2RU-Fragment ein weiteres prominentes Signal (Abb. 3.18a). Das zweite Signal bei 1565,53 Da weicht um 0,03 Da von der kalkulierten Masse für das 2RU-Fragment mit zwei zusätzlichen Hexosen ab. In der Literatur finden sich zwei Strukturen, die ein Fragment mit der detektierten Masse produzieren könnten: in beiden Fällen handelt es sich um eine Glucosylierung an den Galactose-Positionen C4 oder C6. Diese Glucosylierungen werden serologisch entsprechend als Serotyp O12₂ und O1 (auch O12₁) bezeichnet. Das Signal bei 1565,53 Da geht demnach auf die 2RU-Fragmente, mit je einer Glucose pro RU. Eine präzise Aussage über die Lokalisation der Glucosylierung ist aus den verfügbaren Daten nicht möglich, dies müsste in MS/MS-Experimenten aufgeklärt werden. Des Weiteren geht aus dem Vergleich der Verdauprofile für P22TSP und 9NATSP hervor, dass 9NATSP eine Glucosylierung des O-Ags, wie sie bei *Salmonella* Brancaster vorliegt, besser tolerieren kann als P22TSP. Die beobachteten Unterschiede in der Bindung durch die beiden TSPs sowie die nahezu vollständige Glucosylierung des O-Ags machen den Stamm *Salmonella* Brancaster zu einem interessanten Kandidaten für detaillierte Interaktionsstudien.

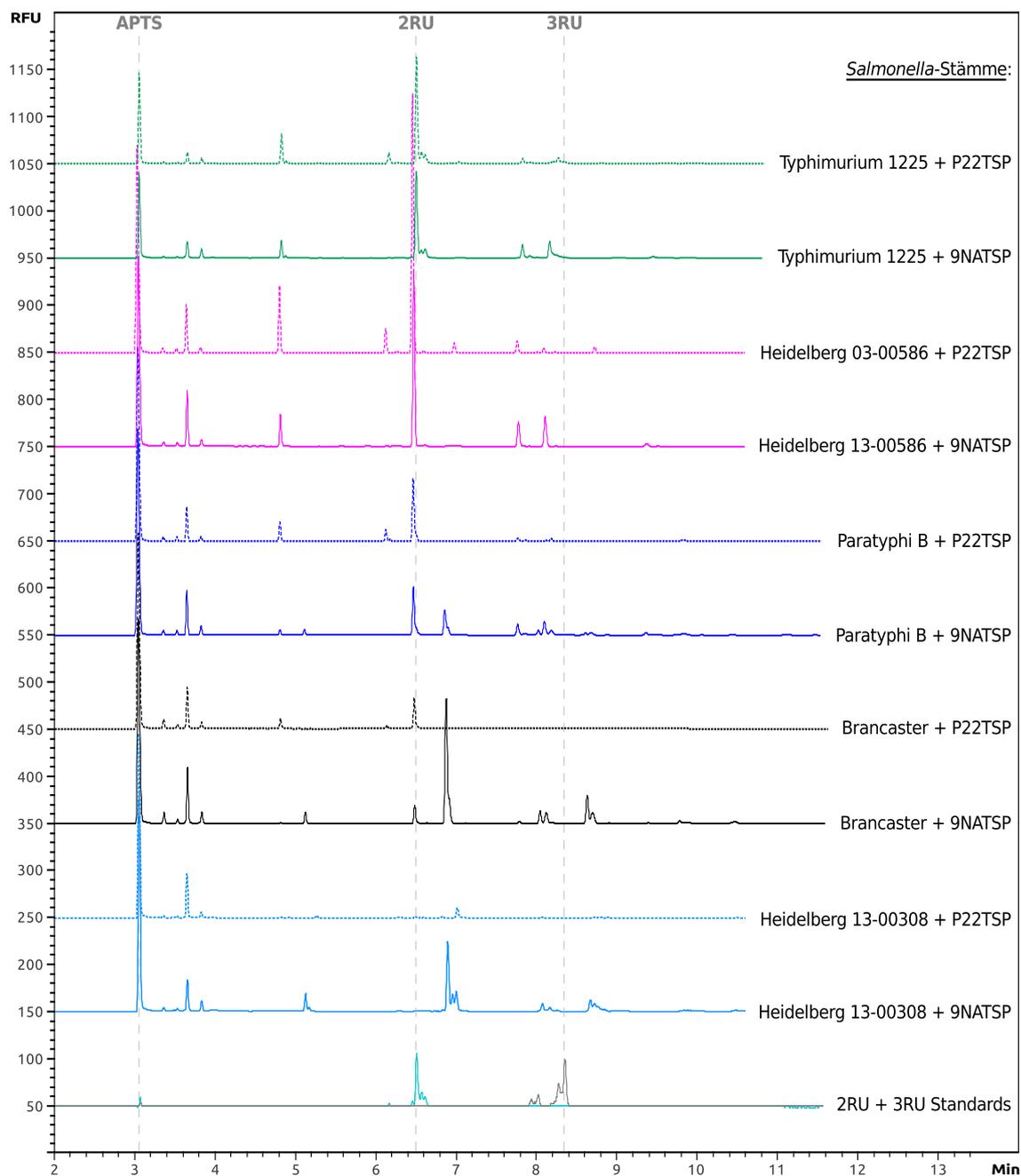


Abbildung 3.16: Elektropherogramme der Produkte nach einem LPS-Verdau mit P22TSP und 9NATSP. Das isolierte LPS aus ausgewählten *Salmonella*-Stämmen wurde mit einer katalytisch aktiven Form von P22TSP oder 9NATSP inkubiert und die entstandenen Oligosaccharidfragmente mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die 2RU- und 3RU-Standards markieren die Laufpositionen jeweiliger Oligosaccharidfragmente (überlagerte Elektropherogramme, cyan und grau). Bei den restlichen Proben sind Ansätze mit 9NATSP als durchgehende Linien dargestellt, die Ansätze mit P22TSP als gestrichelte Linien.

Beim Stamm *Salmonella* Heidelberg 13-00586 wurde im ELITA-Test eine Bindung von beiden TSPs beobachtet, mit einer ausgeprägten Präferenz für P22TSP. Die Signalintensitäten der Hauptprodukte nach dem Verdau mit 9NATSP und P22TSP zeigten ein ähnliches Verhältnis: Bei der gleichen Ausgangsmenge von LPS lieferte der Verdau mit P22TSP höhere Mengen an 2RU (Abb. 3.16). Das Massenspektrum des

Hauptprodukts nach einem TSP-Verdau enthält ein einziges Signal bei 1241,45 Da (2RU) und zeigt, dass das O-Ag des Stamms höchstwahrscheinlich nicht modifiziert ist. Da diesmal keine zusätzliche Variabilität der O-Ag-Struktur durch nicht stöchiometrische Modifikationen vorlag, qualifizieren die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Bindung und der katalytischen Aktivität das P22TSP als ein effektiveres Enzym bzw. einen effektiveren Binder für die Grundstruktur des O4-Ags (Andres, Roske u. a., 2012).

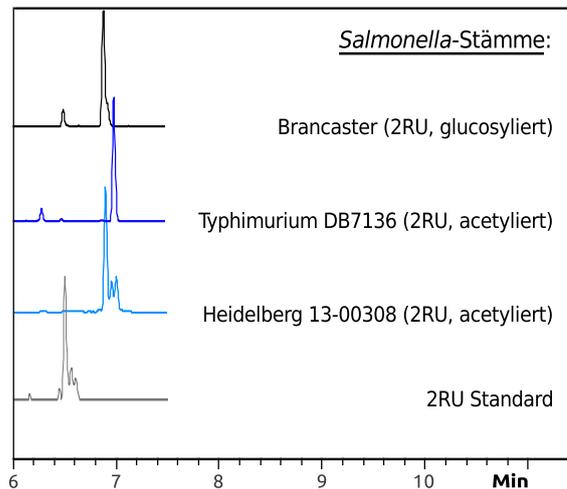


Abbildung 3.17: Ausschnitt der Elektropherogramme der Verdauungsprodukte von 9NATSP aus der Abb. 3.16. Dargestellt wurde der Bereich mit den Produkten, bestehend aus 2 RU. Die Angaben über eine Glucosylierung oder eine Acetylierung des jeweiligen O-Ags beziehen sich auf die massenspektrometrischen Daten. Die Intensitäten der Peaks wurden auf die Intensität des 2RU-Standards normiert.

Die Produktverteilungen der *Salmonella*-Stämme Paratyphi B und Typhimurium 13-01225 zeigten nicht die ausgeprägten Unterschiede zwischen 9NATSP und P22TSP, die zuvor in den Bindungsexperimenten beobachtet wurden. LPS aus *Salmonella* Paratyphi B lieferte jeweils vergleichbare Elektropherogramme für P22TSP und 9NATSP, während die FACS-Daten und besonders die ELITA-Daten auf eine effektivere Bindung von 9NATSP hindeuteten. Möglicherweise wurde eine weniger effiziente Bindung des Substrats durch eine höhere katalytische Aktivität von P22TSP in Bezug auf Paratyphi B-LPS kompensiert. Das Massenspektrum der Verdauungsprodukte aus Paratyphi B-LPS zeigt neben der Masse des 2RU-Fragments weitere Signale. Ein Oligosaccharidfragment mit der Masse von 1565,52 Da wurde bereits bei *Salmonella* Brancaster beobachtet und einer glucosylierten Form von 2RU zugeordnet. Während bei *Salmonella* Brancaster ca. 90% der Oligosaccharidfragmente glucosyliert vorlagen, fiel der Anteil des glucosylierten PS bei *Salmonella* Paratyphi B deutlich geringer aus. Die Verteilung der Signalintensitäten der glucosylierten und nicht-glucosylierten Oligosaccharidfragmente stimmt im CE-Elektropherogramm und im Massenspektrum überein. Ein direkter Vergleich der CE-Verdauprofile für 9NATSP und P22TSP zeigt, dass 9NATSP, nicht aber P22TSP, Signale für das glucosylierte 2RU-Fragment lieferte. Das bedeutet, 9NATSP war in der Lage, neben dem O4 O-Ag auch eine glucosylierte Form dieses O-Ags (O_{4,12}₁ oder 12₂) umzusetzen. Gleichzeitig ist anzumerken, dass der Stamm Paratyphi B laut der Serotypisierung weder eine O₁₂₁- noch eine 12₂ Serospezifität zeigte. Dagegen lieferte P22TSP keine

glucosylierten Fragmente. Beides deutet auf den Befund hin, der bereits beim Stamm *Salmonella* Brancaster beobachtet wurde: Während 9NATSP die Glucosylierung des O-Ags tolerieren konnte, hydrolysierte P22TSP bevorzugt die nicht-glucosylierten PS-Abschnitte.

Interessanterweise wurden bei beiden Stämmen, *Salmonella* Brancaster und Paratyphi B, entweder die vollständig glucosylierten Fragmente mit einem Glucose-Rest pro RU oder die vollständig nicht glucosylierten Fragmente detektiert. Ein 2RU-Fragment mit nur einer glucosylierten RU wurde dagegen bei MALDI-MS nicht beobachtet. Möglicherweise läuft die Glucosylierung stöchiometrisch ab und die beiden Populationen von PS, die glucosylierte und die nicht-glucosylierte, sind auf zwei verschiedene Phasen innerhalb der gleichen Zellkultur zurückzuführen. Zumindest für den Stamm *Salmonella* Brancaster wurde im FACS-Experiment eine ausgeprägte Aufspaltung der Zellpopulation beobachtet, die ebenfalls auf zwei Subpopulationen bzw. zwei Phasen hindeutet. Gleichzeitig muss man beachten, dass die für MALDI-MS eingesetzten Oligosaccharidfragmente durch die katalytische Aktivität der beiden TSPs entstanden sind. Das bedeutet, dass die beobachteten Oligosaccharidfragmente nicht nur die Zusammensetzung des PS repräsentieren, sondern auch die Präferenzen des jeweiligen TSPs. Das bedeutet, wenn 9NATSP bevorzugt die vollständig glucosylierten Fragmente umsetzen würde, würden keine teilweise glucosylierten Produkte gebildet.

3.2.4 Die Zusammensetzung der O-Ag Fragmente wird durch die Serotypisierung nicht vollständig repräsentiert

Die Daten der MALDI-MS der *Salmonella*-Stämme lassen Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des O-Ags bzw. seiner Teile zu. Neben den bereits im vorigen Abschnitt erwähnten MS-Spektren der Stämme *Salmonella* Brancaster, Heidelberg 13-00568, Paratyphi B und Typhimurium DB7136 wurde ein MS-Spektrum für Oligosaccharidfragmente des Stamms *Salmonella* Kalamu aufgenommen (Abb. 3.18c). Die Zusammensetzung des O-Ags, die sich aus dem Spektrum ableiten ließ, ähnelt stark der Zusammensetzung des Stamms *Salmonella* Brancaster. Das 2RU-Fragment lag überwiegend in der glucosylierten Form vor, da das Signal bei 1565,52 Da dominierte. Darüber hinaus wurden sowohl für die glucosylierten als auch für die nicht glucosylierten Formen Signale mit einer Massendifferenz von etwa 42,01 Da beobachtet, die auf eine zusätzliche Acetylierung der Fragmente hindeuten. Der Anteil der Acetylierung lag bei etwa 30 %, vorausgesetzt, die Acetylierung hat keinen signifikanten Einfluss auf das Ionisierungsverhalten der Oligosaccharidfragmente.

Insgesamt zeigten alle mittels MALDI-MS charakterisierten *Salmonella*-Stämme bis auf den Stamm *Salmonella* Heidelberg 13-00586 eine teilweise Acetylierung der O-Ag-Fragmente. Interessanterweise war der Stamm *Salmonella* Typhimurium DB7136

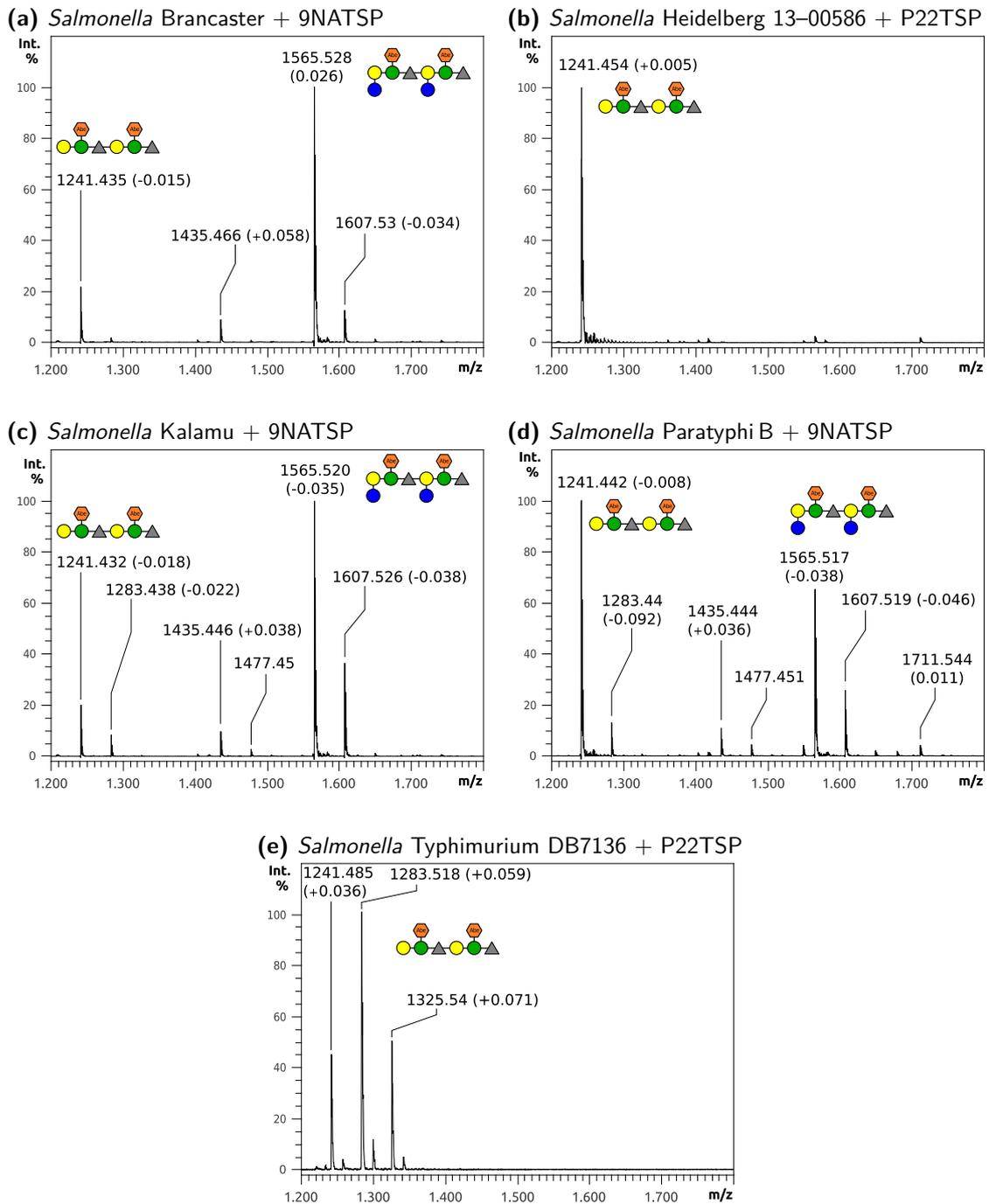


Abbildung 3.18: MALDI-Massenspektren des Hauptprodukts nach dem Verdau des isolierten PS mit einem TSP. Die Zahlen in Klammern zeigen die Differenz zwischen der detektierten und der berechneten Masse. Die Masse von 1241,45 Da entspricht der Masse des 2RU-Fragments plus Natrium. Die Signale bei 1283,46 Da wurden aufgrund der Massendifferenz von 42,01 Da einer einfach-acetylierten Form von 2RU zugeordnet. Die Masse von 1565,55 Da entspricht dem 2RU-Fragment mit zwei zusätzlichen Glucosen. Der korrespondierende Signal bei 1607,56 Da repräsentiert die einfach-acetylierte Form des glycosylierten 2RU-Fragments. Beim Verdau des PS aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 (f) wurden neben der 2RU-Masse von 1241,49 Da zwei weitere Signale mit einer Massendifferenz von 42,01 Da detektiert. Diese entsprechen der einfach- und doppelt-acetylierten Formen des 2RU-Fragments. Die Masse von 1435,45 Da korreliert mit der Masse von zwei vollständig glycosylierten RU ohne eine Didesoxyhexose. Eine Acetylierung des Oligosaccharidfragments hat die Masse von 1477,46 Da

der einzige Stamm, bei dem die Massenpeaks auf eine partielle und vollständige Acetylierung von 2RU hindeuten. Alle anderen Stämme zeigten nur Signale für einfach acetyliertes bzw. teilweise acetyliertes 2RU-Fragment. Bei der serologischen Typisierung dieser Stämme führte die massenspektrometrisch detektierte Acetylierung des O-Ags nicht zur O4,5-Spezifität (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Übersicht der mit MALDI-MS detektierten Modifikationen der O-Ag-Fragmente. Doppeltes Plus markiert die Ansätze mit der höchsten relativen Intensität der Signale der glucosylierten Form. Im Fall von Typhimurium DB7136 wurden Signale des vollständig acetylierten 2RU-Fragments beobachtet, so dass dieser Stamm, als stärker acetyliert, mit zwei Plus-Zeichen markiert ist. Die bei der MALDI-MS detektierte Acetylierung bei den Stämmen Brancaster, Kalamu und Paratyphi B wurde bei der Serotypisierung nicht als O4,5-Ag detektiert.

<i>Salmonella</i> -Stamm	Glucosylierung	Acetylierung	O-Ag (serologisch)
Brancaster	++	+	4
Heidelberg 13-00586	–	–	4
Kalamu	++	+	4
Paratyphi B	+	+	4
Typhimurium DB7136	–	++	4,5

Neben eindeutig zugeordneten Signalen traten bei Ansätzen Brancaster, Kalamu und Paratyphi B weitere Signale bei 1435,45 Da und teilweise bei 1477,45 Da auf. Die Masse von 1435,45 Da entspricht auf $\pm 0,06$ Da der kalkulierten Masse von zwei glucosylierten repetitiven Einheiten, bei denen eine Dideoxyhexose bzw. eine ABequose im Fall von einem O4-Ag fehlt. Die α -1–3 glycosidische Bindung zwischen Dideoxyhexosen und Mannose ist relativ labil, so dass eine Abspaltung durch eine hohe Laserintensität beim Ionisieren durchaus möglich wäre (Zaia, 2010).

Eine Übersicht der Ergebnisse in der Tabelle 3.4 listet vier *Salmonella*-Stämme der Serogruppe O4 auf. Drei davon zeigen Glucosylierung und Acetylierung in unterschiedlichem Ausmaß. Trotz der stark ausgeprägten Glucosylierung des O-PS, wurden diese Stämme ursprünglich nicht als O12₁ oder O12₂ charakterisiert. Angesichts der ausgeprägten Glucosylierung bei den Stämmen Brancaster und Kalamu, kann eine fehlende O12₁- oder O12₂-Spezifität nicht durch eine zu schwache Agglutinierung bei der Serotypisierung erklärt werden. Eine mögliche Erklärung ist eine spätere Infektion mit einem serokonvertierenden Bakteriophagen oder eine Mutation, die zur Aktivierung beteiligter Gene führte.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung der *Salmonella*-Stämme mit bindenden O-Ag-Varianten

4.1.1 Technische Aspekte des ELITA-Bindungstests

Der Hintergrund der vorliegenden Arbeit liegt thematisch auf Interaktion komplexer Kohlenhydrate mit Proteinen. Für die detaillierte biophysikalische Charakterisierung der Interaktionen sind Binderpaare aus Protein und Kohlenhydrat nötig, die Kriterien wie chemische Stabilität, Verfügbarkeit und eine ausreichende Affinität der Bindung erfüllen. Ein Interaktionssystem mit entsprechenden Eigenschaften besteht aus bakteriellen O-Ag und viralen Adhäsionsproteinen bzw. Tailspikes (TSP). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden etabliert, um Bakterienstämme zu identifizieren, deren O-Ag durch eingesetzte TSP-Sonden gebunden wird.

Eine der etablierten Methoden, ELITA, basiert technisch auf ELISA mit viralen TSPs anstelle von Antikörpern. Der Ablauf setzt sich aus drei Schritten zusammen. Die Bakterienkulturen werden bis zu einer empirisch ermittelten Dichte angezogen, inaktiviert und auf einer Mikrotiterplatte unspezifisch adsorbiert. Anschließend folgt die Inkubation mit einer TSP-Sonde, gefolgt von den Waschschritten, um die unspezifisch gebundene TSP-Sonde zu entfernen. Die beiden eingesetzten TSPs stammen aus den Bakteriophagen 9NA und P22. Beide Proteine enthalten eine Mutation in der Bindungsstelle bzw. katalytisch aktiven Tasche und besitzen anders als die Wildtyp-TSPs keine hydrolytische Aktivität gegenüber O-Ag. Zusätzlich wurden beide TSPs um eine N-terminale TwinStrep-Markierungssequenz ergänzt, um das an die Bakterien gebundene TSP nachzuweisen. Der Nachweis erfolgt über ein Streptactin-Konjugat, das einerseits für Bindung der TwinStrep-Sequenz optimiert ist und andererseits über die gekoppelte Peroxidase per Farbreaktion detektierbar ist.

Die hohe Sensitivität des eingesetzten Nachweissystems geht unter anderem auf die multiplen Bindungsstellen zurück: Die TwinStrep-Sequenz enthält zwei Erkennungssequenzen pro TSP, was bei einem nativen TSP-Trimer in sechs Erkennungssequenzen pro TSP-Partikel resultiert. Streptactin enthält pro Partikel vier Bindungsstellen. Dies bedingt die hohe Avidität der Bindung, kann aber auch zu der Quervernetzung der Proben führen. Zum einen sind Phagenpartikel normalerweise auch polyvalent, da sie über mehrere Adhäsionsproteine pro Partikel verfügen. Zum anderen kann eine Voragglutininierung bzw. Quervernetzung der TSPs durch das Streptactin-Konjugat potentiell die Sensitivität des Systems steigern. Analog wird mit quervernetzenden anti-6×His-Antikörpern verfahren, die potentielle Binder vor dem Test auf Microar-

rays quervernetzen (Rillahan und Paulson, 2011; Blixt u. a., 2004). Die aus der Quervernetzung resultierenden Vor- und Nachteile werden detailliert im Abschnitt 4.1.3 diskutiert.

Die Waschbedingungen beim ELITA sind entscheidend für die Unterscheidung zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Bindung der eingesetzten TSP-Sonden. Während der Optimierung der Waschbedingungen wurde keine unspezifische Bindung der TSP-Sonden beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte das Streptactin-Konjugat eine deutliche Tendenz zur unspezifischen Bindung, was bei den Waschsritten den Einsatz vergleichsweise hoher Konzentrationen von Tween 20 (0,2 % (v/v)) und NaCl (0,2 M) nötig machte. Eine der möglichen Ursachen für die beobachtete unspezifische Bindung ist die Oberfläche der eingesetzten Mikrotiterplatten. Diese zeichnet sich durch ein hohes Adsorptionsvermögen und garantiert, dass genügend Bakterien immobilisiert werden, um Bindung von TSP-Sonden detektieren zu können. Der unspezifische Charakter der Adsorption soll vermeiden, dass Unterschiede in der Zusammensetzung des O-Ags in unterschiedlich effektiven Adsorptionsraten der Stämme resultieren und damit die Ergebnisse des Bindungstests verfälschen. Andererseits können dadurch auch verschiedene Komponenten des Tests unspezifisch binden, darunter das Streptactin-Konjugat. Da TSP-Sonden an sich keine unspezifische Bindung zeigten, ist das etablierte System dennoch für Messungen mit verschiedenen TSPs geeignet: Solange die TwinStrep-Markierungssequenz und das Streptactin-Konjugat als Detektionssystem eingesetzt werden, müssen die Waschbedingungen nicht angepasst werden. Dies ist essentiell für die Vergleichbarkeit der Daten, denn zusätzliche Waschschriffe reduzieren nachweislich die Menge an spezifisch gebundenem TSP. Dies wird unter anderem beim Test der Spezifität der detektierten TSP-Bindung deutlich (vgl. Abschnitt 3.1.2.5) deutlich. Durch die Vorinkubation mit einer katalytisch aktiven Form von 9NATSP waren zusätzliche Waschschriffe nötig. Die Kontrollansätze wurden dabei mit Puffer ohne TSP vorinkubiert und analog zu den Proben mit TSP zusätzlich gewaschen. Die zusätzlichen Waschschriffe führten bei den Kontrollansätzen zu teilweise niedrigeren absoluten Signalen im Vergleich zu den Ansätzen ohne Vorinkubation. Neben der Vergleichbarkeit der Daten beeinflussen die eingesetzten Waschbedingungen die Sensitivität des Tests. Bei harschen Waschbedingungen werden schwächer interagierende Binderpaare nicht identifiziert.

ELITA könnte wie die zugrunde liegende ELISA-Methode weitgehend durch den Einsatz von Pipettierrobotern automatisiert werden. Dies kann für den nötigen Durchsatz und die Parallelisierbarkeit beim Testen größerer bakterieller Bibliotheken sorgen. Der kritische Schritt hinsichtlich der Automatisierbarkeit ist die Kultivierung der Bakterien. Dabei stellt die mehrfache Kontrolle der Zelldichte den intensivsten Arbeitsschritt dar, speziell wenn mehr als fünf Stämme parallel angezogen werden und diese ein ausgeprägt unterschiedliches Verhalten beim Wachstum aufweisen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Kontrolle der Zelldichte in mehrfacher Hinsicht essentiell ist (vgl. Abschnitt 3.1.2.1). Es wurde beobachtet, dass Zellen je nach der Wachstumsphase unterschiedliches Bindungsverhalten im ELITA zeigen. Dies korreliert mit publizierten Daten, wonach sich die Zusammensetzung des O-Ags, z. B. Acetylierung der Aboquose, im Laufe der Kultivierung verändern kann (Zandomenighi u. a., 2012). Infolgedessen würde je nach der Wachstumsphase der eingesetzten Bakterien unterschiedliches Bindungsverhalten der TSP-Sonden beobachtet. Ähnliches Verhalten wurde bereits bei Serotypisierung der *Salmonella*-Spezies beobachtet, so dass für den Nachweis einiger Serogruppen ein optimaler Abschnitt der Wachstumsphase empfohlen wird (persönliche Kommunikation mit Dr. W. Rabsch).

Der zeitliche und apparative Aufwand des Experiments ist verhältnismäßig niedrig. Für die Durchführung des kompletten Bindungstests werden mindestens zwei Tage benötigt, da am ersten Tag Bakterienkulturen angezogen und über Nacht an die Mikrotiterplatte adsorbiert werden. Theoretisch sind auch kürzere Adsorptionszeiten möglich. Allerdings profitiert man von den kürzeren Adsorptionszeiten erst, wenn alle Schritte in der Mikrotiterplatte (Inaktivieren mit Phenol, Blockieren mit Serumalbumin und der Bindungstest mit TSPs inklusive photometrischer Detektion) voll automatisiert ablaufen. Damit kann die Länge des Experiments auf etwa 24 h reduziert werden, was beim Testen größerer Bakterienbibliotheken mit mehreren TSPs vorteilhaft wäre.

Die im ELITA-Bindungstest erhaltenen Ergebnisse sind semi-quantitativ. Als Folge kann lediglich die Tendenz verschiedener Stämme verglichen werden, eine TSP-Sonde zu binden. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Adsorption der Bakterien an die Oberfläche der Mikrotiterplatte. Sollte ein Stamm aufgrund abweichender Zusammensetzung des O-Ags weniger gut an die Mikrotiterplatte binden, wird dies als schwächere Bindung der TSP-Sonde interpretiert. Daher sollte die Adsorption unterschiedlicher Stämme beispielsweise mittels Fluoreszenzmikroskopie oder einer Gram-Färbung mit anschließender Mikroskopie quantitativ kontrolliert werden. Eine weitere Eigenschaft der Bakterienstämme, die das absolute Signal im ELITA-Bindungstest beeinflussen kann, ist die Länge des O-Ags. Diese unterliegt einer beträchtlichen Variabilität zwischen den Stämmen und beträgt zwischen 1RU bei semi-rauen Stämmen bis zu 100RU (Raetz und Whitfield, 2002). Zusätzlich kann sich die Länge der O-Ag-Ketten aufgrund der Phasenvariabilität dynamisch verändern (Cota, Blanc-Potard und Casadesús, 2012). Bei gleicher Anzahl immobilisierter Bakterien bieten Stämme mit längerem O-Ag mehr potentielle Bindungsstellen für die TSP-Sonde. Dadurch sind unterschiedliche detektierte Bindungseffizienzen für Stämme mit gleicher Zusammensetzung des O-Ags möglich. Diese Aspekte betreffen keine direkten Vergleiche der Bindung von mehreren verschiedenen TSPs.

4.1.2 9NATSP und P22TSP differenzieren im ELITA-Test zwischen *Salmonella*-Stämmen gleicher Serogruppen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem ELITA-Test eine Bibliothek aus 44 *Salmonella*-Stämmen mit zwei TSP-Sonden erfolgreich getestet. Davon gehörten 38 Stämme zu den potentiell bindenden Serogruppen O2, O4, O4,5, O9. Stämme dieser Serogruppen wurden als Wirte für Bakteriophagen 9NA und P22 beschrieben, deren TSP als Sonden beim ELITA eingesetzt wurden (Lindberg, 1973; Wilkinson, Gemski und Stocker, 1972). Ein gemeinsames Merkmal dieser Serogruppen bildet das O12-Antigen, das auf den linearen Teil des O-Ags aus Mannose, Rhamnose und Galactose zurückgeht. Zusätzlich wurde ein LPS-produzierender *E. coli*-Stamm HTD2158 als Kontrollstamm mit nicht bindendem LPS eingesetzt. Der ELITA-Bindungstest erlaubte eine eindeutige Unterscheidung zwischen Stämmen, die bindende O-Ag-Varianten herstellen, und den Stämmen mit nicht bindendem O-Ag.

4.1.2.1 Keine Bindung der TSPs an die Stämme der Serogruppen O1,9,46,27, O3,10 und O11

Zu den untersuchten Stämmen mit nicht bindendem O-Ag zählten neben dem *E. coli*-Stamm je zwei *Salmonella*-Stämme der O-Serogruppen O1,9,46,27, O3,10 und O11. Stämme dieser Serogruppen gehören nicht zu den potentiellen Wirten von 9NA oder P22. Das O-Ag dieser Serogruppen weist partiell Gemeinsamkeiten mit dem O-Ag der Serogruppen O2, O4, O4,5 und O9 auf. Das O-Ag O1,9,46,27 basiert strukturell auf dem O-Ag O9: Es enthält die gleichen Kohlenhydrate in der repetitiven Untereinheit (RU) (Curd, D. Liu und P. R. Reeves, 1998; Peter R. Reeves u. a., 2013). Ein Unterschied liegt in der α -1-6-Verknüpfung zwischen der Galactose und der Mannose. Zusätzlich weist der anomere Kohlenstoff des Mannose-Rests sowohl eine α - als auch eine β -Konfiguration auf. Die resultierenden strukturellen Unterschiede sind gravierend für die Bindung der getesteten TSPs: Während alle getesteten Stämme der Serogruppe O9 mit Ausnahme des Stamms *Salmonella* Bad Langensalza eine eindeutige Bindung durch P22TSP und 9NATSP zeigten, wurde bei den Stämmen der Serogruppe O1,9,46,27 keine signifikante Bindung beobachtet.

Bei der Serogruppe O3,10 ist der lineare Teil der O-Ag-Kette aus den gleichen Kohlenhydrat-Resten aufgebaut wie das O12-Ag. Im Unterschied zum O12-Ag liegt bei der Serogruppe O3,10 eine α -1-6-Verknüpfung zwischen den Galactose- und Mannose-Resten vor. Darüber hinaus fehlt dem O3,10-Ag die Didesoxyhexose-Seitenkette am Mannose-Rest. Auch dieser Stamm zeigte keine nachweisbare Bindung durch 9NATSP oder P22TSP. Einerseits kann die Verknüpfung zwischen den RU der Grund sein, wie es bereits bei der Serogruppe O1,9,46,27 beobachtet wurde. Andererseits ist die beim O3,10-Ag fehlende Didesoxyhexose-Seitenkette essentiell

für die Bindung von P22TSP und trägt entscheidend zur Affinität bei (U. Baxa, Cooper u. a., 2001; Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Das O-Ag der Serogruppe O11 ist strukturell am wenigsten mit den O-Ag der potentiell bindenden O-Ag verwandt (vgl. Tab. 3.1). Der lineare Teil des O-Ags enthält ein N-Acetylglucosamin-Rest, der über eine α -1–3 glycosidische Bindung an eine Galactose gebunden ist (B. Liu u. a., 2013). Außerdem enthält das O-Ag eine α -1–4 verknüpfte Mannose als Seitenkette. Die beiden Stämme der Serogruppe O11 lieferten Signale an der Nachweisgrenze der Methode, wie es bereits bei den Serogruppen O1,9,46,27 und O3,10 beobachtet wurde. Diese Daten charakterisieren den etablierten ELITA-Bindungstest als nicht anfällig für falsch positive Ergebnisse.

4.1.2.2 Heterogene Bindung an Stämme der Serogruppe O4(,5)

Die restlichen getesteten *Salmonella*-Stämme gehören zu den Serogruppen O2, O4(,5) und O9(,12₁,12₂,12₃). Das O-Ag dieser Stämme stellt ein Substrat für die Bakteriophagen 9NA und P22 bzw. ihre TSPs dar (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Da Bindung und Spaltung des O-Ags bei Wildtyp-TSPs gekoppelte Prozesse sind, gehören die O-Ag-Varianten zu potentiellen Interaktionspartnern der im ELITA eingesetzten 9NATSP und P22TSP. Tatsächlich zeigte die überwiegende Anzahl an Stämmen dieser Serogruppen Bindung durch einen oder beide TSPs. Die detektierten Signale lagen bei den meisten Stämmen signifikant über der Signalintensität der nicht-bindenden Stämme. Damit eignet sich die ELITA-Bindungsmessung, um Stämme mit bindendem O-Ag für das jeweilige TSP zu identifizieren. Neben grundsätzlichen Aussagen über das Bindungsvermögen wurden im Test ausgeprägte Unterschiede zwischen Stämmen der bindenden Serogruppen beobachtet. Die größte Heterogenität der Bindung wurde bei der Serogruppe O4(,5) beobachtet, die gleichzeitig die häufigste und im Test am stärksten vertretene Serogruppe darstellt. Für beide getesteten TSPs wurden Stämme dieser Serogruppe identifiziert, die entweder keine Bindung, eine schwächere oder eine mit dem Referenzstamm *Salmonella* Typhimurium DB7136 vergleichbare Bindung zeigten. Eine der möglichen Ursachen wäre die bereits angesprochene Variabilität der O-Ag-Länge. Dies trifft aber nicht auf die Stämme zu, die zumindest bei einem der beiden getesteten TSPs eine ausgeprägte Bindung zeigten, wie z. B. bei *Salmonella* Brancaster und *Salmonella* Heidelberg 13-00308. Eine weitere Quelle für unterschiedliches Verhalten innerhalb einer Serogruppe sind nicht-stöchiometrische Modifikationen. Antikörper haben kleinere Bindungsstellen als TSPs und erfassen somit nur einen Teil der strukturellen Informationen des O-Ags (D. R. Bundle u. a., 1994; Zdanov u. a., 1994; Cygler, Rose und D. Bundle, 1991). Es kann je nach Art, Position und chemischer Natur der Modifikationen vorkommen, dass diese durch die Antikörper nicht erfasst werden. Außerdem kann mit der Serotypisierung nur die Präsenz eines

Epitops gezeigt werden, nicht aber die Existenz weiterer, modifizierter Epitope in der gleichen O-Ag-Kette ausgeschlossen werden. Folglich können serologisch identische Stämme strukturelle Unterschiede aufweisen, die sich im ELISA in einer schwächeren oder fehlenden Bindung der TSPs äußern können. Zwar gilt die Problematik der Antikörper-basierten Detektion auch für die Bindung eines TSPs, aber die größeren Bindungsstellen von TSPs, die zwei komplette RU fassen, erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass eine nicht stöchiometrische Modifikation sich auf die Bindung des TSPs und seine katalytische Aktivität auswirkt. Einige Stämme wurden auf Präsenz von nicht-stöchiometrischen Modifikationen getestet und werden im Abschnitt 4.3 diskutiert.

Für den O4-Stamm Wien wurde keine Bindung der TSPs beobachtet. Eine mögliche Ursache für diesen Befund ist die eingeschränkte Zugänglichkeit des O-Ags aufgrund der Expression weiterer Oberflächenmoleküle (Polysaccharid-kapsel, Proteine). Theoretisch können die O-Ag-Ketten eine Länge von einer RU wie bei einem semi-rauen Stamm haben. Damit wären ein Epitop für das anti-O4-Antikörper vorhanden, nicht aber ein Epitop für TSPs, die mindestens 2RU und im Fall von LPS-Aggregaten einige zusätzliche RU für eine effektive Bindung benötigen (Andres, Hanke u. a., 2010; Andres, Roske u. a., 2012). Alle beschriebenen Erklärungen können mit einer verminderten Adsorption der Zellen an die eingesetzte Oberfläche einhergehen und damit für die fehlenden Signale verantwortlich sein. Um das zu vermeiden, könnte man die Bindung mit einer nicht oberflächenbasierten Methode wie FACS testen (siehe Abs. 4.1.3). Alternativ könnte man untersuchen, ob die beiden Bakteriophagen P22 und 9NA in dem Stamm *Salmonella* Wien propagieren. Schließlich kann LPS isoliert und mit einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung hinsichtlich der Länge der O-Ag-Ketten charakterisiert werden.

Mehrere Stämme der Serogruppe O4(,5) zeigten Bindung durch einen der beiden TSPs. Kein Zusammenhang zwischen der Zugehörigkeit zu einer O-Serogruppe bzw. einer H-Serogruppe und der beobachteten Bindungseffizienz der TSPs konnte abgeleitet werden. Sieben Stämme dieser Serogruppe wurden näher charakterisiert und werden in den Abschnitten 4.1.3 und 4.3 diskutiert.

4.1.2.3 9NATSP erkennt Stämme der Serogruppe O2 effektiver als P22TSP – Strukturelle Ursachen der Präferenz

Neben der unterschiedlichen Bindung der *Salmonella*-Stämme einer Serogruppe an ein TSP wurden deutliche Unterschiede in den Bindungsmustern der beiden getesteten TSPs festgestellt. Die drei getesteten *Salmonella* Paratyphi A-Stämme zeigen für 9NATSP eine Bindung vergleichbar mit der zum Referenzstamm *Salmonella* Typhimurium DB7136. P22TSP zeigt hingegen bei allen drei Stämmen eine deutlich schwächere Bindung mit Signalintensitäten um 12–15 % der Signalintensitäten der

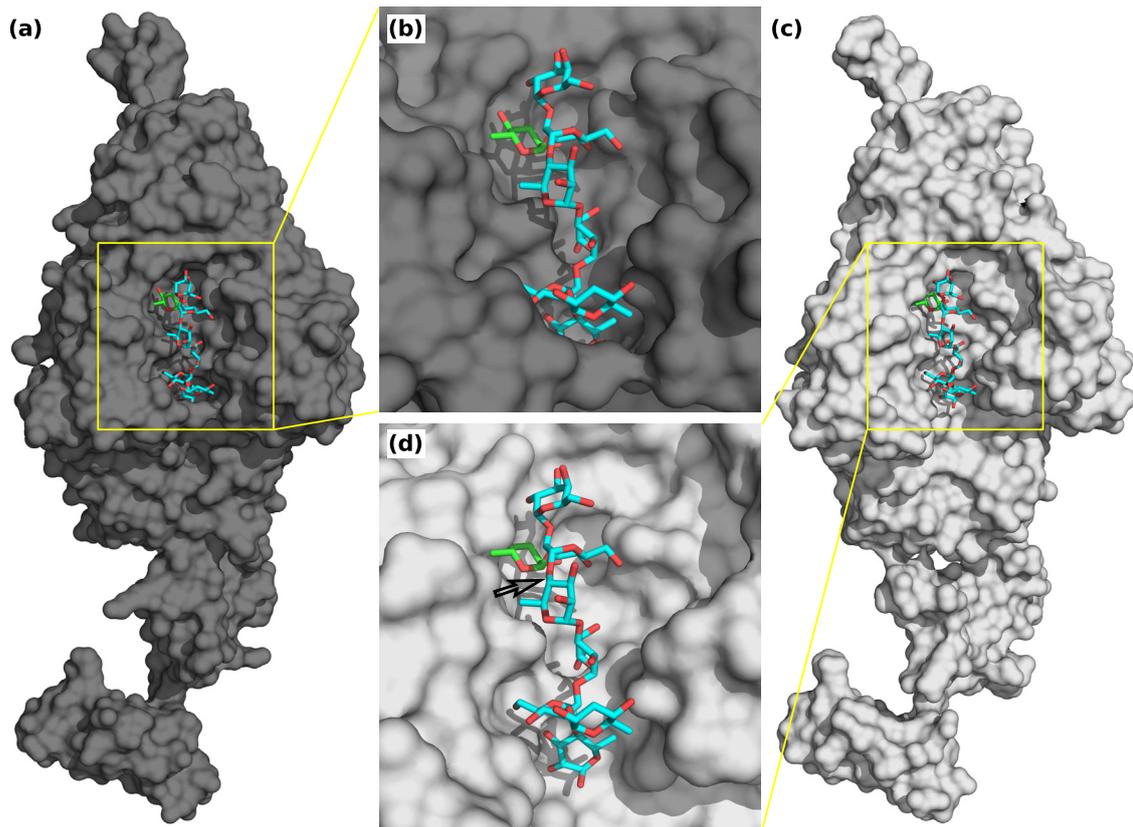


Abbildung 4.1: (a) Die kristallographische Struktur des Komplexes aus P22TSP und einem 2RU-Fragment des O2-Ag's, PDB: 3TH0 (Andres, Gohlke u. a., 2013). Das P22TSP-Monomer ist der raumfüllenden Dargestellung gezeigt (grau). Das Oligosaccharidfragment in der Bindungstasche ist in der *stick*-Darstellung abgebildet (Kohlenstoff: cyan, Sauerstoff: rot, die Paratose am nicht-reduzierenden Ende ist farblich hervorgehoben: Kohlenstoff: grün, Sauerstoff: rot). (b) Eine vergrößerte Ansicht der Bindungsstelle von P22TSP mit gebundenem 2RU-Fragment. (c) Die kristallographische Struktur eines 9NATSP-Monomers (weiß), PDB: 3RIQ (Andres, Roske u. a., 2012). Für die Strukturen des 9NATSPs und des P22TSP-Komplexes mit dem 2RU-Fragment wurde ein dreidimensionales *alignment* mit dem CEALIGN-plugin in PyMOL angewandt ($r.m.s.d. \approx 2,54 \text{ \AA}$). Durch das *alignment* wurde eine potentielle Bindungsposition des 2RU-Oligosaccharidfragments in der Bindungsstelle von 9NATSP ermittelt. (d) Eine vergrößerte Ansicht der Bindungsstelle von 9NATSP mit dem hineinmodellierten 2RU-Oligosaccharidfragment. Die grün gefärbte Paratose am nicht-reduzierenden Ende des Oligosaccharids kollidiert teilweise mit der Oberfläche von 9NATSP. Der schwarze Pfeil markiert den ψ -Winkel zwischen Mannose und Rhamnose. Dieser weicht vom bevorzugten ψ -Winkel Oligosaccharids in der Lösung ab (Andres, Gohlke u. a., 2013).

9NATSP-Ansätze. Während für 9NATSP keine detaillierte Strukturinformationen und thermodynamische Charakteristika der Bindung vorliegen, ist die Bindung von P22TSP ausführlich charakterisiert (Andres, Gohlke u. a., 2013; U. Baxa, Cooper u. a., 2001; U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Die vorhandenen Daten legen nahe, dass P22TSP zwar in der Lage ist das O2-Ag zu binden, aber die Interaktion deutlich schwächer ist als die mit den O-Ag-Varianten O4 oder O9. Der strukturelle Hintergrund liegt laut Andres, Gohlke u. a. (2013) in zwei konservierten Wassermolekülen in der Dideoxyhexose-Bindungstasche, die auch in den Komplexen mit O4- und O9-Ag vorhanden sind. Offensichtlich ist energetisch ungünstig, diese von ihren Positionen auf der Proteinoberfläche zu verdrängen. Für das Dideoxyhexose-Epimer

Paratose wird stattdessen eine Konformation des Oligosaccharids gebunden, die nicht die günstigste Konformation in der Lösung darstellt, aber mit den beiden Wassermolekülen vereinbar ist. Dadurch wird auch die Galactose am nicht reduzierenden Ende dem Lösungsmittel exponiert und kann nicht zur Wechselwirkung beitragen. Die weniger günstige Konformation des Oligosaccharids ist in der Lösung schwach populiert, was die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit dem Protein herabsetzt. Diesbezüglich stimmen die Daten, die sich aus dem ELITA-Test ableiten lassen, mit den strukturellen und thermodynamischen Daten überein: P22TSP zeigt eine schwächere Bindung an die Stämme der Serogruppe O2 als an die Stämme der Serogruppen O4 und O9. Eine naheliegende Erklärung für eine effektivere Bindung von 9NATSP sind strukturelle Unterschiede der Bindungsstellen beider TSPs. Leider ist keine kristallographische Struktur für den Komplex aus 9NATSP und 2RU-Oligosaccharidfragment verfügbar. Als eine Näherung wurden die Struktur des P22TSP-Oligosaccharid-Komplexes und die Struktur von 9NATSP durch dreidimensionales *alignment* überlagert (Abb. 4.1). Die mittlere quadratische Abweichung (r.m.s.d., *root mean square deviation*) zwischen den Strukturen beträgt 2,54 Å und weist somit auf eine hohe strukturelle Homologie der beiden TSP's hin. Auch die Aminosäuren, die bei beiden TSPs an der Spaltung der glycosidschen Bindung beteiligt sind, ko-lokalisierten nach dem *alignment*. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis auf die Ähnlichkeit der Architektur und Lokalisation der Bindungsstellen bei 9NATSP und P22TSP. Auf dieser Grundlage wurde die potentielle Position des 2RU-Fragments in der Bindungstasche von 9NATSP ermittelt. Die angenommene Position wird teilweise dadurch bestätigt, dass die RU am reduzierenden Ende des Oligosaccharids keine Kollisionen mit der Proteinoberfläche zeigt. Die Paratose am nicht-reduzierenden Ende (Abb. 4.1, grün hervorgehoben) kollidiert mit den Atomen der Proteinoberfläche in der Didesoxybindungstasche. Reduziert man den ψ -Winkel zwischen der benachbarten Mannose und Rhamnose, wird die apparente Kollision aufgehoben. Gleichzeitig nimmt das Oktasaccharidfragment damit eine Struktur ein, die der bevorzugten Struktur in Lösung näher kommt (Andres, Gohlke u. a., 2013; Lütkeke, Frank und von der Lieth, 2005; Bush, Martin-Pastor und Imberty, 1999). Damit würde das 9NATSP eine in der Lösung stärker populierte Konformation des O2-Ag's binden. Auch wenn diese Überlegungen in Bezug auf 9NATSP rein spekulativ sind, könnten die erläuterten strukturellen Unterschiede eine bessere Bindung durch 9NATSP an das O2-Ag erklären. Darüber hinaus befindet sich ein Netzwerk aus Wassermolekülen auf der 9NATSP-Oberfläche in der Nähe der vermuteten Position der Paratose. Die Abstände zwischen diesen Wassermolekülen stimmen in etwa mit den Abständen zwischen Paratose-Atomen O2, O5 und C6 überein. Bei einer geeigneten Positionierung der Paratose in der Bindungstasche könnten die drei Wassermoleküle durch die entsprechenden Paratose-Atome verdrängt werden, wobei O2-Atom zwei H-Brücken

anstelle eines der verdrängten Moleküle ausbilden würde. Theoretisch würde sich die Freisetzung der drei Wassermoleküle positiv auf die Entropie der Bindung auswirken. Leider liegen zur Zeit keine Daten bezüglich der thermodynamischen Stabilität der beteiligten Wassermoleküle vor, so dass die erwähnten Bindungsmodi und die Beteiligung der an der Proteinoberfläche koordinierter Wassermoleküle spekulativ bleiben. Eine Aufklärung der Zusammenhänge wäre mit Hilfe der Kristallstrukturdaten von 9NATSP mit gebundenem Oligosaccharid oder NMR-Experimenten möglich. Mit diesen Daten wäre es möglich in Simulationen die Rolle einzelner Wassermoleküle bei der Bindung zu untersuchen.

Für den Stamm mit dem Serotyp O1,2 wurde die schwächste Bindung der P22TSP-Sonde beobachtet. Die O1-Spezifität des O-Ags kommt durch die Glucosylierung der Galactose an der Position C6 zustande, die strukturell äquivalent zum O-Ag 12₁ ist (Lüderitz, Staub und Westphal, 1966; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Diese ist auf eine Lysogenisierung durch den Bakteriophagen P22 zurückzuführen und verhindert Adsorption weiterer P22-Bakteriophagen bzw. Bindung von P22TSP an das modifizierte O-Ag.

4.1.2.4 Bewertung von ELITA als Identifizierungsmethode

Zusammengefasst, die ELITA erlaubt Identifizierung der Stämme mit bindendem O-Ag. Die identifizierten Stämme können als Quelle für Polysaccharid bzw. Oligosaccharidfragmente dienen, die für detaillierte biophysikalische Interaktionsstudien eingesetzt werden können. Die produzierten Daten zeigen geringe Schwankungen, die durchschnittlich unter 10 % der Messwerte liegen. Somit waren die meisten detektierten Unterschiede statistisch signifikant. Die beobachteten Schwankungen sind wahrscheinlich auf die Abfolge von mehreren Inkubations- und Waschschritten zurückzuführen und sind systematischer Natur. Theoretisch kann eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse dadurch erreicht werden, dass die gemessenen Werte auf eine negative und eine positive Kontrolle normiert werden. Dies kann jedoch nicht für den Vergleich zwischen verschiedenen TSPs angewendet werden, da in diesem Fall die Bindung an einen Referenzstamm nicht zwangsläufig gleich ausfällt. Gleichzeitig stellen O-Ag Variationen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase eine potentielle Quelle für Schwankungen dar und damit ein Problem für den Vergleich zwischen mehreren Experimenten. Eine Synchronisierung der Bakterienzellen könnte daher die Vergleichbarkeit der Daten weiter verbessern. Theoretisch könnte eingeschränkte Zugänglichkeit des O-Ags durch die Kapsel-Expression zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Gleichzeitig wäre der Einsatz eines solchen Stammes für die Isolierung des PS und anschließende Charakterisierung der Bindung ungünstig, auch wenn dieser Stamm gleichzeitig bindendes O-Ag exprimieren würde. Ein positives Ergebnis im ELITA-Test deutet hingegen eindeutig auf eine spezifische Bindung von TSPs an das

O-Ag hin. Weiterhin sollte ELITA problemlos auf andere Gattungen übertragbar sein, da die Adsorption der Bakterien nicht an eine bestimmte Oberflächenstruktur geknüpft ist. Somit ist der ELITA-Test universell einsetzbar.

4.1.3 FACS-Test

Ein ausgewählter Satz der Stämme der Serogruppe O4(,5) wurde zusätzlich durch ein FACS-Experiment getestet. Der Versuchsaufbau sieht im Unterschied zu ELITA keine Adsorption der Bakterien an eine Oberfläche vor und vermeidet die damit verbundenen potentiellen Fehlerquellen. Der restliche Ablauf ist bei beiden Methoden weitgehend vergleichbar: die Bakterien werden mit einer TSP-Sonde inkubiert und das ungebundene oder unspezifisch gebundene TSP anschließend in mehreren Waschschrritten entfernt. Somit ist das Waschen auch bei der FACS-Messung ein kritischer Schritt, der im Rahmen dieser Arbeit optimiert wurde. Eine Färbung mit einem unspezifischen Fluoreszenzfarbstoff, SytoRed, um intakte Zellen von größeren Zelltrümmern zu unterscheiden, war bei *Salmonella*-Stämmen nicht erfolgreich. Beim Kontrollstamm *E. coli* HTD2158 wurden dagegen mehr als 90 % der Zellen gefärbt, was im Einklang mit den Daten steht, die für *E. coli* publiziert sind (Comas und Vives-Rego, 1997). Der SytoRed-Farbstoff bindet nicht sequenz-spezifisch an Nucleinsäuren und muss für eine Färbung die äußere und die innere Membran passieren. Daher könnte eine niedrigere Permeabilität der äußeren und evtl. der inneren Membran ein naheliegender Grund für die ineffektive Färbung bei *Salmonella* sein.

4.1.4 Vergleich von FACS-Bindungsmessung und ELITA

In sieben von acht untersuchten *Salmonella*-Stämmen der Serogruppe O4(,5) stimmten die Ergebnisse von ELITA und FACS-Bindungsmessung überein: wenn bei ELITA ein TSP eine effektivere Bindung für einen Stamm zeigte, wurde das gleiche TSP auch im FACS als ein besserer Binder identifiziert. Bei der achten Probe wurde in ELITA kein signifikanter Unterschied zwischen 9NATSP und P22TSP detektiert, während FACS auf eine unterschiedliche Bindung der beiden TSPs hindeutet. Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden bestätigt, dass die unterschiedlichen beobachteten Bindungscharakteristika nicht methodenbedingt sind, sondern auf strukturelle Unterschiede des O-Ags zurückgehen. Darüber hinaus stimmen die Ergebnisse der beiden Bindungstests mit der Infektiosität mit Bakteriophagen P22 und 9NA zu den 8 *Salmonella*-Stämmen überein (Dr. Nina Bröker, unveröffentlichte Daten). Die zugrunde liegenden *Plating*-Tests basieren auf der Plaquebildung durch Bakteriophagen, die in verschiedenen Konzentrationen auf einem Zellrasen ausplattiert werden. Die Ergebnisse der *Plating*-Tests korrelieren mit den Bindungstests, wobei eine bessere Bindung in einem ELITA-/FACS-Bindungstest mit einer höheren

Infektiosität beim *Plating* einhergeht. Dies bestätigt zusätzlich die Validität der Ergebnisse der ELITA- und FACS-Bindungsmessungen. Ähnliches geht aus den Aktivitätstests mit katalytisch aktiven TSPs und isoliertem PS hervor, die im Abschnitt 4.3 diskutiert werden.

Obwohl die Ergebnisse der beiden Bindungstests qualitativ übereinstimmen, ist kein direkter Vergleich der beiden Experimente möglich. Beim FACS werden sowohl bindende als auch nicht bindende Bakterien erfasst. Die Daten repräsentieren Anteile der Zellpopulation, die ausreichend TSP gebunden haben, um einen Fluoreszenzschwellenwert zu überschreiten. Da die Fluoreszenzintensität theoretisch pro Zelle vermessen wird, könnte im Unterschied zu einer ELITA-Messung die Beladung der Zellen mit TSPs erfasst werden. In der Praxis werden *Events* oder Tropfen erfasst, die auch mehrere Bakterien bzw. Bakterienaggregate enthalten können. Da gleichzeitig auch die Größe der vermessener Partikel erfasst wird, könnte die Beladung pro Zelle potentiell auch aus Zellaggregaten abgeschätzt werden. Die Voraussetzung dafür ist, dass die Größe der Partikel und die Fluoreszenzintensität und somit die gebundene Menge an TSP direkt proportional zueinander sind. Dies wäre gewährleistet, wenn in einer zweidimensionalen Auftragung von Größe gegen TSP-Menge die Daten einen diagonalen Verlauf zeigten. Das bedeutet, je nach vermessener Fluoreszenzintensität könnte man grob die Menge des gebundenen TSPs pro Zelle abschätzen, oder zumindest ob ein Stamm mehr oder weniger TSP pro Zelle binden kann als ein anderer.

4.1.4.1 Detektion unterschiedlicher Zellpopulationen mit FACS

Interessanterweise wurden zwei Bindungsmodi beobachtet. Neben der gleichmäßigen Verschiebung zu einer höheren Intensität wurde bei zwei Ansätzen eine Aufspaltung in zwei Populationen detektiert. Dies kann als zwei Zellpopulationen interpretiert werden, die sich hinsichtlich der Bindung stark unterscheiden. Dabei blieb bei einer größeren Population die Fluoreszenzintensität unverändert, d. h. es fand keine Bindung von TSP statt. Die zweite Population zeigte hingegen eine überdurchschnittlich hohe Fluoreszenzintensität, was auf eine besonders hohe Beladung mit der TSP-Sonde pro Zelle hindeutet. Weiterhin interessant ist, dass für einen betroffenen Stamm in der Regel nur eins der zwei untersuchten TSPs die Aufspaltung in Populationen zeigte. Der zweite TSP zeigte beim gleichen Stamm eine Intensitätsverschiebung der Fluoreszenz für alle Zellen. Das TSP mit einer Aufspaltung in zwei Populationen wurde bei beiden Bindungstests als ein weniger guter Binder charakterisiert. Eine mögliche Interpretation ist, dass eine Modifikation des O-Ags für die Aufspaltung verantwortlich ist. Die eingesetzten TSPs können diese unterschiedlich gut tolerieren. Ein besserer Binder kann demnach an modifiziertes O-Ag annähernd gleich effektiv binden wie an das nicht modifizierte. Der schlechtere Binder kann dagegen nur an

das nicht-modifizierte O-Ag binden, was zu zwei Populationen im FACS führt. Im ELITA würde das zweite TSP einfach als schwächerer Binder auftreten, da weniger TSP bzw. nicht alle immobilisierten Zellen gebunden wären. Diese Interpretation wird im Zusammenhang mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse im Abschnitt 4.3.4 bekräftigt.

Einerseits ist die beobachtete Aufspaltung in zwei Zellpopulationen eine Eigenschaft der eingesetzten TSPs bzw. der Unterschiede ihrer Bindungsstellen für das O-Ag. Andererseits präsentierten einige Stämme zwei Sorten von O-Ag auf ihren Oberflächen. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass es sich um zwei Phasen einer bi-phasischen Kultur handelt, die je nach Zeitpunkt der Zellernte in einem variablen Verhältnis zueinander stehen. In diesem Fall könnte man die Kultur in unterschiedlichen Wachstumsphasen für den FACS-Bindungstest einsetzen und dabei einen optimalen Zeitpunkt für die Zellernte bei der Produktion von Polysaccharid (PS) identifizieren. Auf diese Weise könnte man eine unerwünschte Heterogenität in den PS-Präparationen vermeiden oder minimieren. Potentiell können auch lebendige Bakterien mit dem FACS-Bindungstest vermessen werden. Dabei ergibt sich eine interessante Perspektive beim Einsatz eines FACS-Geräts, das neben der Detektion eine mechanische Sortierung der Zellen bietet. Damit wäre eine Anreicherung bzw. Isolierung derjenigen Bakterien aus einem Gemisch möglich, die die benötigten Bindungseigenschaften aufweisen.

4.1.4.2 Zellaggregation im FACS

Eine weitere Beobachtung bei der FACS-Bindungsmessung war eine Zellaggregation in einigen Ansätzen. Der Stamm *E. coli* HTD2158 zeigte als einziger eine Autoaggregation, d. h. Zellen dieses Stammes aggregierten unabhängig von weiteren Komponenten des Tests wie TSP oder Streptactin-Konjugat. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine FimH-vermittelte Zellaggregation (Schembri, Christiansen und Klemm, 2001). In den restlichen betroffenen Ansätzen ging die Aggregation auf den Einsatz des Streptactin-Konjugats zurück. Im Fall der Aggregation wird die Messung weniger zuverlässig, weil die Zellaggregate bei der FACS-Messung als ein Partikel erfasst werden. Gleichzeitig lieferten die aggregierten Zellen entsprechend mehr Eigenfluoreszenz pro detektiertem Partikel als einzelne Zellen. Damit wären Signale von einzelnen Zellen mit einer zusätzlichen Fluoreszenzintensität aufgrund des gebundenen TSP von den Signalen aus Zellaggregaten ohne gebundenes TSP nicht zu unterscheiden. Da FACS eine Auftrennung von Zellen nach mehreren Eigenschaften ermöglicht, konnte man im ersten Schritt Partikel mit einer überdurchschnittlichen Größe ausschließen. Im zweiten Schritt wurde die Fluoreszenzintensität als Maß für die TSP-Bindung ausgewertet, wobei nur kleinere Partikel bzw. einzelne Zellen berücksichtigt wurden. Auch wenn nicht alle der getesteten *Salmonella*-Stämme

eine Aggregation zeigten, wurde die Methode auf alle Ansätze angewandt, um diese potentielle Fehlerquelle auszuschließen. Andererseits ging die Aggregation bei *Salmonella*-Stämmen auf Bindung von Streptactin und somit auf Bindung eines TSPs zurück. Das bedeutet, durch den Ausschluss größerer Zellaggregate blieb ein Teil der bindenden Zellen bei der Auswertung unberücksichtigt. Die Berücksichtigung dieser Zellen führt zu minimal höheren Werten, ändert aber nichts in Bezug darauf, welcher TSP als ein besserer Binder für den jeweiligen Stamm identifiziert wird.

Als eine Ursache für die Aggregation kommt der multivalente Bindungscharakter des Nachweissystems infrage, mit sechs Strep-Bindungssequenzen pro TSP-Sonde und vier Bindungsstellen pro Streptactin. Eine mögliche Lösung wäre der Einsatz eines anti-TwinStrep-tag Antikörpers, der über zwei statt vier Bindungsstellen verfügt. Interessanterweise wurde die Streptactin-bedingte Aggregation nicht bei allen Ansätzen beobachtet, bei denen eine TSP-Bindung detektiert wurde. Damit können weitere Faktoren wie Expression zusätzlicher Oberflächenmoleküle oder Länge der O-Ag-Ketten eine Bedeutung für das beobachtete Phänomen der Zellaggregation haben. Auch wenn im dargestellten FACS-Experiment die Aggregation als eine potentielle Fehlerquelle gehandelt wird, ist diese nicht grundsätzlich negativ zu bewerten. Die Aggregation bzw. Agglutinierung kann bewusst eingesetzt werden, um höhere Signale zu erhalten. Das Verfahren wird unter anderem bei der Chip-Analytik eingesetzt, wenn Bindung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen mit einer niedrigen Affinität ($K_D \approx 1 \text{ mM}$) erfasst werden soll (Rillahan und Paulson, 2011; Blixt u. a., 2004).

4.1.4.3 Informationsgehalt und die technischen Aspekte der FACS- und ELITA-Messungen

Ein wichtiger Punkt bei der Interpretation der FACS-Daten ist, dass die Festlegung der Intensitätsgrenzen bei der Auswertung relativ ist. So wurde für die Unterscheidung zwischen Zellen und Zellaggregaten lediglich eine Intensitätsgrenze in FSC- und SSC-Kanälen gewählt, die nicht von unbehandelten *Salmonella*-Ansätzen (Kontrollansätze ohne TSP) erreicht wird. Somit definieren sich die Grenzen allein durch die Beobachtungen bei den 8 getesteten *Salmonella* Stämmen. Auf Grundlage des *E. coli*-Stamms allein wäre diese Festlegung problematisch, da der Stamm autoaggregiert und somit höhere Werte in den FSC- und SSC-Kanälen erreicht. Analog wurde die Grenze der Fluoreszenzintensität festgelegt, ab der Bakterien als durch TSP-gebunden gelten: die maximale Eigenfluoreszenz der Bakterien in Abwesenheit von TSP. Dementsprechend würde die Definition des Intensitätsbereichs anders ausfallen, wenn Zellen eine höhere oder eine niedrigere Grundfluoreszenz hätten als die, die im FACS-Experiment für *Salmonella* beobachtet wurde. Damit ist die definierte Fluoreszenzgrenze nicht unbedingt auf andere Gattungen übertragbar. Andererseits ist es nicht zwingend erforderlich, dass alle Bakterienstämme beim FACS-Experiment

mit identischen Intensitätsfenstern ausgewertet werden, wie es bei den präsentierten Messungen der Fall ist. Speziell wenn die Fragestellung nicht auf einen Vergleich der Bindung eines TSPs an verschiedene Stämme zielt, sondern lediglich eine Bindung bei einem Paar aus Bakterium und TSP festgestellt werden soll. In diesem Fall kann eine Auswertung mit individuellen Intensitätsfenstern für jeden Stamm durchgeführt werden, um ein Binderpaar zu identifizieren.

Beim Vergleich der technischen Aspekte von ELITA- und FACS-Bindungsmessungen fällt die FACS-Messung zeitlich etwas effektiver aus, da der Adsorptionsschritt über Nacht und der Blockierungsschritt mit Serumalbumin entfallen. Die restlichen Schritte wie Kultivierung, Detektion und Waschen sind weitgehend gleich. Dafür ist die Messung der Proben im FACS-Gerät aufwändiger und zeitintensiver. Der entscheidende Nachteil von FACS ist, dass die Proben nicht parallel vermessen werden. Die resultierenden Daten enthalten aber deutlich mehr Informationen als die Daten der ELITA-Messung. Speziell bei Stämmen, die ein heterogen modifiziertes O-Ag exprimieren, bietet FACS besondere Vorteile: Die Subpopulationen mit verschiedenen O-Ag-Varianten können durch den Einsatz geeigneter TSPs identifiziert werden. Somit empfiehlt sich der Einsatz von ELITA zum Testen größerer Bibliotheken, während bei wenigen zu testenden Stämmen eine FACS-Bindungsmessung vorzuziehen ist.

4.2 Quantifizierung der Bindung aus ELITA-/FACS-Bindungsexperimenten mittels Oberflächenplasmonresonanz

4.2.1 Immobilisierung von Polysaccharid für Oberflächenplasmonresonanz-basierte Interaktionsmessungen

Die Identifizierung von Binderpaaren aus Bakterien und TSPs lieferte Systeme aus TSPs und O-Ag für weitere quantitative Charakterisierung der Interaktion. Dafür wurde Oberflächenplasmonresonanz (SPR) als Methode ausgewählt (Safina, 2012). Kohlenhydrate sind der limitierende Faktor hinsichtlich der Verfügbarkeit, daher wurden Kohlenhydrate testweise als Ligand auf einem SPR-Chip immobilisiert, um die Oberfläche für mehrere Interaktionsmessungen nutzen zu können. Dabei wurden zwei Alternativen getestet: Zum einen wurde PS eingesetzt, womit längere O-Ag-Ketten als Ligand getestet wurden. Zum anderen wurden enzymatisch hergestellte Oligosaccharidfragmente mit einer Länge von 3RU getestet.

Die Immobilisierung von isoliertem PS verspricht einige Vorteile. So gibt der Einsatz des kompletten PS die strukturelle Heterogenität des O-Ags inklusive nicht-stöchiometrischer Modifikationen wieder. Ein weiterer Aspekt ist, dass PS-Präparationen einen polydispersen Charakter tragen und naturgemäß O-Ag-Ketten verschiedener Längen enthalten. Das bedeutet, bei einer bekannten Konzentration

on des PS in der Lösung kann die Konzentration der potentiellen Bindungsstellen nicht verlässlich bestimmt werden. Dies verhindert den Einsatz von PS für alle Messungen in Lösung, bei denen Bindungskonstanten bestimmt werden sollen. Bei einer SPR-basierten Messung fließt die Konzentration des immobilisierten Ligands prinzipbedingt nicht in die Auswertung ein (Kapoor u. a., 2003). Die Immobilisierung des PS ermöglicht damit den Einsatz für quantitative Messungen. Außerdem könnte immobilisiertes PS die Verhältnisse auf der Bakterienoberfläche potentiell besser abbilden als kurze Oligosaccharidfragmente in Lösung. Bei PS-Immobilisierung ist mit einer lokal höheren Konzentration sowie einer Vororientierung der PS-Moleküle zu rechnen. Beides trifft auf bakterielle Membranen zu und spielt eine Rolle bei der Interaktion von TSPs mit den Rezeptoren *in vivo*.

Das Kernsaccharid bildet einen natürlichen Abstandshalter zur Oberfläche und spielt eine Schlüsselrolle bei der Immobilisierungsreaktion. Es unterscheidet sich in der Zusammensetzung von dem bindenden O-Ag, so dass man spezifisch die verfügbaren chemischen Gruppen für die Immobilisierung nutzen kann. Dadurch bleibt das bindende O-Ag chemisch unverändert und zugänglich, was essentiell für die Interaktionsmessung ist. Im Fall von *Salmonella* enthält das Kernsaccharid einige Kohlenhydrate, die sich chemisch von den Hexosen des O-Ags unterscheiden: mindestens ein N-Acetylglucosamin, bis zu drei Heptosen und mindestens einen KDO-Rest (Olsthoorn u. a., 2000). Darüber hinaus wurden nicht-stöchiometrische Modifikationen in Form von Phosphoethanolamin dokumentiert (Raetz und Whitfield, 2002; Kanipes u. a., 2001; Tamayo u. a., 2005). Keines der enthaltenen Kohlenhydrate verfügt über chemische Gruppen, die sich für eine direkte Immobilisierung auf Polycarboxylat-Oberflächen eignen. Die Phosphoethanolamin-Modifikation stellt hingegen eine primäre Aminogruppe zur Verfügung, die z. B. mit EDC/NHS-Chemie an eine Carboxymethyldextran-Oberfläche gekoppelt werden kann. Mit der Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit das isolierte, nicht derivatisierte PS aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 erfolgreich immobilisiert. Die Immobilisierung wurde durch spezifische Bindung einer P22TSP-Sonde bestätigt.

Ein zentrales Problem bei den durchgeführten Messungen stellte die Regeneration der Chip-Oberfläche nach einer TSP-Injektion dar. Aufgrund der hohen Anzahl an Bindungsstellen verlief die Freisetzung des gebundenen TSPs ineffektiv. Der Einsatz milder Regenerationsbedingungen mit 1 M NaCl in 0,1 M Borsäure (pH 9) führte nicht zu vollständiger Oberflächenregeneration. Die alternativ zur Regeneration eingesetzte verdünnte Natronlauge führte zum Abfall der Basislinie bzw. reduzierte die Menge des immobilisierten PS. Eine partielle Zerstörung der Polycarboxylat-Chipoberfläche ist unwahrscheinlich, da diese in einem weiten pH-Bereich zwischen 1 und 13 stabil ist. Der Grund hierfür ist vermutlich die Spaltung der baselabilen Phosphodiesterbindung, über die das Phosphoethanolamin am Kernsaccharid gebunden ist (Warren, Kowalski

und Wallas, 1977; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Weitere Bedingungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet werden. Durch den Einsatz von Regenerationsbedingungen mit $\text{pH} < 6$ (z. B. Na-Acetat) könnte jedoch eine effektivere Regeneration von PS-beschichteten SPR-Oberflächen erreicht werden (persönliche Kommunikation mit Dr. Stefanie Barbirz). Eine effektivere Freisetzung der gebundenen TSPs könnte vermutlich erreicht werden, indem man die Anzahl der Bindungsstellen auf der Oberfläche reduziert. Um das zu erreichen, kann eine SPR-Chipoberfläche mit einer geringeren Schichtdicke und einem niedrigeren Gehalt an reaktiven Carboxyl-Gruppen eingesetzt werden. Alternativ könnten weitere Regenerationsbedingungen getestet werden, bei denen chaotrope Salze oder Detergenzien zum Einsatz kommen, um einzelne Interaktionen zwischen den TSP und dem O-Ag wie Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen zu schwächen. Insgesamt besteht ein Optimierungsbedarf hinsichtlich der Regeneration der SPR-Chipoberfläche.

Darüber hinaus gibt es neben Gattungen wie *Escherichia* und *Neisseria*, die ebenfalls durch Phosphoethanolamin modifiziert sind, Gattungen wie *Klebsiella*, bei denen Modifikationen dieser Art nicht beobachtet wurden (Müller-Loennies, Lindner und Brade, 2003; O'Connor u. a., 2006; Raetz und Whitfield, 2002). Als eine Alternative könnte eine Immobilisierung über KDO-Reste erfolgen, die beispielweise mit einem Adipinsäure-Dihydrazidadapter derivatisiert werden können (Micoli, Rondini u. a., 2012; Cho u. a., 2009). Vorteilhaft wäre dabei, dass KDO-Reste bei den meisten gramnegativen Bakterien vorhanden sind, wodurch eine einheitliche Immobilisierungsprozedur für viele Gattungen möglich wäre. Außerdem ist der KDO-Rest bzw. die Säurefunktion terminal am reduzierenden Ende des PS positioniert. Dies erlaubt eine selektive Derivatisierung und damit eine gerichtete Bindung von PS an die SPR-Chipoberfläche, ähnlich zu der in dieser Arbeit durchgeführten Immobilisierung. Nichtsdestotrotz bietet die Phosphoethanolamin-basierte Immobilisierung eine schnelle Alternative ohne zusätzliche Derivatisierungsschritte für Bakterienstämme, die über diese Modifikation verfügen. Auch wenn das Ausmaß der Modifikation durch Phosphoethanolamin für einige *Salmonella*-Stämme zwischen 15–43% betragen kann (Micoli, Rondini u. a., 2012), kann eine schwache Modifizierung durch einen Überschuss an PS während der Immobilisierung kompensiert werden. Daneben besteht theoretisch die Möglichkeit, die Modifizierung des Kernsaccharids zu erzwingen oder deren Ausmaß zu erhöhen, da die beteiligten Gene bekannt sind. Bei *Salmonella* ist das Genprodukt von *cptA* für die Modifikation sowie das Zweikomponentensystem aus Proteinen PmrA/PmrB für die Regulation verantwortlich (Tamayo u. a., 2005). Eine Aktivierung des PmrA/PmrB-Regulationssystems kann unter anderem durch Zugabe von Fe^{3+} oder Al^{3+} erreicht werden, was die Ausbeute der modifizierten PS-Ketten potentiell erhöhen könnte (Nishino u. a., 2006). Der Einsatz dieser speziellen Wachstumsbedingungen muss die Möglichkeit in den Betracht gezogen werden, dass

solche Bedingungen unter Umständen in einer Veränderung der Zusammensetzung oder der Länge der O-Ag-Ketten resultieren können (Farizano u. a., 2012).

4.2.2 Immobilisierung von derivatisierten Oligosaccharidfragmenten für Oberflächenplasmonresonanz-basierte Interaktionsmessungen

Im Unterschied zum PS stellt das 3RU-Oligosaccharidfragment einen definierten Interaktionspartner von TSPs mit einer homogenen chemischen Zusammensetzung dar. Dies ist speziell von Bedeutung, wenn die Fragestellung weniger auf die Bindung eines TSPs an die bakterielle Oberfläche zielt, sondern das System aus Oligosaccharid und TSP als Modell für die Interaktion zwischen Proteinen und Kohlenhydraten herangezogen wird. Die chemisch homogenen Oligosaccharidfragmente sind auch für fluoreszenzbasierte Titrationsexperimente oder isotherme Titrationskalorimetrie geeignet, sodass verschiedene Bindungsparameter für ein Interaktionssystem aus Oligosaccharid und Protein bestimmt werden können. Durch den Vergleich der lösungsmittel- und oberflächenbasierten Methoden wäre es z. B. möglich, Oberflächeneffekte zu adressieren, die bei einer SPR-Messung oder einer Bindung an Membranstrukturen auftreten können.

Die Immobilisierung von kleineren Oligosacchariden erfordert in der Regel eine Derivatisierung mit einem Adapter, der geeignete reaktive Gruppen (z. B. Amino-, Hydrazid-, Thiol-, Epoxy-Gruppe) zur Verfügung stellt (Rillahan und Paulson, 2011; Gedig, 2008). Ein wichtiger Aspekt der Derivatisierung ist dabei die Erhaltung der Ringstruktur des betroffenen Saccharidrests. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Oligosaccharidfragment aus 3RU war die Erhaltung der Ringstruktur essentiell, da 2RU als minimaler Interaktionspartner von P22TSP in fluoreszenzbasierten Bindungsassays und kristallographischen Studien charakterisiert wurde (U. Baxa, Cooper u. a., 2001; U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Daher wurde ein bi-funktionaler Oxaminadapter eingesetzt, der einerseits eine primäre Aminogruppe bereitstellt und andererseits die Ringstruktur am reduzierenden Ende erhält (Bohorov u. a., 2006).

Der Erfolg der Derivatisierung des 3RU-Fragments mit dem Oxaminadapter wurde durch Massenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ bestätigt. Eine effektive Immobilisierung des resultierenden Oligosaccharids auf einer SPR-Oberfläche ist jedoch nicht gelungen. Ein Grund dafür ist vermutlich eine langsame Kinetik der Immobilisierungsreaktion zusammen mit einer geringen Menge an verfügbarem derivatisiertem Oligosaccharid. Eine Immobilisierung von Kohlenhydraten über den Oxaminadapter wurde in einer Chip- bzw. *Microarray*-Studie gezeigt (Bohorov u. a., 2006). Im Unterschied zu SPR-Experimenten handelt es sich dabei nicht um ein Durchflusssystem. Das ermöglicht es, Immobilisierungsschritte mit einer geringen verfügbaren Menge an Oligosaccharid über mehrere Stunden durchzuführen, um ausreichend Material auf einem *Microarray* immobilisieren zu können. Eine mögliche Lösung wäre daher, die

Oligosaccharidfragmente außerhalb des SPR-Geräts auf dem SPR-Chip zu immobilisieren und erst danach ins Flusssystem einzubauen. Es ist anzumerken, dass die Reaktionskinetik der EDC/NHS-vermittelten Immobilisierung ausreichend schnell und für die SPR-basierten Experimente grundsätzlich geeignet ist (Gedig, 2008). Für die beobachtete niedrige Effizienz bei der Immobilisierung über den bi-funktionalen Oxaminadapter ist vermutlich die fehlende Anreicherung des Oligosaccharids auf der Oberfläche des SPR-Chips verantwortlich. Die Voranreicherung des Liganden an der SPR-Oberfläche kann die Effizienz der Immobilisierung entscheidend beeinflussen (Gedig, 2008). Eine Optimierungsstrategie für die Immobilisierung wäre der Einsatz von SPR-Chipoberflächen mit einer höheren Schichtdicke und gleichzeitig einer höheren Dichte der Carboxyl-Gruppen. Neben der Immobilisierung wäre der Einsatz der Oberflächen mit einer hohen Kapazität auch für die Messung vorteilhaft: Da pro 3RU-Molekül nur eine potentielle Bindungsstelle für ein TSP vorliegt, könnte bei einer höheren Beladung ein besseres Signal-Rauschverhältnis erreicht werden. Alternativ wäre eine Derivatisierung des Oligosaccharidfragments mit einem mehrfach geladenen Adapter in Betracht zu ziehen. Dadurch könnte eine effektivere elektrostatische Anreicherung des Oligosaccharids auf der Oberfläche und folglich eine effektivere Immobilisierung erreicht werden.

4.3 Effekte der nicht-stöchiometrischen Modifikationen des O-Ags auf das Bindungsverhalten von 9NATSP und P22TSP

4.3.1 Methoden zur Analyse der Produktprofile aus einem O-Ag-Verdau durch TSPs

Die in ELITA- und FACS-Bindungstests eingesetzten TSPs enthielten jeweils eine Mutation, um ihre katalytische Aktivität zu unterbinden ohne dabei ihre Bindung an das O-Ag zu verändern (Andres, Roske u. a., 2012; U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Bei einem Wildtyp-TSP hingegen ist die Bindung an ein geeignetes O-Ag unmittelbar an eine Spaltung der O-glycosidischen Bindung gekoppelt. Da einige der charakterisierten *Salmonella*-Stämme ausgeprägt unterschiedliche Bindungseffizienzen an P22TSP und 9NATSP zeigten, wurde die katalytische Aktivität der TSPs verglichen. Einen Hinweis darauf, wie effizient eine O-Ag-Variante durch ein TSP umgesetzt wird, liefern die Verdauprofile. Die Effizienz des Verdauens durch ein TSP wurden auf der Grundlage bewertet, dass das 2RU-Fragment das Hauptprodukt eines vollständigen Verdauens darstellt (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Andres, Ulrich Baxa u. a., 2010). Die Dominanz längerer Fragmente deutet demnach auf einen unvollständigen Umsatz des O-Ags hin und qualifiziert dieses O-Ag als ein weniger geeignetes Substrat.

Mehrere Möglichkeiten sind verfügbar, um Verdauprofile eines TSPs zu erhalten: Es können komplette Zellen oder isoliertes LPS mit einem Bakteriophagen oder einem TSP inkubiert werden, wobei die freigesetzten Oligosaccharidfragmente durch Dialyse getrennt und chemisch charakterisiert werden können (Eriksson und Lindberg, 1977; Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981). In dieser Arbeit wurden zwei Kombinationen der Methoden eingesetzt. Die Analyse der Produktverteilungen nach dem Verdau von LPS erfolgte mit der Kapillargelelektrophorese (CE). Das LPS unterscheidet sich vom PS durch die Präsenz von Lipid A. Die hydrophoben Ketten von Lipid A führen dazu, dass LPS in wässrigen Lösungen Aggregate unterschiedlicher Größe und Morphologie bildet (Kastowsky, Gutberlet und Bradaczek, 1993; Aurell und Wiström, 1998; Aurell, Hawley und Wiström, 1999; Andres, Roske u. a., 2012). Das PS enthält keine stark hydrophoben Anteile und bleibt daher in Lösung. Die Präsenz lamellarer Aggregate von LPS ist die Voraussetzung für eine Ejektion der Bakteriophagen-DNA, während PS keine DNA-Ejektion bei Bakteriophagen auslöst (Andres, Hanke u. a., 2010; Andres, Roske u. a., 2012). Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass dieses Aggregationsverhalten von LPS die Bindung von TSPs signifikant beeinflusst (U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996; Andres, Ulrich Baxa u. a., 2010). Die CE erlaubte die Trennung der 2RU-Oligosaccharidfragmente der O-Ag-Variante O4 von den nicht-stöchiometrisch modifizierten Varianten, die eine zusätzliche Glucosylierung oder eine Acetylierung trugen.

Die zweite Kombination analytischer Methoden, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, setzt sich aus dem Verdau des PS, der Größenausschluss-HPLC zur Trennung der Oligosaccharidfragmente und anschließender MALDI-MS zusammen. Die Auftrennung der modifizierten und nicht-modifizierten Oligosaccharidfragmente, wie sie bei CE beobachtet wurde, war mit der eingesetzten HPLC nicht möglich. Da Retentionszeiten der modifizierten und nicht-modifizierten Formen in der HPLC sehr ähnlich waren, wurden diese Fragmente mit einer minimalen Verzögerung eluiert, was sich teilweise negativ auf die Peakbreite auswirkte. Dafür erlaubte der Einsatz von HPLC eine präparative Aufreinigung der 2RU-Fragmente, die anschließend mittels MALDI-MS hinsichtlich ihrer Zusammensetzung charakterisiert werden konnten. Präzisere Aussagen hinsichtlich der Struktur der Oligosaccharidfragmente wären allerdings mit fragmentierenden Varianten der Massenspektrometrie (MS/MS) möglich. Optimal wäre eine Kopplung von CE an die MS/MS. Diese Kombination würde es ermöglichen, die Vorteile einer höherer Trennleistung der CE mit der strukturellen Analyse der aufgetrennten Fragmente zu verbinden (Kilár, Dörnyei und Kocsis, 2013; Banoub u. a., 2010; Zamfir, 2007).

Die Auswertung der Produktprofile aus den CE- und HPLC-Läufen basierte auf dem Vergleich der relativen Intensitäten der Peaks für Oligosaccharidprodukte verschiedener Längen sowie der modifizierten und nicht-modifizierten Formen im

Fall von CE. Um die Vergleichbarkeit der Intensitäten bzw. der Produktprofile zu verbessern, können den Verdauansätzen Standards zugesetzt werden. Dabei bieten sich Mono- oder Disaccharide mit einer vom O-Ag abweichenden Zusammensetzung an, die nachweislich nicht mit der Bindung und der Rhamnosidaseaktivität der TSPs interferieren. Da Kohlenhydrate als Standards eingesetzt würden, könnte man davon ausgehen, dass sie sich bei allen Verarbeitungsschritten der Verdauansätze (z. B. Ethanol-fällung) ähnlich zu den Oligosaccharidprodukten verhalten werden. Nach der Auftrennung der Oligosaccharidfragmente könnten die Peakintensitäten von Produkten (2RU, 3RU) auf die Intensität des Standards normiert werden.

Auf einige *Salmonella*-Stämme wurden beide analytische Methoden, CE und HPLC/MALDI-MS, angewandt. Die erhaltenen Produktprofile sind weitgehend vergleichbar. Das bedeutet, dass die Unterschiede in der Umsetzung des jeweiligen O-Ags durch das P22TSP und 9NATSP unabhängig von der eingesetzten Methode beobachtet wurden. Dies bestätigt die Validität der erhaltenen Daten und der abgeleiteten Effekte auf die Bindung bzw. den Verdau des O-Ags durch die eingesetzten TSPs.

4.3.2 Produktprofile von 9NATSP und P22TSP beim Verdau des nicht-modifizierten O4-Ags

Der Stamm *Salmonella* Heidelberg 13-00586 wurde sowohl mittels CE als auch mittels HPLC hinsichtlich der Produktverteilungen beider TSPs untersucht. Beide Methoden zeigten minimale Unterschiede zwischen 9NATSP und P22TSP, wobei P22TSP etwas effektiver war. Dies korreliert insofern mit den Daten der Bindungstests, dass sowohl ELITA als auch die FACS-basierte Messung P22TSP als einen minimal besseren Binder für diesen Stamm identifizierten. Die Massenspektrometrie der 2RU-Fragmente deutet darauf hin, dass das O-Ag von *Salmonella* Heidelberg 13-00586 unmodifiziert vorliegt. Die Peakintensitäten der HPLC-Läufe zeigen, dass P22TSP etwa 10 % mehr vom 2RU-Fragment produzierte als 9NATSP. Ob Unterschiede in dieser Größe allerdings signifikant sind, lässt sich ohne geeignete Standards nicht abschätzen. In der CE sind die Intensitätsunterschiede beim 2RU-Peak ebenfalls nicht eindeutig. Dafür wurden bei dem Ansatz mit 9NATSP höhere Mengen an längerem Produkt, 3RU-Oligosaccharidfragment, beobachtet. Die Tatsache, dass mehr längere Produkte gebildet wurden, kann als eine etwas niedrigere Effizienz von 9NATSP bei der Spaltung des O-Ags interpretiert werden. Insgesamt stimmen die Ergebnisse der Bindungstests für den Stamm Heidelberg 13-00586 mit den Aktivitätsdaten aus den Produktverteilungen sowie Massenspektrometriedaten überein.

4.3.3 Effekt der Acetylierung auf Bindung und katalytische Aktivität von 9NATSP und P22TSP

Von besonderem Interesse waren die Stämme, die serologisch als O4,5 charakterisiert wurden und folglich eine Acetylierung an der ABequose-Position C2 tragen (Grimont und Weill, 2007; Zandomenighi u. a., 2012). Tatsächlich wurden für diese Stämme unterschiedliche Produktprofile der TSPs in Verbindung mit der Acetylierung des O-Ags beobachtet. Zum einen interferiert die Acetylierung mit der katalytischen Aktivität von P22TSP. Nach dem Verdau von Wildtyp-O-Ag aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 und von chemisch de-O-acetyliertem O-Ag aus dem gleichen Stamm wurden deutliche Unterschiede in den Produktverteilungen (HPLC) beobachtet. Diese deuten darauf hin, dass beim Verdau des acetylierten O-Ags neben dem Hauptprodukt mit 2RU signifikante Mengen an längeren Produkten gebildet werden. Da 2RU als Endprodukt beim Verdau betrachtet werden kann, deuten längere Oligosaccharidprodukte auf eine unvollständige Umsetzung des O-Ags durch P22TSP hin. Die de-O-acetylierte Variante des O-Ags zeigt beim Verdau fast ausschließlich 2RU-Produkte und liefert höhere Ausbeuten, was auf eine vollständige Umsetzung hinweist.

Die massenspektrometrische Analyse der 2RU-Fragmente aus dem Verdau des O4,5-Ags aus *Salmonella* Typhimurium DB7136 zeigte Massen für eine nicht acetylierte Form, eine Form mit einer acetylierten RU und eine vollständig acetylierte Form des O-Ags. Die Auswertung der Peakintensität erfolgte unter der Annahme, dass bei ähnlichen Oligosaccharidfragmenten die Peakintensität semi-quantitativ mit den jeweiligen Mengen im analysierten Gemisch korreliert (Szájli, Fehér und Medzihradsky, 2008; El-Hawiet, Kitova und Klassen, 2012). Die beobachtete Intensitätsverteilung der Peaks für die acetylierten und die nicht acetylierte Formen des O-Ags war entsprechend 1:2:1. Da die analysierten Fragmente aus dem Verdau mit P22TSP stammen, spiegelt die Intensitätsverteilung potentiell sowohl die tatsächliche Verteilung der O-Acetylierung in den O-Ag-Ketten als auch die Präferenz von P22TSP. Im ersten Fall kann die Intensitätsverteilung der Peaks als eine zufällige, statistische Verteilung der nicht-stöchiometrischen O-Acetylierung entlang der O-Ag-Ketten interpretiert werden. Dafür spricht auch die Intensitätsverteilung in Massenspektren der 3RU-Produkte aus dem gleichen Verdau: Es wurden alle Formen von nicht acetyliert über einfach und doppelt acetyliert bis vollständig acetyliert im Verhältnis von etwa 1:3:3:1 beobachtet (Spektrum nicht gezeigt). Diese Verteilung könnte ebenfalls eine statistische Natur der Acetylierung repräsentieren. Theoretisch könnte die Intensitätsverteilung von 1:2:1 auch darauf hindeuten, dass P22TSP besonders effektiv O-Ag-Abschnitte mit abwechselnd acetylierten RU prozessiert, da 2RU-Fragmente mit einer acetylierten RU im MS-Produktspektrum die höchste Intensität zeigen. In

diesem Zusammenhang wäre es besonders interessant die tatsächliche Position der O-Acetylierung zu bestimmen bzw. zu bestimmen, ob ausschließlich die Abequose am reduzierenden Ende oder am nicht-reduzierenden Ende des 2RU-Fragments toleriert wird. Die kristallographische Struktur des Komplexes aus P22TSP und 2RU zeigt, dass beide RU entlang der Bindungsachse um ca. 180° gegeneinander verdreht sind (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Das bedeutet, die Bindungsstelle von P22TSP interagiert mit unterschiedlichen Teilen der Oberfläche der beiden RU. Entsprechend könnte sich eine Acetylierung an der Abequose am nicht reduzierenden Ende des 2RU-Fragments ungünstig auf die Interaktion auswirken, während die alternative Acetylierung an der Abequose am reduzierenden Ende nicht durch die Bindungsstelle von P22TSP erfasst wird (Abb. 4.2). Gleichzeitig stehen die Ergebnisse im Einklang mit den Daten aus früheren Studien, denen zufolge Abequose eine essentielle Rolle bei der Interaktion von TSP und O-Ag spielt (U. Baxa, Cooper u. a., 2001). Die eingesetzte MALDI-MS-Methode ohne die Verwendung von MS/MS-Methode erlaubt keine Lokalisierung der beobachteten Acetylierung, was den Einsatz alternativer Methoden wie z. B. MS/MS oder NMR nötig macht.

Interessanterweise geben die Ergebnisse der Bindungstests nicht die Beobachtungen bei Produktverteilungen wieder. Während die Produktverteilungen des Stamms *Salmonella* Typhimurium DB7136 auf eine deutlich bessere Substratkompatibilität von 9NATSP hindeuten, charakterisieren ELITA und FACS beide TSPs als nahezu gleich gute Binder. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Dynamik der Acetylierung. Zandomenighi u. a. (2012) berichtet von signifikanter Veränderung der Acetylierung im Laufe der Kultivierung sowie in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen (aerob/anaerob, pH-Wert). Zusammen mit der Tatsache, dass diese Veränderungen nur in lebenden Zellen beobachtet werden, liegt es nahe, dass der Umfang der Acetylierung durch physiologische Regulationsmechanismen kontrolliert ist (Zandomenighi u. a., 2012). Für beide Bindungstests wurden die *Salmonella*-Stämme etwa 3–5 h bis zum Erreichen einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) zwischen 0,8 und 1,2 kultiviert. Für die Präparation von LPS und PS wurden die Kulturen jedoch über Nacht inkubiert, um die Ausbeute zu maximieren. Unter den eingesetzten Bedingungen können dabei über Nacht Zelldichten von etwa 4,0–6,0 erreicht werden. Unter diesen Umständen kann sich der Umfang der Acetylierung in Bindungsexperimenten und Verdauexperimenten unterscheiden. Eine Möglichkeit, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus Verdauexperimenten zu verbessern, besteht durch den Einsatz eines Fermenters. Dadurch können Schlüsselparameter wie pH-Wert, Sauerstoffgehalt und die Verfügbarkeit von Nährstoffen konstant gehalten werden. Alternativ wäre es möglich, ganze inaktivierte Zellen, die bis zu einer definierten Dichte angezogen sind, mit einem TSP zu inkubieren (Eriksson und Lindberg, 1977). Die Menge der gewonnenen Oligosaccharidfragmente würde für sensitive Methoden wie CE

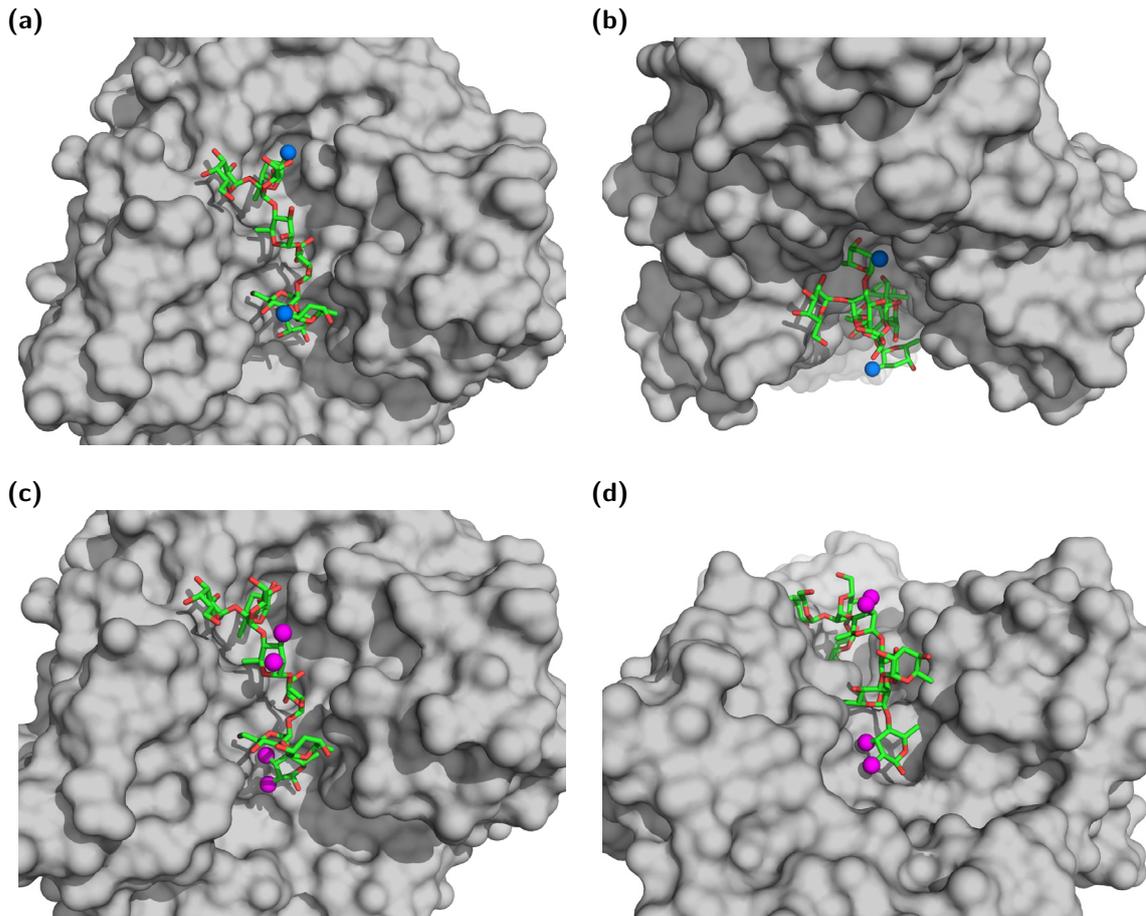


Abbildung 4.2: Acetylierungspositionen auf Oligosaccharidfragmenten, gebunden an P22TSP. **(a)** Frontalansicht der Bindungstasche von P22TSP (grau, raumfüllende Darstellung) mit dem gebundenen 2RU-Fragment (grün, rot) der Serogruppe O4, PDB: 1TYX (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Die Sauerstoffatome an den Abequose-Resten an der Position C2 (blau) sind beim O4,5-Ag acetyliert. **(b)** Die Struktur aus (a), Ansicht von schräg oben verdeutlicht die Orientierung der im O4,5-Ag acetylierten Gruppen. Bei der repetitiven Einheit am reduzierenden Ende zeigt die potentielle Acetylierung zum Lösungsmittel. Die Position der Acetylierung der Abequose am nicht reduzierenden Ende liegt direkt an der Proteinoberfläche. **(c)** Die Struktur analog zu (a) mit den Sauerstoffatomen an den Rhamnose-Positionen C2 und C3 (magenta), die infolge einer Lysogenisierung durch Bakteriophagen A2 oder A3 acetyliert werden können (Wollin, Stocker und Lindberg, 1987). **(d)** Die Struktur aus (c), Ansicht von schräg unten zur Verdeutlichung der Orientierung der potentiell acetylierten Positionen der Rhamnose-Reste. Die Positionen nahe dem reduzierenden Ende liegen unmittelbar an der Proteinoberfläche. Die äquivalenten Positionen am nicht-reduzierenden Ende sind zum Lösungsmittel hin orientiert.

und Massenspektrometrie vermutlich ausreichen. Auf diese Weise könnte man für ELITA- und FACS-Bindungstests sowie für Verdauexperimente eine vergleichbare Zusammensetzung des O-Ags erreichen, da alle Messungen mit Zellaliquots aus einer Kultur durchführbar wären. Es wäre jedoch zu beachten, dass die auf diese Weise gewonnenen absoluten Produktmengen zwischen unterschiedlichen Stämmen nur eingeschränkt vergleichbar wären. Neben der Menge an eingesetzten Zellen ist die Länge der O-Ag-Ketten und somit die Menge an verfügbarem Substrat pro Zelle für die Produktmengen entscheidend.

Für zwei weitere Stämme, die serologisch als O4,5 charakterisiert wurden, liegen CE-

Daten vor: *Salmonella* Heidelberg 13-00308 und *Salmonella* Typhimurium 13-01225. Für den Stamm Typhimurium 13-01225 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden TSPs sowie keine nennenswerten Anteile von 3RU in den Produktverteilungen beobachtet. Ein möglicher Grund könnte das Ausmaß der Acetylierung sein, das einerseits für O_{4,5}-positive Ergebnisse bei der Serotypisierung ausreicht und andererseits zu gering ist, um die Produktverteilung beim Verdau zu beeinflussen. Um eine genaue Aussage bezüglich der Acetylierung zu treffen, müssten auch bei diesem Stamm die entstehenden Fragmente mittels MS/MS oder NMR untersucht werden. Darüber hinaus können mit den vorhandenen Daten weitere Modifikationen des O-Ags nicht ausgeschlossen werden, die nicht durch die Serotypisierung erfasst werden. Dafür sprechen die ELITA-Bindungsdaten, die keine Bindung durch 9NATSP und eine vergleichsweise schwache Bindung durch P22TSP zeigten.

Der Stamm *Salmonella* Heidelberg 13-00308 zeigte für P22TSP eine noch stärker ausgeprägte Abweichung der Produktverteilung vom Idealfall mit 2RU, als Hauptprodukt als es bei *Salmonella* Typhimurium DB7136 beobachtet wurde. Statt einer Verschiebung der Produktverteilung zugunsten längerer Oligosaccharidfragmente wurden kaum Produkte detektiert. Dies könnte wiederum mit dem Ausmaß der Acetylierung zusammenhängen und gleichzeitig die Vermutung erhärten, dass beide möglichen Acetylierungspositionen beim Substrat unterschiedlich stark interferieren. D. h. wenn ein überwiegender Anteil einer O-Ag-Kette acetyliert vorliegt, gibt es kaum Stellen, die ein effektives Substrat für P22TSP darstellen. Auch beim ELITA-Bindungstest wurde nur eine minimale Bindung von P22TSP bei diesem Stamm beobachtet. Beim Verdau von LPS aus *Salmonella* Heidelberg 13-00308 mit 9NATSP wurden 2RU-Fragmente produziert, was auf eine effektive Umsetzung hindeutet. Zusammen mit den positiven Ergebnissen der Bindungstests könnten die Daten als ein Hinweis darauf interpretiert werden, dass 9NATSP eine O-Acetylierung der Abequose potentiell besser tolerieren könnte als P22TSP. Allerdings basiert diese Argumentation hinsichtlich der O-Ag-Struktur auf der Serotypisierung. Für eine zuverlässige Aussage über die Bindungseigenschaften von 9NATSP in Bezug auf die Acetylierung sind genauere Informationen über die Zusammensetzung und die Struktur des O-Ags aus MS/MS-Experimenten nötig. Außerdem könnte das PS aus den Stämmen *Salmonella* Typhimurium DB7136 und Heidelberg 13-00308 chemisch deacetyliert und neben der acetylierten Form auf einem SPR-Chip immobilisiert werden. Auf diese Weise könnte der Einfluss der Acetylierung auf die Bindung beider TSPs erfasst werden.

Interessanterweise wurden bei MALDI-MS der Verdauprodukte auch beim Stamm *Salmonella* Paratyphi B zusätzliche Peaks detektiert, die aufgrund der Massendifferenzen auf eine Acetylierung hindeuten. Gleichzeitig wurde der Stamm serologisch als

O4,5-negativ getestet, was eine Acetylierung der Aequose ausschließt. Theoretisch wäre eine alternative Position der Acetylierung an der Rhamnose möglich, wie sie von Wollin, Stocker und Lindberg (1987) als Folge einer Lysogenisierung durch Bakteriophagen A3 und A4 beschrieben wurde. Auch diese Art der Acetylierung würde vermutlich mit der Bindung von 9NATSP und P22TSP interferieren, da die betroffenen Positionen C2 und C3 der Rhamnose bei einer RU am reduzierenden Ende des gebundenen Oligosaccharidfragments zur Proteinoberfläche orientiert wären (Abb. 4.2). Anders als beim Stamm *Salmonella* Typhimurium DB7136 wurden bei Paratyphi B keine vollständig acetylierten 2RU-Fragmente in der Massenspektrometrie beobachtet. Dies kann ein Hinweis auf eine strikte Inkompatibilität der TSPs mit dem vollständig acetylierten O-Ag sein, wie es zuvor für den Stamm *Salmonella* Heidelberg 13-00308 beobachtet wurde.

Gleichzeitig zeigt Paratyphi B neben der Acetylierung auch eine Glucosylierung des O-Ags. Diese kann mit der Bindung bzw. Rhamnosidaseaktivität von P22TSP interferieren, wie es für P22-lysogenisierte *Salmonella*-Stämme beobachtet wurde (Andres, Gohlke u. a., 2013; Eriksson, Svenson u. a., 1979; Lüderitz, Staub und Westphal, 1966). Die Effekte der Glucosylierung werden detailliert im Abschnitt 4.3.4 diskutiert. Fest steht jedoch, dass sowohl die Acetylierung als auch die Glucosylierung die Aktivität der TSPs beeinflussen können. Demnach wäre es vorstellbar, dass ein komplexes Zusammenwirken der beiden vorhandenen Modifikationen für die beobachtete Verteilung der Acetylierung in MALDI-Massenspektren sowie Produktprofilen aus HPLC-Läufen für den Stamm *Salmonella* Paratyphi B verantwortlich ist.

4.3.4 Effekt der Glucosylierung auf Bindung und die katalytische Aktivität von 9NATSP und P22TSP

Die 2RU-Oligosaccharidfragmente aus den *Salmonella*-Stämmen Paratyphi B, Brancaster und Kalamu zeigten in MALDI-MS Signale, deren Massendifferenz zu 2RU-Peaks auf eine zusätzliche Hexose pro RU hindeutet. In der Literatur sind zwei O-Ag-Varianten beschrieben, bei denen Galactose an den Positionen C4 und C6 glucosyliert vorliegt (B. Liu u. a., 2013; Micoli, Ravenscroft u. a., 2013; Lüderitz, Staub und Westphal, 1966). Das bedeutet, die drei *Salmonella*-Stämme exprimieren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit das O-Ag mit einer Glucosylierung an der Galactose. Die genaue Position der Glucosylierung kann aus den vorliegenden MALDI-MS-Daten nicht abgeleitet werden. Dies macht einen direkten Vergleich zwischen den Stämmen schwierig, da man die beobachteten, gegebenenfalls gegensätzlichen Effekte nicht einer der beiden möglichen Glucosylierungen zuordnen kann. Andererseits sind die Effekte der beiden Glucosylierungen auf die hydrolytische Aktivität der gesamten Bakteriophagen P22TSP und 9NATSP bekannt (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Da beide Bakteriophagen über jeweils einen Typ von

TSP verfügen, kann man vom beobachteten Verhalten der TSPs in erster Näherung auf die Art der Glucosylierung schließen. Ein zweiter Aspekt ist das Ausmaß der Glucosylierung der drei Stämme. Die Peakintensitäten in Massenspektren legen es nahe, dass bei Brancaster und Kalamu etwa 80 % der 2RU-Oligosaccharidfragmente glucosyliert sind, die durch 9NATSP-Verdau produziert wurden. Beim Stamm Paratyphi B sind höchstens 40 % der gebildeten Verdauprodukte glucosyliert. Auch bei diesen Daten ist zu beachten, dass sie zum Teil das Ausmaß der Glucosylierung des PS repräsentieren und zum Teil die Präferenz von 9NATSP für eine Glucosylierung abbilden können.

Die Verdauprofile der Stämme Kalamu und Paratyphi B zeigen einen jeweils effektiveren Umsatz des PS durch 9NATSP. Bei der Inkubation mit P22TSP wurden beim Stamm Paratyphi B etwa 50 % weniger Produkte aller Längen gebildet, verglichen mit 9NATSP. Im Fall von *Salmonella* Kalamu wurden bei der Inkubation mit P22TSP kaum Produkte gebildet. In dieser Hinsicht korrelieren die Ergebnisse mit dem Umfang der Glucosylierung: Bei dem Stamm Kalamu liegt laut Peakintensität der MALDI-Massenspektren etwa 90 % des O-Ags glucosyliert vor. Bei Paratyphi B ist das O-Ag weniger stark glucosyliert, wodurch mehr Verdauprodukte als bei Kalamu gebildet werden. Dieser Zusammenhang legt nahe, dass P22TSP in seiner katalytischen Aktivität durch die vorhandene Glucosylierung beeinträchtigt wird. Das gleiche Verhalten wurde im ELITA- und FACS-Bindungstests beobachtet, die 9NATSP sowohl im Fall von *Salmonella* Kalamu als auch im Fall von *Salmonella* Paratyphi B als einen besseren Binder identifizierten.

Noch stärker ist die Korrelation zwischen dem Umfang der Glucosylierung und der Effektivität des Verdaus beim Stamm *Salmonella* Brancaster ausgeprägt. Für diesen Stamm liegen die Daten aus dem LPS-Verdau mit anschließender Analytik über CE vor. Der Verdau von LPS mit 9NATSP lieferte in den CE-Elektropherogrammen einen prominenten 2RU-Peak mit einer Verschiebung in der Retentionszeit, die auf die Glucosylierung zurückzuführen ist. Die Inkubation mit P22TSP zeigte in der CE ein schwaches Signal für 2RU, mit der Retentionszeit des nicht glucosylierten 2RU-Standards. Das deutet darauf hin, dass P22TSP lediglich den nicht glucosylierten Anteil des LPS umsetzen konnte und daher insgesamt deutlich weniger Oligosaccharidfragmente produzierte. Das Ausmaß der Glucosylierung bei diesem Stamm liegt bei etwa 80 %, wie es den Massenspektren der Verdauprodukte zu entnehmen ist. Das bedeutet, für P22TSP stellten lediglich 20 % des O-Ags ein geeignetes Substrat dar. Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in den Ergebnissen der Bindungstests wider. Sie identifizierten 9NATSP als einen deutlich besseren Binder mit den 3- bis 5-fachen höheren Werten als bei P22TSP.

Für die drei *Salmonella* Stämme Brancaster, Kalamu und Paratyphi B wurde im FACS-Experiment eine Aufspaltung in zwei Populationen nach Zugabe von P22TSP

beobachtet. Dabei zeigte Brancaster eine eindeutige Trennung von bindenden und nicht bindenden Zellen und gleichzeitig die schwächste Bindung durch P22TSP, verglichen mit den beiden restlichen glycosylierten Stämmen. Dabei bezieht sich die Stärke der Bindung auf den Anteil der bindenden Zellen in der Gesamtpopulation und nicht auf die Interaktion zwischen dem O-Ag und dem TSP an sich. Die Tatsache, dass im FACS-Experiment eine kleine Population von Zellen eine effektive Bindung durch P22TSP zeigte, deutet darauf hin, dass nicht etwa 80 % des O-Ags pro Zelle glycosyliert vorliegt, sondern etwa 80 % der Zellen das glycosylierte O-Ag exprimieren, während die restlichen Zellen ein nicht glycosyliertes O-Ag herstellen. Diese Konstellation passt auch zu den Produktprofilen aus dem Verdau mit 9NATSP. 9NATSP könnte die Glucosylierung tolerieren und würde das O-Ag sowohl auf den vollständig glycosylierten als auch auf den nicht glycosylierten Zellen verdauen. Das Ergebnis ist ein Produktprofil, bei dem etwa 80 % der Produkte glycosyliert sind. Damit lassen sich zwei Aussagen treffen: zum einen interferiert die beobachtete Glucosylierung des O-Ags mit der Bindung und der katalytischen Aktivität von P22TSP. Damit handelt es sich vermutlich um eine Glucosylierung an der Position C6 der Galactose (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Zum anderen spiegeln die Massenspektren der Produkte nicht nur die durchschnittliche Verteilung der nicht-stöchiometrischen Modifikationen im O-Ag pro Zelle, sondern auch die Verteilung der Subpopulationen, die aufgrund der Phasenvariation zustande kommen kann (Patterson u. a., 2012; Broadbent, Davies und Woude, 2010; van der Woude und Bäumlner, 2004). Eine genauere Aussage über die Herkunft der Verteilung ist im Zusammenhang mit einer FACS-basierten Bindung möglich (Abb. 4.3).

Zwei weitere Stämme, die laut der Serotypisierung glycosylierte Varianten des O9-Ag's exprimieren, sind die Typhi-Stämme T2 und T4. Für diese Stämme liegen nur Ergebnisse der ELITA-Bindungsmessung vor. Der Unterschied zwischen den beiden Stämmen liegt in der Serospezifität O12₂, die nur durch den Stamm Typhi T4 exprimiert wird. Die beiden Stämme zeigten im ELITA-Bindungstest eine Bindung sowohl durch P22TSP als auch durch 9NATSP, wobei für P22TSP eine effektivere Bindung beobachtet wurde. Dies korreliert nicht mit den publizierten Daten, wonach O1-Serotyp, das chemisch mit dem O12₁-Serotyp identisch ist, dem isoliertem PS eine Abbauresistenz gegenüber P22 verleiht (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Die biologische Rolle der Resistenz wird dadurch erklärt, dass die Glucosylierung der Galactose an der Position O6 durch eine P22-Infektion ausgelöst wird und dadurch eine Superinfektion mit dem gleichen Bakteriophagen verhindert (Kim und Ryu, 2012). Eine effektive Bindung von P22TSP steht im Widerspruch zu diesen Daten, da beide Typhi-Stämme serologisch als O12₁ charakterisiert wurden. Die beobachtete Bindung kann unter Umständen dadurch erklärt werden, dass nur ein geringer Anteil des O-Ags die besagte Glucosylierung aufweist. Das

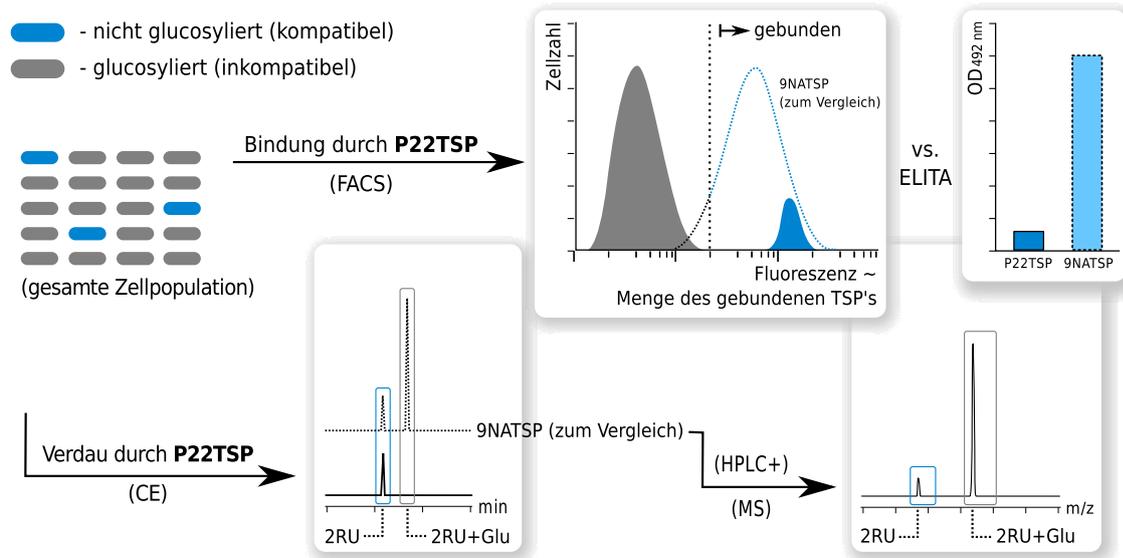


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Informationsgehalts der eingesetzten Methoden bei einem glucosylierten Stamm (z. B. *Salmonella* Brancaster). Die Bakterien mit einem nicht glucosylierten O-Ag (blau) sind kompatibel mit der Bindungstasche von P22TSP. Die restlichen Bakterien sind aufgrund der Glucosylierung des O-Ags resistent gegen Bindung und Verdauung durch P22TSP (grau). Während ELISA eine allgemeine Charakteristik der Bindungseffizienz liefert, erlaubt FACS sowohl die Beurteilung der Bindungseffizienz über die Fluoreszenzintensität als auch eine Einschätzung davon, welcher Anteil der Zellpopulation das glucosylierte O-Ag produziert (Subpopulationen). Diese Daten erlauben im Zusammenhang mit den Verdauungsexperimenten Rückschlüsse auf die Ursachen für eine niedrige Bindungseffizienz bzw. eine ineffiziente Umsetzung des glucosylierten O-Ags durch ein TSP.

restliche O-Ag stünde demnach für die Bindung von P22TSP zur Verfügung. Die Glucosylierung des restlichen O-Ags musste für eine effektive Agglutinerung der Bakterien durch einen anti-O12₁-Antikörper bei Serotypisierung ausreichen. Beim Einsatz von 9NATSP zeigen die *Salmonella* Typhi-Stämme unterschiedliche Bindung, die mit der Expression des O12₂-Ag's zusammenhängt. Der Stamm Typhi T4 mit dem O12₂-Ag zeigt eine schwächere Bindung durch 9NATSP. Dies korreliert wiederum mit den Daten von Wollin, Eriksson und Lindberg (1981), denen zufolge die O12₂-Variante durch P22, nicht aber durch 9NA toleriert wird.

Für P22TSP liegen die Strukturen der Komplexe mit O-Ag-Fragmenten der Serogruppen O2, O4, O9 und O9,12₂ vor. (Andres, Gohlke u. a., 2013; Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996; U. Baxa, Steinbacher u. a., 1996). Da P22TSP mit der Glucosylierung an der Position C6 der Galactose nicht kompatibel ist, ist die kristallographische Struktur des Komplexes mit dem Oligosaccharidfragment des O9,O12₁-Ag's nicht vorhanden (Wollin, Eriksson und Lindberg, 1981; Eriksson, Svenson u. a., 1979). Ein Modell für die unterschiedliche Toleranz von P22TSP und 9NATSP gegenüber dem O12₁ lässt sich auf der Grundlage des Komplexes aus P22TSP und dem O9-Ag herleiten. Da für 9NATSP keine Struktur im Komplex mit dem O9-Ag vorliegt, wird die potentielle Bindungsposition des O-Ag-Fragments durch dreidimensionales *alignment* der beiden TSPs modelliert. Die Vorgehensweise wurde bereits im Abschnitt 4.1.2

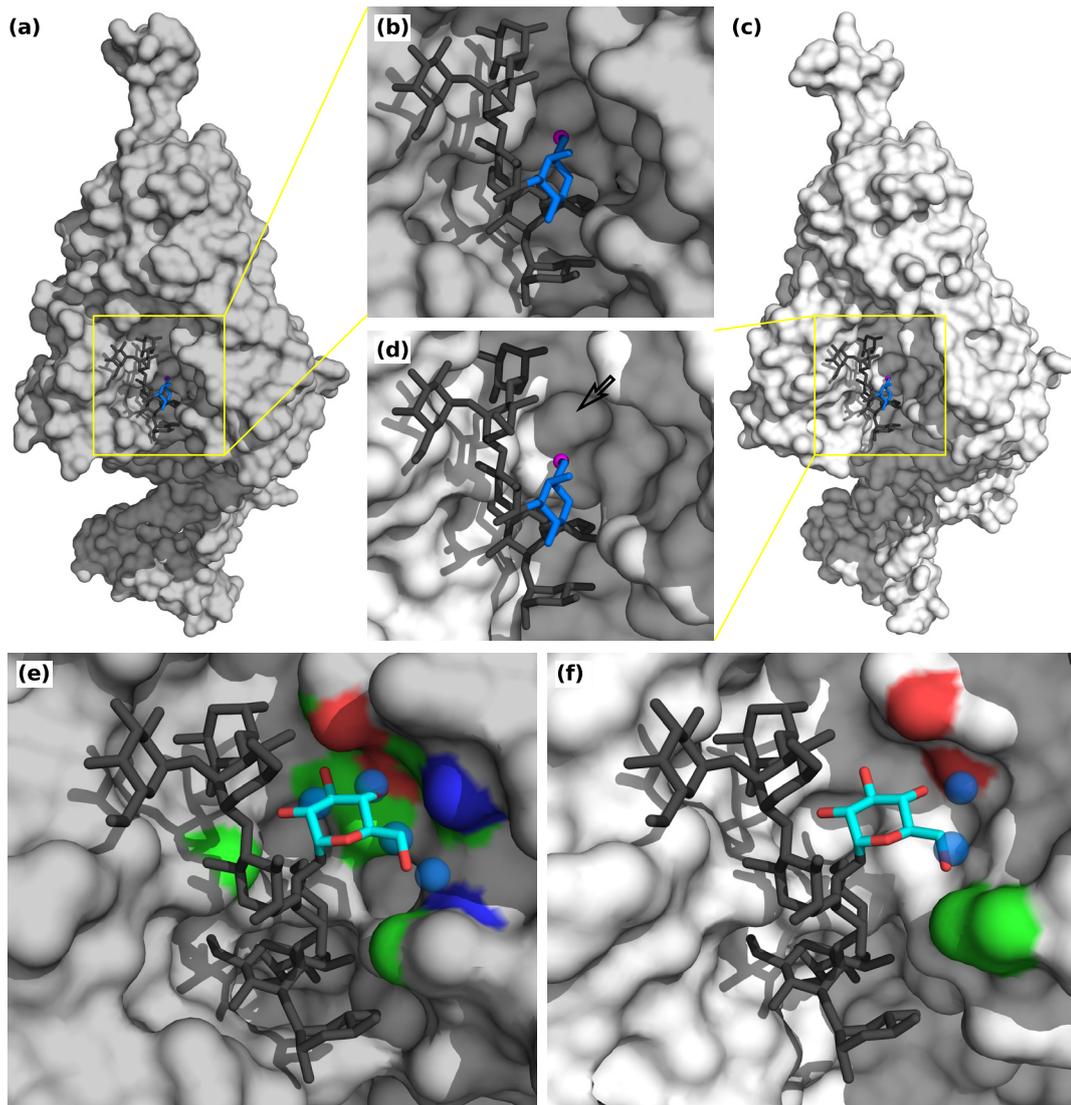


Abbildung 4.4: (a) Die kristallographische Struktur des Komplexes aus P22TSP (raumfüllend, grau) und einem 2RU-Fragment (*stick*-Darstellung, schwarz) des O₉-Ags, PDB: 1TYV (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Die Galactose am reduzierenden Ende (blau) und der Sauerstoff an der Position C6 (Kugeldarstellung, magenta) sind hervorgehoben. Diese Position liegt beim O₁₂₁-Ag glycosyliert vor. (b) Eine vergrößerte Ansicht der Bindungsstelle aus (a) (c) Die kristallographische Struktur eines 9NATSP-Monomers (weiß), PDB: 3RIQ (Andres, Roske u. a., 2012). Analog zur Abbildung 4.1 wurde für die Strukturen von 9NATSP und des P22TSP-Komplexes ein dreidimensionales *alignment* durchgeführt und damit eine potentielle Bindungsposition des 2RU-Fragments in der Bindungsstelle von 9NATSP ermittelt. (d) Eine vergrößerte Ansicht der Bindungsstelle von 9NATSP mit dem hineinmodellierten 2RU-Fragment. Der schwarze Pfeil markiert eine Vertiefung auf der Oberfläche unmittelbar an der Position C6 der Galactose, die beim P22TSP (vgl. mit (b)) nicht vorhanden ist. Diese Vertiefung könnte aufgrund der Dimensionen und der Geometrie einen Teil der Glucose eines O₁₂₂-Ags aufnehmen. (e) Die Ansicht der Bindungsstelle des P22TSP (raumfüllend, grau) im Komplex mit dem 2RU-Fragment (*stick*-Darstellung, schwarz) des O_{9,12}₂-Ags, PDB: 1TYW (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Die Glucose (Kohlenstoff: cyan, Sauerstoff (rot)) an der C4-Position der Galactose ist für die 12₂ verantwortlich. Auf der P22TSP-Oberfläche wurden Atome, die sich in einem Umkreis von 4 Å um den Glucose-Rest befinden, farblich hervorgehoben (C: grün, O: rot, N: blau). Vier Wassermoleküle (Kugeldarstellung, halbtransparent blau) wurden aus der P22TSP-Struktur ohne Ligand übernommen, PDB: 1TYX (Steinbacher, U. Baxa u. a., 1996). Van-der-Waals Radii dieser Wasser-Sauerstoffe kollidieren mit der Glucose im O₁₂₂-Ag und werden vermutlich bei der Bindung verdrängt. (f) Die Bindungsstelle von 9NATSP (weiß) mit dem analog zu (d) hineinmodellierten O_{9,12}₂-Ag-Fragment. Die Farbgebung ist analog zu (e).

beschrieben. Ein direkter Vergleich von P22TSP und 9NATSP zeigt Unterschiede in der Architektur der Bindungsstellen: Bei 9NATSP gibt es in der unmittelbaren Nähe der modellierten Bindungsposition der Galactose eine Vertiefung, die potentiell einen Teil der Glucose fassen könnte (Abb. 4.4 c,d). Die Vertiefung hat eine Breite von etwa 7,8 Å und eine Tiefe von etwa 6,5 Å und enthält sowohl polare als auch unpolare Atome. Die Glucose misst durchschnittlich 5,8 Å bzw. maximal ca. 8 Å entlang der Verbindungslinie zwischen O1 und O6 und würde somit theoretisch in die Vertiefung passen. An der entsprechenden Stelle gibt es bei P22TSP keine Vertiefung bzw. keinen Platz für eine Glucose, sodass der Großteil des Oligosaccharidfragments vermutlich auch keine effektiven Interaktionen mehr mit den restlichen Atomen der Bindestelle eingehen kann (Abb. 4.4 a,b). Somit liegt der Grund für die Resistenz des O9,12₁ gegenüber dem P22TSP höchstwahrscheinlich in der sterischen Hinderung.

Im Fall des O9,12₂-Ags ist die Situation weniger klar. In der unmittelbaren Umgebung der Glucose lässt sich bei keinem der beiden TSPs eine potentielle sterische Hinderung erkennen, wie sie für das O9,12₁ vorliegt (Abb. 4.4 e,f). Im Gegensatz ist der Abstand der in die Bindungsstelle hineinmodellierten Glucose von der Oberfläche des 9NATSPs sogar größer als beim P22TSP. Vermutlich handelt es sich bei der Inkompatibilität des O12₂-Ag's zum 9NATSP eher um eine weniger günstige Bindung, da Glucose keine effektiven Interaktionen mit den Oberflächenatomen des 9NATSP eingehen kann. Gleichzeitig würde das bedeuten, dass 9NATSP lediglich eine gleich starke Bindung zum O9,12₂-Ag zeigen sollte wie zum O9. Dabei wurde in der ELITA-Messung bei dem einzigen als O12₂-positiv serotypisierten Stamm Typhi T4 eine um 50 % schwächere Bindung beobachtet als bei den Stämmen der Serogruppe O9. Da der Stamm Typhi T4 allerdings auch Serospezifität O12₁ und O12₃ zeigte, kann ein zusätzlicher Einfluss dieser O-Ag-Varianten nicht ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich liegt die Erklärung für die geringere Bindungseffizienz von 9NATSP in den thermodynamischen Zusammenhängen, die sich nicht durch die bloße Betrachtung der Oberflächenkomplementarität erklären lassen. Es könnte sich z. B. um negative entropische Effekte handeln, die im Fall von 9NATSP nicht durch den enthalpischen Beitrag der Interaktionen der Glucose ausgeglichen werden. Auch koordinierte Wassermoleküle können dabei eine Rolle spielen, die nicht aus vorhandenen Daten abgeleitet werden kann (Broeker u. a., 2012; Andres, Gohlke u. a., 2013; U. Baxa, Cooper u. a., 2001; Kadirvelraj u. a., 2008). Auch wenn die kristallographisch erfassten Wassermoleküle nicht zwangsläufig physiologisch relevant sein müssen, könnte man spekulieren, welchen Beitrag die beobachteten Wassermoleküle in den Strukturen von 9NATSP und P22TSP leisten (Beuming u. a., 2012; C. Mattos und Ringe, 2006; Carla Mattos, 2002). So werden in der Struktur von P22TSP vier koordinierte Wassermoleküle beobachtet, die bei einer Bindung des O9,12₂-Ags durch die Glucose verdrängt werden (Abb. 4.4 e). Zwei davon sind vor

Kohlenstoffatomen positioniert und bilden somit die Hydrathülle für einen hydrophoben Teil der Oberfläche. Die Freisetzung dieser Wassermoleküle durch die Bindung des Oligosaccharids wäre theoretisch entropisch günstig. Im vorgeschlagenen Modell des Komplexes aus 9NATSP und dem O_{9,12₂}-Ag wäre ein in der Kristallstruktur sichtbares Wassermolekül durch die Glucose-Atome C₆ und O₆ verdrängt. Da es sich bei der Struktur des 9NATSP-Oligosaccharid-Komplexes lediglich um ein Modell handelt, kann die tatsächliche Bindung bzw. die Konformation des Oligosaccharid-fragments anders aussehen, wodurch zusätzliche Interaktionen der Glucose möglich wären. Für eine Aufklärung der Zusammenhänge sind weitere Experimente nötig, die thermodynamische, aber auch strukturelle Aspekte der Interaktion erfassen: isotherme Titrationskalorimetrie, kristallographische Strukturaufklärung oder NMR.

4.4 Zusammenfassende Diskussion

Zusammengefasst legen es die Ergebnisse nahe, dass ein Teil der Modifikationen der O-Ag-Fragmente, die massenspektrometrisch detektiert wurden, durch die Serotypisierung nicht erfasst wird. Von den fünf massenspektrometrisch charakterisierten Stämmen zeigten drei Stämme Glucosylierung und Acetylierung in unterschiedlichem Ausmaß, ohne ursprünglich eine 12₁, 12₂ oder O_{4,5}-Serospezifität zu zeigen. Dies könnte auf unterschiedliche Bindungsmodi der Antikörper und der beiden getesteten TSPs zurückgehen. Die meisten Antikörper erkennen relativ kleine Epitope aus zwei bis drei Monosacchariden. So erkennen die Antikörper zur Bestimmung der Serotypen O₂, O₄ und O₉ die jeweilige Dideoxyhexose und wahrscheinlich die benachbarten Reste Mannose und Rhamnose, wobei der Großteil der Spezifität durch Dideoxyhexose-Bindung zustande kommt (D. R. Bundle u. a., 1994; Zdanov u. a., 1994; Cygler, Rose und D. Bundle, 1991). Das bedeutet, die Bindungsstellen der Antikörper erfassen immer nur einen Teil der strukturellen Information eines O-Ags. Die Bindungsstelle eines TSPs umfasst 2RU bzw. sechs bis acht Hexosen. Damit ist ein TSP deutlich sensitiver gegenüber Modifikationen des O-Ags, speziell nicht-stöchiometrisch auftretender Modifikationen als ein Antikörper.

Gleichzeitig spiegeln die Ergebnisse die Mikroheterogenität und die Dynamik der Zusammensetzung des PS und die damit einhergehenden Probleme bei der Charakterisierung von Bakterien wider (Parker u. a., 2001; B. Liu u. a., 2013). Diese Problematik betrifft auch detaillierte Bindungsstudien bzw. biophysikalische Charakterisierung der Interaktion, da diese im Idealfall maximale Homogenität der Bindungspartner voraussetzen. Der etablierte Methodensatz aus ELISA und FACS erlaubte die Identifizierung der Stämme *Salmonella* Brancaster und *Salmonella* Kalamu, die über ein nahezu vollständig glucosyliertes O-Ag verfügen. Dadurch eignen sich die beiden Stämme dafür, die strukturellen und thermodynamischen Effekte der Glucosylierung

zu untersuchen. Die beobachteten Effekte der nicht-stöchiometrischen Modifikation auf Bindung und Rhamnosidaseaktivität der TSPs deuten auf eine partielle Resistenz der modifizierten O-Ag-Abschnitte, aber auch kinetischen Effekte hin. Der Einfluss der Glucosylierung auf die Bindung könnte in erster Näherung durch die Immobilisierung des kompletten PS unter beschriebenen Bedingungen mit anschließender quantitativer SPR-Charakterisierung adressiert werden. Für kinetische Analysen wären immobilisierte Oligosaccharidfragmente potentiell besser geeignet, da die Avidität der repetitiven O-Ag-Ketten eine zusätzliche Komplexitätsebene in die Kinetik einbringt. Unabhängig davon wären auch bei monovalenten Oligosaccharidfragmenten komplexe Adsorptionskinetiken zu erwarten, da bei den TSPs aufgrund ihrer Größe und den drei Bindungsstellen pro Partikel weitere Parameter wie Massentransport und Multivalenz berücksichtigt werden müssten (De Mol, Nicol und J.E., 2008).

Auf Grundlage der Ergebnisse wären aufbauende Studien sinnvoll, um eine detaillierte thermodynamische und strukturelle Charakterisierung der Bindung mittels isothermer Titrationskalorimetrie und Röntgenkristallographie zu vervollständigen. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten das aktuelle Verständnis für Strategien erweitern, die einem TSP eine breitere Substratspezifität ermöglichen und damit für eine breitere Wirtsspezifität bei Bakteriophagen sorgen. Angesichts der Tatsache, dass die beiden untersuchten TSPs jeweils unterschiedliche Modifikationen tolerieren können, wäre das Design eines universellen TSPs möglich, dessen Bindestelle beide Glucosylierungen und die Acetylierung des O-Ags effektiv binden würde. Ein Bakteriophage mit einer derart erweiterten Spezifität wäre im medizinischen und lebensmitteltechnischen Bereich interessant, um Diagnostik durchzuführen oder Kontaminationen durch *Salmonella* zu kontrollieren. Eine umfassende Erklärung der Zusammenhänge, die einer Interaktion zwischen Protein und Kohlenhydrat zugrunde liegen, wären aufgrund der Verbreitung komplexer Kohlenhydrate in biologischen Systemen und ihrer vielfältigen physiologischen Funktionen von interdisziplinärer Bedeutung für Wissenschaft und Medizin.

Literatur

- Ackermann, H. W. (2001). "Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review." eng. In: *Arch Virol* 146.5, S. 843–857.
- Álvarez-Fernández, Elena u. a. (2012). "Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006." eng. In: *Int J Food Microbiol* 153.3, S. 281–287.
- Andersen, Christian B F. und Søren K. Moestrup (2014). "How calcium makes endocytic receptors attractive." eng. In: *Trends Biochem Sci* 39.2, S. 82–90.
- Anderson, E. S. u. a. (1977). "Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*." eng. In: *J Hyg (Lond)* 78.2, S. 297–300.
- Andres, Dorothee, Ulrich Baxa u. a. (2010). "Carbohydrate binding of *Salmonella* phage P22 tailspike protein and its role during host cell infection." eng. In: *Biochem Soc Trans* 38.5, S. 1386–1389.
- Andres, Dorothee, Ulrich Gohlke u. a. (2013). "An essential serotype recognition pocket on phage P22 tailspike protein forces *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A O-antigen fragments to bind as nonsolution conformers." eng. In: *Glycobiology* 23.4, S. 486–494.
- Andres, Dorothee, Christin Hanke u. a. (2010). "Tailspike interactions with lipopolysaccharide effect DNA ejection from phage P22 particles in vitro." eng. In: *J Biol Chem* 285.47, S. 36768–36775.
- Andres, Dorothee, Yvette Roske u. a. (2012). "Tail morphology controls DNA release in two *Salmonella* phages with one lipopolysaccharide receptor recognition system." eng. In: *Mol Microbiol* 83.6, S. 1244–1253.
- Aurell, C. A., M. E. Hawley und A. O. Wiström (1999). "Direct visualization of gram-negative bacterial lipopolysaccharide self-assembly." eng. In: *Mol Cell Biol Res Commun* 2.1, S. 42–46.
- Aurell, C. A. und A. O. Wiström (1998). "Critical aggregation concentrations of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS)." eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 253.1, S. 119–123.
- Banoub, Joseph H u. a. (2010). "Structural investigation of bacterial lipopolysaccharides by mass spectrometry and tandem mass spectrometry." eng. In: *Mass Spectrom Rev* 29.4, S. 606–650.
- Barbirz, Stefanie u. a. (2008). "Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related." eng. In: *Mol Microbiol* 69.2, S. 303–316.
- Baxa, U., A. Cooper u. a. (2001). "Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike protein." eng. In: *Biochemistry* 40.17, S. 5144–5150.
- Baxa, U., S. Steinbacher u. a. (1996). "Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, *Salmonella* O-antigen polysaccharide." eng. In: *Biophys J* 71.4, S. 2040–2048.
- Beuming, Thijs u. a. (2012). "Thermodynamic analysis of water molecules at the surface of proteins and applications to binding site prediction and characterization." eng. In: *Proteins* 80.3, S. 871–883.
- Binder, Florian P C. u. a. (2012). "Sialyl Lewis(x): a "pre-organized water oligomer"?" eng. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 51.29, S. 7327–7331.

- Blixt, Ola u. a. (2004). "Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins." eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101.49, S. 17033–17038.
- Bohorov, Ognian u. a. (2006). "Arraying glycomics: a novel bi-functional spacer for one-step microscale derivatization of free reducing glycans." eng. In: *Glycobiology* 16.12, S. 21C–27C.
- Boraston, Alisdair B (2005). "The interaction of carbohydrate-binding modules with insoluble non-crystalline cellulose is enthalpically driven." eng. In: *Biochem J* 385.Pt 2, S. 479–484.
- Boraston, Alisdair B u. a. (2004). "Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition." eng. In: *Biochem J* 382.Pt 3, S. 769–781.
- Bradley, D. E. (1967). "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins." eng. In: *Bacteriol Rev* 31.4, S. 230–314.
- Brenner, F. W. u. a. (2000). "Salmonella nomenclature." eng. In: *J Clin Microbiol* 38.7, S. 2465–2467.
- Broadbent, S. E., M. R. Davies und M. W. van der Woude (2010). "Phase variation controls expression of *Salmonella* lipopolysaccharide modification genes by a DNA methylation-dependent mechanism." eng. In: *Mol Microbiol* 77.2, S. 337–353.
- Broeker, Nina K u. a. (2012). "Single amino acid exchange in bacteriophage HK620 tailspike protein results in thousand-fold increase of its oligosaccharide affinity." eng. In: *Glycobiology*.
- Brüssow, Harald, Carlos Canchaya und Wolf-Dietrich Hardt (2004). "Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion." eng. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 68.3, 560–602, table of contents.
- Bundle, D. R. u. a. (1994). "Molecular recognition of a *Salmonella* trisaccharide epitope by monoclonal antibody Se155-4." eng. In: *Biochemistry* 33.17, S. 5172–5182.
- Bush, C. A., M. Martin-Pastor und A. Imberty (1999). "Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids, and bacterial polysaccharides." eng. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, S. 269–293.
- Carmen Fernández-Alonso, María del u. a. (2005). "Molecular recognition of saccharides by proteins. Insights on the origin of the carbohydrate-aromatic interactions." eng. In: *J Am Chem Soc* 127.20, S. 7379–7386.
- Casjens, Sherwood R. und Pamela A. Thuman-Commike (2011). "Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly." eng. In: *Virology* 411.2, S. 393–415.
- Chavelas, Eneas A. und Enrique García-Hernández (2009). "Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes." eng. In: *Biochem J* 420.2, S. 239–247.
- Chen, F. T., T. S. Dobashi und R. A. Evangelista (1998). "Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis." eng. In: *Glycobiology* 8.11, S. 1045–1052.
- Chibani-Chennoufi, Sandra u. a. (2004). "Phage-host interaction: an ecological perspective." eng. In: *J Bacteriol* 186.12, S. 3677–3686.
- Cho, Chia-Ching u. a. (2009). "Direct amidation of aldoses and decarboxylative amidation of alpha-keto acids: an efficient conjugation method for unprotected carbohydrate molecules." eng. In: *J Org Chem* 74.4, S. 1549–1556.

- Čižnár, I. und J. W. Shands (1970). "Effect of Alkali on the Immunological Reactivity of Lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*." eng. In: *Infect Immun* 2.5, S. 549–555.
- Clackson, T. u. a. (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." eng. In: *Nature* 352.6336, S. 624–628.
- Clark, Gary F. (2013). "The role of carbohydrate recognition during human sperm-egg binding." eng. In: *Hum Reprod* 28.3, S. 566–577.
- Clarke, C. u. a. (2001). "Involvement of water in carbohydrate-protein binding." eng. In: *J Am Chem Soc* 123.49, S. 12238–12247.
- Comas, J. und J. Vives-Rego (1997). "Assessment of the effects of gramicidin, formaldehyde, and surfactants on *Escherichia coli* by flow cytometry using nucleic acid and membrane potential dyes". In: *Cytometry* 29.1, S. 58–64.
- Cooper, A. (2000). "Heat capacity of hydrogen-bonded networks: an alternative view of protein folding thermodynamics." eng. In: *Biophys Chem* 85.1, S. 25–39.
- Cota, Ignacio, Anne Béatrice Blanc-Potard und Josep Casadesús (2012). "STM2209-STM2208 (opvAB): a phase variation locus of *Salmonella enterica* involved in control of O-antigen chain length." eng. In: *PLoS One* 7.5, e36863.
- Cox, Christopher R u. a. (2014). "Rapid *Burkholderia pseudomallei* identification and antibiotic resistance determination by bacteriophage amplification and MALDI-TOF MS". In: *Bacteriophage* 4.
- Crocker, Paul R., James C. Paulson und Ajit Varki (2007). "Siglecs and their roles in the immune system." eng. In: *Nat Rev Immunol* 7.4, S. 255–266.
- Curd, H., D. Liu und P. R. Reeves (1998). "Relationships among the O-antigen gene clusters of *Salmonella enterica* groups B, D1, D2, and D3." eng. In: *J Bacteriol* 180.4, S. 1002–1007.
- Curry, F. E. und R. H. Adamson (2012). "Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor." eng. In: *Ann Biomed Eng* 40.4, S. 828–839.
- Cygler, M, DR Rose und DR. Bundle (1991). "Recognition of a cell-surface oligosaccharide of pathogenic *Salmonella* by an antibody Fab fragment." In: *Science* 253, S. 442–445.
- Danner, M. u. a. (1993). "Folding and assembly of phage P22 tailspike endorhamnosidase lacking the N-terminal, head-binding domain." eng. In: *Eur J Biochem* 215.3, S. 653–661.
- De Mol, Fischer Nicol C. J. und Marcel J.E. (2008). "Kinetic and Thermodynamic Analysis of Ligand–Receptor Interactions: SPR Applications in Drug Development". In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Hrsg. von Richard B M Schasfoort und Anna J Tudos. The Royal Society of Chemistry. Kap. 5.
- Dhillon, T. S. u. a. (1998). "General transducing phages like *Salmonella* phage P22 isolated using a smooth strain of *Escherichia coli* as host." eng. In: *FEMS Microbiol Lett* 161.1, S. 129–133.
- Duckworth, D. H. (1976). "'Who discovered bacteriophage?'" eng. In: *Bacteriol Rev* 40.4, S. 793–802.
- Edgar, Rotem u. a. (2012). "Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes." eng. In: *Appl Environ Microbiol* 78.3, S. 744–751.
- Eriksson, U. und A. A. Lindberg (1977). "Adsorption of phage P22 to *Salmonella typhimurium*." eng. In: *J Gen Virol* 34.2, S. 207–221.

- Eriksson, U., S. B. Svenson u. a. (1979). "Salmonella phage glycanases: substrate specificity of the phage P22 endo-rhamnosidase." eng. In: *J Gen Virol* 43.3, S. 503–511.
- Ernst, R. K., T. Guina und S. I. Miller (2001). "Salmonella typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity." eng. In: *Microbes Infect* 3.14-15, S. 1327–1334.
- Farizano, Juan V u. a. (2012). "The PmrAB-inducing conditions control both lipid A remodelling and O-antigen length distribution, influencing the Salmonella Typhimurium-host interactions." eng. In: *J Biol Chem*.
- Felix, A. und B. R. Callow (1943). "Typing of Paratyphoid B Bacilli by Vi Bacteriophage." eng. In: *Br Med J* 2.4308, S. 127–130.
- Fortier, Louis-Charles und Ognjen Sekulovic (2013). "Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens". In: *Virulence* 4.5, S. 354–365.
- Freidl, G. S. u. a. (2014). "Influenza at the animal-human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1)." eng. In: *Euro Surveill* 19.18.
- Fuhrman, J. A. und M. Schwalbach (2003). "Viral Influence on Aquatic Bacterial Communities". In: *The Biological Bulletin* 204.2, S. 192–195. eprint: <http://www.biolbull.org/content/204/2/192.full.pdf+html>.
- Gabius, Hans-Joachim u. a. (2011). "From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code." eng. In: *Trends Biochem Sci* 36.6, S. 298–313.
- Gänzle, M. G., C. Hertel und W. P. Hammes (1999). "Resistance of Escherichia coli and Salmonella against nisin and curvacin A." eng. In: *Int J Food Microbiol* 48.1, S. 37–50.
- Gedig, Erk T. (2008). "Surface Chemistry in SPR-Technology". In: *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Hrsg. von Richard B M Schasfoort und Anna J Tudos. The Royal Society of Chemistry. Kap. 6, S. 194–203.
- Gerstenbruch, Sandra u. a. (2010). "Analysis of cross-reactive and specific anti-carbohydrate antibodies against lipopolysaccharide from Chlamydomonas reinhardtii." eng. In: *Glycobiology* 20.4, S. 461–472.
- Giannella, Ralph A. (1996). *Medical Microbiology*. Hrsg. von Baron S. 4th. Galveston (TX).
- Gibbons, H. S. u. a. (2000). "Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxymyristate moiety in Salmonella typhimurium lipid A. Function of LpxO, A new Fe²⁺/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue." eng. In: *J Biol Chem* 275.42, S. 32940–32949.
- Gilli, Gastone und Paola Gilli (2009). *The Nature of the Hydrogen Bond: Outline of a Comprehensive Hydrogen Bond Theory*. Oxford University Press.
- Goujon, Mickael u. a. (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI." eng. In: *Nucleic Acids Res* 38.Web Server issue, W695–W699.
- Grimont, Patrick A.D. und François-Xavier Weill, Hrsg. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars* 9th.
- Harper, D. R. und M. C. Enright (2011). "Bacteriophages for the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections." eng. In: *J Appl Microbiol*.
- Harvey, David J (2009). "Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2003-2004." eng. In: *Mass Spectrom Rev* 28.2, S. 273–361.

- Hauser, E. u. a. (2011). "Different mutations in the oafA gene lead to loss of O5-antigen expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium." eng. In: *J Appl Microbiol* 110.1, S. 248–253.
- El-Hawiet, Amr, Elena N Kitova und John S Klassen (2012). "Quantifying carbohydrate-protein interactions by electrospray ionization mass spectrometry analysis." eng. In: *Biochemistry* 51.21, S. 4244–4253.
- Hellerqvist, Carl Gustaf u. a. (1968). "Structural studies on the O-specific side-chains of the cell-wall lipopolysaccharide from Salmonella typhimurium 395 ms". In: *Carbohydrate Research* 8.1, S. 43–55.
- Heukeshoven, J. und R. Dernick (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." eng. In: *Electrophoresis* 9.1, S. 28–32.
- Hirose, K. u. a. (1997). "Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted Salmonella typhi strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen." eng. In: *FEMS Microbiol Lett* 147.2, S. 259–265.
- Israel, J. V., T. F. Anderson und M. Levine (1967). "in vitro MORPHOGENESIS OF PHAGE P22 FROM HEADS AND BASE-PLATE PARTS." eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 57.2, S. 284–291.
- Johnke, Julia u. a. (2014). "Multiple micro-predators controlling bacterial communities in the environment." eng. In: *Curr Opin Biotechnol* 27, S. 185–190.
- Kadirvelraj, Renuka u. a. (2008). "Involvement of water in carbohydrate-protein binding: concanavalin A revisited." eng. In: *J Am Chem Soc* 130.50, S. 16933–16942.
- Kanipes, M. I. u. a. (2001). "Ca²⁺-induced phosphoethanolamine transfer to the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid moiety of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. A novel membrane enzyme dependent upon phosphatidylethanolamine." eng. In: *J Biol Chem* 276.2, S. 1156–1163.
- Kapoor, Mili u. a. (2003). "Exploring kinetics and mechanism of protein-sugar recognition by surface plasmon resonance." eng. In: *Methods Enzymol* 362, S. 312–329.
- Kastowsky, M., T. Gutberlet und H. Bradaczek (1993). "Comparison of X-ray powder-diffraction data of various bacterial lipopolysaccharide structures with theoretical model conformations." eng. In: *Eur J Biochem* 217.2, S. 771–779.
- Katzenellenbogen, Ewa u. a. (2009). "Structure of an abequose-containing O-polysaccharide from *Citrobacter freundii* O22 strain PCM 1555." eng. In: *Carbohydr Res* 344.13, S. 1724–1728.
- Kaufmann, Kerstin B. u. a. (2013). "Gene therapy on the move." eng. In: *EMBO Mol Med* 5.11, S. 1642–1661.
- Keenleyside, W. J. u. a. (1994). "A plasmid-encoded rfbO:54 gene cluster is required for biosynthesis of the O:54 antigen in Salmonella enterica serovar Borreze." eng. In: *Mol Microbiol* 11.3, S. 437–448.
- Kilár, Anikó, Ágnes Dörnyei und Béla Kocsis (2013). "Structural characterization of bacterial lipopolysaccharides with mass spectrometry and on- and off-line separation techniques." eng. In: *Mass Spectrom Rev* 32.2, S. 90–117.
- Kim, Minsik und Sangryeol Ryu (2012). "Spontaneous and transient defence against bacteriophage by phase-variable glucosylation of O-antigen in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." eng. In: *Mol Microbiol* 86.2, S. 411–425.

- King, J. und U. K. Laemmli (1971). "Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4." eng. In: *J Mol Biol* 62.3, S. 465–477.
- Knirel, Yuriy A. und Miguel A. Valvano (2011). *Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells*. Springer.
- Koenig, Helmut u. a. (2010). *Prokaryotic Cell Wall Compounds*. Springer Heidelberg Dordrecht London New York.
- Konadu, E. u. a. (1996). "Synthesis, characterization, and immunological properties in mice of conjugates composed of detoxified lipopolysaccharide of *Salmonella paratyphi* A bound to tetanus toxoid with emphasis on the role of O acetyls." eng. In: *Infect Immun* 64.7, S. 2709–2715.
- Lander, Gabriel C u. a. (2009). "The P22 tail machine at subnanometer resolution reveals the architecture of an infection conduit." eng. In: *Structure* 17.6, S. 789–799.
- Lee, B. und F. M. Richards (1971). "The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility." eng. In: *J Mol Biol* 55.3, S. 379–400.
- Leiman, Petr G und Ian J Molineux (2008). "Evolution of a new enzyme activity from the same motif fold." eng. In: *Mol Microbiol* 69.2, S. 287–290.
- Lemieux, Raymond U. (1996). "How Water Provides the Impetus for Molecular Recognition in Aqueous Solution". In: *Accounts of Chemical Research* 29.8, S. 373–380.
- Li, Yang u. a. (2011). "Structural and genetic relationships of two pairs of closely related O-antigens of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: *E. coli* O11/*S. enterica* O16 and *E. coli* O21/*S. enterica* O38." eng. In: *FEMS Immunol Med Microbiol* 61.3, S. 258–268.
- Licht, T. R. u. a. (1996). "Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by *Salmonella typhimurium* studied by in situ hybridization." eng. In: *Infect Immun* 64.9, S. 3811–3817.
- Liesegang, A. u. a. (2002). "Phage typing and PFGE pattern analysis as tools for epidemiological surveillance of *Salmonella enterica* serovar Bovismorbificans infections." eng. In: *Epidemiol Infect* 128.2, S. 119–130.
- Lilleengen, K. (1950). "Typing of *Salmonella dublin* and *Salmonella enteritidis* by means of bacteriophage." eng. In: *Acta Pathol Microbiol Scand* 27.4, S. 625–640.
- Lin, Ming V., Lindsay Y. King und Raymond T. Chung (2014). "Hepatitis C Virus-Associated Cancer." eng. In: *Annu Rev Pathol*.
- Lindberg, A. A. (1973). "Bacteriophage receptors." eng. In: *Annu Rev Microbiol* 27, S. 205–241.
- Liu, Bin u. a. (2013). "Structural diversity in *Salmonella* O antigens and its genetic basis." eng. In: *FEMS Microbiol Rev*.
- Looney, R. J. und R. T. Steigbigel (1986). "Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense in vitro." eng. In: *J Lab Clin Med* 108.5, S. 506–516.
- Lüderitz, O., A. M. Staub und O. Westphal (1966). "Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related Enterobacteriaceae." eng. In: *Bacteriol Rev* 30.1, S. 192–255.
- Lütteke, Thomas, Martin Frank und Claus-W. von der Lieth (2005). "Carbohydrate Structure Suite (CSS): analysis of carbohydrate 3D structures derived from the PDB." eng. In: *Nucleic Acids Res* 33.Database issue, S. D242–D246.
- Lyman, M. B., J. P. Steward und R. J. Roantree (1976). "Characterization of the virulence and antigenic structure of *Salmonella typhimurium* strains with lipopolysaccharide core defects." eng. In: *Infect Immun* 13.6, S. 1539–1542.

- Mäkelä, P. H. (1973). "Glucosylation of lipopolysaccharide in *Salmonella*: mutants negative for O antigen factor 12₂1." eng. In: *J Bacteriol* 116.2, S. 847–856.
- Mattos, C. und D. Ringe (2006). "Solvent structure". In: *International Tables for Crystallography F*, S. 623–647.
- Mattos, Carla (2002). "Protein–water interactions in a dynamic world". In: *Trends in Biochemical Sciences* 27.4, S. 203–208.
- Mazumdar, Saikat Datta u. a. (2010). "Surface plasmon resonance (SPR) as a rapid tool for serotyping of *Salmonella*." eng. In: *Biosens Bioelectron* 25.5, S. 967–971.
- McWilliam, Hamish u. a. (2013). "Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI." eng. In: *Nucleic Acids Res* 41.Web Server issue, W597–W600.
- Micoli, Francesca, Neil Ravenscroft u. a. (2013). "Structural analysis of O-polysaccharide chains extracted from different *Salmonella* Typhimurium strains." eng. In: *Carbohydr Res* 385C, S. 1–8.
- Micoli, Francesca, Simona Rondini u. a. (2012). "O:2-CRM(197) conjugates against *Salmonella* Paratyphi A." eng. In: *PLoS One* 7.11, e47039.
- Mihu, Mircea Radu und Luis R. Martinez (2011). "Novel therapies for treatment of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* skin infections." eng. In: *Virulence* 2.2, S. 97–102.
- Morrison, D. C. und J. L. Ryan (1987). "Endotoxins and disease mechanisms." eng. In: *Annu Rev Med* 38, S. 417–432.
- Müller, Jürgen J u. a. (2008). "An intersubunit active site between supercoiled parallel beta helices in the trimeric tailspike endorhamnosidase of *Shigella flexneri* Phage Sf6." eng. In: *Structure* 16.5, S. 766–775.
- Müller-Loennies, Sven, Buko Lindner und Helmut Brade (2003). "Structural analysis of oligosaccharides from lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* K12 strain W3100 reveals a link between inner and outer core LPS biosynthesis." eng. In: *J Biol Chem* 278.36, S. 34090–34101.
- Murthy, K. G. K. und M. Chakravorty (1998). "Physical mapping and characterization of bacteriophage 9NA genome." In: *Biosci.* 23, S. 143–150.
- Nagae, Masamichi u. a. (2013). "Crystal structure of anti-polysialic acid antibody single chain Fv fragment complexed with octasialic acid: insight into the binding preference for polysialic acid." eng. In: *J Biol Chem* 288.47, S. 33784–33796.
- Nghiêm, H. O., K. Himmelspach und H. Mayer (1992). "Immunochemical and structural analysis of the O polysaccharides of *Salmonella zuerich* [1,9,27,(46)]." eng. In: *J Bacteriol* 174.6, S. 1904–1910.
- Nikaido, H. u. a. (1971). "Glucosylation of lipopolysaccharide in *Salmonella*: biosynthesis of O antigen factor 12₂. I. Over-all reaction." eng. In: *J Biol Chem* 246.12, S. 3902–3911.
- Nishino, Kunihiko u. a. (2006). "Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III)." eng. In: *Mol Microbiol* 61.3, S. 645–654.
- O'Connor, Ellen T u. a. (2006). "Biochemical analysis of Lpt3, a protein responsible for phosphoethanolamine addition to lipooligosaccharide of pathogenic *Neisseria*." eng. In: *J Bacteriol* 188.3, S. 1039–1048.
- Olsthoorn, M. M. u. a. (2000). "The structure of the linkage between the O-specific polysaccharide and the core region of the lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium revisited." eng. In: *Eur J Biochem* 267.7, S. 2014–2027.

- Parker, C. T. u. a. (2001). “Lipopolysaccharide O-chain microheterogeneity of Salmonella serotypes Enteritidis and Typhimurium.” eng. In: *Environ Microbiol* 3.5, S. 332–342.
- Patterson, Sheila K. u. a. (2012). “Characterization and differential gene expression between two phenotypic phase variants in Salmonella enterica serovar Typhimurium.” eng. In: *PLoS One* 7.8, e43592.
- Paul, Vivek Daniel u. a. (2011). “Lysis-deficient phages as novel therapeutic agents for controlling bacterial infection.” eng. In: *BMC Microbiol* 11, S. 195.
- Petty, Nicola K. u. a. (2007). “Biotechnological exploitation of bacteriophage research.” eng. In: *Trends Biotechnol* 25.1, S. 7–15.
- Pirnay, Jean-Paul u. a. (2011). “The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure?” eng. In: *Pharm Res* 28.4, S. 934–937.
- Pol, Jonathan u. a. (2014). “Trial Watch:: Oncolytic viruses for cancer therapy.” eng. In: *Oncoimmunology* 3, e28694.
- Rabsch, Wolfgang (2007). “Salmonella typhimurium phage typing for pathogens.” eng. In: *Methods Mol Biol* 394, S. 177–211.
- Rabsch, Wolfgang u. a. (2002). “Salmonella enterica serotype Typhimurium and its host-adapted variants.” eng. In: *Infect Immun* 70.5, S. 2249–2255.
- Raetz, Christian R H und Chris Whitfield (2002). “Lipopolysaccharide endotoxins.” eng. In: *Annu Rev Biochem* 71, S. 635–700.
- Reeves, Peter R. u. a. (2013). “Genetics and evolution of the Salmonella galactose-initiated set of o antigens.” eng. In: *PLoS One* 8.7, e69306.
- Rietschel, E. T. u. a. (1994). “Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function.” eng. In: *FASEB J* 8.2, S. 217–225.
- Rillahan, Cory D. und James C. Paulson (2011). “Glycan microarrays for decoding the glycome.” eng. In: *Annu Rev Biochem* 80, S. 797–823.
- Robbins, J. D. und J. B. Robbins (1984). “Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of Salmonella typhi.” eng. In: *J Infect Dis* 150.3, S. 436–449.
- Robert-Koch-Institut, Hrsg. (2014). *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013*.
- Rohwer, Forest und Rob Edwards (2002). “The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage.” eng. In: *J Bacteriol* 184.16, S. 4529–4535.
- Ropartz, David u. a. (2011). “Performance evaluation on a wide set of matrix-assisted laser desorption ionization matrices for the detection of oligosaccharides in a high-throughput mass spectrometric screening of carbohydrate depolymerizing enzymes.” eng. In: *Rapid Commun Mass Spectrom* 25.14, S. 2059–2070.
- Rosales, Ricardo und Carlos Rosales (2014). “Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers.” eng. In: *World J Clin Oncol* 5.5, S. 1002–1019.
- Safina, Gulnara (2012). “Application of surface plasmon resonance for the detection of carbohydrates, glycoconjugates, and measurement of the carbohydrate-specific interactions: a comparison with conventional analytical techniques. A critical review.” eng. In: *Anal Chim Acta* 712, S. 9–29.
- Sato, Sachiko u. a. (2012). “Glycans, galectins, and HIV-1 infection.” eng. In: *Ann N Y Acad Sci* 1253, S. 133–148.
- Schantz, Laura von u. a. (2012). “Structural basis for carbohydrate-binding specificity—A comparative assessment of two engineered carbohydrate-binding modules.” eng. In: *Glycobiology* 22.7, S. 948–961.

- Schembri, M. A., G. Christiansen und P. Klemm (2001). "FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*." eng. In: *Mol Microbiol* 41.6, S. 1419–1430.
- Schmidt, Thomas G M. u. a. (2013). "Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants." eng. In: *Protein Expr Purif* 92.1, S. 54–61.
- Schrödinger, LLC (2010). "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1".
- Schuler, B. und R. Seckler (1998). "P22 tailspike folding mutants revisited: effects on the thermodynamic stability of the isolated beta-helix domain." eng. In: *J Mol Biol* 281.2, S. 227–234.
- Seckler, R. u. a. (1989). "Reconstitution of the thermostable trimeric phage P22 tailspike protein from denatured chains in vitro." eng. In: *J Biol Chem* 264.20, S. 11750–11753.
- Seng, Piseth u. a. (2009). "Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry." eng. In: *Clin Infect Dis* 49.4, S. 543–551.
- Shapiro, Orr H, Ariel Kushmaro und Asher Brenner (2010). "Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater". In: *ISME Journal*, S. 327–336.
- Shindyalov, I. N. und P. E. Bourne (1998). "Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path." eng. In: *Protein Eng* 11.9, S. 739–747.
- Slauch, J. M. u. a. (1995). "Acetylation (O-factor 5) affects the structural and immunological properties of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide O antigen." eng. In: *Infect Immun* 63.2, S. 437–441.
- Stanfield, Robyn L. u. a. (2014). "Crystal structure of the HIV neutralizing antibody 2G12 in complex with a bacterial oligosaccharide analog of mammalian oligomannose." eng. In: *Glycobiology*.
- Steinbacher, S., U. Baxa u. a. (1996). "Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with *Salmonella* sp. O-antigen receptors." eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93.20, S. 10584–10588.
- Steinbacher, S., S. Miller u. a. (1997). "Interaction of *Salmonella* phage P22 with its O-antigen receptor studied by X-ray crystallography." eng. In: *Biol Chem* 378.3-4, S. 337–343.
- Swimmer, C. u. a. (1992). "Phage display of ricin B chain and its single binding domains: system for screening galactose-binding mutants." eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89.9, S. 3756–3760.
- Szafranek, Janusz u. a. (2006). "Structure and heterogeneity of the O-antigen chain of *Salmonella* Agona lipopolysaccharide." eng. In: *FEMS Immunol Med Microbiol* 48.2, S. 223–236.
- Szajli, Emelia, Tamas Feher und Katalin F Medzihradsky (2008). "Investigating the quantitative nature of MALDI-TOF MS." eng. In: *Mol Cell Proteomics* 7.12, S. 2410–2418.
- Tamayo, R. u. a. (2005). "Identification of *cptA*, a *PmrA*-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core." eng. In: *J Bacteriol* 187.10, S. 3391–3399.
- Tang, Liang u. a. (2005). "Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine." eng. In: *EMBO J* 24.12, S. 2087–2095.

- Toukach, Philip u. a. (2007). “Sharing of worldwide distributed carbohydrate-related digital resources: online connection of the Bacterial Carbohydrate Structure Database and GLYCOSCIENCES.de.” eng. In: *Nucleic Acids Res* 35.Database issue, S. D280–D286.
- Trent, M. S. u. a. (2001). “A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*.” eng. In: *J Biol Chem* 276.12, S. 9083–9092.
- van der Woude, Marjan W. und Andreas J. Bäuml (2004). “Phase and antigenic variation in bacteria.” eng. In: *Clin Microbiol Rev* 17.3, 581–611, table of contents.
- Wang, Lei u. a. (2002). “Extensive variation in the O-antigen gene cluster within one *Salmonella enterica* serogroup reveals an unexpected complex history.” eng. In: *J Bacteriol* 184.6, S. 1669–1677.
- Wang, Xiaoyuan und Peter J. Quinn, Hrsg. (2010). *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Springer Heidelberg Dordrecht London New York.
- Warren, J. R., M. M. Kowalski und C. H. Wallas (1977). “Effect of alkali-treated lipopolysaccharide on the intracellular cations of human erythrocytes.” eng. In: *Infect Immun* 17.2, S. 389–394.
- Webster, Robert G. und Elena A. Govorkova (2014). “Continuing challenges in influenza.” eng. In: *Ann N Y Acad Sci* 1323, S. 115–139.
- Weintraub, A. u. a. (1992). “Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharides of *Salmonella* strains with both antigen O4 and antigen O9.” eng. In: *J Bacteriol* 174.6, S. 1916–1922.
- Weis, W. I. und K. Drickamer (1996). “Structural basis of lectin-carbohydrate recognition.” eng. In: *Annu Rev Biochem* 65, S. 441–473.
- Wetter, Michael u. a. (2012). “Molecular characterization of the *viaB* locus encoding the biosynthetic machinery for Vi capsule formation in *Salmonella Typhi*.” eng. In: *PLoS One* 7.9, e45609.
- Wilkinson, R. G., P. Gemski und B. A. Stocker (1972). “Non-smooth mutants of *Salmonella typhimurium*: differentiation by phage sensitivity and genetic mapping.” eng. In: *J Gen Microbiol* 70.3, S. 527–554.
- Wimmerová, Michaela u. a. (2012). “Stacking interactions between carbohydrate and protein quantified by combination of theoretical and experimental methods.” eng. In: *PLoS One* 7.10, e46032.
- Woller, Norman u. a. (2014). “Oncolytic viruses as anticancer vaccines.” eng. In: *Front Oncol* 4, S. 188.
- Wollin, R., U. Eriksson und A. A. Lindberg (1981). “*Salmonella* bacteriophage glycanases: endorhamnosidase activity of bacteriophages P27, 9NA, and KB1.” eng. In: *J Virol* 38.3, S. 1025–1033.
- Wollin, R., B. A. Stocker und A. A. Lindberg (1987). “Lysogenic conversion of *Salmonella typhimurium* bacteriophages A3 and A4 consists of O-acetylation of rhamnose of the repeating unit of the O-antigenic polysaccharide chain.” eng. In: *J Bacteriol* 169.3, S. 1003–1009.
- Yoder, M. D., N. T. Keen und F. Jurnak (1993). “New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor.” eng. In: *Science* 260.5113, S. 1503–1507.
- Yosef, Ido u. a. (2014). “Different approaches for using bacteriophages against antibiotic-resistant bacteria.” eng. In: *Bacteriophage* 4.1, e28491.

- Zaia, Joseph (2010). "Mass spectrometry and glycomics." eng. In: *OMICS* 14.4, S. 401–418.
- Zamfir, Alina D. (2007). "Recent advances in sheathless interfacing of capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry." eng. In: *J Chromatogr A* 1159.1-2, S. 2–13.
- Zandomeneghi, Giorgia u. a. (2012). "On-cell MAS NMR: physiological clues from living cells." eng. In: *J Am Chem Soc* 134.42, S. 17513–17519.
- Zdanov, A. u. a. (1994). "Structure of a single-chain antibody variable domain (Fv) fragment complexed with a carbohydrate antigen at 1.7-Å resolution." eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91.14, S. 6423–6427.
- Zinder, N. D. und J. Lederberg (1952). "Genetic exchange in Salmonella." eng. In: *J Bacteriol* 64.5, S. 679–699.

Anhang

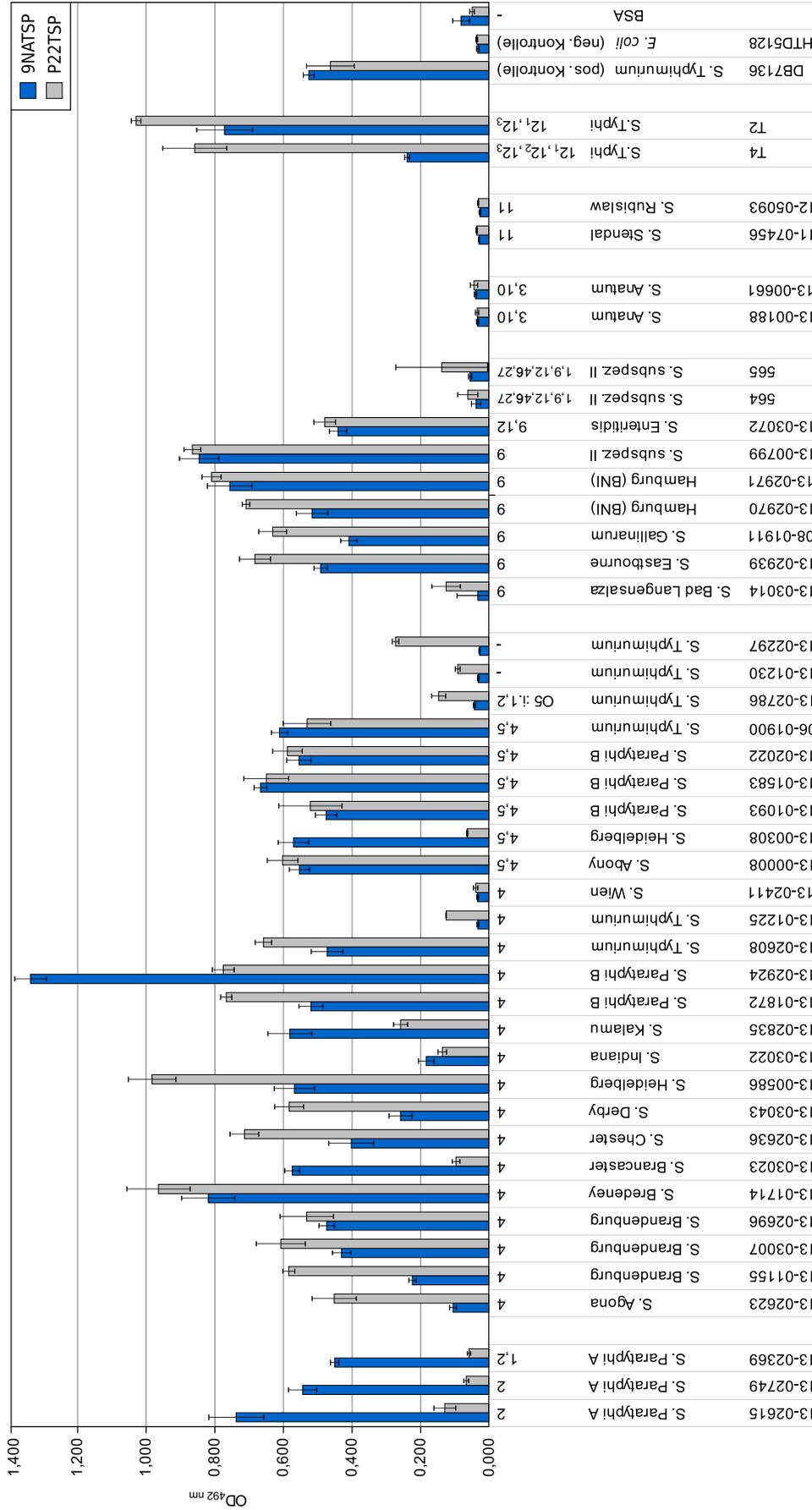


Abbildung A.1: ELITA-Ergebnisse der Bindung von 9NATSP und P22TSP an *Salmonella*-Stämme der Serovaren O2, O4, O4:5, O9, O3,10, O11 und O9,46,27. *E. coli* HTD2158 wurde als Kontrolle eingesetzt. Die an Mikrotiterplatten adsorbierten Bakterien wurden mit 9NATSP oder P22TSP als Sonde inkubiert und das gebundene TSP über StrepTag nachgewiesen. Zum Nachweis wurde ein Konjugat aus Streptactin und Meerrettichperoxidase eingesetzt, das über eine Farbreaktion bei 492 nm quantifiziert wurde. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus vier Ansätzen pro Stamm. Die Beschriftung enthält (von oben nach unten) Serotyp, Stammbezeichnung und Stammmummer der Stammsammlung des Robert-Koch-Instituts.

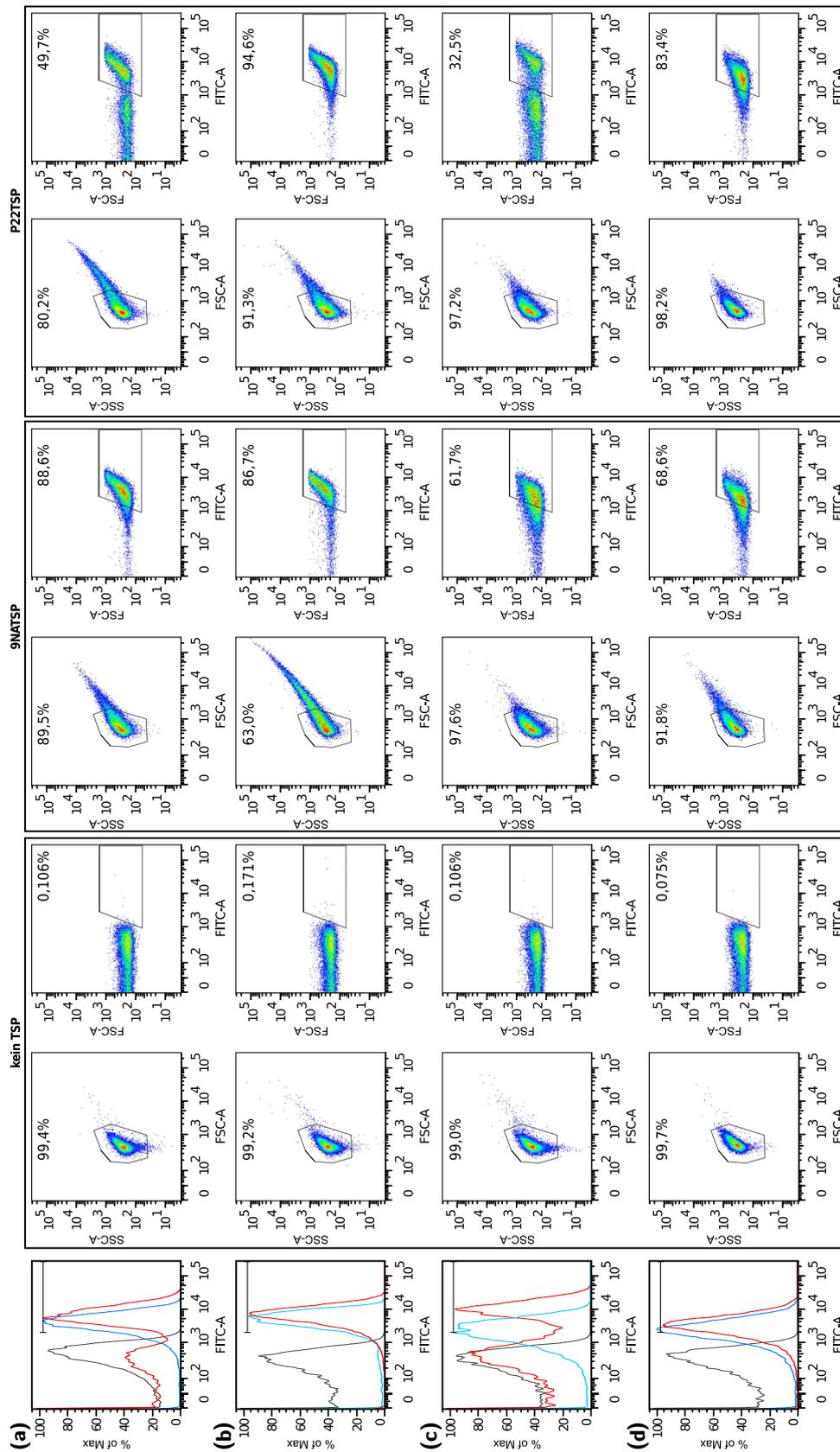


Abbildung A.2: FACS-Ergebnisse der Bindung von 9NATSP und P22TSP an *Salmonella*-Stämme (a) Heidelberg 13-00308 (b) Heidelberg 13-00586 (c) Kalamu (d) Typhimurium DB7136. In der ersten Spalte sind die Histogramme der Ansätze ohne TSP (schwarz), mit 9NATSP (cyan) und P22TSP (rot) dargestellt. In den restlichen Spalten sind die gleichen Ansätze als Punktauftragungen mit spektral gefärbten Dichteverteilungen dargestellt. In der FSC-A gegen SSC-A-Auftragungen wurden Fenster für die Größe und Granularität der Zellen festgelegt. In den FITC-A-Auftragungen wurde die Bindung der TSP erfasst (FITC-A-Fenster).

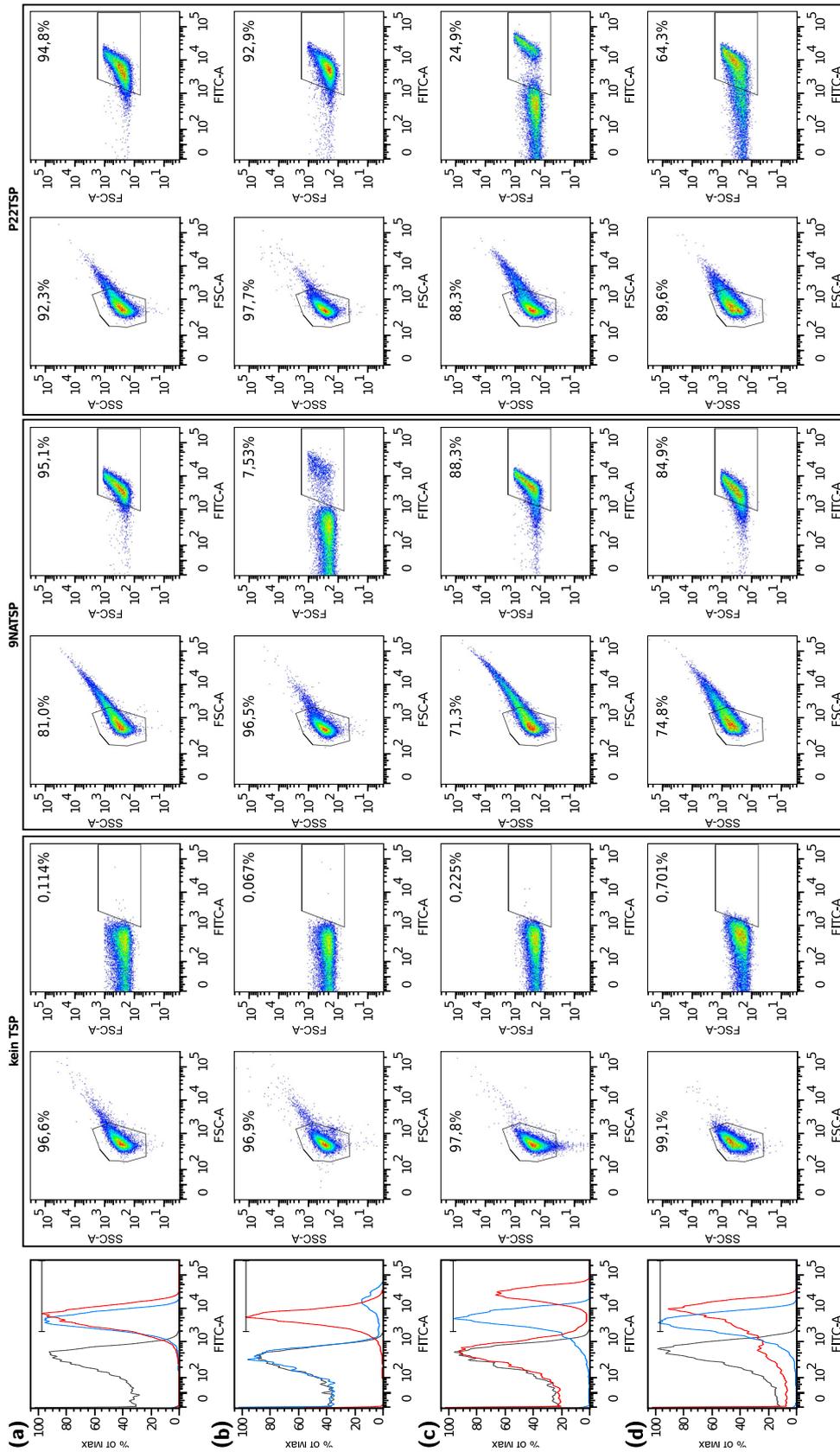


Abbildung A.3: FACS-Ergebnisse der Bindung von 9NATSP und P22TSP an *Salmonella*-Stämme **(a)** Typhimurium 06-01900 **(b)** Typhimurium 13-01225 **(c)** Brancaster **(d)** Paratyphi B. In der ersten Spalte sind die Histogramme der Ansätze ohne TSP (schwarz) und P22TSP (rot) dargestellt. In den restlichen Spalten sind die gleichen Ansätze als Punktauftragungen mit spektral gefärbten Dichteverteilungen dargestellt. In der FSC-A gegen SSC-A-Auftragungen wurden Fenster für die Größe und Granularität der Zellen festgelegt. In den FITC-A gegen FSC-A-Auftragungen wurde die Bindung der TSP erfasst (FITC-A-Fenster).

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Robert Seckler danken, der mich freundlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat, für die Zeit in seinem übervollen Terminkalender. Danke, dass ich bei den unzähligen Prüfungsbeisitzten immer wieder etwas Neues dazulernen konnte.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Dr. Stefanie Barbirz für die unzähligen Diskussionen und die wertvollen Anregungen sowie für die Möglichkeit frei und selbstständig arbeiten zu können. Danke für die unerschöpfliche Motivation und für die unendliche Geduld.

Außerdem möchte ich mich bei den Kooperationspartnern Dr. Wolfgang Rabsch, Dr. Matthias Heydenreich, PD Dr. Jörg Fettke und Prof. Carlo Unverzagt für die Möglichkeit bedanken, in ihrem Umfeld einen Teil der Fragestellungen meines Projekts lösen zu dürfen.

Einen lieben Dank an die aktuellen und die ehemaligen Mitarbeiter der AG Seckler: Nadin, Nina, Igor, Sonja, Kerstin, Dorothee, Anja T., Jana, Mandy und Anja S. für die wunderschöne gemeinsame Zeit im Labor und im Büro.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich mein ganzes Leben und ganz besonders während der Promotion unterstützt hat. Ohne euren Rückhalt wäre diese Arbeit unmöglich.

Ganz besonders möchte ich meiner Frau, Natascha, danken: Ich bin da wo ich bin, nur weil ich mit dir zusammen bin. Danke.

SUMMARY

Interactions between complex carbohydrates and proteins are ubiquitous. They play a major role in plenty of physiological processes as cell adhesion, signal transduction, as well as viral infections. The molecular details of the interaction are not completely understood. A model system for protein-carbohydrate interactions consists of adhesion proteins (Tailspikes) of bacteriophages, which recognize complex carbohydrates on the bacterial surface (O-antigen). A Tailspike primary used in this work originates from the bacteriophage 9NA (9NATSP). 9NATSP shows a remarkable structural similarity to the extensively studied TSP of the bacteriophage P22 (P22TSP), showing a low sequential similarity. Since structures of both TSP's are known, they provide an appropriate system for comparative interaction studies.

An ELISA-like Tailspike-adsorption assay (ELITA) was established in this work which allows identification of binding pairs consisting of TSP's and O-antigens. In this approach 9NATSP and P22TSP were used as probes. Their binding to intact bacteria adsorbed to a multi-well plate was tested. In a collection of 44 *Salmonella*-strains a set of strains was identified which express a binding O-antigen. Additionally different binding efficiencies were observed among the strains of the same O-serotype. Binding data of the ELITA were qualitatively resembled in a FACS-based binding test. Additionally FACS-measurements allowed estimation of the extent of non-stoichiometric modifications of the O-antigens in strains expressing modified O-antigen variants.

The surface plasmon resonance (SPR) interaction-measurements were used to quantify affinities of TSP-O-antigen binding. For this, two carbohydrate immobilization strategies were tested. An O-antigen fragment, produced by enzymatic digestion, was derivatized by a bi-functional Oxamine-spacer. The spacer provides a primary amine-functionality for the immobilization. Despite the successful derivatization, sufficient amount of the O-antigen fragment could not be immobilized. Oppositely, the non-derivatized whole polysaccharide was successfully immobilized. The immobilization was confirmed by SPR-measurements with P22TSP. This approach allows quantitative measurements with polysaccharide as ligand, despite of its polydisperse characteristics.

A set of *Salmonella*-strains with a distinctively different binding to 9NATSP and P22TSP in ELITA were characterized in terms of the content of their O-antigen by HPLC, capillary gel electrophoresis and MALDI-MS. Non-stoichiometric modifications of the O-antigens as acetylation and glucosylation were identified. The extent of glucosylation correlated negatively with the binding efficiencies to both TSP's, identifying 9NATSP as more susceptible to the glucosylation. That finding resembles with published data from early studies on the infectivity of bacteriophages 9NA and P22. Observed data could be interpreted in a structural context.

The results of the O-antigen analysis as well as the results of ELITA and FACS-based interaction tests two *Salmonella*-strains, were identified, which produce almost completely glucosylated O-antigen: *Salmonella* Brancaster and *Salmonella* Kalamu. These strains are suitable for further studies to investigate the interdependence of the specificity and the structure of the binding sites of both TSP's.