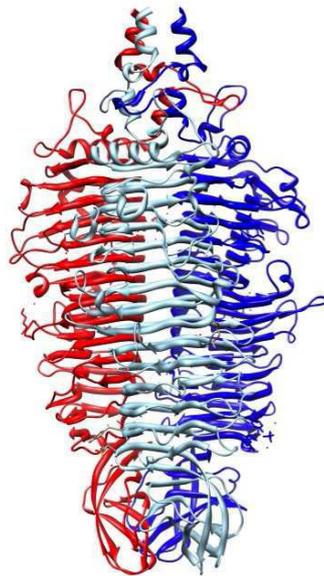


Institut für Biochemie und Biologie  
Arbeitsgruppe für Physikalische Biochemie

# Die Erkennung komplexer Kohlenhydrate durch das *Tailspike* Protein aus dem Bakteriophagen HK620



## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin  
Physikalische Biochemie.

Eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
**Universität Potsdam**

von

**Dipl.-Biochem. Nina Kristin Bröker**

Potsdam, April 2012

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:  
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen  
Bedingungen 3.0 Deutschland  
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/6036/>  
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-60366](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-60366)  
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-60366>

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig erarbeitet und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.  
Diese Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Potsdam, 10. April 2012

---

Nina K. Bröker (Unterschrift)



*Für meine Familie*

„Science is like a black man searching a black room  
for a black cat that might not be there“

von Sir Carl Popper



## Zusammenfassung

Kohlenhydrate stellen aufgrund der strukturellen Vielfalt und ihrer oft exponierten Lage auf Zelloberflächen wichtige Erkennungsstrukturen dar. Die Wechselwirkungen von Proteinen mit diesen Kohlenhydraten vermitteln Zell-Zell-Interaktionen, die z.B. für das Immunsystem und für die Differenzierung der Zellen wichtig sind. Aufgrund der strukturellen Vielfalt der Kohlenhydrate und entsprechend der sie bindenden Proteine sind Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen und ihre Triebkräfte bislang nur teilweise verstanden. Bei Lektinen handelt es sich um die bislang am besten untersuchte Familie von kohlenhydratbindenden Proteinen. Klassische Lektine binden wenig komplexe Kohlenhydrate in flachen, vorgeformten Bindungsfurchen mit geringen Bindungsaffinitäten im Bereich von millimolaren Dissoziationskonstanten. Andere kohlenhydratbindende Proteine hingegen binden ihre Liganden unter Konformationsänderungen in tiefe Taschen mit hohen Affinitäten im Bereich von nanomolaren Dissoziationskonstanten. Beispiele für Proteine, die ihre Liganden derart binden, sind bakterielle, periplasmatische Bindeproteine wie das Arabinose-bindende Protein und zum Teil Antikörper.

Diese großen Unterschiede in den Bindungsmodi verschiedener kohlenhydratbindender Proteine erschweren Vorhersagen für die Bindung von Zuckern. Zudem sind nur für einen Bruchteil der kohlenhydratbindenden Proteine strukturelle Daten im Komplex mit den Zuckern erhältlich und somit ist die strukturelle Grundlage zum Verständnis der Triebkräfte der Bindung lückenhaft. Mit der vorliegenden Promotionsarbeit soll ein Beitrag zum Verständnis von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen geleistet werden, um zukünftig Vorhersagen mit zuverlässigen Algorithmen zu erlauben.

Als Modell zur Protein-Kohlenhydrat-Interaktion diente dabei das *Tailspike* Protein (TSP) aus dem Bakteriophagen HK620. Dieser Phage erkennt spezifisch seinen *E. coli* Wirt anhand der Oberflächenzucker, der sogenannten *O*-Antigene. Dabei binden die TSP des Phagen das *O*-Antigen des Lipopolysaccharids (LPS) und weisen zudem eine hydrolytische Aktivität gegenüber dem Polysaccharid (PS) auf. Anhand von isolierten Oligosacchariden des Antigens (Typ O18A1) wurde die Bindung an TSP analysiert. Die Bindung der komplexen Kohlenhydrate durch TSP aus dem Phagen HK620 zeichnet sich durch große Interaktionsflächen aus. Die Interaktion wird durch ein ausgedehntes Netzwerk an Wasserstoffbrücken und durch die Verdrängung vieler Wassermoleküle von der Proteinoberfläche durch die Bindung ermöglicht, wodurch sowohl Spezifität als auch Affinität generiert werden. Diese Eigenschaften unter-

scheiden sich von denen der Lektine und der Antikörper und erlauben es, dieses System als neuartiges Modell für Kohlenhydratbindung zu benutzen.

In vorangegangenen Arbeiten wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Bindungseigenschaften von TSP aus dem Phagen HK620 durch geringe Veränderungen in der Aminosäuresequenz stark beeinflusst werden können. In der vorliegenden Dissertation wurde daher die Kohlenhydratbindung des Wildtyp-Proteins (HK620TSP $\Delta$ N) und verschiedener Varianten davon systematisch untersucht. Dafür wurden TSP-Varianten erzeugt sowie Oligosaccharide des Antigentyps O18A1 gereinigt und durch Bindungsstudien wurden thermodynamische Parameter ermittelt. Durch einzelne Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum wurden Varianten generiert, die eine tausendfach erhöhte Affinität ( $K_D \approx 100$  nM) im Vergleich zum Wildtyp-Protein ( $K_D \approx 130$   $\mu$ M) aufweisen. Dabei zeichnet sich das System dadurch aus, dass die Bindung bei Raumtemperatur nicht nur enthalpisch, sondern auch entropisch getrieben wird. Ursache für den günstigen Entropiebeitrag ist die große Anzahl an Wassermolekülen (21), die bei der Bindung des Hexasaccharids verdrängt werden.

Die Ursache für die Affinitätssteigerung durch einzelne Aminosäureaustausche wurde durch strukturelle Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse ergründet. In der Struktur einer der hochaffinen TSP-Varianten (E372Q) im Komplex mit dem Hexasaccharid wurde im Vergleich zum Wildtyp-Protein lediglich eine weitere Wasserstoffbrücke zum Kohlenhydrat gefunden. In den Strukturen ohne gebundenes Kohlenhydrat hingegen zeigten sich deutlichere Unterschiede zwischen der Variante E372Q und dem Wildtyp. Die Reste Gln372, Tyr344 und His374 sind anders orientiert als im Wildtyp-Protein und koordinieren zudem ein zusätzliches Wassermolekül. Die Bindung des Hexasaccharids geht mit einer Rotation an diesen Resten einher, welche die Verdrängung dieses zusätzlich koordinierten Wassers und dadurch vermutlich die erhöhte Affinität für die Variante E372Q erlaubt.

Neben der Veränderung einzelner Aminosäuren an HK620TSP wurden zudem Modifikationen am Kohlenhydrat und der Einfluss davon auf die Bindung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass HK620TSP nicht nur spezifisch für das O18A1-Antigen ist, sondern zudem das um eine Glucose verkürzte Oligosaccharid des Typs O18A erkennt und polymere Strukturen davon hydrolysiert. Studien der Bindung des O18A-Pentasaccharids zeigten, dass sich die Triebkräfte der Bindung im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen O18A1-Hexasaccharid verschoben haben. Durch Fehlen der Seitenkettenglucose ist die Bindung im Vergleich zu dem O18A1-Hexasaccharid weniger stark entropisch getrieben ( $\Delta(-T\Delta S) \approx 10$  kJ/mol), während der Enthalpiebeitrag zu der Bindung zunimmt ( $\Delta\Delta H \approx -10$  kJ/mol). Insgesamt gleichen sich diese Effekte aus, wodurch sehr ähnliche Affinitäten der TSP-Varianten zu O18A1-Hexasaccharid

und O18A-Pentasaccharid gemessen wurden. Durch diese Untersuchungen zur Bindung des verkürzten Oligosaccharids konnte der einzelne Beitrag der Glucose in der Seitenkette zur Bindung ermittelt werden. Die Glucose wird nach Bindung des Hexasaccharids an das Protein durch eine Schleife (*loop*) vom Lösungsmittel abgeschirmt. Durch die Bindung der Glucose werden aus dieser Tasche vier Wassermoleküle verdrängt, was entropisch stark begünstigt und unter enthalpischen Aspekten genau wie einige Kontakte zwischen der Glucose und einigen Resten in der Tasche eher ungünstig ist.

Durch Öffnung der Tasche mittels Deletion von zwei Aminosäuren (Asn471 und Ser472) konnte der Einfluss der Abschirmung der Glucose vom Lösungsmittel näher charakterisiert werden. Die Bindung von O18A1-Hexasaccharid durch die Deletionsvariante ist entropisch weniger günstig ( $\Delta(-T\Delta S) \approx 10$  kJ/mol) als mit diesen abschirmenden Aminosäuren, während der Enthalpiebeitrag zur Bindung leicht positiv beeinflusst wird ( $\Delta\Delta H \approx -3$  kJ/mol). Offen bleibt die Frage, wozu die Bindung der Seitenkettenglucose dient oder ob sich das HK620TSP aus einem O18A-bindenden TSP evolutionär herleitet. Mögliche Verwandtschaften zu dem O18A-bindenden Phagen  $\Omega$ 18A könnten bestehen, sind aber noch nicht untersucht. Bei diesem Phagen handelt es sich um ein Mitglied der Familie *Myoviridae*. Es könnte also eine Morphologie-übergreifende Verwandtschaft zwischen diesen Phagen, die den gleichen Wirt (*E. coli*) infizieren, bestehen. Dies ist auch für TSP der Phagen P22 (*Podoviridae*), Det7 (*Myoviridae*) und 9NA (*Siphoviridae*) der Fall, welche alle homolog sind und dieselbe Spezifität für *Salmonella* als Wirt bei den verschiedenen Phagen bedingen.

In dem dritten Teilprojekt der Promotionsarbeit wurde der Infektionsmechanismus des Phagen HK620 (*Podoviridae*) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass analog zu dem verwandten Phagen P22 die Ejektion der DNA aus dem Phagen allein durch das Lipopolysaccharid (LPS) des Wirts *in vitro* induziert werden kann. Die Morphologie und Kettenlänge des LPS und die Aktivität von TSP gegenüber dem LPS erwiesen sich dabei als essentiell. So konnte die DNA-Ejektion *in vitro* auch durch LPS mit O18A-Antigen induziert werden, welches ebenfalls von dem TSP des Phagen gebunden und hydrolysiert wird. Diese Ergebnisse betonen die Rolle von TSP für die Erkennung der LPS-Rezeptoren als wichtigen Schritt in der Infektion der *Podoviridae* HK620 und P22.

## Abkürzungen und Formelzeichen

Å	Ångström ( $10^{-10}$ m)
aa	<i>amino acid</i> (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
ä. S.	äußere Schale
au	<i>absorption units</i> (Absorptionseinheit)
CBM	<i>carbohydrate binding module</i>
CD	<i>circular dichroism</i> (Zirkulardichroismus)
cps	<i>counts per second</i> (Fluoreszenzeinheit)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D339N	Variante von HK620TSPΔN (Aspartat 339 ist gegen Asparagin ausgetauscht)
Da	Dalton
ΔASA	Änderung in <i>accessible surface area</i>
DC	<i>destabilizing contacts</i> (hydrophil-hydrophobe Kontakte)
ΔC <sub>p</sub>	Wärmekapazitätsänderung
ΔH	Enthalpieänderung
DMSO	Dimethylsulfoxid
ΔN	um die N-terminale Domäne verkürzt (im Falle von HK620TSPΔN sind die aa 1-110 deletiert)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase I	Desoxyribonuklease I
ΔS	Entropieänderung
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
Gal	D-Galactose
Glc	D-Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin (auch mit NAG abgekürzt)
ges.	gesamt

---

gp	<i>gene product</i> (Genprodukt)
h	<i>hour</i> (Stunde)
HAEPC	<i>high performance anion exchange chromatography</i>
HB	<i>hydrogen bond</i> (Wasserstoffbrücke)
HK620	Podovirus HK620
HK620TSP	<i>Tailspike</i> Protein aus HK620
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
J	Joule (4,18 Joule = 1 Kalorie)
$K_D$	Dissoziationskonstante
$k_{\text{ass/diss}}$	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation/Dissoziation
KDO	Ketodesoxyoctonsäure
LB	Luria-Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid
LS	Lichtstreuung
MALDI-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry</i>
MD	<i>molecular dynamics</i> (Moleküldynamik)
min	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
P22	Podovirus P22
P22TSP	<i>Tailspike</i> Protein aus P22
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Proteindatenbank ( <a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a> )
Pfu	<i>Plaque forming unit</i>
Phob	hydrophobe Kontakte
PS	Polysaccharid
psi	<i>pounds per square inch</i> (Pfund pro Quadratzoll)
Rha	L-Rhamnose
RMSD	<i>root mean square deviation</i> (mittlere quadratische Abweichung)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)

RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RU	<i>repetitive units</i> (repetitive Einheiten)
RU <sub>eq</sub>	<i>response units</i> (Signaleinheiten bei SPR) im Gleichgewicht
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i> , Nomenklatur nach Le Minor und Popoff (Le Minor <i>et al.</i> 1982)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
STD	<i>saturation transfer difference</i>
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	<i>Tailspike</i> Protein
U	<i>units</i> (Enzymaktivität)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumenanteil
Wt	Wildtyp-Protein (gemeint ist HK620TSPΔN aa 111-710)
(w/v)	Gewichtsanteil
Z	Lösungsmittel-Polaritätsparameter nach Kosower (Kosower 1958)

Für die Aminosäuren werden sowohl die gängigen Einbuchstaben- als auch die Dreibuchstabenabkürzungen verwendet. Varianten von HK620TSP wurden, wie für die Variante D339N beispielhaft aufgeführt, benannt. Abkürzungen bezüglich kristallographischer Arbeiten werden an entsprechender Stelle erläutert. In Abkürzungen wurden alle Deklinationen in Singular und Plural mit inbegriffen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN UND FORMELZEICHEN .....</b>	<b>IV</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. PROTEIN-KOHLLENHYDRAT-INTERAKTIONEN .....	1
1.2. BEISPIELE FÜR KOHLLENHYDRATBINDENDE PROTEINE.....	2
1.2.1. <i>Antikörper und bakterielle, periplasmatische Bindeproteine</i> .....	3
1.2.2. <i>Lektine</i> .....	4
1.3. BAKTERIOPHAGEN: VORKOMMEN UND MORPHOLOGIEEN .....	6
1.3.1. <i>Der Bakteriophage P22 als Prototyp der Podoviridae</i> .....	8
1.3.2. <i>Vorkommen und Struktur des Bakteriophagen HK620</i> .....	9
1.4. DAS TAILSPIKE PROTEIN DES PHAGEN HK620 .....	11
1.5. LIPOPOLYSACCHARIDE .....	12
1.6. LIPOPOLYSACCHARID ALS REZEPTOR FÜR DEN PHAGEN HK620 .....	14
1.6.1. <i>Die Kohlenhydratbindung durch HK620TSP</i> .....	15
1.6.2. <i>Die Kohlenhydratbindung bei verwandten Tailspike Proteinen</i> .....	16
1.7. DER INFEKTIONSMECHANISMUS DES PHAGEN P22 .....	17
1.8. ZIELSTELLUNG .....	18
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1. MATERIAL.....	20
2.1.1. <i>Chemikalien</i> .....	20
2.1.2. <i>Puffer und Medien</i> .....	20
2.1.3. <i>Enzyme</i> .....	21
2.1.4. <i>Molekulargewichtsmarker</i> .....	21
2.1.5. <i>Primer</i> .....	22
2.1.6. <i>Plasmide</i> .....	22
2.1.7. <i>Bakterienstämme</i> .....	23
2.1.8. <i>Geräte</i> .....	23
2.1.9. <i>Software</i> .....	25
2.1.10. <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	25
2.2. METHODEN .....	26
2.2.1. <i>Molekularbiologische Arbeiten</i> .....	26

2.2.1.1.	Ortsgerichtete Mutagenese .....	26
2.2.1.2.	Klonierung mittels <i>Splicing by Overlapextension</i> .....	26
2.2.1.3.	Ligation .....	27
2.2.1.4.	Transformation von Bakterien .....	27
2.2.1.5.	Kultivierung und Lagerung von Bakterien .....	27
2.2.1.6.	Isolierung von Plasmid-DNA .....	28
2.2.1.7.	Restriktionsverdau .....	28
2.2.1.8.	Agarose-Gelelektrophorese .....	28
<b>2.2.2.</b>	<b><i>Proteinbiochemische Methoden</i></b> .....	<b>28</b>
2.2.2.1.	Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	28
2.2.2.2.	Bakterienaufschluss .....	29
2.2.2.3.	Proteinreinigung .....	29
2.2.2.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
2.2.2.5.	Färbung von SDS-Gelen .....	30
<b>2.2.3.</b>	<b><i>Reinigung von Kohlenhydraten</i></b> .....	<b>30</b>
2.2.3.1.	Reinigung von Lipopolysaccharid .....	30
2.2.3.2.	Reinigung von Polysaccharid .....	32
2.2.3.3.	Herstellung von Oligosacchariden .....	33
<b>2.2.4.</b>	<b><i>Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von TSP</i></b> .....	<b>34</b>
2.2.4.1.	Nachweis reduzierender Enden mittels DNSA .....	34
2.2.4.2.	Aktivität gegenüber Lipopolysaccharid .....	34
<b>2.2.5.</b>	<b><i>Biophysikalische Methoden</i></b> .....	<b>34</b>
2.2.5.1.	Absorptionsspektroskopie .....	34
2.2.5.2.	Bindungsstudien .....	34
	<i>Fluoreszenztitrationsen</i> .....	35
	<i>Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)</i> .....	35
	<i>Oberflächenplasmonresonanz (SPR)</i> .....	36
2.2.5.3.	Zirkulardichroismus-Spektroskopie .....	36
2.2.5.4.	Kinetische Untersuchungen mittels <i>Stopped-Flow</i> .....	37
2.2.5.5.	Kristallographische Arbeiten .....	37
<b>2.2.6.</b>	<b><i>Arbeiten mit dem Phagen HK620</i></b> .....	<b>38</b>
2.2.6.1.	Reinigung des Phagen HK620 .....	38
2.2.6.2.	Herstellung von <i>Plating</i> -Bakterien .....	39
2.2.6.3.	Infektiösität des Phagen .....	39
	<i>Bestimmung des Titers durch Ausplattieren</i> .....	39
	<i>Untersuchungen in Flüssigkultur</i> .....	39
2.2.6.4.	Inhibierung der Infektiösität durch Lipopolysaccharid .....	40
2.2.6.5.	Nachweis der DNA-Ejektion mittels Gelelektrophorese .....	40
2.2.6.6.	Transmissions-Elektronenmikroskopie .....	40
<b>2.2.7.</b>	<b><i>Arbeiten mit dem Phagen P22</i></b> .....	<b>41</b>
2.2.7.1.	Reinigung von P22-Köpfen .....	41
2.2.7.2.	Anheften von TSP an die P22-Köpfe .....	41

---

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
3.1. KLONIERUNG UND EXPRESSION VON PROTEIN-VARIANTEN .....	42
3.2. REINIGUNG VON TAILSPIKE PROTEINEN AUS HK620 .....	43
3.3. REINIGUNG VON POLYMEREN KOHLENHYDRATEN .....	44
3.4. HERSTELLUNG VON OLIGOSACCHARIDFRAGMENTEN .....	45
3.4.1. <i>Arbeiten mit weiteren E. coli-Stämmen.....</i>	<i>49</i>
3.5. CHARAKTERISIERUNG DER VARIANTEN DES TAILSPIKE PROTEINS .....	51
3.5.1. <i>Aktivität gegenüber Polysaccharid.....</i>	<i>51</i>
3.5.2. <i>Aktivität gegenüber Lipopolysaccharid.....</i>	<i>52</i>
3.6. KOHLENHYDRATBINDUNG DURCH VERSCHIEDENE TSP-VARIANTEN .....	54
3.6.1. <i>Bindungsstudien mittels Fluoreszenztitration.....</i>	<i>55</i>
3.6.2. <i>Bindungsstudien mittels isothermaler Titrationskalorimetrie.....</i>	<i>57</i>
3.6.3. <i>Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Kohlenhydratbindung .....</i>	<i>60</i>
3.6.4. <i>Affinität zu O18A1-Antigenen aus verschiedenen Stämmen.....</i>	<i>61</i>
3.6.5. <i>Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonresonanz .....</i>	<i>61</i>
3.6.6. <i>Bindungsstudien mit längeren Oligosacchariden.....</i>	<i>62</i>
3.7. UNTERSUCHUNGEN BEZÜGLICH DER AFFINITÄTSERHÖHUNG .....	64
3.7.1. <i>Kokristallisation von HK620TSP-Varianten mit Hexasaccharid.....</i>	<i>64</i>
3.7.2. <i>Kristallisation der ligandenfreien Variante E372Q .....</i>	<i>68</i>
3.7.3. <i>Protonentransfer während der Kohlenhydratbindung .....</i>	<i>69</i>
3.8. SPEZIFITÄT DES TSP AUS DEM PHAGEN HK620.....	70
3.8.1. <i>Aktivität von HK620TSP gegenüber verschiedenen LPS.....</i>	<i>71</i>
3.8.2. <i>Aktivität von HK620TSP gegenüber verschiedenen PS .....</i>	<i>72</i>
3.8.3. <i>Präparation von Oligosacchariden des Antigentyps O18A.....</i>	<i>73</i>
3.8.4. <i>Bindung des O18A-Antigens durch HK620TSP .....</i>	<i>74</i>
3.8.4.1. <i>Die Bindung längerer O18A-Oligosaccharide .....</i>	<i>76</i>
3.8.4.2. <i>Der Einfluss von organischen Lösungsmitteln .....</i>	<i>77</i>
3.8.4.3. <i>Die Kohlenhydrat-Bindestelle von HK620TSP .....</i>	<i>79</i>
3.9. HERSTELLUNG DER TSP-VARIANTE E372Q/ $\Delta$ 471-2.....	81
3.9.1. <i>Bindung von Oligosacchariden durch Variante E372Q/<math>\Delta</math>471-2 .....</i>	<i>81</i>
3.10. KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN DER KOHLENHYDRATBINDUNG .....	82
3.11. ARBEITEN MIT DEM PHAGEN HK620.....	85
3.11.1. <i>Spezifität des Phagen HK620 in vivo .....</i>	<i>85</i>
3.11.2. <i>Induktion von Prophagen.....</i>	<i>86</i>
3.11.3. <i>In vitro Experimente zur Infektion durch HK620 .....</i>	<i>87</i>
3.11.4. <i>Experimente zur DNA-Ejektion mit verschiedenen LPS.....</i>	<i>89</i>

3.11.5. Inaktivierung des Phagen HK620 durch LPS.....	90
3.11.6. Studien zur DNA-Ejektion mittels Elektronenmikroskopie.....	91
3.11.7. Beeinflussung der Spezifität von Phagen.....	93
3.11.8. Untersuchung der Hybrid-Phagen mittels TEM.....	95
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
4.1. DIE REINIGUNG VON TAILSPIKE PROTEIN-VARIANTEN .....	96
4.2. DIE REINIGUNG VON KOHLENHYDRATEN.....	97
4.2.1. Die Reinigung von Kohlenhydraten aus <i>E. coli</i> H TD2158 .....	98
4.2.2. Die Reinigung von Kohlenhydraten aus <i>E. coli</i> IHE3042 .....	98
4.2.3. Die Reinigung von Kohlenhydraten des Antigentyps O18A.....	99
4.3. SPEZIFITÄT UND AKTIVITÄT VON TSP AUS DEM PHAGEN HK620 .....	100
4.3.1. Generierung inaktiver TSP-Varianten .....	101
4.4. DIE KOHLENHYDRATBINDUNG DURCH HK620TSP .....	102
4.4.1. Affinitätssteigerung durch einzelne Aminosäureaustausche .....	103
4.4.2. Weitere Bindungseigenschaften von HK620TSP.....	107
4.4.3. Die Thermodynamik der Kohlenhydratbindung durch TSP.....	109
4.5. DIE BINDUNG VON O18A-ANTIGEN-FRAGMENTEN .....	112
4.6. DIE ZUCKERBINDESTELLE IN HK620TSP .....	114
4.7. ARBEITEN MIT DEM PHAGEN HK620.....	118
4.7.1. <i>In vitro</i> Untersuchungen zur DNA-Ejektion durch HK620.....	120
4.7.2. Inhibition der Infektiosität des Phagen HK620 durch LPS.....	123
4.7.3. Beeinflussung der Spezifität von Podoviren.....	125
4.8. ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION .....	126
<b>5. LITERATUR .....</b>	<b>130</b>
<b>6. ANHANG .....</b>	<b>142</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>148</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. **Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen**

Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen sind aufgrund ihrer Funktion bei der Zell-Zell-Erkennung von besonderem Interesse. Aufgrund der exponierten Lage der Zucker auf Zelloberflächen stellen sie wichtige Erkennungsstrukturen für Immunreaktionen, unterschiedliche zelluläre Prozesse sowie für Wirt-Pathogen-Interaktionen dar (Varki 2007; Lentz 1990; Crocker *et al.* 2007; Lis & Sharon 1998). Als Beispiele für solche zellulären Prozesse sind die Befruchtung und die Nervenentwicklung in der Embryogenese zu nennen (Töpfer-Petersen 1999; Varki 2007). Die große Vielfalt an Funktionen von Zuckerstrukturen ist mit einer immensen strukturellen Diversität dieser Kohlenhydrate und der sie bindenden Proteine verbunden (Quiocho 1986). Durch unterschiedliche Verknüpfungen, verschiedene Epimere und Konformere übersteigen die Möglichkeiten des Zuckercodes die auf DNA- oder Proteinebene (André *et al.* 2007): Vergleicht man die Anzahl aller möglichen Moleküle aus sechs „Bausteinen“, erhält man 4096 Möglichkeiten für Oligonukleotide,  $6,4 \times 10^6$  für Peptide und  $1,4 \times 10^{15}$  für Saccharide (Gabiús *et al.* 2011). Durch diese Vielfalt und die entscheidende Rolle der Zucker bei Infektionen und verschiedenen Krankheiten ist das Interesse an Zuckerstrukturen und Proteinwechselwirkungen mit diesen gestiegen. Entsprechend befinden sich Impfstoffe in der Entwicklung, welche die Produktion von Antikörpern gegen Zuckerstrukturen bewirken, die mit Krankheiten wie Malaria, Krebs und HIV assoziiert sind (Hecht *et al.* 2009; Westerlind & Kunz 2011; Danielczyk *et al.* 2006; Ravn *et al.* 2007; Doores *et al.* 2010; B. E. Clark *et al.* 2012). Trotz dieser Entwicklung liegt das Verständnis für Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen und für ihre Triebkräfte noch in den Anfängen, während die Triebkräfte von Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie Proteinfaltung und strukturelle Grundlagen für diese schon lange Gegenstand intensiver Forschung sind (Baldwin 2007; Bolen & G. D. Rose 2008).

In der seit 1998 bestehenden Datenbank CAZy (*Carbohydrate-active enzymes database*) sind 24080 kohlenhydratbindende Module (CBM) vermerkt. Bei CBM handelt es sich um nicht-katalytische, kohlenhydratbindende Module von Polysaccharid-degradierenden Hydrolasen (Boraston *et al.* 2004). In der Datenbank CAZy sind zudem etwa 100000 Enzyme neben Hydrolasen vermerkt. Nicht-enzymatische, kohlenhydratbindende Proteine wie Lektine sind in der Datenbank nicht erfasst. In der Proteindatenbank (PDB) sind hingegen nur 1979 drei-

dimensionale Strukturen für kohlenhydratbindende Proteine sowie 4865 unter dem Stichwort Kohlenhydratmetabolismus hinterlegt (Stand März 2012). Sucht man speziell Lektine findet man 192 Einträge. Diese Zahlen spiegeln wider, dass eine unglaublich große Vielfalt an kohlenhydratbindenden Proteinen vorhanden ist und bislang nur ein Bruchteil der Proteine strukturell untersucht wurde. Entsprechend wenig umfassend ist bisher das Wissen um Kohlenhydratbindung; und Vorhersagen über Kohlenhydratbindung zu treffen oder die Wechselwirkungen zwischen Protein und Kohlenhydrat gezielt zu beeinflussen, ist eine herausfordernde Aufgabe (Taroni *et al.* 2000; Shionyu-Mitsuyama *et al.* 2003; Kerzmann *et al.* 2006). Dabei wären diese Vorhersagen von entscheidender Bedeutung, um Kohlenhydrat-basierte Pharmaka gezielter und effektiver entwickeln zu können. Ein Problem bei den Vorhersagen ist z.B., dass die enthalpischen Beiträge einzelner Wasserstoffbrücken nicht quantifiziert werden können und die Gibbs Energie der Bindung nicht linear mit der Anzahl der Wasserstoffbrücken korreliert, was für bisher nicht quantifizierbare Einflüsse durch Lösungsmittel und das Protein spricht (Chervenak & Toone 1995; Gupta *et al.* 1997).

## **1.2. Beispiele für kohlenhydratbindende Proteine**

Kohlenhydrate bieten eine große strukturelle Vielfalt und sind in viele Erkennungsprozesse involviert. Entsprechend vielfältig sind kohlenhydratbindende Proteine und ihre biochemischen Aufgaben. Zu diesen Proteinen gehören Lektine, bakterielle Bindeproteine aus dem Periplasma, für Kohlenhydrate spezifische Antikörper, Membrantransport-Proteine und Enzyme, die Kohlenhydrate umsetzen. Zuletzt genannte Enzyme weisen insbesondere für den Abbau pflanzlicher Polysaccharide meist modulare Strukturen auf, bei denen das aktive Zentrum mit einer oder mehreren CBM verknüpft ist (Boraston *et al.* 2004).

Anfang der 90er Jahre wurden kohlenhydratbindende Proteine grob nach ihren Bindungseigenschaften in zwei Gruppen eingeteilt (N. K. Vyas 1991; Weis & Drickamer 1996). Zur Vereinfachung wird diese Unterteilung benutzt und es werden beispielhaft Mitglieder dieser Gruppen vorgestellt.

Proteine der Gruppe 1 binden ihre Kohlenhydrate mit hohen Affinitäten meist unter Konformationsänderungen in tiefe Taschen, wobei der Ligand stark vom Lösungsmittel abgeschirmt wird. Dahingegen binden Mitglieder aus der zweiten Gruppe die Kohlenhydrate mit geringen Affinitäten in flache, vorgeformte Furchen (N. K. Vyas 1991; Weis & Drickamer 1996).

Als Beispiele für die erste Gruppe werden im folgenden Abschnitt die Bindungseigenschaften von Antikörpern, die spezifisch für Kohlenhydrate sind, sowie von periplasmatischen Binde-

proteinen beschrieben. Lektine stellen ein typisches Beispiel für Proteine der Gruppe 2 dar. Dabei ist anzumerken, dass neben den Unterschieden zwischen diesen Gruppen die gleichen Grundzüge in der Kohlenhydraterkennung in unterschiedlichen Abstufungen zu finden sind. Dazu zählen schwache Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrücken, van der Waals Kontakte und Stapelung der Saccharide an aromatische Aminosäuren sowie die Verdrängung von Wasser durch Bindung des Kohlenhydrats (Quioco 1986; Weis & Drickamer 1996; Toone 1994; Ambrosi *et al.* 2005).

### 1.2.1. Antikörper und bakterielle, periplasmatische Bindeproteine

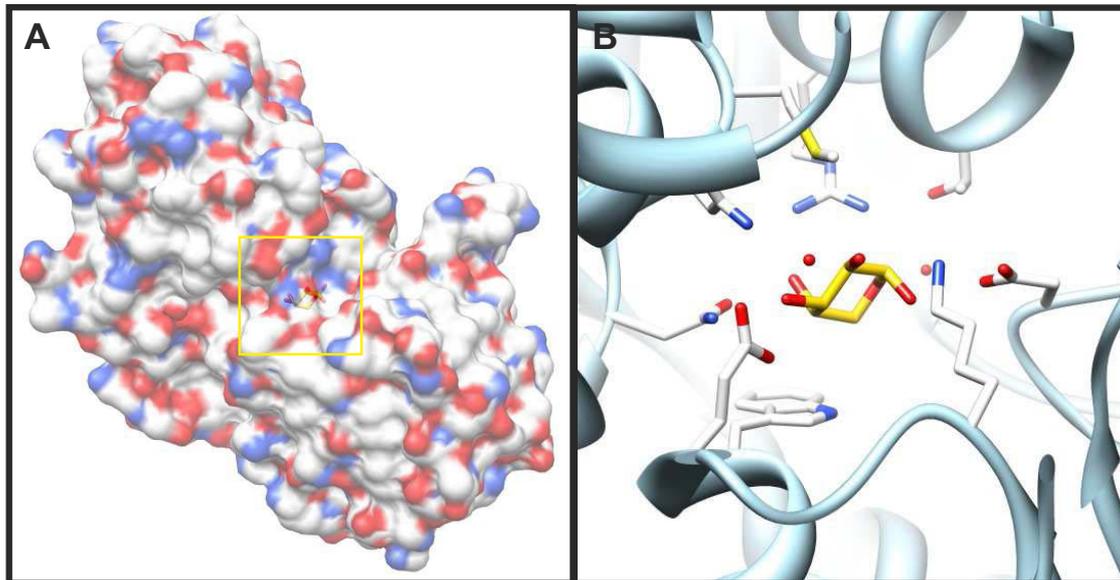
Antikörper zeichnen sich durch hohe Affinitäten gegenüber dem Antigen bis in den Bereich von pikomolaren Dissoziationskonstanten aus. Damit stellen sie hochspezialisierte Werkzeuge des Immunsystems dar.

Im periplasmatischen Raum Gram-negativer Bakterien können Bindeproteine gefunden werden, die als primäre Rezeptoren zum Transport und zur Chemotaxis dienen. Kohlenhydrat-bindende Antikörper und periplasmatische Bindeproteine zeichnen sich durch hohe Affinitäten (nanomolare Dissoziationskonstanten) im Vergleich zu Lektinen aus, die sie meist durch Bindung der Zucker in tiefe Bindestellen unter teils starken Konformationsänderungen erreichen (Gerstenbruch *et al.* 2010; Quioco 1986; Müller-Loennies *et al.* 2000). Das Kohlenhydrat wird entsprechend stark durch das Protein vom Lösungsmittel abgeschirmt, wodurch ein großer Teil der Oberfläche des Liganden durch Protein bedeckt ist. Daher sind für Antikörper stark Temperatur-abhängige Wärmekapazitätsänderungen bis zu  $-4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  durch die Bindung zu messen (Toone 1994; Sigurskjöld & Bundle 1992).

Die Wärmekapazität des Systems wird bei Bindung durch verschiedene Faktoren beeinflusst, die eine Änderung in Vibrations- und Schwingungsmodi, welche Wärme absorbieren, bewirken (Chavelas & García-Hernández 2009). Am anschaulichsten ist dabei der Faktor, dass durch Bindung Wassermoleküle von der Protein- und Ligandenoberfläche verdrängt werden und das Kohlenhydrat bei der Bindung an Flexibilität verliert. Dadurch gehen entsprechende Schwingungen und Vibrationen durch Wassermoleküle und den Zucker zum Teil verloren, wodurch ein Verlust von Wärmekapazität ( $\Delta C_p$ ) durch die Bindung entsteht.

Da die Kohlenhydrate bei periplasmatischen Bindeproteinen und vielen Antikörpern meist stark vom Lösungsmittel abgeschirmt werden, ergibt sich der beschriebene, große Verlust an Wärmekapazität durch die Bindung. Abbildung 1-1 zeigt beispielhaft die Bindestelle des L-Arabinose-bindenden Proteins (ABP). Der Ligand Arabinose ist von dem bilobären L-

Arabinose-bindenden Protein zu etwa 98% begraben (Newcomer *et al.* 1981; Quioco & N. K. Vyas 1984; Quioco 1986; Gabius *et al.* 2011).



**Abb. 1-1: Die Kohlenhydratbindung durch das Arabinose-bindende Protein (ABP).** Die Struktur des ABP im Komplex mit Arabinose (1ABE) ist in raumfüllender Darstellung im Überblick (A) gezeigt (Newcomer *et al.* 1981; Quioco & N. K. Vyas 1984). Die Arabinose (gelb) ist komplett von dem bilobären Protein umgeben (B). Es sind nur zwei Wassermoleküle (rote Kugeln) in der Arabinose-Bindestelle koordiniert.

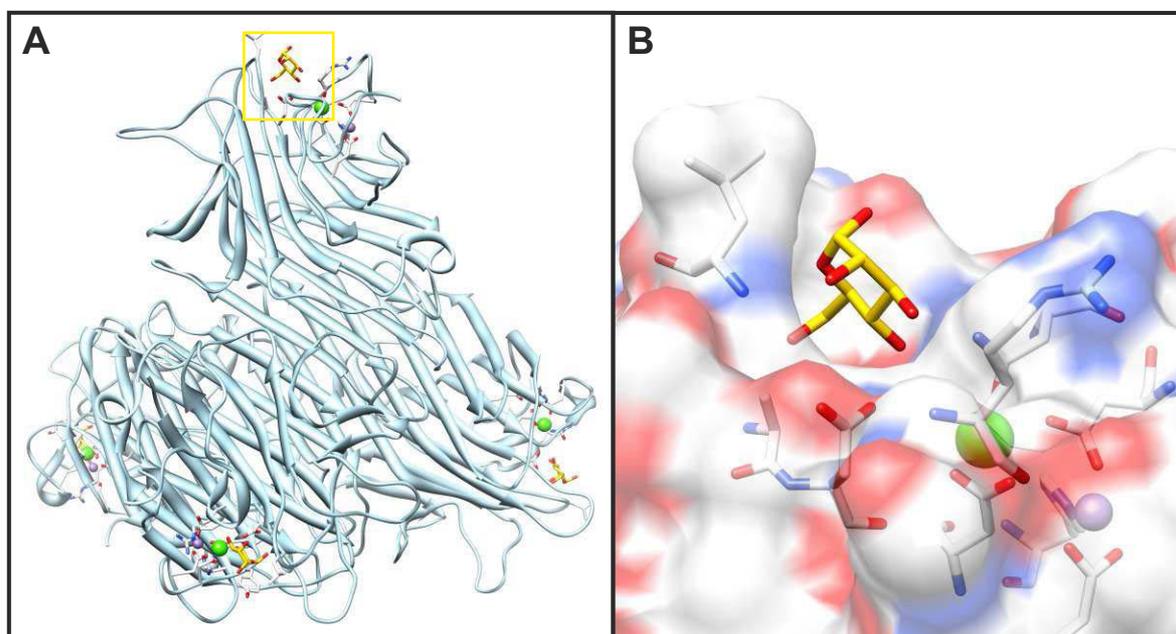
### 1.2.2. Lektine

Bei Lektinen handelt es sich um kohlenhydratbindende Proteine, die als eigene Klasse neben Enzymen und Immunoglobulinen definiert werden. Sie existieren in vielen Spezies von Bakterien und Viren, über Pflanzen bis hin zu Tieren und sind für die Erkennung von Zuckern auf der Zelloberfläche zuständig. Pflanzliche Lektine wurden bereits vor über 100 Jahren entdeckt (Y. C. Lee & R. T. Lee 1995), was die Gruppe der Lektine wohl zu der am besten charakterisierten Familie der kohlenhydratbindenden Proteine macht. Die meisten Lektine wurden bisher in Samen von Gemüse und Getreide gefunden. Tierische Lektine werden zum Teil nach Ähnlichkeiten zu Immunoglobulinen oder pflanzlichen Lektinen (I- und L-Typ) bzw. nach ihren Eigenschaften (Calcium-Abhängigkeit, C-Typ) unterteilt (Weis & Drickamer 1996). Des Weiteren bietet sich eine Unterteilung entsprechend der Monosaccharide, gegenüber denen die Lektine die höchste Affinität aufweisen, an. Entsprechend klassifizierten Lis und Sharon Lektine in folgende fünf Gruppen: Mannose, Galactose/ N-Acetylgalactosamin, N-Acetylglucosamin, Fucose oder N-Acetylneuraminsäure (Lis & Sharon 1998).

Lektine zeichnen sich meist durch flache Bindungsfurchen und eine relativ schwache Affinität gegenüber Monosacchariden mit Dissoziationskonstanten im millimolaren Bereich aus. Die

Affinität ist dabei aufgrund von einer geringen Anzahl an Kontakten zwischen Protein und Ligand gering. Eine Ausweitung der Bindestelle und Multivalenz durch multiple Bindestellen oder durch Bindung an akkumulierte Glycostrukturen wie auf einer Zelloberfläche (*cluster glycoside effect*) erhöhen die Affinität. Dies sowie die hohe Spezifität von Lektinen gegenüber Oligosacchariden befähigt diese, als Erkennungsmoleküle in biologischen Prozessen zu wirken (Ambrosi *et al.* 2005; Weis & Drickamer 1996).

Die Bindung von Kohlenhydraten durch klassische Lektine ist typischerweise enthalpisch getrieben, wobei diesem Enthalpieterm eine für die Bindung ungünstige Entropie entgegenwirkt (Dam & Brewer 2002; García-Hernández *et al.* 2003). Obwohl die Affinität von Lektinen gegenüber Oligosacchariden im Vergleich zu kleineren Zuckern erhöht ist, sind nur wenige strukturelle Daten für Lektine in Komplexen mit diesen längeren Kohlenhydratfragmenten erhältlich. Die Bindung von weniger komplexen Sacchariden (Mono- oder Disaccharide) ist mit einem geringen Grad der Abschirmung von dem Lösungsmittel verbunden. In Abbildung 1-2 ist beispielhaft die Struktur des am längsten bekannten Lektins, Concanavalin A, im Komplex mit Mannose zu sehen. Jedes Monomer des tetrameren Proteins bindet eine Mannose (gelb), ein Calciumion (grün) und ein Manganion (lila). Die Ionen sind an die Bindestelle für die Mannose koordiniert und essentiell für die Struktur der Bindestelle (Bouckaert *et al.* 1995).



**Abb. 1-2: Struktur des Lektins Concanavalin A im Komplex mit Mannose.** Das gesamte tetramere Protein ist links gezeigt (A, PDB: 4CNA). Jedes Monomer bindet eine Mannose (gelb), ein Manganion (lila) sowie ein Calciumion (grün). Die Bindestelle für die Mannose (in A gelb umrahmt) ist im Detail gezeigt (B). Die Mannose ist an der Oberfläche des Monomers gebunden. An die Bindestelle sind die essentiellen Mangan- und Calciumionen koordiniert.

Mit der durch den Liganden besetzten Oberfläche am Protein bzw. der Änderung der Lösungsmittel-Zugänglichkeiten korreliert die Wärmekapazitätsänderung durch Bindung (vgl. Abschnitt 1.2.1.). Entsprechend der geringen Kontaktfläche zwischen Ligand und Protein ist die Wärmekapazitätsänderung bei Lektin-Kohlenhydrat-Bindungen mit bis zu  $-0,4 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$  vom Betrag her klein (Toone 1994).

In der Gruppe der Lektine stellen bakterielle Lektine eine Ausnahme dar. Sie weisen oft höhere Affinitäten gegenüber ihren Liganden auf und entsprechend sind thermodynamische Parameter zu beobachten, die sich von klassischen Lektinen unterscheiden (Pokorná *et al.* 2006).

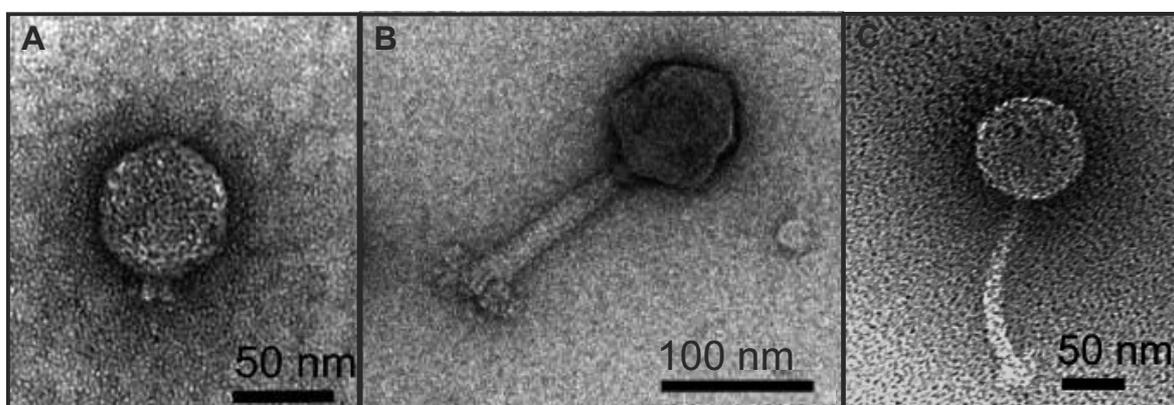
### **1.3. Bakteriophagen: Vorkommen und Morphologien**

Bei Viren handelt es sich um eine weit verbreitete Spezies: So sind im Meereswasser z.B. etwa  $3 \times 10^9$  Partikel pro Liter zu finden (Suttle 2005). Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien infizieren und sie als Wirt zur Vervielfältigung nutzen. Viren und somit auch Bakteriophagen sind nicht in der Lage sich unabhängig von der Wirtszelle zu replizieren. Die ersten Phagen wurden vor etwa 100 Jahren von Twort und d'Herelle beschrieben. Sie sind aufgrund der Tatsache, dass sie Bakterien lysieren, als Phagen (aus dem Griechischen *phagein* - bedeutet fressen) benannt (Chibani-Chennoufi *et al.* 2004; Lu & Koeris 2011). Mit geschätzt über  $10^{30}$  Partikeln auf der Erde stellen Phagen das zahlenmäßig am stärksten vertretene biologische System dar (Chibani-Chennoufi *et al.* 2004).

Aufgrund der bakteriziden Wirkung von Phagen wurden diese zur Therapie genutzt. Wegen des geringen Verständnisses der Biologie von Bakteriophagen, therapeutisch gemischter Erfolge und durch die Einführung von Breitband-Antibiotika wurde bislang von der Therapie mit Phagen in der westlichen Welt zumeist abgesehen (Lu & Koeris 2011). In den letzten Jahren wurde die Therapie mit Phagen wieder vorangetrieben und es befinden sich einige Phagenbasierte Mittel in klinischen Studien. Außerhalb von Deutschland sind einige Phagenprodukte schon in der Lebensmittelindustrie in Nutzung. So wird z.B. ein Phage mit *Lysteria monocytogenes* als Wirt zur Entkeimung von Nahrungsmitteln benutzt (Petty *et al.* 2007; Hagens & Offerhaus 2008; Lu & Koeris 2011).

Bakteriophagen werden entsprechend ihrer Morphologie und der Nukleinsäuren, die sie tragen, eingeteilt. Die Ordnung der *Caudovirales* beinhaltet drei Familien an Phagen mit Schwanzstrukturen, deren Proteinkapside mit doppelsträngiger (ds) DNA gefüllt sind: *Podoviridae*, *Myoviridae* und *Siphoviridae* (Ackermann 1998; Ackermann 2001). Ein Großteil (etwa 96%) an Bakteriophagen weist eine Schwanzstruktur auf. Die *Siphoviridae* stellen unter den *Caudo-*

*virales* mit etwa 61% die größte Familie dar (Ackermann 2001). Sie zeichnen sich durch einen langen, nicht-kontraktilen Schwanz aus (Abb. 1-3 C). Die *Myoviridae* haben einen langen, kontraktilen Schwanz (B), während die *Podoviridae* eine kurze, nicht-kontraktile Schwanzstruktur aufweisen (A).

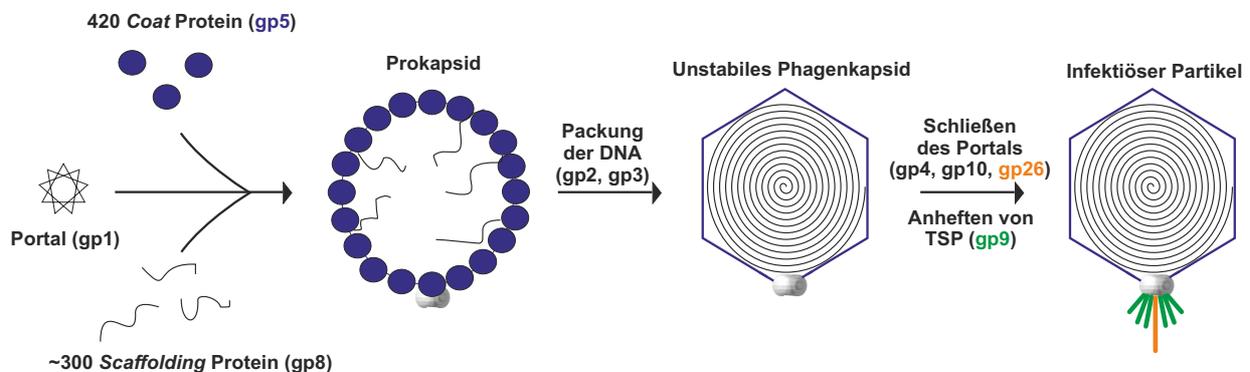


**Abb. 1-3: Die drei Familien der *Caudovirales*.** Gezeigt sind Elektronenmikroskopie-Aufnahmen der Phagen P22 (A), Det7 (B) und 9NA (C) (Andres, Roske *et al.* 2012; Walter *et al.* 2008). Sie stellen Mitglieder der Familien *Podoviridae*, *Myoviridae* und *Siphoviridae* dar. Die Phagen wurden in einem *negative staining* mit Uranylacetat gefärbt. Die Maßstäbe sind eingezeichnet.

Unter Bakteriophagen ist Temperenz stark verbreitet, das heißt, dass diese ihr Genom als sogenannten Prophagen in das der Bakterien einbauen können und durch bestimmte Reize ein Übergang aus diesem Lysogen in den lytischen Zyklus induziert werden kann. Ein gleichermaßen für Bakterien sowie Bakteriophagen evolutionär wichtiges Phänomen ist die sogenannte lysogene Konversion. Dies beschreibt die Gewinnung neuer Eigenschaften für das Bakterium durch einen Prophagen im Lysogen. Der Gentransfer durch Transduktion oder lysogene Konversion durch Phagen beeinflusst im großen Maße die genetische Vielfalt von Bakterien. Die globale Rate von Phagen-induzierten Genmodifikationen wird auf  $20 \times 10^{15}$  Gentransfers pro Sekunde geschätzt (Brüssow *et al.* 2004). Die durch lysogene Konversion induzierten Veränderungen im Bakterium dienen oft dazu, weitere Infektionen durch andere Phagen zu verhindern. Durch andere Faktoren wie durch Prophagen kodierte Toxine (z.B. Shiga Toxin) kann jedoch auch die pathogene Potenz des Bakteriums gesteigert werden (Brüssow *et al.* 2004). Für die vorliegende Arbeit sind vor allem Änderungen in der Struktur der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien interessant, die durch lysogene Konversion bewirkt werden können und in Kapitel 1.5. beschrieben werden.

### 1.3.1. Der Bakteriophage P22 als Prototyp der *Podoviridae*

Bei dem Phagen P22 handelt es sich um einen Prototypen der Familie *Podoviridae*. Dieser Phage wurde bereits 1952 durch Zinder und Lederberg entdeckt und unterliegt somit bereits seit 60 Jahren intensiven Forschungen (Prevelige, 2006). Der Phage zeichnet sich durch einen ikosaedrischen Kopf, der mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) gefüllt ist, und einen kurzen, nicht-kontraktilen Schwanz aus (Israel *et al.* 1967). Das Kapsid besteht aus einem Protein (gp5), dessen Struktur in vielen *Caudovirales* und sogar *Herpesviridae* konserviert ist (Parent *et al.* 2010). Neben dieser Homologie wird aufgrund von weiteren genetischen und strukturellen Gemeinsamkeiten generell ein gemeinsamer Vorfahre für alle Bakteriophagen, die dsDNA beinhalten, vermutet (Hendrix *et al.* 1999; Hendrix *et al.* 2003).

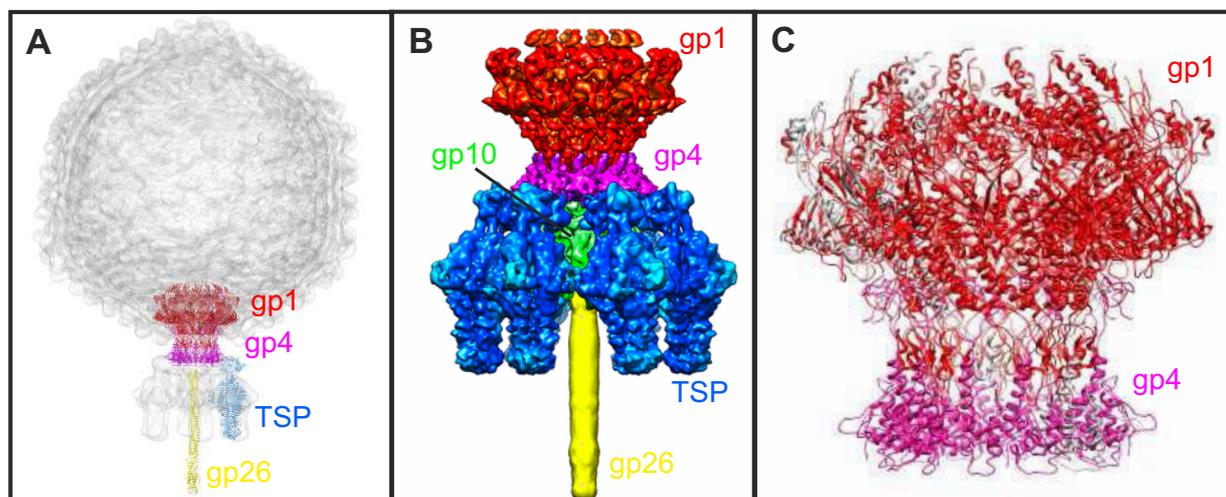


**Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Assemblierung des Phagen P22** (Abbildung orientiert an Calendar 2006). Details sind dem Fließtext zu entnehmen.

Während der Assemblierung von P22 (Abb. 1-4) wird ein Prokapsid aus *coat* Protein (gp5) und *scaffolding* Protein (gp8) gebildet, wobei das Portal (gp1) bereits eingebunden wird (King *et al.* 1976; King *et al.* 1973). Das Prokapsid wird durch einen ATP (Adenosintriphosphat)-verbrauchenden Mechanismus mit dsDNA gefüllt (Nemecek *et al.* 2007). Die DNA im Phagenkopf wird dabei stark kondensiert und die Füllung mit DNA induziert eine Konformationsänderung im Kapsid, die zu einer Expansion und zur Ausbildung der ikosaedrischen Form führt (Abb. 1-4). Das Portal des Kapsids wird sequenziell mit den Proteinen gp4 sowie gp10 und final durch das sogenannte *Plug* Protein (gp26) verschlossen (Calendar 2006). Das Kapsid ist nach diesen Schritten stabil und in einem letzten Schritt werden sechs *Tailspike* Proteine (TSP) angeheftet.

Die detaillierte Struktur des Portals bzw. der davon ausgehenden *tail machine* ist in Abbildung 1-5 dargestellt. Für diese Abbildungen wurden bekannte Kristallstrukturen der Bestandteile der *tail machine* (gp1, gp4, gp9 (TSP) und gp26) in die Struktur des Phagen P22 modelliert, die durch *Cryo*-Elektronenmikroskopie (*Cryo*-EM) gelöst wurde (A und B). Die TSP binden mit

ihrer N-terminalen Kapsidbinde-Domäne an die Interaktionsfläche zwischen gp4 und gp10 (Lander *et al.* 2009).

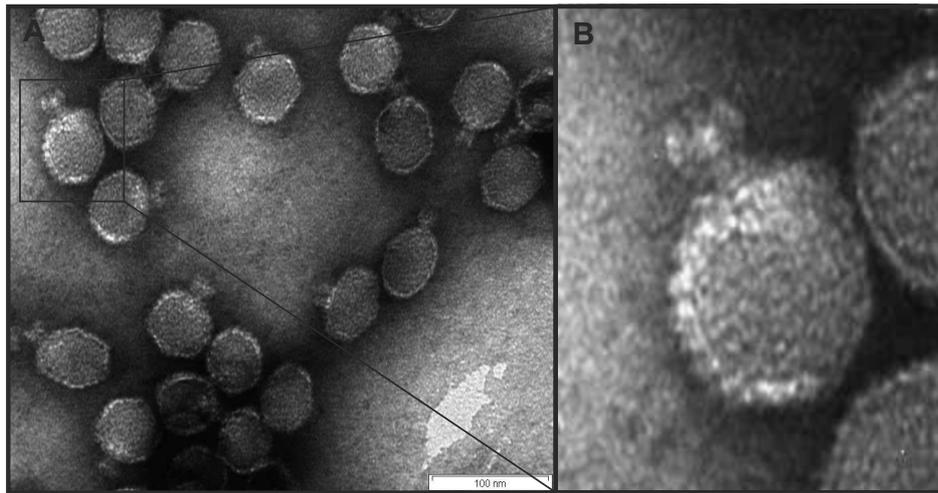


**Abb. 1-5:** Die schematische Darstellung des Phagen P22 (A) und der sogenannten *tail machine* im Detail (B). Als Grundlage für die Abbildung des ganzen Phagen diente die Cryo-EM Struktur des Phagen P22 (EMDB: 1222) (J. Chang *et al.* 2006). Die Strukturen des *Plug* Proteins gp26 (gelb, PDB: 2POH) (Olia *et al.* 2007) sowie der P22TSP-Variante Y108W (blau, PDB: 2XC1) (Seul 2008) sind in die Dichtekarte des Phagen angepasst worden. Bei der Variante Y108W handelt es sich um die einzige Vollängenstruktur von P22TSP, die aufgrund der Stabilisierung der flexiblen Linkerregion erhalten werden konnte (vgl. Abschnitt 1.4. und Seul 2008). Die Struktur der *tail machine* ist im Detail in B gezeigt (modifiziert nach Lander *et al.* 2009). Die Strukturen von gp1 und gp4 (PDB: 3LJ4) (Olia *et al.* 2011) sind in allen Abbildungen rot bzw. in Magenta dargestellt und im Detail mit je einer Untereinheit in Grau gezeigt (C).

### 1.3.2. Vorkommen und Struktur des Bakteriophagen HK620

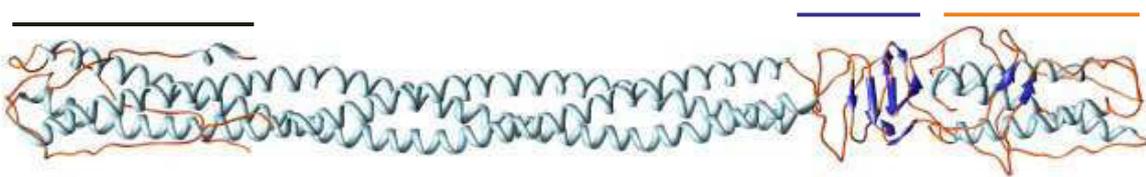
Der Bakteriophage HK620 wurde 1997 in Hongkong (HK) in Abwässern gefunden und als Mitglied der Familie *Podoviridae* klassifiziert (Dhillon *et al.* 1998). Das Genom von HK620 wurde vollständig sequenziert (A. J. Clark *et al.* 2001). Über Sequenzvergleiche und anhand der Morphologie, die in elektronenmikroskopischen Untersuchungen begutachtet wurde (Abb. 1-6), wurde eine Verwandtschaft zu dem zuvor beschriebenen Phagen P22 festgestellt (Casjens & Thuman-Commike 2011). Der Phage HK620 gehört zu den temperenten Phagen und gehört wie P22 zu der Familie lambdoider Phagen, da sie mit der DNA des Phagen  $\lambda$  rekombinante Hybride ausbilden können (Botstein & Herskowitz 1974; Dhillon *et al.* 1998).

Der Phage HK620 und seine Komponenten sind strukturell und funktionell kaum untersucht. Neben der Ähnlichkeit zu dem Phagen P22 bezüglich der Morphologie wurden Homologien zwischen verschiedenen Proteinen aus den Bakteriophagen P22 und HK620 festgestellt (Casjens & Thuman-Commike 2011).



**Abb. 1-6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Phagen HK620** ( $10^{10}$  Pfu/ml in 50 mM TrisHCl, 1 mM EDTA pH 7,5). Diese Aufnahmen wurden von S. Rüstig aus der Arbeitsgruppe von Prof. Koetz an der Universität Potsdam angefertigt (vgl. Abschnitt 2.2.6.6.) und es wurde dafür ein *negative staining* mit Uranylacetat verwendet. Der Maßstab von 100 nm ist eingezeichnet (A).

Auf die Strukturhomologie zwischen den TSP der Phagen HK620 und P22 soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden. An dieser Stelle sollen jedoch Ähnlichkeiten der *Plug* Proteine (gp26) aus den beiden Phagen beschrieben werden. Die trimeren *Plug* Proteine verschließen das Kapsid mit ihrem N-Terminus (Abb. 1-5/7). Diese N-terminale Domäne I ist stark konserviert, während die zentrale Domäne II unterschiedlich stark ausgedehnte *coiled-coil* Strukturen aufweist (Casjens & Thuman-Commike 2011; Bhardwaj *et al.* 2009). In P22 ist der C-Terminus (IV) eine invertierte *coiled-coil* Struktur, welche durch eine kurze  $\beta$ -Helix (III) mit der zentralen Struktur verbunden ist (Olia *et al.* 2007; Bhardwaj *et al.* 2009). Sequenzhomologien mit 60% Identität lassen für gp26 aus HK620 eine sehr ähnliche Struktur vermuten (Bhardwaj *et al.* 2009). Die *Plug* Proteine (gp26) aus HK620 und P22 bestehen jeweils aus 233 Aminosäuren. Die Domäne I sowie der C-Terminus (Domäne III und IV) aus den beiden Proteinen weisen eine hohe Sequenzidentität von 85% bzw. 70% auf. Die *coiled-coil* Struktur der Domäne II hat für die homologen gp26 aus HK620 und P22 die gleiche Länge (aus 11 Heptad-Wiederholungen) und weist mit 37% die geringste Sequenzidentität auf.

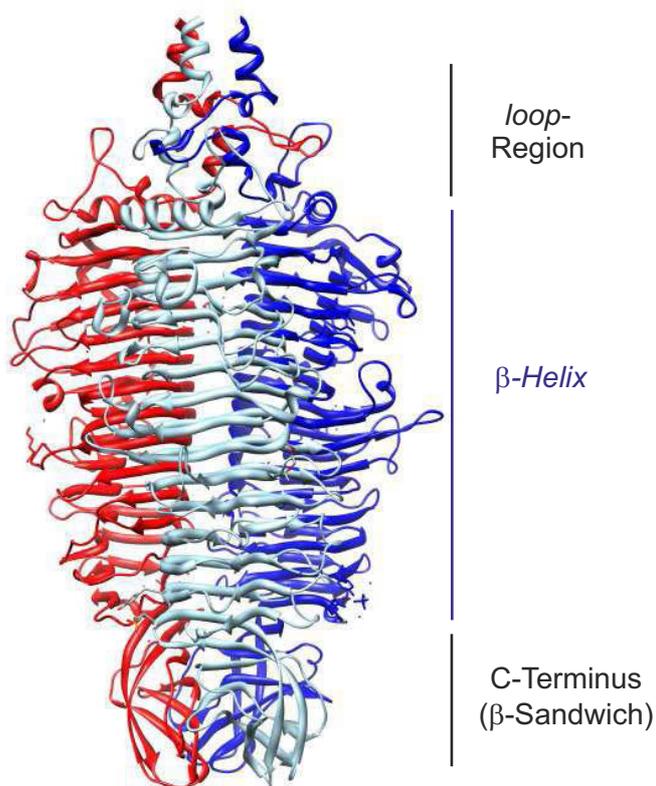


**Abb. 1-7: Trimeres *Plug* Protein gp26 aus dem Phagen P22 (PDB: 2POH).** Die Struktur dieses Proteins ist im Text beschrieben (Olia *et al.* 2007).

## 1.4. Das Tailspike Protein des Phagen HK620

Bei dem TSP des HK620-Phagen handelt es sich um ein trimeres Protein. Die TSP aus HK620 und P22 erkennen, binden und hydrolysieren das Lipopolysaccharid der Wirtsbakterien (U. Eriksson *et al.* 1979; Barbirz *et al.* 2008). Im Fall von P22 ist gezeigt worden, dass die TSP essentiell für die Infektion durch den Phagen sind.

Die N-terminale Domäne von P22TSP bindet an die Portalstruktur des Kapsids (vgl. Abschnitt 1.3.1.). Unter den P22-ähnlichen Phagen ist die N-terminale Sequenz der Kapsidbindedomäne der TSP aufgrund der Bindung an das stark konservierte Protein gp10 ebenfalls konserviert (Casjens & Thuman-Commike 2011). Der N-Terminus ist über einen flexiblen Linker mit dem restlichen Protein verbunden. Dieser Linker unterbindet die Kristallisation des Proteins, daher ist bisher nur die Kristallstruktur von HK620TSP ohne N-terminale Domäne, d. h. ohne die ersten 110 Aminosäuren, bekannt (Barbirz *et al.*, 2008). Die N-terminale Domäne beeinflusst die Eigenschaften von HK620TSP und seine Aktivität gegenüber dem LPS kaum (Barbirz *et al.* 2008). Die Struktur von HK620TSP wird vor allem durch eine ausgedehnte  $\beta$ -Helix mit 13

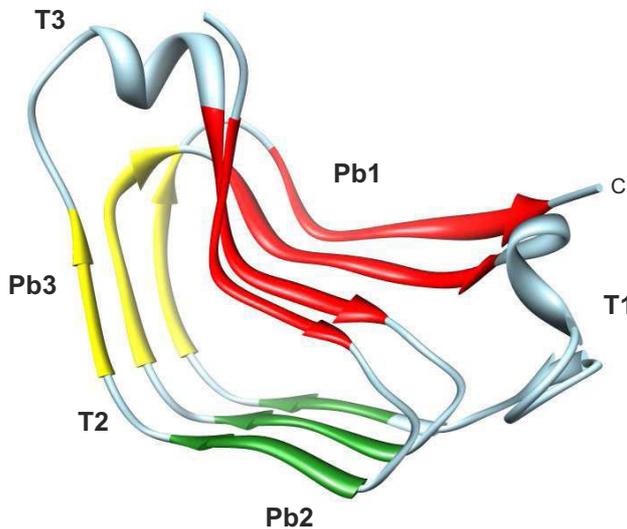


**Abb. 1-8: Struktur des um die N-terminale Domäne verkürzten ( $\Delta$ aa 1-110) TSP aus dem Phagen HK620 (PDB: 2VJI; Barbirz *et al.* 2008). Die ersten Aminosäuren sind in dieser Struktur nicht aufgelöst (erst ab aa 114). Details sind dem Text zu entnehmen.**

Windungen dominiert (Abb 1-8), welche im weiteren Verlauf dieses Kapitels näher beschrieben wird. Durch diese Struktur ist eine hohe Stabilität des TSP bedingt: es denaturiert bei 90°C erst nach 4 h vollständig und weist eine hohe Resistenz gegenüber SDS und Proteasen auf (Barbirz *et al.* 2009). An den N-terminalen *loop* (aa 114-149) schließt sich die rechtshändige, parallele  $\beta$ -Helix an (aa 150-631), gefolgt von einem  $\beta$ -Sandwich (aa 632-709).

Die  $\beta$ -Helix wird durch die Stapelung verschiedener Valine und Isoleucine sowie Phenylalanine und Cysteine stabilisiert. Zudem wurden zwei Asparaginleitern gefunden: Eine, die ins Innere der  $\beta$ -Helix zeigt, und eine lösungsmittel-exponierte (Barbirz *et al.*, 2008).

Das zentrale Motiv der rechtsgängigen, parallelen  $\beta$ -Helix zeichnet sich durch ein ausgedehntes Netzwerk aus Wasserstoffbrücken aus, welches den hydrophoben Kern der Helix abschirmt (Hennetin *et al.* 2006).



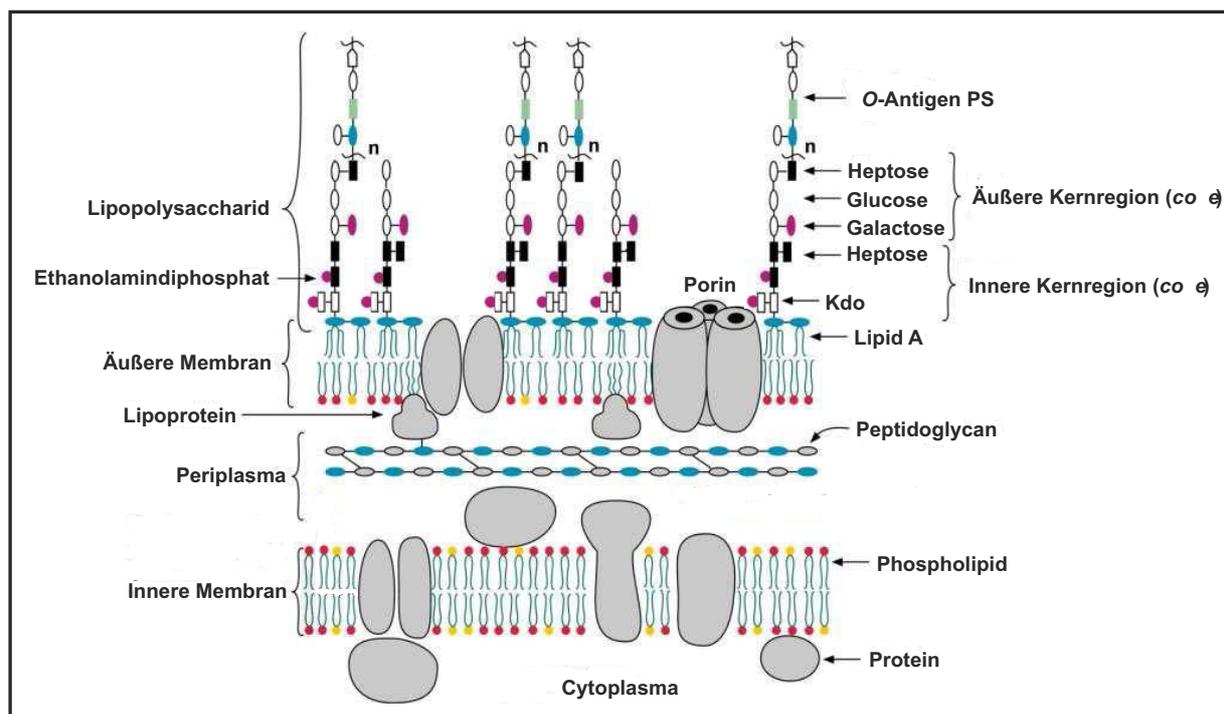
**Abb. 1-9:** Die rechtsgängige, parallele  $\beta$ -Helix am Beispiel von einigen Windungen (aa 338-430) aus HK620TSP. Pfeile in der Bänderdarstellung symbolisieren  $\beta$ -Stränge, die entlang der Helixachse die parallelen  $\beta$ -Faltblätter Pb1-3 ausbilden, die durch die turns T1-3 verbunden sind (Benennung nach Yoder *et al.* 1995).

In Abbildung 1-9 ist beispielhaft ein Ausschnitt aus der  $\beta$ -Helix aus HK620TSP gezeigt. In einer  $\beta$ -Helix sind die  $\beta$ -Stränge (Pb1-3) durch flexible *turns* (T1-3) miteinander verbunden (Yoder & Jurnak 1995). Für Proteine mit solch einer parallelen  $\beta$ -Helix wurde postuliert, dass diese parallel zur  $\beta$ -Helix elongierte Polysaccharide binden können (Jenkins *et al.* 1998). Dabei binden die Kohlenhydrate an der Lösungsmittel-zugewandten Seite (Kajava & Steven 2006), was auch bei HK620TSP der Fall ist und unter Abschnitt 1.6.1. erläutert wird.

## 1.5. Lipopolysaccharide

Entsprechend der Vielfältigkeit von Bakteriophagen und ihren Wirtsbakterien ist eine Fülle verschiedener Rezeptoren für Phagen bekannt. So sind vor allem bei *Siphoviridae* Proteinrezeptoren bekannt wie FhuA für den Phagen T5 und Lamb für den Phagen  $\lambda$  (Leforestier *et al.* 2008; Roa 1981). Kapselpolysaccharid kann von dem Phagen K1-5 erkannt werden und selbst Pili und Flagellen von Bakterien stellen Rezeptoren dar (Scholl *et al.* 2001; Schade *et al.* 1967; Raimondo *et al.* 1968). Des Weiteren können das Peptidoglycan in Gram-positiven und verschiedene Teile des Lipopolysaccharids (LPS) in Gram-negativen Bakterien von Phagen gebunden werden (Lindberg 1973).

Die Phagen P22, HK620 und Sf6 erkennen jeweils spezifisch die *O*-Antigene im Lipopolysaccharid ihrer Gram-negativen Wirtsbakterien (*Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*).



**Abb. 1-10: Schematische Darstellung der Zellmembran Gram-negativer Bakterien am Beispiel von *E. coli* K-12.** Die Abbildung basiert auf Raetz *et al.* 2007. Die innere und äußere Membran sind durch das Peptidoglycan im Periplasma voneinander getrennt. Das Lipopolysaccharid ist über Lipid A in die äußere Membran verankert. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Das LPS ist in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien zu finden (Abb. 1-10). Es setzt sich aus einem Lipid- und einem Kohlenhydratteil zusammen. Über den Lipidteil, das sogenannte Lipid A, ist der Zuckerteil in die Membran des Bakteriums verankert (Raetz *et al.* 2007; Frirdich & Whitfield 2005). Lipid A besteht aus einem  $\beta$ -1,6-verknüpften Disaccharid aus N-Acetylglucosamin, welches mit sechs Fettsäuren acetyliert ist (Raetz *et al.* 2007). An die N-Acetylglucosamine schließen sich charakteristische 2-Keto-3-Deoxyoctonate (KDO) an. An dieser inneren Region des LPS sind negative Ladungen durch Phosphate zu finden, welche die Eigenschaften des LPS stark beeinflussen (Frirdich & Whitfield 2005). Diese negativen Ladungen werden durch zweiwertige Ionen kompensiert. Die Kernregion (*core*) des Kohlenhydratteils im LPS ist bei Bakterien eines Genus konserviert. Dahingegen ist die exponierteste Struktur des PS aus repetitiven O-Antigeneinheiten hoch variabel.

Die O-Antigene bewirken die Bildung von Antikörpern in infizierten Organismen und dienen der serologischen Charakterisierung und Identifizierung der Bakterien (I. Orskov *et al.* 1977). Obwohl die Zuckerstrukturen auf der Oberfläche nur einen Massenanteil von etwa 10-15% an der Membran ausmachen, nehmen sie aufgrund ihrer Raumerfüllung einen deutlich größeren Volumenanteil ein (Lerouge & Vanderleyden 2002). Das Lipopolysaccharid dient den Bakterien als Schutzbarriere und unterliegt aufgrund von sich ändernden Umgebungseinflüssen

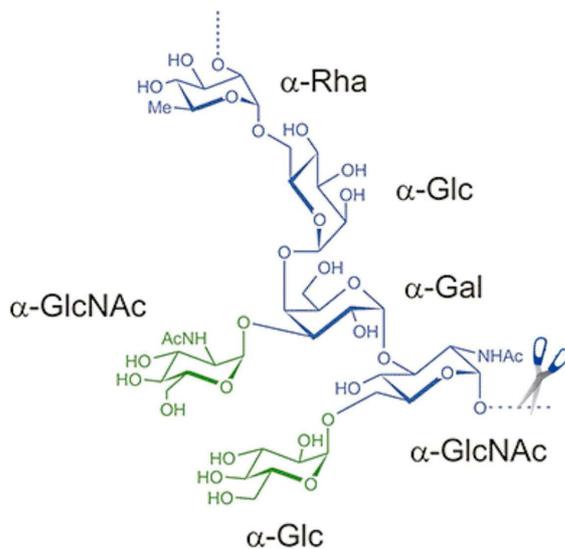
einer gewissen Variabilität (Allende & Thomas J McIntosh 2003). So erhöhen z.B. längere Ketten bei *S. Typhimurium* die Resistenz gegenüber menschlichem Serum (Bravo *et al.* 2008). LPS weist typischerweise eine statistische Kettenlängen-Verteilung auf. Die Kontrolle der Kettenlänge des LPS unterliegt dem Protein Wzz. Dieses Protein interagiert mit der *O*-Antigen Polymerase Wzy, der genaue Mechanismus dieser Kontrolle ist jedoch nicht verstanden (Franco *et al.* 1998).

Modifikationen im LPS können nach Infektion von Phagen selbst durch lysogene Konversion entstanden sein (vgl. Abschnitt 1.3). Dabei kann die Kettenlänge des *O*-Antigenteils im LPS beeinflusst werden, durch Modifikationen wie Acetylierungen und Glucosylierungen kann zudem der Kohlenhydratteil am LPS verändert werden und es können neue Antigen-Typen entstehen (Tomás & Kay 1984; Barksdale & Arden 1974; Kropinski *et al.* 2007).

### 1.6. Lipopolysaccharid als Rezeptor für den Phagen HK620

Der Bakteriophage HK620 wurde ursprünglich in Hongkong vergesellschaftet mit dem *E. coli* Stamm H TD2509 gefunden. Dieser Stamm stand jedoch nicht mehr zur Verfügung, weshalb mit *E. coli* H TD2158 ein neuer Stamm gefunden wurde, der durch HK620 infiziert werden kann (Dhillon *et al.* 1998). Dieser Stamm *E. coli* H TD2158 wird daher in der vorliegenden Dissertation als Wirtsstamm bezeichnet. Dabei ist anzumerken, dass das H in der Nomenklatur der Stämme nicht wie sonst üblich für eine Flagelle am Bakterium steht, sondern für den

Fundort Hongkong.



**Abb. 1-11:** Das *O*-Antigen O18A1, welches spezifisch von HK620TSP erkannt wird und zwischen der Rhamnose (Rha) und dem N-Acetylglucosamin (GlcNAC) in der Hauptkette spezifisch hydrolysiert wird (durch die Schere symbolisiert, Barbirz *et al.* 2008).

TSP aus dem Phagen HK620 erkennt, bindet und hydrolysiert den *O*-Antigenteil des LPS seines *E. coli*-Wirts. Die Hydrolyse durch HK620TSP wird durch eine Endo-N-Acetylglucosaminidase-Aktivität gewährleistet. Das Enzym spaltet spezifisch eine α-1,2-glykosidische Bindung zwischen dem N-Acetylglucosamin und der Rhamnose in der Hauptkette. Es entstehen Hexasaccharide des Antigentyps O18A1 als kleinstes Produkt (Abb. 1-11). Dieses Oligosaccharid besitzt eine Hauptkette aus vier Monosacchariden

(blau), welche an zwei Stellen verzweigte Zucker (GlcNAc und Glc, grün) trägt (Barbirz *et al.* 2008). Dieses Antigen wird als O18A1 bezeichnet.

Drei natürlich vorkommende Modifikationen des O18A1-Antigens wurden mit Hilfe von Antikörpern voneinander unterschieden (Pluschke *et al.* 1986) und strukturell charakterisiert (Jann *et al.* 1992). Die verschiedenen O18-Antigene wurden im Zuge der Dissertation benutzt, um die Spezifität des Phagen zu untersuchen, daher sollen die Modifikationen kurz beschrieben werden (Abb. 1-12).

Das O18A-Antigen (bzw. O18B) unterscheidet sich von dem O18A1-Antigen (bzw. O18B1) lediglich durch eine fehlende Glucose in der Seitenkette (blau markiert in Abb. 1-12). Die B-Varianten haben im Vergleich zu den A-Varianten unterschiedliche Verknüpfungen in Haupt- und Seitenketten (blau und rot markiert). Des Weiteren ist das N-Acetylglucosamin in der Seitenkette durch eine Glucose ersetzt (grün).

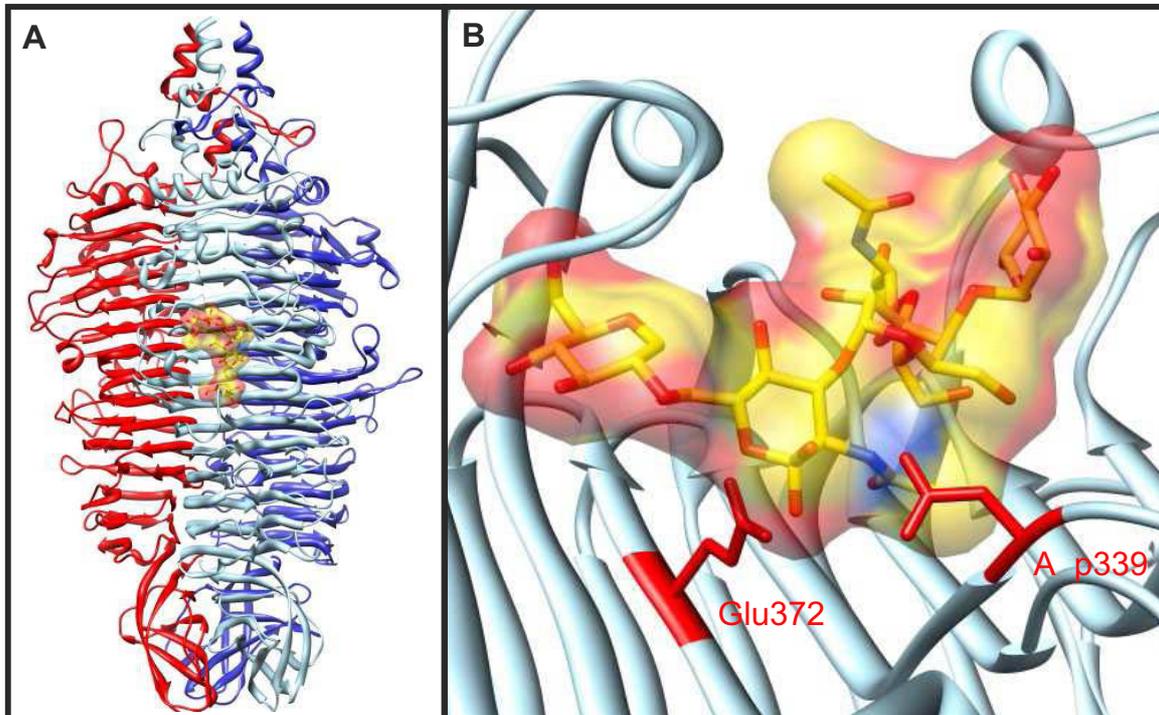


**Abb. 1-12: Die vier verschiedenen O18-Antigene nach Pluschke und Jann (Pluschke *et al.* 1986; Jann *et al.* 1992).** Das Antigen O18A unterscheidet sich von O18A1 nur durch eine fehlende Glucose in der Seitenkette (blau). Die B-Varianten weisen im Vergleich eine Glucose anstelle des N-Acetylglucosamins in der Seitenkette auf (grün) sowie andere Verknüpfungen in der Hauptkette (rot) und zu der Seitenkettenglucose (in den Varianten O18A1 und O18B1).

### 1.6.1. Die Kohlenhydratbindung durch HK620TSP

In der mit Hexasaccharid besetzten Kristallstruktur von HK620TSP in Abbildung 1-13 ist zu erkennen, dass große Interaktionsflächen zur Bindung des Zuckers beitragen und das Kohlenhydrat mit dem terminalen N-Acetylglucosamin an dem aktiven Zentrum gebunden ist. Bei dem aktiven Zentrum, welches durch Mutation der Reste identifiziert werden konnte (Barbirz *et al.* 2008), handelt es sich um die Reste D339 und E372. Durch Mutation der  $\gamma$ -Carboxygruppen zu Amidgruppen in diesen Resten ist die Aktivität von HK620TSP stark

herabgesetzt worden (Utrecht 2006). In den vorangegangenen Arbeiten von C. Utrecht konnten für die TSP-Variante E372Q veränderte Eigenschaften in der Kohlenhydratbindung beobachtet werden. Durch diesen einzelnen Aminosäureaustausch wurde die Affinität des TSP gegenüber der kleinsten repetitiven Einheit (Hexasaccharid) um einen Faktor von etwa 1000 erhöht (Utrecht 2006).

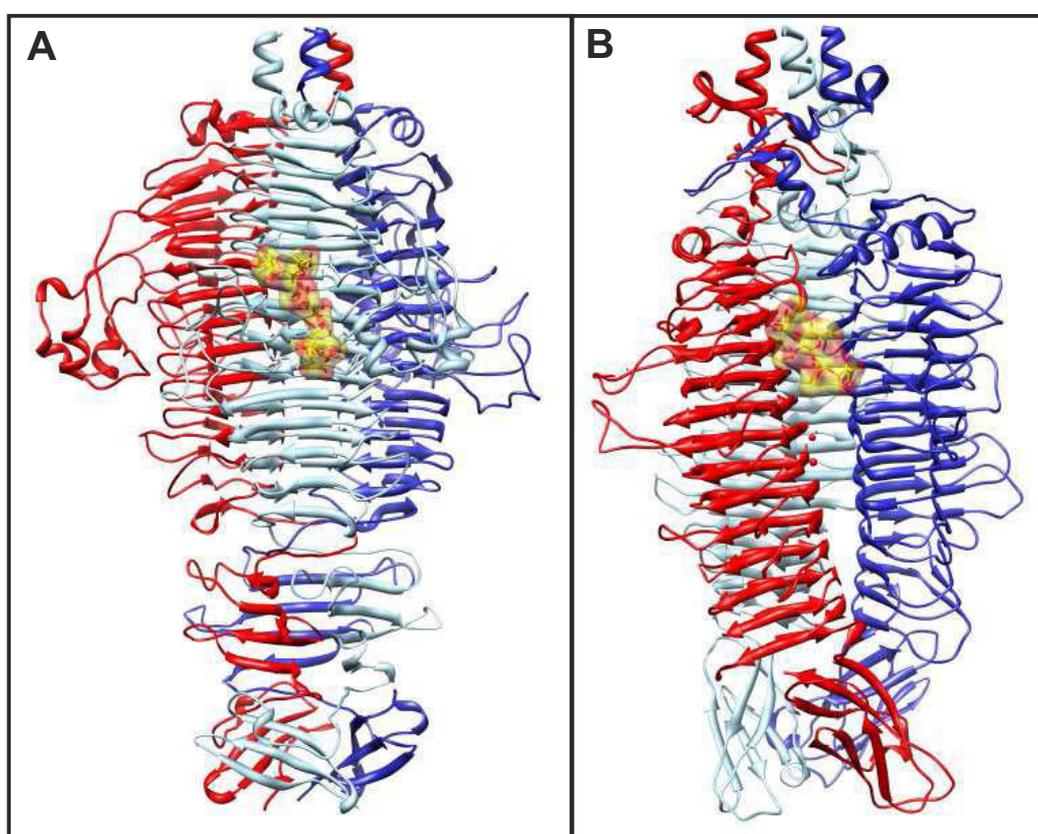


**Abb. 1-13:** Das HK620TSP im Komplex mit einer repetitiven Einheit des Antigentyps O18A1 (PDB:2VJJ). Das TSP in der Übersicht ist entsprechend der Darstellung in Abbildung 1-9 angepasst. Die Monomere sind dabei unterschiedlich eingefärbt und an einem Monomer ist beispielhaft das Hexasaccharid in gelb dargestellt. Ein Ausschnitt aus einem Monomer mit gebundenen Hexasaccharid des Typs O18A1 ist im Detail gezeigt (B). Dabei sind die Reste des aktiven Zentrums (E372 und D339) rot markiert (Barbirz *et al.* 2008)

### 1.6.2. Die Kohlenhydratbindung bei verwandten *Tailspike* Proteinen

Als ein Prototyp der *Podoviridae* ist P22 der wichtigste zu nennende, mit HK620 verwandte Phage. Die TSP aus P22 und HK620 sind strukturhomolog ebenso wie das TSP aus dem *Shigella* Phagen Sf6 (Müller *et al.* 2008; Casjens & Thuman-Commike 2011). Unter den P22-ähnlichen Phagen ist die N-terminale Sequenz der Kapsidbindedomäne der TSP aufgrund der Bindung an ein stark konserviertes Protein am Portal (gp10) ebenfalls konserviert. Die zentralen Motive der TSP aus HK620, Sf6 und P22 sind jeweils rechtsgängige, parallele  $\beta$ -Helices, die eine geringe Sequenzhomologie teilen, aber strukturell große Ähnlichkeiten aufweisen (Müller *et al.* 2008).

Das TSP aus dem Phagen P22 stellt ein gut untersuchtes Modell für Kohlenhydratbindung und Faltung dar (Baxa *et al.* 2001; Seckler 1998). Über das TSP aus dem Sf6-Phagen ist hinsichtlich dieser Aspekte deutlich weniger bekannt. Trotz der großen strukturellen Homologien unterscheiden sich die drei TSP aus den Phagen HK620, Sf6 und P22. So liegen verschiedene Faltungstypen im C-Terminus vor (vgl. Abb. 1-13 und 1-14). Obwohl P22TSP wesentlich stärker verdrillt ist, ist das Protein nicht stabiler als Sf6TSP oder HK620TSP (Barbirz *et al.* 2009). Bei dem TSP aus Sf6 liegt die Kohlenhydrat-Bindestelle zwischen den monomeren Untereinheiten, während sie bei den TSP aus P22 und HK620 auf der  $\beta$ -Helix einer monomeren Untereinheit lokalisiert ist (Abb. 1-14).



**Abb. 1-14: TSP aus den Phagen P22 (A) und Sf6 (B).** Die Darstellung der TSP wurde an Abb. 1-7 angepasst. Die spezifisch gebundenen O-Antigene sind jeweils in gelb dargestellt (PDB: 1TYX und 2VBM; Müller *et al.* 2008; Steinbacher *et al.* 1996).

### 1.7. Der Infektionsmechanismus des Phagen P22

Der unter Abschnitt 1.3.1. vorgestellte Phage P22 wurde bereits hinsichtlich der Interaktionen mit LPS aus dem Wirt (*Salmonella*) untersucht. Es zeigte sich, dass die TSP des Phagen P22 für die Spezifität und zur Infektion des Phagen von entscheidender Wichtigkeit sind. Schon 1967 wurde von Israel entdeckt, dass die Infektion durch den Phagen P22 stark von der

Konzentration an TSP am Phagen abhängt und dass mindestens drei TSP für eine erfolgreiche Infektion notwendig sind (Israel *et al.* 1967). Die TSP binden das O-Antigen des Wirts und hydrolysieren zudem polymere Strukturen davon. Die Rolle der TSP und vor allem ihrer Aktivität gegenüber dem Lipopolysaccharid des Wirts war jahrelang unklar. 2010 schlug D. Andres ein Modell für die Infektion von *Salmonella* durch P22 vor, in dem die Rolle des TSP genauer beleuchtet wurde. Es konnte in diesen Arbeiten gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der P22-Phagen für eine erfolgreiche Infektion bzw. DNA-Ejektion essentiell ist. Durch *in vitro* Experimente konnte zudem gezeigt werden, dass die Ejektion der DNA lediglich durch LPS-Strukturen in Anwesenheit von zweiwertigen Ionen induziert werden kann. Die einzelnen Komponenten des LPS (Lipid A und PS) konnten die DNA-Ejektion nicht initiieren. Zur Induktion der DNA-Ejektion durch P22 *in vitro* waren lediglich multilamellare LPS-Strukturen, welche die Membran imitieren, notwendig. Aus diesen Daten wurde ein Modell entworfen, welches nahelegt, dass der Phage durch die enzymatische Aktivität der TSP Richtung Membran ausgerichtet wird und das *Plug* Protein gp26 durch diese Bewegung gegen die äußere Membran gedrückt wird. Das distale Ende des gp26 (Lazo-Domäne (IV), vgl. Abb. 1-7) ist sehr flexibel und kann vermutlich in die Membran integrieren (Tang *et al.* 2005; J. Chang *et al.* 2006; Lander *et al.* 2009). Durch dieses Signal werden noch nicht geklärte Mechanismen ausgelöst; so wird vermutet, dass das gp26 durch eine Konformationsänderung die Ejektion der DNA erlaubt (Andres, Hanke *et al.* 2010). Wie die beiden Membranen im Detail überwunden werden, ist noch nicht geklärt.

## **1.8. Zielstellung**

In dieser Promotionsarbeit sollte die Wechselwirkung zwischen dem TSP des Bakteriophagen HK620 und dem O-Antigen des Wirts als Modell für Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen beschrieben werden. Die Analyse der Thermodynamik des Bindungsprozesses stand dabei im Vordergrund. Dadurch sollten generelle Merkmale dieser Wechselwirkungen herausgearbeitet werden, die es erlauben, zukünftig Vorhersagen über Kohlenhydrat-Bindungsstellen treffen zu können.

Erste vorangegangene Studien wiesen darauf hin, dass die Kohlenhydratbindung durch geringe Veränderungen am HK620TSP stark beeinflusst werden kann. Daher wurden in dieser Arbeit systematische Studien der Bindung verschieden langer O18A1-Oligosaccharide an HK620TSP bzw. an Varianten dieses Proteins angefertigt. Zudem sollte der Einfluss von Modifikationen am Kohlenhydrat auf die Bindung untersucht werden.

Um die Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zu untersuchen, wurden Methoden wie isothermale Titrationskalorimetrie, Fluoreszenztitration und Oberflächenplasmonresonanz genutzt. Diese Daten können zusammen mit strukturellen Daten, die durch Röntgenstrukturanalysen generiert wurden, dabei helfen das Verständnis für Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen zu vertiefen.

Außerdem wurde der Infektionsmechanismus des Phagen HK620 untersucht, der einen weiteren LPS-erkennenden Phagen neben P22 darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden erste *in vitro* Untersuchungen mit dem Phagen HK620 angefertigt, um die Rolle der TSP als LPS-bindende Proteine im Phagen für die Infektion näher zu charakterisieren. Dieses System erlaubt vergleichende Studien zur Spezifizierung gemeinsamer Charakteristika von Phagen mit LPS-bindenden TSP.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. *Material*

#### 2.1.1. Chemikalien

Agarose	SERVA (Heidelberg)
Bacto-Agar, -Trypton, -Hefeextrakt	DIFCO (Detroit, USA)
Stickstoff	PRAXAIR (Düsseldorf)
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	USB CORPORATION (Cleveland, USA)

Alle Chemikalien, die an dieser Stelle nicht aufgeführt wurden, wurden von den Herstellern Sigma Aldrich (St. Louis, USA), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) bezogen und besaßen den Reinheitsgrad *pro analysi*. Sämtliche Lösungen wurden mit Millipore-gereinigtem Wasser hergestellt.

#### 2.1.2. Puffer und Medien

Auftragspuffer (Ionenaustausch)	7,5 mM Tris/HCl; 2,5 mM EDTA; pH 7,8
Coomassie-Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,025-0,05% (w/v) Coomassie blue R
Coomassie-Entfärber	10% (v/v) Essigsäure
6x DNA-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 15% (w/v) Ficoll Typ 400; 20 mM EDTA
Elutionspuffer (Ionenaustausch)	7,5 mM TrisHCl; 2,5 mM EDTA; 500 mM NaCl pH 7,8
Entwickler (Silberfärbung)	5 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> und 80 µl Formaldehyd in 200 ml H <sub>2</sub> O
Färbelösung (Silberfärbung)	0,5 ml 29% (w/v) AgNO <sub>3</sub> und 25 µl 37% (v/v) Formaldehyd in 100 ml H <sub>2</sub> O
Fixierlösung 1 (Silberfärbung)	30% (v/v) EtOH, 10% (v/v) Essigsäure
Fixierlösung 2 (Silberfärbung)	0,4 M Natriumacetat; 0,5% (v/v) Essigsäure; 30% (v/v) Ethanol; vor Gebrauch wurden je 100 ml 2 ml 25% (v/v) Glutaraldehyd und 100 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> zugesetzt
Kristallisationspuffer	0,1 M Tris/HCl; 3,5 M Natriumformiat pH 8,0
LB-Agar	LB-Medium mit 2% (w/v) Agar-Agar

LB-Medium	1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,0
LPS/Phagen-Puffer	50 mM Tris/HCl; 4 mM MgCl <sub>2</sub> pH 7,5
NEB-Puffer	Pufferzusammensetzungen und die für die Restriktionsenzyme optimalen Bedingungen nach Herstellerangaben (NEW ENGLAND BIOLABS)
SDS-Ladepuffer	163 mM Tris/HCl; 5% (w/v) SDS, 250 mg/ml Glycerin; 0,25 mg/ml Bromphenolblau; pH 6,8
SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris/HCl; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS; pH 8,8
2x SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,25 M Tris/HCl; 0,4% (w/v) SDS; pH 6,8
4x SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl; 0,8 % (w/v) SDS; pH 8,8
Softagar	8 g/l Nutrient Broth No 3; 5 g/l NaCl; 3 g/l Natriumcitrat; 6,5 g/l Agar
Standardpuffer	50 mM Natriumphosphatpuffer; 1 mM EDTA; pH 7,5
Stop-Lösung (Silberfärbung)	50 mM EDTA, pH 8.0
TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0
TEC-Puffer	40 mM Tris/HCl; 2 mM EDTA; pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
ZYM-5250-Medium	Autoinduktionsmedium nach Studier <i>et al.</i> 2005

### 2.1.3. Enzyme

Restriktionsenzyme	NEW ENGLAND BIOLABS (Schwalbach)
Dnase I	SERVA (Heidelberg)
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase, T4 Ligase	STRATAGENE (La Jolla, USA)
RNase A	SIGMA ALDRICH (St. Louis, USA)

### 2.1.4. Molekulargewichtsmarker

100 bp-DNA <i>Ladder</i> [1 µg/µl], 10 µl pro Spur	NEW ENGLAND BIOLABS (Schwalbach)
1 kb-DNA <i>Ladder</i> [1 µg/µl], 20 µl pro Spur	NEW ENGLAND BIOLABS (Schwalbach)
MW-SDS-200 (High Range), 30-200 kDa	SIGMA ALDRICH (St. Louis, USA)

### 2.1.5. Primer

Aus vorangegangenen Arbeiten lagen bereits Sequenzierprimer, verschiedene Konstrukte und Mutageneseprimer vor (Barbirz 2005; Utrecht 2006).

**Tabelle 2-1: Verwendete Klonierungsprimer:** Die Primer wurden von Sigma Genosys (Sigma Aldrich) synthetisiert. Rot und fett markiert sind die Positionen für den Basenaustausch. Stille Mutationen zur Einführung einer neuen Restriktionsschnittstelle sind durch fett dargestellte Kleinbuchstaben hervorgehoben.

Primer	Sequenz	Zweck (Schnittstelle)
NKL 1	5'-GCGTAACATCGCaTGCTCTGTAGcGTTGCACCAACATG-3'	Mutageneseprimer für die Variation E372A (SphI)
NKL 2	5'-CATGTTGGTGCAACgCTACAGAGCAtGCGATGTTACGC-3'	
NKL 3	5'-GCAGTGCAATGCAGcCCACAGTACTGTGTACGTCAAC-3'	Mutageneseprimer für die Variation D339A (ScaI)
NKL 4	5'GTTGACGTACACaGTACTGTGGgCTGCATTGACACTGC-3'	
NKL 20	5'- CATTATTGATATTGGCCCGGACAGCGGGGCTAGTAATGTAC-3'	Zur Deletion der aa 471-2 ( <i>HK620ΔN-E372Q Δ471-2</i> )
NKL 21	5'- GTACATTACTAGCCCCGCTGTCCGGGCCAATATCAATAAATG-3'	
NKL 22	5'-CGAGGGCTAGCAATGACAGA-3'	Zur Erstellung der Variante <i>P22NHK620ΔN</i> durch <i>splicing by overlap extension</i>
NKL 23	5'-GATCTGGATCGTACTTCAATACGTTAGCAATATAGTC-3'	
NKL 24	5'-CTCTATAATTGCCCTGAATTGATCTGGATCGTACTTC-3'	
NKL 25	5'-CCGGATCCTCACACCT-3'	

### 2.1.6. Plasmide

**pET11d-*HK620TSPAN*** Die kodierende Sequenz für *HK620TSPAN* (1806 bp) und für *E372A* Varianten davon (exemplarisch *E372A*) befindet sich in dem Vektor pET11d und wird von den mittels PCR generierten Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nco*I flankiert. Das Plasmid enthält ein Gen für Ampicillin-Resistenz.  
(alle Varianten entsprechend benannt)

**pET11d-*P22NHK620ΔN*** Die kodierende Sequenz für *P22NHK620TSPAN* (2127 bp) befindet sich in dem Vektor pET11d und wird von den mittels PCR generierten Schnittstellen *Bam*HI und *Nco*I flankiert. Das Plasmid enthält ein Gen für Ampicillin-Resistenz.

**pET11d-*HK620ΔN-E372Q Δ471-2*** Die kodierende Sequenz für *HK620TSPAN-E372Q Δ471-2* (1800 bp) befindet sich im Vektor pET11d und wird von den mittels PCR generierten Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Nco*I flankiert. Das Plasmid enthält ein Gen für Ampicillin-Resistenz.

### 2.1.7. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expressionsstamm; Genotyp: F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) (NOVAGEN über MERCK (Darmstadt))
<i>E. coli</i> XL1-blue	Klonierungsstamm; Genotyp: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔMI5 Tn10</i> (Tetr)] (STRATAGEN (La Jolla, USA))
<i>E. coli</i> H TD2158	Dhillon <i>et al.</i> 1998, O-Serogruppe O18A1
<i>E. coli</i> IHE3042	O-Serogruppe O18A1 (DSMZ, Achtman <i>et al.</i> 1983; Jann <i>et al.</i> 1992)
<i>E. coli</i> 10809	O-Serogruppe O18A (DSMZ, Achtman <i>et al.</i> 1983; Jann <i>et al.</i> 1992)
<i>E. coli</i> 10837	O-Serogruppe O18B (DSMZ, Achtman <i>et al.</i> 1983; Jann <i>et al.</i> 1992)
<i>E. coli</i> 10922	O-Serogruppe O18B1 (DSMZ, Achtman <i>et al.</i> 1983; Jann <i>et al.</i> 1992)
<i>E. coli</i> 10797	O-Serogruppe O18A1 (DSMZ, Achtman <i>et al.</i> 1983)
S. DB7136 c <sub>2</sub> ts30	<i>Salmonella serovar</i> Typhimurium mit temperatursensitiven P22-Prophagen c <sub>2</sub> ts30 (13- am / 9- am) (Andres, Hanke <i>et al.</i> 2010)

### 2.1.8. Geräte

Tabelle 2-2: Liste der verwendeten Geräte

Absorptionspektrometer: Cary 50 Probe ChemStation (Typ 89090A)	VARIAN (Darmstadt) AGILENT (Böblingen)
BIAcore™ 2000	BIACORE AB (Uppsala, Schweden)
Brutschränke : Innova 2300 Platform Shaker Innova 42	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC (Enfield, USA) NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC (Enfield, USA)
CD-Spektrometer J-715	JASCO (Groß-Umstadt)
Chromatographie-Einheiten: ÄktaFPLC/ Prime/ Purifier HPLC-System	GE HEALTHCARE (Freiburg) SHIMADZU (Duisburg)
Dampfsterilisator Viroklav	H+P LABORTECHNIK (Oberschleißheim)
Elektrophoresekammern für Agarose-Gele	BIOMETRA (Göttingen)

Elektrophoresekammern für SDS-PAGE	BIO-RAD (München)
Fluoreszenzspektrometer FluoroMax3	HORIBA JOBIN YVON (Unterhaching)
French-Press SLM-Aminco	POLYTEC (Waldbronn)
Gelscanner Imagescanner III	GE HEALTHCARE (Freiburg)
Isothermale Titrationskal. VP-ITC	MICROCAL GE HEALTHCARE (Freiburg)
Lyophylle VaCo 5/2	ZIRBUS TECHNOLOGY (Bad Grund)
Massenspektrometer REFLEX <sup>TM</sup> 2	BRUKER (Bremen)
pH-Meter 597	WTW (Weilheim)
Pipetten	THERMO (Bonn)
Reinstwasseranlage	MILLIPORE (Schwalbach)
Sonifikator Sonopuls GM70	BANDELIN ELECTRONIC (Berlin)
Spannungsquelle Bio 105, PP4000	BIOMETRA (Göttingen)
<i>Speedvac</i> RVC 2-18	CHRIST (Osterode)
Sterilbank HERAsafe	HERAEUS (Hanau)
<i>Stopped Flow</i> Apparatur SX-18MV	APPLIED PHOTOPHYSICS (Leatherhead, UK)
TGradient Thermocycler	BIOMETRA (Göttingen)
Thermoschüttler	EPPENDORF (Hamburg)
Ultrafiltrationseinheit Amicon	MILLIPORE (Schwalbach)
Vakuumpumpe Trivac	OERLIKON LEYBOLD VACUUM (Köln)
Waagen: B 120 S Feinwaage PB	SARTORIUS (Göttingen) KERN (Balingen-Frommern)
Zentrifugen: RC-26 Plus, Discovery M150 SE MR22i Optima XL-90  Rotoren: SS-34, GSA, SLA3000 T856 SW-32 Ti	SORVALL (Buckinghamshire, England) JOUAN (Winchester, USA) BECKMAN COULTER (Krefeld)  KENDRO LABORATORY PRODUCTS (Newton, USA) SORVALL (Buckinghamshire, England) BECKMAN COULTER (Krefeld)

### 2.1.9. Software

BIAevaluation 3.1	BIACORE AB (Uppsala, Schweden)
BioEdit	IBIS BIOSCIENCES (USA)
Chimera v1.5	UCSF (USA)
IgorPro v6.0	WAVEMETRICS (Portland, USA)
LabScan v6.0	GE HEALTHCARE (Freiburg)
Programme der CCP4 Suite	COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT 4
PyMol v0.99rc6	DELANO SCIENTIFIC LLC (San Francisco, USA)
SigmaPlot v11.0	SYSTAT SOFTWARE (Chicago, USA)

### 2.1.10. Verbrauchsmaterialien

CM5- Sensor Chip	BIACORE AB (Uppsala, Schweden)
DE52 Cellulose	WHATMAN (Dassel)
Dialyseschläuche Spectra/Por	SPECTRUM (Houston, USA)
Kunststoff UV/vis-Küvetten	EPPENDORF (Hamburg)
Kristallisationsschalen und –besteck	HAMPTON RESEARCH (Aliso Viejo, USA)
Petrischalen (92 x 16 mm, PS)	GREINER BIO-ONE (Frickenhausen)
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml; 0,5 ml)	EPPENDORF (Hamburg)
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Sterilfilter Puradisc 30 (0,2 und 0,45 µm)	WHATMAN (Dassel)
Ultrafiltrationsmembranen YM10, YM30	MILLIPORE (Schwalbach)
Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra	MILLIPORE (Schwalbach)

## **2. 2. Methoden**

### **2.2.1. Molekularbiologische Arbeiten**

#### **2.2.1.1. Ortsgerichtete Mutagenese**

Die ortsgerechte Mutagenese wurde nach dem *QuickChange* Verfahren von Stratagene durchgeführt. Dabei dient doppelsträngige Plasmid-DNA als Templat und ausgehend von zwei komplementären Oligonukleotid-Primern (Abschnitt 2.1.6) wurde dieses komplett amplifiziert. Durch die Primer wurde die gewünschte Mutation und, wenn möglich, eine Restriktionsschnittstelle eingeführt. Die Ansätze, Inkubationszeiten und -temperaturen wurden den Herstellerangaben angepasst. Die Ansätze wurden jedoch halbiert (je Ansatz je 125 ng Primer und 50 ng Templat) und es wurde z.T. 1 mM DMSO zugegeben, um eine prognostizierte Ausbildung von Sekundärstrukturen der Primer zu vermeiden. Die Konstrukte aus ortsgerechten Mutagenesen wurden ebenso wie die durch *Splicing by Overlapextension* (vgl. Abschnitt 2.2.1.2.) erstellten Varianten durch Sequenzierung (GATC Biotech AG (Konstanz)) bestätigt.

#### **2.2.1.2. Klonierung mittels *Splicing by Overlapextension***

Für die Variante *P22NHK620TSPAN* wurden die Gene für den N-terminalen Terminus des TSP aus dem Phagen P22 mit dem Gen für den C-Terminus des TSP aus dem Phagen HK620 fusioniert. Für diese Fusion wurde die homologe Aminosäuresequenz NVLKYDPDQ als überlappende Region ausgewählt und die beiden Gene mittels *splicing by overlap extension* fusioniert (Horton *et al.* 1989). Mittels entsprechender Primer wurden komplementäre Überhänge an die jeweiligen Fragmente mittels PCR nach Horton *et al.* generiert. Diese Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese kontrolliert (siehe Abschnitt 2.2.2.7) und nach Ausschneiden der entsprechenden Banden unter UV-Licht nach den Herstellerangaben mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* aus dem Gel gereinigt. In einem letzten Schritt wurden die beiden Fragmente vereinigt und die komplette Sequenz amplifiziert. Die Sequenz für die Variante *P22NHK620TSPAN* wurde während der Klonierung mit Restriktionsschnittstellen für BamHI und NheI versehen und konnte in den Vektor pET11d ligiert werden.

### 2.2.1.3. Ligation

Für die Ligation von Fragmenten in einen Vektor wurde dieser nach Restriktionsverdau eingesetzt. Es wurden 100 ng Vektor mit der zehnfachen Menge an *Insert* versetzt. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen verwendet. Die Ligationsansätze mit je 20 µl Gesamtvolumen wurden für 2 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 10 µl in *E. coli* XL1-blue transformiert (siehe Abschnitt 2.2.2.4.), die restlichen 10 µl wurden über Nacht bei 16°C weiter inkubiert, um diesen Ansatz gegebenenfalls zu transformieren.

### 2.2.1.4. Transformation von Bakterien

Kompetente *E. coli* XL1-blue oder *E. coli* BL21(DE3) wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100 ng Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz wurden die Bakterien für 10 min auf Eis gestellt, anschließend für 45 sec bei 42°C inkubiert und danach wiederum für 7 min auf Eis inkubiert. Es wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Ansätze für 30 min bei 37°C inkubiert. Je 100 µl eines Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Die restliche Bakteriensuspension wurde für 3 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ungefähr 100 µl abgenommen, das Pellet resuspendiert und auf LB-Agar ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### 2.2.1.5. Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* Stämmen zu Klonierungszwecken und zum Erstellen von Glycerinkulturen erfolgte bei 37°C in LB-Medium. Zur Selektion wurden den Medien und Platten 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt, somit konnten nur plasmidtragende Zellen mit Ampicillin-Resistenz wachsen. Flüssigkulturen wurden mit einer *E. coli* Kolonie von LB-Agar-Platten angeimpft und bei 37°C üN geschüttelt. Zur Lagerung wurden von den Flüssigkulturen Glycerinstocks angelegt, indem Bakterien mit 17,5% (v/v) Glycerin gemischt und mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert wurden. Anschließend konnten so präparierte Zellen bei -80°C gelagert werden, ohne ihre Expressionskompetenz zu verlieren.

### **2.2.1.6. Isolierung von Plasmid-DNA**

Zur Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL1blue Zellen wurde das Mini Kit von Qiagen nach Anleitung der Hersteller verwendet. Hierzu wurden Zellen einer stationären üN-Kultur durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA entsprechend der Herstellerangaben gereinigt. Im Anschluss an die Präparation wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl H<sub>2</sub>O (bidest.) eluiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektroskopisch anhand der Absorption bei 260 nm. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.2.1.7. Restriktionsverdau**

Für den Restriktionsverdau wurden Restriktionsenzyme der Firma *New England Biolabs* und die hierzu empfohlenen Puffer verwendet. Je Ansatz wurden 2-10 µg DNA mit 10 U Restriktionsenzym versetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Glycerolkonzentration im Gesamtansatz maximal 5% betrug. Der Restriktionsverdau wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert und die DNA anschließend über Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.2.8.) aufgetrennt und analysiert.

### **2.2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese**

Zum Auftrennen und Nachweisen von DNA verschiedener Größe wurden Agarosegele im Konzentrationsbereich von 0,8-1,0% (w/v) verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer geschmolzen, welcher auch als Laufpuffer verwendet wurde. Die Gele enthielten 0,6 µg/ml Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 120 V.

## **2.2.2. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1. Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli***

Die entsprechenden Plasmide wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Anschließend wurden etwa 5 Kolonien gepickt, eine Vorkultur damit angeimpft und üN bei 37°C inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden für Expressionskulturen LB- oder ZYM 5052-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin im Verhältnis von 1:100 angeimpft. Bei den Kulturen in LB-Medium wurde bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 1,0 bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde mit 1 mM IPTG induziert und weiter üN inkubiert.

Bei den ZYM 5052-Kulturen wurde nicht mit IPTG induziert, da hier die Regulation der Expression durch das Lac-Operon über das Nährstoffangebot gesteuert wird. In dem Medium ist Glucose, Glycerol und Lactose enthalten. Wenn noch ausreichend Glucose vorhanden ist, wird die Expression reprimiert, erst wenn nur noch Lactose vorhanden ist, wird die Expression induziert (Studier 2005). Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 5000 rpm.

#### **2.2.2.2. Bakterienaufschluss**

Bakterien aus großen Expressionskulturen (5 l) wurden in etwa 40 ml kaltem TEC-Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch zweimaligen Hochdruckaufschluss bei maximal 1200 psi in einer French-Press 40K Zelle. Durch Zentrifugation bei 18000 rpm und 4°C für 1 h wurden Zelltrümmer pelletiert. Im klaren Überstand befanden sich die löslich exprimierten Proteine.

#### **2.2.2.3. Proteinreinigung**

Alle Chromatographieschritte wurden mit filtrierten und entgasten Puffern durchgeführt und es wurde während dessen die Absorption bei 280 nm verfolgt. Der Reinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie- oder Silberfärbung verfolgt (siehe Abschnitt 2.2.2.4/5).

Alle TSP-Varianten konnten nach einem etablierten Verfahren gereinigt werden (Barbirz 2005), dabei wurden lediglich leichte Veränderungen eingeführt. Der Überstand des Bakterienlysats wurde auf 35% Ammoniumsulfat eingestellt und 1 h bei 4°C gerührt. Durch Zentrifugation bei 18000 rpm und 4°C für 1 h konnte TSP im Pellet angereichert werden. Anschließend wurde das Pellet in möglichst wenig TEC gelöst und  $\mu$ N zweimal gegen 4 l TEC dialysiert (Ausschluss: 30 kDa). Eine zweite Fällung bei 0,5 M Ammoniumsulfat bei 4°C  $\mu$ N wurde eingeführt, da bei dieser Konzentration fast nur das TSP ausfiel. Es wurde erneut zweimal gegen 4 l TEC dialysiert (Ausschluss: 30 kDa) und die Lösung im Anschluss auf 0,2 M Ammoniumsulfat eingestellt und auf eine in dem gleichen Puffer äquilibrierte Phenylsepharose FF Säule aufgetragen. TSP eluierte am Ende des linearen Gradienten von 0,2 M bis 0 M Ammoniumsulfat. Die TSP-haltigen Fraktionen wurden zweimal gegen 4 Liter 7,5 mM Tris/HCl und 2,5 mM EDTA pH 7,8 dialysiert und auf einen zuvor aktivierten und in dem Auftragspuffer äquilibrierten DE52 Anionenaustauscher geladen. Nach Waschen bis zur Basislinie erfolgte die Elution über einen linearen NaCl-Gradienten von 0-500 mM NaCl in dem Auftragspuffer. Die TSP-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und gegebenenfalls wurde als letzter Reinigungsschritt eine Gelfiltration auf einer HiLoad Superdex 200 26/60 in TEC

mit 200 mM NaCl durchgeführt. Nach Etablierung der zusätzlichen Fällung bei 0,5 M Ammoniumsulfat zu Beginn der Reinigung war dies nicht mehr nötig. TSP-haltige Fraktionen wurden durch Ultrafiltration konzentriert, mit 40% Ammoniumsulfat gefällt und bei 4°C gelagert.

#### **2.2.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach King und Laemmli durchgeführt (King & Laemmli 1971). Die Gele hatten eine Größe von 10 x 8 x 0,075 cm. Die Sammelgele enthielten dabei 5% (w/v) Acrylamid und Trenngele 12% (w/v) Acrylamid. Zur Analyse wurden die Proben mit SDS-Ladepuffer versetzt und gegebenenfalls 5 min bei 100°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde diskontinuierlich mit 90 V für das Sammelgel und 150 V für das Trenngel durchgeführt.

#### **2.2.2.5. Färbung von SDS-Gelen**

Die Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie orientierte sich an dem Protokoll nach Fairbanks und Mitarbeitern (Fairbanks *et al.* 1971). Dazu wurden die Gele für mindestens 30 min in Färbelösung inkubiert und im Anschluss in 10% Essigsäure entfärbt. Die Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei etwa 0,2 µg pro Bande.

Die Silberfärbung ist mit einer Nachweisgrenze von 0,1 ng pro Bande deutlich sensitiver als die Coomassie-Färbung. Die Färbung orientierte sich an dem Protokoll von Heukeshoven & Dernick (Heukeshoven & Dernick 1988). Die Gele wurden zunächst für 15 min in Fixierlösung 1 und dann für 30 min in frisch hergestellter Fixierlösung 2 inkubiert. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen mit Wasser wurden die Gele 30 min in Färbelösung inkubiert. Die Entwicklung erfolgte nach kurzem Waschen mit Wasser in der Entwickler-Lösung. Die Reaktion wurde in der Stop-Lösung beendet.

### **2.2.3. Reinigung von Kohlenhydraten**

#### **2.2.3.1. Reinigung von Lipopolysaccharid**

Der Reinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung (Abschnitt 2.2.2.4/5.) analysiert. Dazu wurden größere Gele (10 x 10 x 0,075 cm) verwendet, die 15% (w/v) Acrylamid im Trenngel hatten.

Für die Reinigung von Lipopolysaccharid (LPS) wurden die jeweiligen *E. coli* Stämme (vgl. 2.1.7.) in LB-Medium bei 18°C (alle außer *E. coli* H TD2158) bzw. 37°C üN angezogen. Die Bakterien aus den Kulturen wurden mit Phenol (final 1%) behandelt und eine halbe Stunde inkubiert, um die Bakterien abzutöten. Im Anschluss wurden die Bakterien 10 min zentrifugiert (Rotor SLA 3000, 4°C, 8000 rpm) und mit etwa 250 ml LPS-Puffer (50 mM Tris/HCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7,5) gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Bakterien wurden erneut mit etwa 25 ml LPS-Puffer resuspendiert und anschließend zweimal bei 1200 psi mittels French-Press (40K Zelle) aufgeschlossen. Im Anschluss wurden die Lösungen mittels Sonifizierens bei einer Intensität von 75% für eine halbe Minute zweimal homogenisiert.

Die aufgeschlossenen Zellen wurden mit DNase I (final 200 µg/ml) und RNase A (final 50 µg/ml) versetzt und ÜN bei 37°C inkubiert. Zum Lösen des LPS wurden die Zellsuspensionen auf 0,1 M EDTA und 2% SDS eingestellt und bei einer Intensität von 75% für 40 Sekunden sonifiziert. Die Lösungen wurden anschließend zentrifugiert (Rotor SS-34, 18000 rpm, 20°C, 30 min) und die Überstände drei Tage lyophyllisiert.

Die lyophyllisierten Rohextrakte wurden mit möglichst wenig Wasser resuspendiert und mehrere Stunden gerührt. Nach Abtrennung von ungelösten Bestandteilen erfolgte eine Fällung des LPS mit 2 Volumen absolutem Ethanol und MgCl<sub>2</sub> (final 0,375 M) ÜN bei -40°C (Darveau & Hancock 1983). Die Suspensionen wurden zentrifugiert (SS-34, 15 min, 4°C, 10000 rpm) und die Pellets in möglichst wenig Wasser resuspendiert.

Es folgte die Phenolextraktion nach Westphal, für die wurde das gleiche Volumen an 90% Phenol zu der LPS-Lösung hinzugegeben und unter Rühren bei 65°C für 30 min inkubiert (Westphal *et al.* 1952). Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase abgenommen. Die Phenolphase wurde mit dem gleichen Volumen an Wasser versetzt und die Extraktion erneut durchgeführt. Die aus der Phenolextraktion erhaltenen wässrigen Phasen wurden vereinigt und zur Entfernung von restlichem Phenol mit der Hälfte des Volumens an Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, das restliche Chloroform mit Druckluft ausgetrieben und die Lösung drei Tage gegen fließendes Wasser dialysiert (Ausschluss: 3500 Da).

Nach Lyophyllisieren der Lösung wurde das LPS in LPS-Puffer gelöst und mit DNase I (final 10 µg/ml) und RNase A (final 10 µg/ml) bei 37°C für 3 h inkubiert. Im Anschluss wurde Proteinase K zugegeben (final 15 µg/ml) und bei 65°C für 3 h inkubiert. Nach Zentrifugation (SS-34, 10000 rpm, 4°C, 15 min) erfolgte ein finaler Reinigungsschritt mittels Ultrazentrifugation (T856, 15°C, 2 h, 50000 rpm). Das LPS-enthaltene, farblose Pellet wurde in Wasser (bidest.) resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert. Das finale Pellet enthielt das gereinigte

LPS. Dies wurde gelöst und anschließend lyophilisiert. Das LPS (0,1-1,2 mg/ml in LPS-Puffer) wurde mittels dynamischer Lichtstreuung von der Arbeitsgruppe von K. Gast untersucht (Gast *et al.* 1998).

Vorverdautes LPS wurde gereinigt, indem 1 mg/ml LPS mit 200 µg/ml HK620TSPAN in Standardpuffer bei 37°C üN hydrolysiert wurde. Durch Zugabe eines fünftel Volumens an 90% Phenol und dreißigminütiger Inkubation bei 65°C wurde das TSP wieder entfernt. Die wässrige, LPS-haltige Phase wurde drei Tage gegen fließendes Wasser dialysiert (Ausschluss: 3500 Da). Das Dialysat wurde auf 4 mM MgCl<sub>2</sub> eingestellt und ultrazentrifugiert (T856, 2 h, 50000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurde das vorverdaute LPS aus dem Pellet lyophilisiert.

#### **2.2.3.2. Reinigung von Polysaccharid**

Die Bakterien wurden analog zu der Reinigung von LPS angezogen. Die Bakterien wurden in 10% Essigsäure resuspendiert und 1,5 h unter Rückfluss gekocht. Die Suspension wurde abgekühlt und zentrifugiert (GSA, 7500 rpm, 4°C, 20 min). Der Überstand enthielt das Polysaccharid und wurde abgenommen. Das Pellet wurde erneut mit 10% Essigsäure versetzt und analog behandelt. Anschließend wurden die beiden Überstände 3 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert (Ausschluss: 3500 Da). Das Dialysat wurde zentrifugiert (GSA, 10000 rpm, 4°C, 20 min) und der Überstand weiterverwendet.

Das Ionenaustausch-Material DE52 wurde mit Wasser aufgeschlämmt und anschließend mit 0,5 M Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen. Die Aktivierung des Materials erfolgte ebenfalls mit 0,5 M Ammoniumhydrogencarbonat für mindestens 2 h. Im Anschluss wurde das Material dreimal mit 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen. Die PS-haltige Lösung wurde auf 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat eingestellt, zu dem DE52-Material gegeben und über Nacht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abdekantiert, filtriert und lyophilisiert.

Das trockene Polysaccharid wurde in möglichst wenig Wasser resuspendiert und unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (SS-34, 8000 rpm, 4°C, 20 min). Der Überstand wurde mit Ethanol versetzt (final 80%) und mindestens 1 h bei -40°C gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (GSA, 10000 rpm, 4°C, 30 min) und erneut in möglichst wenig Wasser gelöst. Es wurden erneut unlösliche Bestandteile abzentrifugiert und die Fällung wurde wiederholt, bis sich in Wasser kein Pellet mehr bildete. Die PS-haltige Lösung wurde anschließend lyophilisiert.

### 2.2.3.3. Herstellung von Oligosacchariden

Zur Herstellung von Oligosacchariden wurde die Aktivität von HK620TSP genutzt. Dafür wurden 50 mg/ml Polysaccharid in Standardpuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, 1 mM EDTA pH 7,5) gelöst und 50 µg/ml HK620TSPAN hinzugegeben. Nach der Inkubation bei 37°C üN wurde unverdautes PS bei 80% Ethanol 1 h bei -40°C gefällt und abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 20 min). Der Überstand wurde abgenommen und in der *Speed Vac* getrocknet.

Die getrockneten Oligosaccharide wurden in 1 ml Wasser resuspendiert und mittels Größenausschluss (Superdex 30 26/60) an der HPLC separiert. Die Detektion der Zuckerfragmente erfolgte bei 190 nm und 214 nm. Die Oligosaccharid-haltigen Fraktionen aus mehreren Läufen wurden vereinigt und rechromatographiert.

Zur Kontrolle wurden die Oligosaccharide massenspektrometrisch in der Arbeitsgruppe von Prof. Steup an der Universität Potsdam untersucht. Es wurde ein Reflex II Massenspektrometer von Bruker verwendet. Eine Kalibrierung wurde zuvor mit je 50 µM Maltopentose und Maltohexose durchgeführt. Es wurden je 0,5 µl Probe mit 0,5 µl DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) als Matrix auf das Target gegeben. Nach Trocknen der Proben wurden diese im Positivmodus bei einer Laserintensität von 75% analysiert.

Des Weiteren wurden Stammlösungen der Oligosaccharide mit Hilfe der Messung reduzierender Enden in der Lösung (vgl. 2.2.4.1.) und NMR-Messungen mit internem Standard (DSS (4,4-Dimethyl-4-Silapentan-1-Sulfonsäure)) quantifiziert. Die NMR-Messungen wurden von Andy Mainz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Reif am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der Zucker-Stammlösungen lyophilisiert und von A. Mainz in DSS-D<sub>2</sub>O (0,2 mM DSS in D<sub>2</sub>O) aufgenommen. Es wurden <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Spektren dieser Proben sowie von Puffer und DSS alleine an einem 750 MHz NMR Spektrometer (17.62 Tesla, Bruker Biospin) bei 300 K aufgenommen. Es wurden 256 *Scans* durchgeführt, um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu gewährleisten. Des Weiteren wurde ein *Recycle Delay* von 20 s verwendet, um zu gewährleisten, dass alle Resonanzen in den Ausgangszustand zurückkehren konnten. Die Daten wurden mit einer Exponentialfunktion mit einer Linienverbreiterung von 2 Hz apodisiert. Das Fourier-transformierte Spektrum wurde auf das Signal der Methylgruppen des internen Standards DSS (0,00 ppm) bezogen. Dieses Signal, das von 9 Protonen bei einer Konzentration von 0,2 mM DSS herrührte, diente als Referenz für alle Integrale. Über Integration der Signale des Zuckers konnte die Konzentration an Kohlenhydrat quantifiziert werden.

## **2.2.4. Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von TSP**

### **2.2.4.1. Nachweis reduzierender Enden mittels DNSA**

Der Nachweis der reduzierenden Enden orientierte sich an einem zuvor beschriebenen Protokoll (Seckler *et al.* 1989; Danner *et al.* 1993). Zu untersuchende Proben wurden mit dem gleichen Volumen (50 µl) an Dinitrosalicylsäurelösung (20 mg/ml in 0,7 M NaOH) versetzt und 5 min bei 100°C inkubiert. Nach Auffüllen der Proben auf 1 ml wurden diese bei 535 nm vermessen. Zur Bestimmung der Konzentration an reduzierenden Enden wurde eine Eichreihe mit N-Acetylglucosamin mitgeführt.

### **2.2.4.2. Aktivität gegenüber Lipopolysaccharid**

Zur Untersuchung der Aktivität wurden 0,5 mg/ml LPS mit 50 µg/ml HK620TSPΔN in Standardpuffer bei 37°C verdaut. Es wurden vor der Zugabe von HK620TSPΔN und nach verschiedenen Inkubationszeiten Proben entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und die Reaktion wurde durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Die Aufbewahrung der Proben bis zur Analyse mittels SDS-PAGE erfolgte bei -20°C.

## **2.2.5. Biophysikalische Methoden**

### **2.2.5.1. Absorptionsspektroskopie**

Konzentrationen an Protein bzw. Nukleinsäuren wurden spektroskopisch durch Messung der Absorption bei 280 nm beziehungsweise 260 nm bestimmt. UV-Spektren wurden im Bereich von 240 bis 350 nm bei Raumtemperatur registriert und mit dem jeweiligen Pufferspektrum korrigiert. Verunreinigungen der Probe mit Aggregaten wurden durch Lichtstreuung oberhalb 300 nm detektiert. Die Konzentration von doppelsträngiger DNA wurde über den Zusammenhang  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml dsDNA}$  ermittelt. Die Konzentration von TSP wurde über bereits ermittelte Extinktionskoeffizienten bestimmt (Barbirz 2005). Die Reinheit von LPS und PS wurde anhand der Absorption von verunreinigenden Proteinen und Nukleinsäuren beurteilt.

### **2.2.5.2. Bindungsstudien**

Die Bindung der Oligosaccharide an das HK620TSP bzw. an die entsprechenden Varianten wurde mit Hilfe der folgenden Methoden untersucht. Für alle Bindungsstudien wurden die

verwendeten Puffer filtriert (0,2 mm Porenfilter) und entgast. Die Proteinlösungen wurden vor den Messungen 20 min ultrazentrifugiert (40000 rpm, 4°C).

### ***Fluoreszenztitrationen***

Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte bei 20°C in Quarzglas-Küvetten. Es wurde mit 10 µg/ml Proteinlösungen (etwa 150 nM) in Standardpuffer gearbeitet. Oligosaccharid-Lösungen wurden in dem gleichen Puffer angesetzt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 295 nm. Die Spaltbreite für die Anregung betrug 2 nm, für die Emission 6 nm. Nach der Aufnahme von Spektren mit variierender Emissionswellenlänge wurde die Fluoreszenztitration bei einer Emissionswellenlänge von 347 nm unter Rühren durchgeführt. Die Konzentrationen und Volumina der zugegebenen Kohlenhydrat-Lösungen unterschieden sich je nach Affinität der Proteine. Nach jeder Zugabe wurde jeweils 2 min gewartet vor der Messung. Es wurde darauf geachtet, dass die Volumenzunahme weniger als 5% betrug. Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzsignale puffer- und volumenkorrigiert sowie auf das Ausgangsfluoreszenzsignal in Abwesenheit von Kohlenhydrat bezogen. Die Daten wurden unter nicht-linearer Regression analog zu den Experimenten an P22TSP mit Hilfe von SigmaPlot (Jandel Scientific) oder IgorPro an ein Bindungsmodell, welches sich aus dem Massenwirkungsgesetz herleitet (Baxa *et al.* 1996; Utrecht 2006), angepasst:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + \Delta F_{\max} (E_0 + L_0 + K_D - ((E_0 + L_0 + K_D)^2 - 4L_0E_0)^{\frac{1}{2}}) / 2E_0 .$$

Dabei kennzeichnen F die gemessene Fluoreszenz, F<sub>0</sub> die Fluoreszenz des ungebundenen Proteins, ΔF<sub>max</sub> ist die relative Fluoreszenzänderung in der Sättigung, L<sub>0</sub> und E<sub>0</sub> sind die totalen Konzentrationen an Oligosaccharid und an Bindestellen am TSP und K<sub>D</sub> ist die Dissoziationskonstante.

### ***Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)***

Die Messungen wurden an einem VP-ITC Mikrokalorimeter (MicroCal, Inc., Northhampton) in Standardpuffer durchgeführt (50 mM Natriumphosphatpuffer, 1 mM EDTA pH 7,5). In der gerührten Zelle befanden sich typischerweise 25 µM TSP-Untereinheiten und in der Spritze 0,5 mM O-Antigen-Fragmente. Ein typisches ITC-Experiment bestand aus 25 Injektionen von 8 µl mit einer Dauer von 20 s und 230 s Intervallen. Die mathematische Auswertung der Daten erfolgte durch die Anpassung mit dem Modell „OneSite“ durch Origin (Version 5.0, MicroCal, Inc.). Dabei erhält man direkt aus der Integration der Daten die Bindungsenthalpie (ΔH) und aus der Steigung der Titrationskurve wird K<sub>D</sub> ermittelt. Die Gibbs Energie ΔG wird

von dem Programm aus  $K_D$  berechnet. Die Bindungsentropie  $\Delta S$  ergibt sich entsprechend aus dem Zusammenhang  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Aus Bindungsmessungen bei verschiedenen Temperaturen kann durch Auftragung der gemessenen Enthalpien gegen diese Temperaturen aus der Steigung die Wärmekapazitätsänderung  $\Delta C_P$  ermittelt werden.

### ***Oberflächenplasmonresonanz (SPR)***

An dem verwendeten BIAcore™ 2000 sind vier Fließzellen vorhanden, daher wurden auf einem Sensor Chip drei verschiedene Proteine immobilisiert, die vierte Fließzelle wurde als Referenzkanal benutzt. Die Immobilisierung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einer Temperatur von 25°C. Nach der Aktivierung durch 0,2 M EDC und 0,05 M NHS (160  $\mu\text{l}$ ) wurden die TSP, welche in 10 mM Natriumacetat pH 4,0 auf eine Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt wurden, über einen *loop* injiziert, bis ein Signalanstieg um ca. 8000 RU erreicht wurde. Anschließend wurde die Oberfläche mit 1 M Ethanolamin (160  $\mu\text{l}$ ) inaktiviert. Die Bindung von Kohlenhydraten wurde bei 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  und 20°C in Standardpuffer als Laufpuffer untersucht. Es wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  verschieden konzentrierte Oligosaccharid-Lösungen injiziert und die Änderung im Brechungsindex verfolgt. Nach Subtraktion des Referenzsignals wurde eine Region, wo die Messungen bei allen Konzentrationen im Gleichgewicht vorlagen (Plateau), ausgewählt. Es wurde über 20-40 s gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Nach Auftragung der Messpunkte gegen die Analytkonzentration wurden diese Daten mit Hilfe einer nicht-linearen Regression an

folgende Formel angepasst: 
$$RU_{eq} = \frac{RU_{max} \cdot [A]}{K_D + [A]}$$

Dabei kennzeichnen  $RU_{eq}$  den korrigierten Messwert im Gleichgewicht,  $RU_{max}$  den Sättigungswert im Messsignal,  $K_D$  die Dissoziationskonstante und  $[A]$  die Analytkonzentration (Konzentration an Oligosaccharid).

#### **2.2.5.3. Zirkulardichroismus-Spektroskopie**

Diese Messungen wurden an einem Jasco J-715 Spektropolarimeter bei einer Mess-temperatur von 20°C durchgeführt. Die verwendeten Puffer waren filtriert (0,2 mm Porenfilter) und entgast und die Proteinlösungen wurden vor der Messung 20 min ultrazentrifugiert (40000 rpm, 4°C). Es wurden Fern-UV-Spektren im Bereich von 190-250 nm aufgenommen. Der Messpunktabstand betrug 1,0 nm, die Bandbreite 1 nm und die Responsezeit 4 s. Die

Spektren wurden pufferkorrigiert und es wurde jeweils über 15 Spektren akkumuliert. Für den Vergleich von Spektren wurden die Messwerte unter Verwendung der folgenden Formel in die molare Elliptizität  $[\Theta_{MRW}]$  umgerechnet (Creighton 1997):  $[\Theta_{MRW}] = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot l \cdot N_A}$ .

Mit  $\Theta$  als gemessene Elliptizität (Grad),  $M_r$  als Molekularmasse des Proteins,  $c$  als Proteinkonzentration (mg/ml),  $l$  als Schichtdicke der Küvette (cm) und  $N_A$  als Anzahl der Aminosäuren.

#### 2.2.5.4. Kinetische Untersuchungen mittels *Stopped-Flow*

Die Durchführung kinetischer Untersuchungen sowie experimentelle Details sind bereits beschrieben (Baxa *et al.* 2001).

#### 2.2.5.5. Kristallographische Arbeiten

Alle kristallographischen Arbeiten fanden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch statt. Die Messungen mit Synchrotronstrahlung erfolgten in Berlin-Adlershof (*beamline* BL14.2 der Freien Universität Berlin am BESSY) durch Dr. Yvette Roske und Dr. Ulrich Gohlke, der auch die Datenbearbeitung und Phasierung der Struktur der Variante E372Q durchgeführt hat. Die Kokristallstrukturen wurden zusammen mit Jürgen Müller gelöst.

Zur Kristallisation wurden 3  $\mu$ l Proteinlösung (8 mg/ml in TEC mit 200 mM NaCl) mit 3  $\mu$ l Kristallisationspuffer (0,1 M Tris/HCl, 3,5 M Natriumformiat pH 8,0) auf einem Deckglas gemischt und über dem gleichen Puffer im hängenden Tropfen bei 20°C kristallisiert. Etwa 0,2 mm große Kristalle wuchsen innerhalb von zwei Tagen. Zur Kokristallisation wurden den Tropfen zusätzlich 0,6  $\mu$ l Hexasaccharid (in Wasser gelöst, final 1,4 mM) zugesetzt.

Kristalle wurden mit Stickstoff auf 100 K gekühlt und die Röntgenstreuung von Cu-K- $\alpha$ -Strahlung an Diffraktometern mit Drehanode wurde in Berlin-Buch getestet (Gerät: *Oxford diffraction*) getestet. Details zur Messung des Datensatzes sind Tabelle 6.2 zu entnehmen. Zur Datenbearbeitung und Indizierung wurden die Programme XDS/XSCALE verwendet (Kabsch & Sander 1983).

Strukturmodelle konnten durch molekularen Ersatz mit den Phasen der publizierten Strukturen des Wildtyps (PDB-Code: 2vji, Barbirz *et al.* 2008) als Startmodell mit dem Programm Phaser ermittelt werden (McCoy *et al.* 2007). Wassermoleküle wurden mit ARP/wARP

lokalisiert und hinzugefügt (Perrakis *et al.* 1997). Die Überprüfung erfolgte visuell mit dem Programm O (T. A. Jones *et al.* 1991). Durch mehrere alternierende Verbesserungsrounds mit REFMAC5 (Murshudov *et al.* 1997) und manuelles Einpassen des Strukturmodells in die Elektronendichte mit Hilfe des Programms O konnten die Modelle verfeinert und vervollständig werden. Ausführliche Statistiken sind der Tabelle 6.2 im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen. Dabei dienen vor allem die sogenannten R-Faktoren als Qualitätskontrolle der Verfeinerung. Die R-Werte berechnen sich aus dem Verhältnis der beobachteten Struktur faktoren ( $F_o$ ) und der aus dem Modell berechneten Struktur faktoren ( $F_c$ ) nach

$$R = \sum \frac{\|F_o| - |F_c\|}{|F_o|}$$

Zur Kontrolle wird ein Referenzdatensatz von 5% aller Reflexe nicht mit verfeinert und daraus auf die gleiche Weise ein R-Wert ( $R_{\text{free}}$ ) berechnet (Brünger 1992). Die Strukturen sind in der RCSB Proteindatenbank (PDB) hinterlegt (2X85, 2X6W, 2X6X, 2X6Y). Die Struktur der ligandenfreien Variante E372Q wurde kürzlich von U. Gohlke gelöst und ist noch nicht in der PDB hinterlegt.

## 2.2.6. Arbeiten mit dem Phagen HK620

### 2.2.6.1. Reinigung des Phagen HK620

Der Phage HK620 wurde freundlicherweise von Fr. Ansaldi von der Universität Aix-Marseille zur Verfügung gestellt. Die Reinigung des Phagen orientierte sich an dem Protokoll zur Reinigung des Phagen P22 (<http://web.mit.edu/king-lab/www/cookbook/cookbook.htm>). Für die Anreicherung des Phagen wurde zunächst eine Vorkultur aus *E. coli* H TD2158 in LB-Medium angelegt. Anschließend wurde eine 500 ml Kultur angeimpft und bis zu einer OD von 0,3 bei 600 nm ( $2 \times 10^8$  Zellen/ml) wachsen gelassen. Daraufhin wurden die Bakterien mit dem Phagen HK620 (MOI = 0,1) infiziert. Dabei wurde das zugegebene Volumen an Phagenlösung (X) mit folgender Formel berechnet:

$$X = (\text{Konzentration}_{\text{Bakterien}} \cdot \text{MOI} \cdot \text{Volumen}_{\text{Bakterienkultur}}) / \text{Titer}_{\text{Phagenstock}}$$

Nach mindestens zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Phagensuspension auf Eis abgekühlt und mit 3 ml Chloroform versetzt, um die Lyse von noch intakten Bakterien zu induzieren. Mittels Zentrifugation (Rotor SLA-3000, 15 min, 5000 rpm, 4°C) wurden Zelltrümmer abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Phagen pelletiert (SS-34, 90 min, 18000 rpm, 4°C) und in 50 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7,6 resuspendiert.

In einem finalen Reinigungsschritt wurden Verunreinigungen durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation abgetrennt. Dazu wurde ein CsCl-Gradient (1,3 g/ml (9 ml) sowie 1,4 g/ml (9 ml), 1,5 g/ml (7 ml) und 1,65 g/ml (4,5 ml)) geschichtet. Nachdem 9 ml Probe auf diesen Gradienten gegeben wurden, reicherte sich der Phage nach Ultrazentrifugation (SW-32 Ti; 2,5 h; 24000 rpm; 4°C) an der unteren Zonengrenze zwischen 1,4 und 1,5 g/ml CsCl an. Mittels einer Spritze wurde die bläulich-weiße Phagenbande aus dem Gradienten gesammelt. Anschließend wurde die Phagenlösung bei 4°C zweimal gegen 5 Liter Phagenpuffer dialysiert (Ausschluss: 12-18 kDa). Im Anschluss wurde der Phage bei 4°C gelagert.

#### **2.2.6.2. Herstellung von *Plating*-Bakterien**

Zur Herstellung von *Plating*-Bakterien wurden 300 ml LB-Medium in einem Verhältnis von 1:100 mit einer Vorkultur aus *E. coli* H TD2158 oder anderen *E. coli*-Bakterien (vgl. Ergebnisteil) angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer OD von 0,3 bei 600 nm ( $2 \times 10^8$  Zellen/ml) kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien in sterilen Zentrifugenbechern pelletiert (Rotor SLA-3000, 15 min, 5000 rpm, 4°C) und in 25 ml LB-Medium resuspendiert. *Plating*-Bakterien halten sich für 2 Wochen bei 4 °C.

#### **2.2.6.3. Infektiösität des Phagen**

Die Infektiösität des Phagen HK620 wurde mit verschiedenen Methoden untersucht, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

##### ***Bestimmung des Titers durch Ausplattieren***

Für das Ausplattieren wurden Agarplatten für 10 min bei 45°C vorgewärmt. Anschließend wurden zu 2,5 ml geschmolzenem Softagar 20 µl *Plating*-Bakterien gegeben und mit verschiedenen Verdünnungen des Phagen HK620 gemischt. Die Softagar-Gemische wurden gemischt und auf die vorgewärmten Agarplatten gegossen. Nach zehnmütigem Warten wurden die Platten über Nacht bei 37°C in den Brutschrank inkubiert. Die Auszählung der Plaques erfolgte am nächsten Tag.

##### ***Untersuchungen in Flüssigkultur***

Für die Untersuchungen der Infektiösität des Phagen HK620 in Flüssigkultur wurden 100 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer Vorkultur der jeweiligen *E. coli*-Bakterien angeimpft. Bei einer OD von 0,3 bei 600 nm wurde HK620-Phage zugegeben (MOI = 0,1; Be-

rechnung siehe 2.2.6.1) und die OD wurde kontinuierlich (ca. alle 30 min) gemessen.

Zur Induktion von Prophagen in den lytischen Zyklus wurden manche Kulturen bei einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm mit dem Antibiotikum Carbadox (1,5 µg/ml) versetzt (Barksdale & Arden 1974).

#### **2.2.6.4. Inhibierung der Infektiösität durch Lipopolysaccharid**

In diesem Experiment wurde die Inaktivierung von  $5 \times 10^4$  Pfu/ml des Phagen HK620 durch 25 µg/ml LPS aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen in Phagenpuffer induziert (Andres, Baxa *et al.* 2010). Nach Temperierung der Phagen und der LPS-Lösung auf 37°C wurden die Komponenten gemischt. Nach verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation wurden Proben entnommen und mit 20 µl *Plating*-Bakterien (*E. coli* H TD2158) wie unter Abschnitt 2.2.6.3. beschrieben ausplattiert. Am nächsten Tag wurde die Anzahl an Plaques gezählt.

#### **2.2.6.5. Nachweis der DNA-Ejektion mittels Gelelektrophorese**

Als Nachweis dafür, dass das Lipopolysaccharid aus *E. coli* H TD2158 die DNA-Ejektion des Phagen HK620 induzieren kann, wurden Untersuchungen mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden  $1,6 \times 10^{11}$  Pfu/ml des Phagen HK620 mit 1,2 mg/ml LPS in Phagenpuffer bei 37°C üN inkubiert. Manche Inkubationsansätze wurden anschließend mit 0,1 mg/ml DNase I oder mit 10 U Restriktionsenzymen versetzt und bei 37°C für 1 h oder üN verdaut. Zur Kontrolle wurde die DNA aus dem Phagen HK620 mit Guanidiniumchlorid extrahiert. Dazu wurden Phagen in 6 M Guanidiniumhydrochlorid für 2 h bei 40°C inkubiert und anschließend auf die Säulen der *QIAquick Mini Kits* gegeben und nach Herstellerangaben gereinigt (vgl. 2.2.2.6).

Zur Kontrolle wurde diese DNA mitgeführt und zum Vergleich ebenfalls mit DNase I bzw. Restriktionsenzymen verdaut. Alle Proben wurden mit 5 µl Ladepuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht (vgl. 2.2.2.8).

#### **2.2.6.6. Transmissions-Elektronenmikroskopie**

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Sibylle Rüstig in der Arbeitsgruppe von Prof. Koetz an der Universität Potsdam durchgeführt. Dazu wurden Phagen ( $2 \times 10^9$  Pfu/ml) zum Teil mit 0,1 mg/ml LPS üN in Phagenpuffer bei 37°C inkubiert und

anschließend auf Kupfernetze gegeben. Die Färbung erfolgte mit 2% (w/v) Uranylacetat (Andres, Roske *et al.* 2012).

## **2.2.7. Arbeiten mit dem Phagen P22**

### **2.2.7.1. Reinigung von P22-Köpfen**

Die Reinigung von P22-Köpfen wurde bereits beschrieben (Andres, Hanke *et al.* 2010). Bei dieser Reinigung wird der *Salmonella* Stamm DB7136 c<sub>2</sub>ts30 verwendet, der eine temperatursensitive, lysogene Variante des Phagen P22 trägt (Winston *et al.* 1979; Andres, Hanke *et al.* 2010). Diese Variante des Phagen ist lysedefizient (13- am) und kann keine TSP herstellen (9- am). Nach Induktion des Phagen aus dem Lysogen durch einen Temperaturshift akkumulieren die Phagenköpfe daher in den Bakterien. Nach Ernte der Bakterien werden diese durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen und durch Zugabe von 17% Chloroform und 0,08% Triton-X-100 aufgeschlossen. Im Anschluss werden die Phagenköpfe pelletiert (vgl. Phagenreinigung unter 2.2.6.1.) und final durch einen CsCl-Gradienten gereinigt.

### **2.2.7.2. Anheften von TSP an die P22-Köpfe**

Um ganze Phagen herzustellen, wurden Phagenköpfe ( $4 \times 10^{10}$  Partikel) mit 0,1 mg/ml Voll-längen-TSP 1 h bei 37°C inkubiert (J. V. Israel, Thomas F. Anderson, *et al.* 1967). Anschließend wurden diese Partikel über einen CsCl-Gradienten (vgl. Abschnitt 2.2.6.1.) von überschüssigem TSP gereinigt und gegen Phagenpuffer dialysiert (Ausschluss: 12-18 kDa).

### 3. Ergebnisse

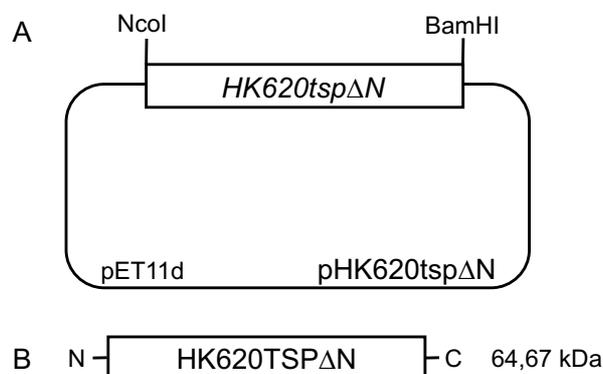
Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation steht die Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung zwischen TSP des Bakteriophagen HK620 und dem *O*-Antigen des Lipopolysaccharids aus dem Wirtsbakterium *E. coli*. Anhand dieses Beispiels sollen allgemeine Aussagen über strukturelle Voraussetzungen und Triebkräfte für Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen getroffen werden. Dazu wurde versucht, diese Wechselwirkung sowohl auf Proteinseite als auch auf Seite der Kohlenhydrate zu beeinflussen.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Modifikationen am TSP auf die kohlenhydratbindenden Eigenschaften, während der zweite Teil die Bindung unterschiedlicher *O*-Antigene an HK620TSP beleuchtet. Im letzten Abschnitt der Dissertation werden Arbeiten mit dem ganzen Phagen HK620 beschrieben, die der Aufklärung des Infektionsmechanismus dienen sollten.

Für diese Arbeit wurde soweit nicht explizit anders erwähnt mit N-terminal verkürzten ( $\Delta N$ ) Varianten des TSP aus dem Phagen HK620 gearbeitet (aa 111-710, vgl. Abschnitt 1.4.). Der *E. coli*-Stamm H TD2158 wird im Folgenden als Wirtsstamm bezeichnet, da der Phage HK620 auf diesem Stamm propagiert werden kann und der Stamm, der ursprünglich mit dem Phagen vergesellschaftet gefunden wurde, nicht zur Verfügung stand (Dhillon *et al.* 1998).

#### 3.1. Klonierung und Expression der Protein-Varianten

In vorherigen Arbeiten von Dr. Stefanie Barbirz und Charlotte Uetrecht wurde die Sequenz von TSP des Phagen HK620 bereits in einen Vektor des pET-Systems kloniert und erfolgreich exprimiert (Abb. 3-1; Barbirz 2005; Uetrecht 2006).



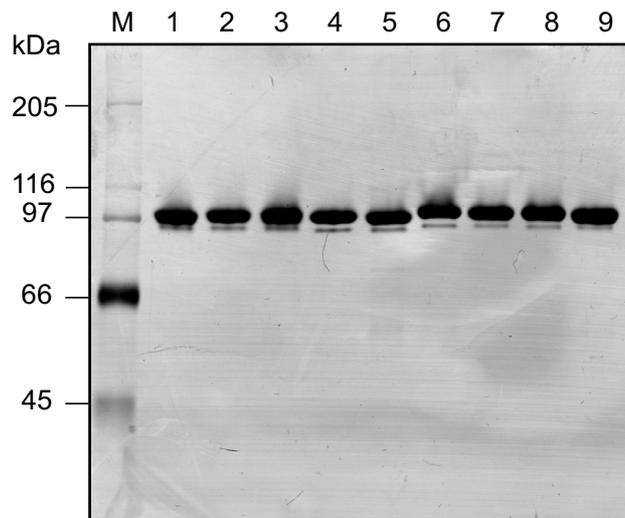
**Abb. 3-1:** Schematische Darstellung des Konstrukts (A) zur Expression von N-terminal verkürztem HK620TSP (B). Die Sequenz für N-terminal verkürztes HK620TSP wurde über BamHI- und NcoI- Schnittstellen in den Vektor pET11d kloniert.

In der Arbeit von C. Uetrecht wurden Varianten von HK620TSP erstellt, wodurch das aktive Zentrum identifiziert werden konnte. Diese Varianten (D339N und E372Q) sowie das N-terminal verkürzte TSP (Wt) aus dem Phagen HK620 wurden in dieser Arbeit erneut exprimiert und gereinigt. Zur systematischen Analyse der Kohlenhydratbindung wurden zudem folgende TSP-Varianten durch ortsgerichtete Mutagenese erstellt: D339A, E372A, D339A/E372A, D339A/E372Q, D339N/E372A, D339N/E372Q (vgl. Einleitung Abb. 1-13). Nach Kontrolle der Klonierung durch Sequenzierung konnten alle Varianten erfolgreich bei 37°C löslich exprimiert werden.

### **3.2. Reinigung von Tailspike Proteinen aus HK620**

Die erfolgreich exprimierten Varianten wurden größtenteils unter bereits etablierten Bedingungen gereinigt (Barbirz 2005; Barbirz *et al.* 2008). Dabei wurden die TSP nativ ohne Zuhilfenahme von Affinitäts-*Tags* gereinigt. In diese Reinigung waren Ammoniumsulfat-Fällungen, hydrophobe Interaktionschromatographie, Anionenaustauschchromatographie sowie Größenausschlusschromatographie inbegriffen. Die Varianten konnten alle erfolgreich mit einem Reinheitsgrad von über 95% gereinigt werden (Abb. 3-2). Die Ausbeuten lagen je nach Expressions- und Reinigungsbedingungen (vgl. Methoden 2.2.2.1/3. und Diskussion 4.1.) zwischen 10 mg und 50 mg je Liter Expressionskultur.

HK620TSP ist SDS-resistent und läuft in der Elektrophorese als natives Trimer auf der Höhe zwischen den 97 und 116 kDa-Marker-Proteinen, wenn es zuvor nicht erhitzt wurde (Abb. 3-2). Bei den TSP-Varianten handelt es sich um Ladungsvarianten, die ein spezifisches Laufverhalten aufweisen. Unterhalb der Bande der TSP-Varianten ist jeweils eine zweite dünne Bande zu erkennen, welche während der Reinigung nicht abgetrennt werden konnte. Durch Erhitzen der Proben auf 100°C zerfallen die nativen, trimeren TSP in ihre Monomere (Barbirz 2005). Nach Erhitzen der TSP-Varianten konnte nur noch eine Bande in der SDS-PAGE auf der Höhe zwischen den 45 und 66 kDa-Marker-Proteinen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

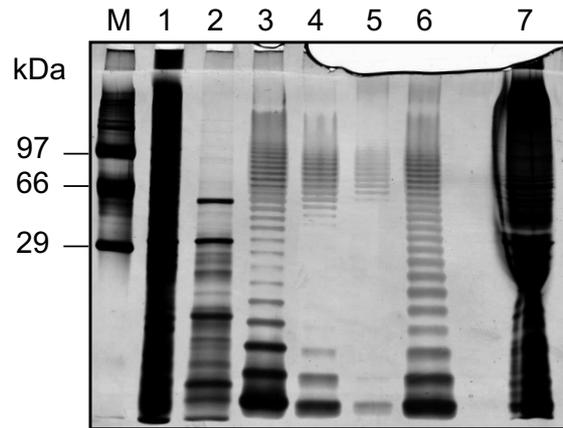


**Abb. 3-2: Gereinigte Varianten von HK620TSP.** 10%ige SDS-PAGE nach Silberfärbung: Aufgetragen sind die gereinigten Varianten von HK620TSP: von links nach rechts sind der Molekulargewichtsmarker (M), der Wildtyp (1), die Varianten D339A (2), D339N (3), E372Q (4), E372A (5), D339N/E372A (6), D339A/E372A (7), D339N/E372Q (8) sowie D339A/E372A (9) mit jeweils 3 µg pro Spur aufgetragen.

Die Stabilität der HK620TSP-Varianten wurde anhand der SDS-Resistenz nach Hitzedenaturierung mittels SDS-PAGE untersucht (Daten nicht gezeigt). In diesen Untersuchungen zeigten alle Varianten eine ähnliche Stabilität wie das Wildtyp-Protein (Barbirz 2005).

### 3.3. *Reinigung von polymeren Kohlenhydraten*

Die Kohlenhydrate für die Interaktionsstudien mit HK620TSP wurden aus den Wirtsbakterien (*E. coli* H TD2158) gereinigt. Dazu wurden Bakterien in größerem Maßstab bei 37°C angezogen und zunächst wurde Lipopolysaccharid (LPS) oder Polysaccharid (PS) aus diesen Bakterien präpariert. Dabei wurde LPS im Wesentlichen nach Aufschluss der Bakterien durch Ethanol-fällung (Darveau & Hancock 1983), heiße Phenolextraktion (Westphal *et al.* 1952), Verdau mit Nukleasen und Ultrazentrifugation gereinigt. Die Reinheit der gereinigten Lipopolysaccharide wurde mittels Absorptionsspektroskopie und SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung beurteilt (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.). Abbildung 3-3 zeigt exemplarisch den Reinigungserfolg im Verlauf der Präparation von LPS. Durch die Auftrennung der verschieden langen LPS-Ketten, die unterschiedlich viele repetitive Einheiten des O-Antigens tragen, zeichnet sich LPS in elektrophoretischen Untersuchungen durch eine Leiter-ähnliche Struktur aus (Franco *et al.* 1998) (Spur 3 und 6 Abb. 3-3). Die Färbung von LPS durch Silber ist weniger sensitiv als die von Proteinen. Daher sind die abgetrennten Proteinverunreinigungen in den Spuren 1, 2 und 7 zum Teil überfärbt. Gereinigtes LPS mit einem typischen, Leiter-ähnlichen Laufmuster ist in Spur 6 zu sehen.



**Abb. 3-3: Reinigung von LPS:** Gezeigt ist der typische Verlauf einer LPS-Reinigung nach Analyse verschiedener Proben aus dieser Reinigung mittels 15%iger SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung. Aufgetragen wurden Markerproteine (M), Proben der unlöslichen Bestandteile des Rohextrakts (Spur 1, Verdünnung 1:40), des Überstands nach Ethanol-fällung (Spur 2, Verdünnung 1:20), der wässrigen Phase nach Phenolextraktion (Spur 3), der Phenolphase dieser Extraktion (Spur 7), der Überstände nach erster und zweiter Ultrazentrifugation (Spuren 4 und 5, nach Trocknen und erneutem Lösen 1 mg/ml) sowie des Pellets der letzten Ultrazentrifugation (1 mg/ml, Spur 6).

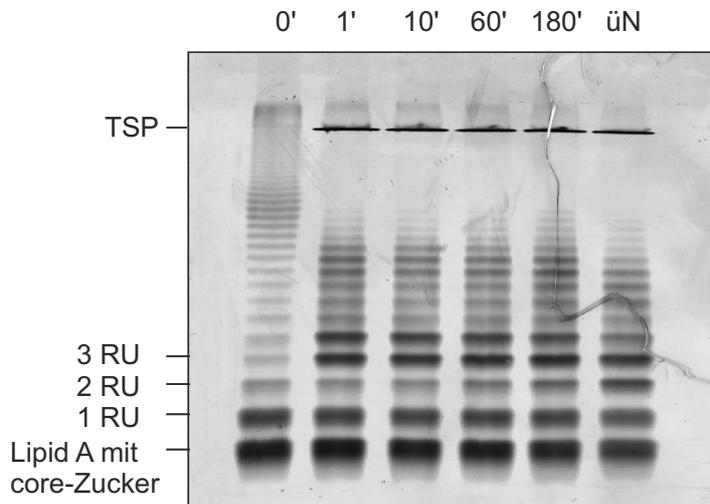
Für die Reinigung von O-Antigen-Polysacchariden wurde die Abspaltung von PS aus LPS unter sauren Bedingungen ausgenutzt. Somit wurde PS durch sauren Aufschluss (Freeman 1942) der Bakterien, anschließende Abtrennung von Nukleinsäuren durch Ionenaustauschchromatographie und abschließende Ethanol-fällung gereinigt. Die Reinheit der Polysaccharide wurde durch Absorptionsspektroskopie anhand der Abwesenheit von Absorption durch Proteine (280 nm) bzw. DNA (260 nm) verifiziert.

Da die Reinigung von LPS deutlich aufwendiger war als die von PS, wurde für die folgenden Oligosaccharid-Präparationen hauptsächlich PS als Ausgangsmaterial verwendet.

### 3.4. Herstellung von Oligosaccharidfragmenten

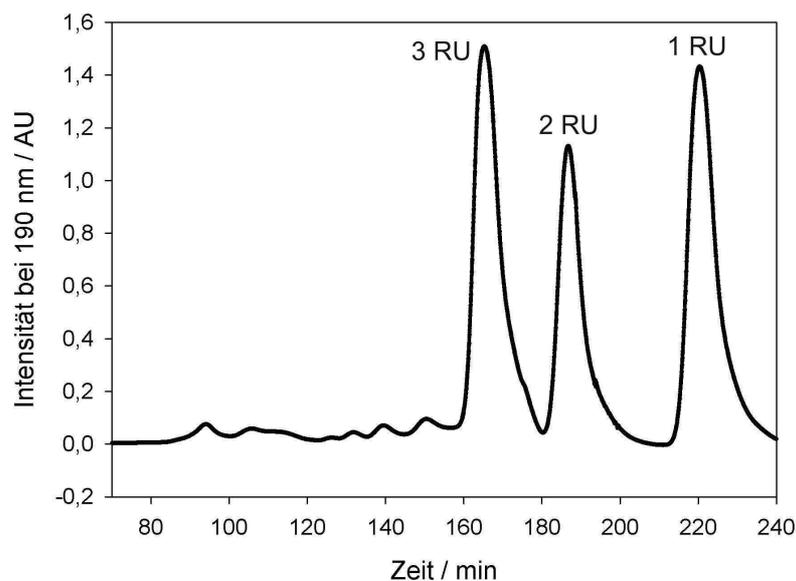
Zur Herstellung der O-Antigenfragmente wurde die hydrolytische Aktivität von HK620TSP gegenüber LPS bzw. PS des Wirtsbakteriums zu Nutze gemacht. HK620TSP bindet nicht nur die O-Antigenstrukturen, sondern spaltet auch längere Polysaccharide aus Einheiten dieses O-Antigens in die kleinste repetitive Einheit (Barbirz *et al.* 2008). Im Falle des Wirtsantigens handelt es sich dabei um ein Hexasaccharid des Antigentyps O18A1 (vgl. Einleitung 1.6.). In Abbildung 3-4 wurde die Aktivität von HK620TSP anhand des Verdaus von LPS mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung des Gels analysiert. Die Leiter-ähnliche Struktur des LPS verändert sich durch Inkubation mit TSP. Längerkettige LPS-Fragmente verschwinden mit steigender Inkubationszeit, während kürzere Ketten (hauptsächlich bis zu 3 repetitiven Einheiten) akkumuliert werden. Nach dem Verdaus von LPS durch HK620TSP

sind in dieser Analyse hauptsächlich Fragmente bis zu acht repetitiven Einheiten zu finden. Das LPS wird durch TSP nicht komplett verdaut, was in der Diskussion beleuchtet wird (vgl. Abschnitt 4.7.2.).



**Abb. 3-4: Analytischer Verdau von LPS aus *E. coli* H TD2158 durch HK620TSP.** Es wurden 0,5 mg/ml LPS in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA mit 50 µg/ml HK620TSPΔN bei 37°C verdaut. Vor Zugabe des TSP und nach 1, 10, 60 und 180 min Verdau sowie nach Inkubation mit dem TSP über Nacht wurden Proben genommen. Nach Abstoppen der Reaktion durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden diese Proben auf 15%igen SDS-Gelen durch Silberfärbung analysiert. Es wurden jeweils 1,5 µg LPS pro Spur aufgetragen. Die Bande des TSP sowie einige Bestandteile des LPS sind entsprechend markiert.

Oligosaccharide wurden hergestellt, indem gereinigtes Polysaccharid mit TSP verdaut wurde und anschließend die Bestandteile des Verdaus mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt wurden. Abbildung 3-5 zeigt ein typisches Elutionsprofil. Als Hauptbestandteile des Verdaus konnten Oligosaccharide mit einer, zwei und drei repetitiven Einheiten erhalten werden. Nachdem die verschiedenen oligosaccharidhaltigen Fraktionen jeweils vereinigt wurden, wurden die Oligosaccharide rechromatographiert und es konnten so Hexasaccharid, Dodekasaccharid und Oktadekasaccharid im Milligramm-Maßstab gereinigt werden.



**Abb. 3-5: Größenausschluss-chromatographische Trennung der Hauptprodukte nach PS-Verdau durch HK620TSP.** Gezeigt ist das typische Elutionsprofil des Verdaus von 10 mg PS aus *E. coli* H TD2158 detektiert durch GlcNAc-Absorption bei 190 nm. Die Hauptprodukte entsprechen drei und zwei repetitiven Einheiten (RU, Elution nach etwa 170 bzw. 190 min) sowie einer RU (Elution nach etwa 220 min).

Das O-Antigen dieses Stammes wurde in vorangegangenen Arbeiten untersucht und als O18A1 identifiziert (Barbirz 2005; Utrecht 2006). Zur Charakterisierung der Oligosaccharide aus der Reinigung wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich für die Oligosaccharide, die aus dem Wirtstamm *E. coli* H TD2158 gereinigt wurden, eine Heterogenität in der Zusammensetzung des O-Antigens. Diese Heterogenität wurde bereits in der vorangegangenen Arbeit von C. Utrecht beschrieben und die auftretenden Modifikationen wurden folgendermaßen beschrieben: Das O18A1-Antigen kann zum Teil in der Seitenkette anstelle des N-Acetylglucosamins eine weitere Glucose tragen (O18A2) bzw. der Rest kann auch komplett fehlen (O18A3, vgl. Utrecht 2006, Abb. 3-6).



**Abb. 3-6: Mögliche Modifikationen des O18A1-Antigens nach C. Utrecht (2006).** Die Antigene O18A2 und O18A3 unterscheiden sich in der Seitenkette an dem N-Acetylglucosamin, welches durch Glucose ersetzt oder deletiert sein kann.

Das Maß dieser Heterogenität steigt dabei mit der Länge der Oligosaccharide (Tab. 3-1). In den Präparationen von Hexasaccharid entsprechen 75% der Gesamtpeakhöhe in der Massenspektrometrie O18A1, bei den Präparationen von zwei und drei repetitiven Einheiten ist die reine O18A1-Spezies lediglich mit 26% bzw. 27% der Gesamtpeakhöhe zu detektieren.

**Tabelle 3-1: Massenspektrometrische Daten zur Heterogenität des O-Antigens aus *E. coli* H TD2158 (Utrecht 2006).** Aufgeführt sind die experimentellen Daten aus MALDI-MS-Untersuchungen der verschiedenen Zucker, die nach Reinigung durch Gelfiltration erhalten werden konnten. Es zeigten sich verschiedene Spezies in den massenspektrometrischen Untersuchungen, die den in Abb. 3-6 gezeigten Modifikationen des O18A1-Antigens zugeordnet wurden.

Probe	[M+Na] <sup>+</sup> <sub>exp./Da</sub>	% Gesamtpeakhöhe	O-Antigen-Einheit
<b>1 repetitive Einheit</b>	1038,5	25	O18A2
	<b>1079,4</b>	<b>75</b>	<b>O18A1</b>
<b>2 repetitive Einheiten</b>	1914,9	7	O18A1 O18A3
	2035,9	15	[O18A] <sub>2</sub>
	2076,9	52	O18A1 O18A2
	<b>2117,9</b>	<b>26</b>	<b>[O18A1]<sub>2</sub></b>
	2912,8	4	O18A1 O18A2 O18A3
<b>3 repetitive Einheiten</b>	2953,8	4	[O18A1] <sub>2</sub> O18A3
	3034,8	4	[O18A2] <sub>3</sub>
	3074,8	23	O18A1 [O18A2] <sub>2</sub>
	3115,8	37	[O18A1] <sub>2</sub> O18A2
	<b>3156,8</b>	<b>27</b>	<b>[O18A1]<sub>3</sub></b>

Im Zuge der vorliegenden Dissertation waren diese Heterogenitäten bei der Präparation von Oligosacchariden aus *E. coli* H TD2158 im gleichen Umfang zu finden. Daher wurden Proben des PS und des Hexasaccharids für NMR-Untersuchungen präpariert. In diesen NMR-Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe von Göran Widmalm konnten die von C. Utrecht postulierten Strukturen der Modifikationen bestätigt werden. Zudem wurden in den Präparationen des Hexasaccharids nur 10% der Modifikation mit Glucose in der Seitenkette anstelle des N-Acetylglucosamins (O18A2) gefunden. Dahingegen war im PS mit 50% ein deutlich höherer Grad an Modifikationen zu finden (Zaccheus, Bröker *et al.* 2012).

Da das Ziel dieser Arbeit darin bestand, quantitative Daten zur Kohlenhydratbindung durch TSP des Phagen HK620 zu generieren, waren möglichst homogene Proben eine Grundvoraussetzung. Daher wurde mit Hilfe von Dr. habil. Fettke (Universität Potsdam) versucht, die verschiedenen Modifikationen durch starke Anionenaustauschchromatographie (HAEPC) und anschließende Entsalzung voneinander zu trennen. Trotz erfolgreicher Trennung wurde von

dieser Methode abgesehen, da es aufgrund von geringen Ausbeuten nicht möglich gewesen wäre, Oligosaccharide in einem ausreichend großen Maßstab zu reinigen.

Alternativ wurde ein anderer Lösungsansatz verfolgt: Es wurde ein anderer *E. coli*-Stamm gesucht, der das gleiche *O*-Antigen wie der Wirt trägt, um Oligosaccharide des Typs O18A1 mit verschiedenen Längen zu generieren. Grundlage für diesen Lösungsansatz war die Vermutung, dass die Heterogenität im *O*-Antigen eine spezifische Eigenschaft dieses Stammes ist und eventuell durch lysogene Konversion eingebracht wurde. Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der Arbeiten mit einem weiteren *E. coli*-Stamm dargestellt werden.

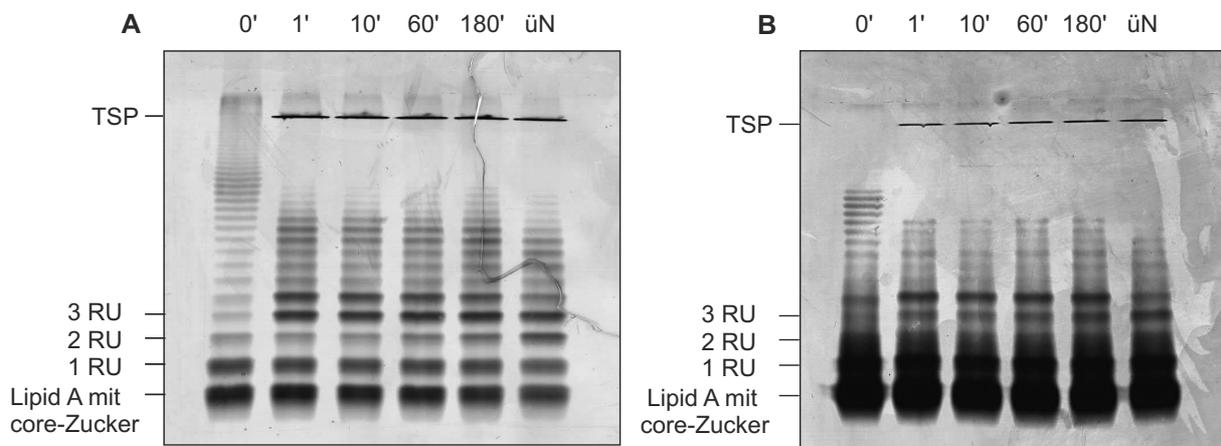
### 3.4.1. Arbeiten mit weiteren *E. coli*-Stämmen

Tatsächlich werden in der Literatur Bakterienstämme erwähnt, deren O18A1-Antigene keine der zuvor beschriebenen Modifikationen aufweisen. Pluschke und Mitarbeiter beschrieben 1986 die Unterteilung der O18-Antigene in O18A, O18A1, O18B und O18B1. Diese Unterscheidung beruhte auf Experimenten mit Antikörpern, die in Ratten nach Behandlung mit Bakterien der vier verschiedenen Antigene produziert wurden. 1992 wurde diese Unterteilung von Jann und Kollegen durch strukturelle Untersuchungen verfeinert. Dazu wurde der *E. coli*-Stamm IHE3042 aus Finnland verwendet, um das Antigen O18A1 zu beschreiben. Dieser Stamm ist somit gut charakterisiert, wurde in nachfolgenden Arbeiten verwendet und von Dr. Achtman zudem der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) zur Verfügung gestellt. In den erwähnten Arbeiten wurden keine Heterogenitäten im *O*-Antigen dieses Stammes beschrieben (Pluschke *et al.* 1986; Jann *et al.* 1992; Achtman *et al.* 1983).

Aus diesen Gründen wurde der Stamm IHE3042 verwendet, um Oligosaccharide des Typs O18A1 mit unterschiedlichen Längen zu präparieren. Dafür wurden die gleichen Methoden verwendet wie bereits beschrieben. Zunächst wurden LPS und PS aus den Bakterien gereinigt. Da dieser Stamm neben dem LPS auch ein Kapselpolysaccharid (K5) ab 20°C exprimiert (I. Orskov *et al.* 1977; Achtman *et al.* 1983; F. Orskov *et al.* 1984), wurden die Bakterien dieses Stammes bei 18°C angezogen. Kapselpolysaccharid stört einige Schritte der LPS- bzw. PS-Reinigung und kann durch die üblichen Reinigungsmethoden nicht komplett von LPS und PS getrennt werden.

Bei der Reinigung zeigte sich, dass sich die Kettenlängenverteilung des LPS aus *E. coli* IHE3042 stark von der des LPS aus *E. coli* H TD2158 unterscheidet (Abb. 3-7). Die Bakterien *E. coli* IHE3042 tragen kürzere LPS-Ketten als *E. coli* H TD2158. In der Analyse

mittels SDS-Gelelektrophorese ist dies deutlich zu erkennen und es war folglich kaum möglich, die *Core*-Zuckerstruktur sowie die langen LPS-Ketten gleichzeitig anzufärben, ohne die *Core*-Zucker zu überfärben (Abb. 3-7). LPS bildet in Anwesenheit von Magnesium in Lösung geordnete, komplexe Mizellen bzw. Aggregate, die Licht streuen können (Richter *et al.* 2011). Dynamische Lichtstreuungsmessungen ergaben für LPS aus *E. coli* IHE3042 (29 nm) einen leicht reduzierten Stokes Radius im Vergleich zu LPS aus *E. coli* H TD2158 (37 nm). Für die LPS aus beiden *E. coli*-Stämmen ergibt sich jedoch nach Inkubation mit TSP das gleiche Verdauemuster. Dabei erscheinen die Aktivitäten von HK620TSP gegenüber den Lipopolysacchariden aus den Stämmen IHE3042 und H TD2158 vergleichbar (Abb. 3-7).



**Abb. 3-7: Verdau von LPS aus dem Stamm *E. coli* H TD2158 (A) und IHE3042 (B).** Es wurden 0,5 mg/ml LPS in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA mit 50 µg/ml HK620TSPΔN bei 37°C verdaut. Vor Zugabe des TSP und nach 1, 10, 60 und 180 min Verdau sowie nach Inkubation mit dem TSP über Nacht wurden Proben genommen und auf 15%igen SDS-Gelen (Silberfärbung) analysiert. Es wurden jeweils 1,5 µg LPS pro Spur aufgetragen. Die Bande des TSP sowie einige Bestandteile des LPS sind entsprechend markiert.

Neben LPS wurde auch PS dieses Stammes gereinigt und wie zuvor für PS aus *E. coli* H TD2158 beschrieben mit TSP verdaut und der Verdau wurde anschließend chromatographisch mittels Größenausschluss aufgetrennt. Es konnten Oligosaccharide (Hexa-, Dodeka- und Oktadekasaccharid) im Milligramm-Maßstab gereinigt werden. In der massenspektrometrischen Analyse konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm für eine bis drei repetitive Einheiten keinerlei Modifikationen im *O*-Antigen aufwies (Daten nicht gezeigt).

Die gereinigten Oligosaccharide aus *E. coli* IHE3042 wurden nach Trocknung und Einwiegen gelöst und die Konzentrationen in diesen Stammlösungen wurden durch Messung der reduzierenden Enden in dieser Lösung und durch quantitative NMR mit einem internen Standard, DSS (4,4 Dimethyl-4 Silapentan-1-Sulfonsäure), quantifiziert (siehe Anhang 6-1). Dies wurde zur Standardisierung durchgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, da Konzentrations-Ungenauigkeiten aufgrund von hygroskopischen Eigenschaften des

Zuckers auftraten. Andere Verunreinigungen konnten aufgrund der Untersuchungen mittels NMR, Massenspektrometrie, Absorptions- sowie Fluoreszenzspektroskopie und geringer Verdünnungswärmen in der isothermalen Titrationskalorimetrie (vgl. Abschnitt 3.6.2., schließt Salze als Verunreinigung aus) ausgeschlossen werden.

### **3.5. Charakterisierung der Varianten des Tailspike Proteins**

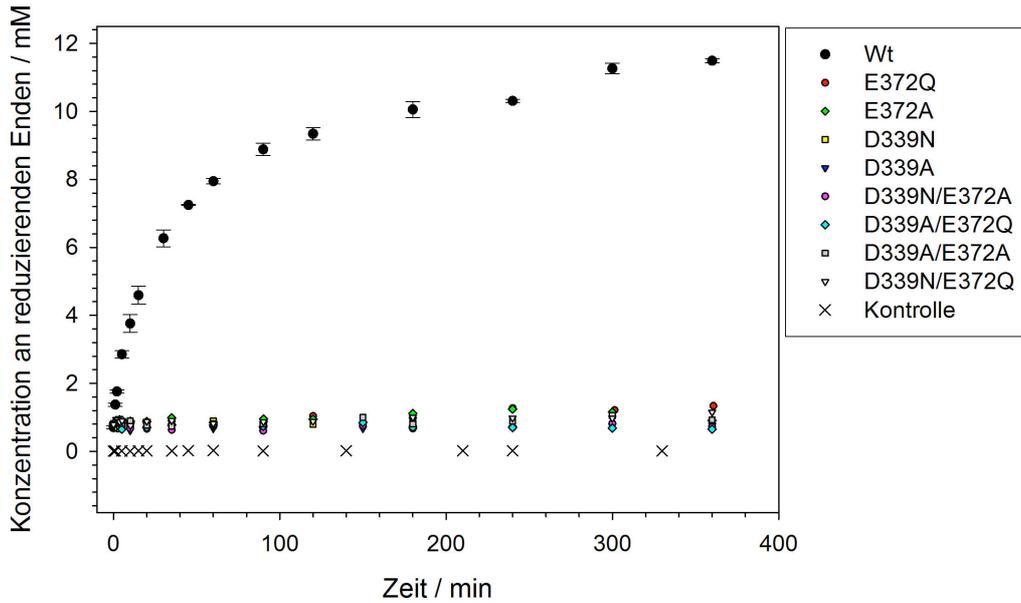
Die gereinigten Varianten von HK620TSP wurden hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht, um die Auswirkungen der Veränderungen am aktiven Zentrum zu überprüfen. Die Varianten wurden für Bindungsmessungen mit längeren Oligosaccharidfragmenten erstellt. Da das Wt-TSP diese längeren Fragmente verdaut, sollten diese Varianten möglichst komplett inaktiv sein und so Bindungsmessungen mit diesen längeren Oligosacchariden erlauben.

#### **3.5.1. Aktivität gegenüber Polysaccharid**

Die Aktivität des TSP gegenüber PS kann durch die zunehmende Konzentration an reduzierenden Enden im Verlauf der Reaktion bestimmt werden. Dabei wurde die Konzentration an reduzierenden Enden zu definierten Zeitpunkten des Verdaus mit Hilfe von Dinitrosalicylsäure (DNSA) detektiert (vgl. Methoden 2.2.4.1.).

In Abbildung 3-8 ist die Untersuchung der Aktivität der TSP-Varianten gegenüber dem PS aus *E. coli* H TD2158 dargestellt. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit dem zuvor beschriebenen PS aus *E. coli* IHE3042 durchgeführt. Diese Ergebnisse werden an anderer Stelle in dieser Arbeit erläutert (vgl. Abschnitt 3.8.2).

Bei den Aktivitätsmessungen mit PS aus *E. coli* H TD2158 ergibt sich innerhalb der ersten 20 Minuten Inkubation für den Wt ein starker Anstieg in der Konzentration an reduzierenden Enden (Abb. 3-8). Nach etwa 100 Minuten Inkubation mit TSP ändert sich die Konzentration an reduzierenden Enden nur noch wenig und erreicht mit der Zeit eine Sättigung. Für die TSP-Varianten, die im aktiven Zentrum verändert wurden, steigt die Konzentration an reduzierenden Enden kaum an. Zum Vergleich ist eine Kontrolle mit Puffer anstelle von PS mitgeführt worden.



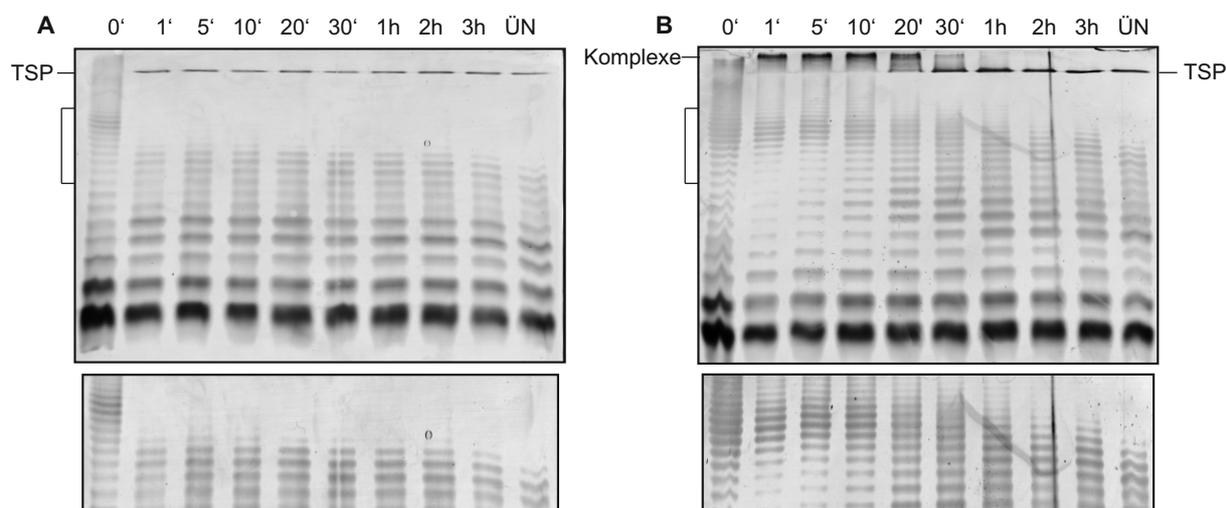
**Abb. 3-8: Untersuchungen der Aktivität von Wt-TSP und verschiedenen TSP-Varianten gegenüber PS.** Die Aktivität von HK620TSP-Varianten (siehe Legende) wurde anhand des Verdauens von PS aus *E. coli* H TD2158 untersucht, welcher mit Hilfe von DNSA anhand der Zunahme reduzierender Enden verfolgt werden kann. Es wurden 12 mg/ml PS aus *E. coli* H TD2158 in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA bei 37°C mit 50 µg/ml TSP verdaut und nach den im Diagramm gezeigten Zeiten wurden Proben entnommen und die Konzentration an reduzierenden Enden wurde mit Hilfe von DNSA nachgewiesen. Die Aktivität aller TSP wurde dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden die Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerbalken, welche bei den TSP-Varianten aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt wurden, sich aber in einem ähnlichen Bereich bewegen wie für den Wildtyp dargestellt.

Aus den Anfangssteigungen dieses Experiments wurden Umsatzraten für HK620TSP und die Varianten bestimmt. Für den Wt wurde ein Umsatz von  $21,1 \pm 3,6 \mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{s}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{TSP}}^{-1}$  gemessen, während für die Varianten lediglich Umsatzraten zwischen 0,04 und  $0,71 \mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{s}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{TSP}}^{-1}$  gemessen wurden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Varianten konnte auch durch längere Messungen nicht erhalten werden.

### 3.5.2. Aktivität gegenüber Lipopolysaccharid

Die zuvor beschriebene Untersuchung der Aktivität gegenüber PS durch DNSA-Nachweis weist eine geringe Sensitivität auf. Daher wurde neben diesem Experiment auch die Aktivität gegenüber LPS untersucht. Dazu wurde auf die bereits erwähnte Analyse der LPS-Fragmente mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung der Gele zurückgegriffen. Für diese Untersuchungen wurde LPS aus *E. coli* H TD2158 aufgrund der besseren Auflösung niedermolekularer Banden (vgl. Abb. 3-7) verwendet. Analoge Experimente mit LPS aus *E. coli* IHE3042 ergaben ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die Hydrolyse durch HK620TSP ist daran zu beobachten, dass längere LPS-Ketten nach kurzer Inkubation mit TSP verschwinden, während kürzere Ketten akkumuliert werden.

In Abbildung 3-9 sind die Zeitverläufe der LPS-Verdaue durch den Wt sowie durch die TSP-Variante D339N vergleichend gegenübergestellt. Es ist festzustellen, dass sich die Kettenlängenverteilung bereits nach wenigen Minuten des Verdaus durch den Wt nur noch marginal ändert. Lediglich im direkten Vergleich zwischen der Probe nach drei Stunden Verdaue und der nach Inkubation mit TSP über Nacht ist zu erkennen, dass noch wenige längere LPS-Ketten verdaut und kürzere Ketten weiter angereichert wurden (Abb. 3-9 A Vergrößerung).

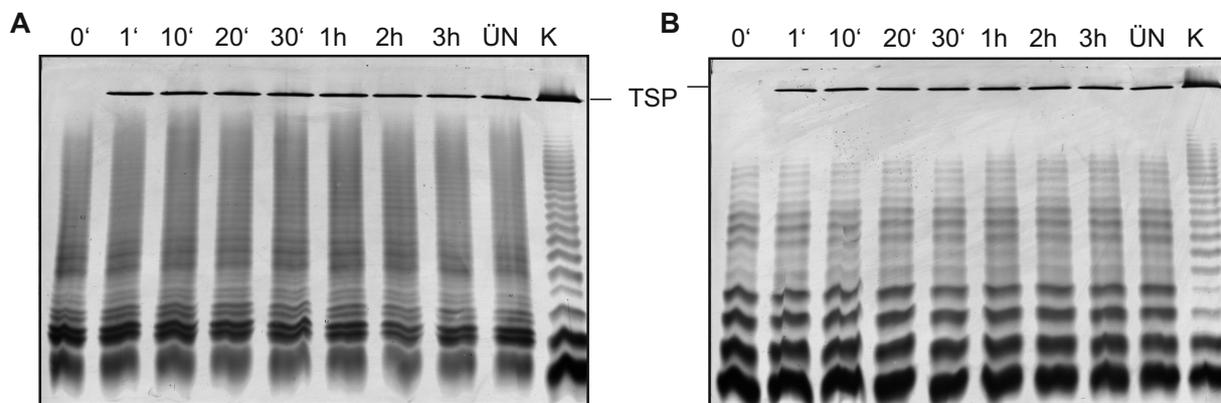


**Abb. 3-9: Aktivität von Wt-TSP (A) und Variante D339N (B) gegenüber LPS.** Die Aktivität gegenüber LPS wurde durch zeitaufgelöste Analyse des Verdaus mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung der Gele untersucht. Dazu wurden 0,5 mg/ml LPS aus *E. coli* H TD2158 in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA bei 37°C mit 50 µg/ml TSP verdaut. Nach den der Darstellung zu entnehmenden Zeitpunkten wurden Proben genommen und der Verdaue nach Zugabe von Ladepuffer durch Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff gestoppt. Je Spur wurden 0,5 µg LPS auf 15%ige SDS-Gele aufgetragen. Die durch eckige Klammern gekennzeichneten Bereiche wurden vergrößert und gespreizt unter den ganzen Gelen dargestellt.

Durch Inkubation von LPS mit der Variante D339N (Abb. 3-9 B) werden ebenfalls längere LPS-Ketten verdaut, allerdings deutlich langsamer als bei dem Wt. Die Akkumulation kürzerer LPS-Fragmente konnte dabei in guter zeitlicher Auflösung erfasst werden, für eine quantitative Auswertung zur Bestimmung einer Umsatzrate waren diese Untersuchungen allerdings zu fehlerbehaftet. Auffällig sind die Banden am oberen Rand des SDS-Gels in der Aktivitätsuntersuchung der Variante D339N. Diese Banden verschwinden nach einiger Zeit der Inkubation. Da in den Spuren, wo diese Banden auftauchen, keine TSP-Bande auf gewohnter Höhe zu detektieren ist, wurde darauf geschlossen, dass es sich dabei um hochmolekulare Komplexe zwischen LPS und TSP handelt. Diese Komplexe verschwinden im Laufe des Verdaus durch die restliche Endo-N-Acetylglucosaminidase-Aktivität der Variante D339N: Nach etwa zwei Stunden ist nur noch die TSP-Bande zu erkennen (Abb. 3-9 B). Ähnliche Komplexbildungen zu Beginn des Aktivitätstests konnten für alle bisher erwähnten TSP-Varianten festgestellt werden. Die Komplexbildung war tendenziell bei Varianten mit

zwei Aminosäureaustauschen ausgeprägter als bei denen mit nur einer variierten Aminosäure. Dort lagen die TSP in großen Komplexen vor, die zum Teil kaum ins Gel einwanderten und somit im Sammelgel als hochmolekulare, diffuse Bande zu erkennen waren (siehe Abb. 6-2 Anhang).

Durch Vergleichsexperimente mit LPS aus *Salmonella* Typhimurium (Abb. 3-10 A) konnte gezeigt werden, dass diese Komplexbildung spezifisch nur mit dem entsprechenden LPS aus *E. coli* stattfindet. Des Weiteren wurde LPS aufgereinigt, das zuvor mit TSP verdaut wurde, und damit wurde das gleiche Experiment erneut durchgeführt. Mit dem vorverdauten LPS bildeten sich diese Komplexe nicht, eine gewisse Kettenlänge ist demzufolge notwendig für die Ausbildung dieser Komplexe (Abb. 3-10 B). Diese Kontrollen ergaben für alle bisher erwähnten Varianten analoge Ergebnisse.



**Abb. 3-10:** Analyse der TSP-Variante D339N nach Inkubation mit LPS aus *Salmonella* Typhimurium (A) bzw. mit vorverdaulichem Wirts-LPS (B). Die Spezifität der Bildung hochmolekularer Komplexe der Variante D339N mit LPS wurde untersucht. Dazu wurden 0,5 mg/ml LPS aus *Salmonella* Typhimurium (A) bzw. durch TSP vorverdautes und anschließend gereinigtes LPS aus *E. coli* H TD2158 (B) in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA bei 37°C mit 50 µg/ml TSP verdaut. Nach den der Darstellung zu entnehmenden Zeitpunkten wurden Proben genommen und der Verdau wurde nach Zugabe von Ladepuffer durch Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff gestoppt. Je Spur wurden 0,5 µg LPS aufgetragen und die Proben auf 15%igen SDS-Gelen (Silberfärbung) analysiert. Zum Vergleich wurden Proben des Verdau von LPS aus *E. coli* H TD2158 nach 30 min mit aufgetragen (K, vgl. Abb. 3-9). In diesen Kontrollen wurde die Komplexbildung beobachtet.

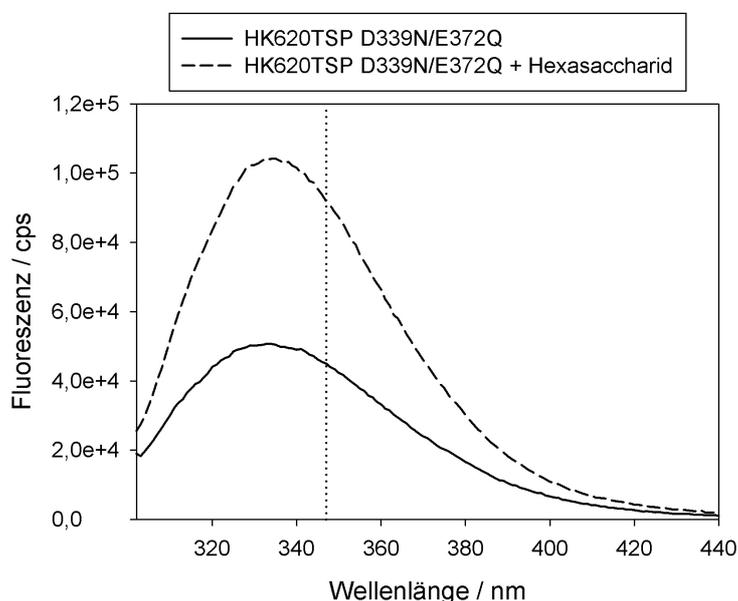
### 3.6. Kohlenhydratbindung durch verschiedene TSP-Varianten

Die Kohlenhydratbindung durch den Wt sowie die Varianten D339N und E372Q wurde in der Arbeit von C. Utrecht teilweise bereits untersucht. Frau Utrecht konnte durch Fluoreszenztitrations von Wt-TSP und der beiden Varianten mit Hexasaccharid (eine repetitive Einheit) zeigen, dass der Wt sowie die Variante D339N schwache Affinitäten zum Kohlenhydrat aufweisen ( $K_D \sim 200 \mu\text{M}$ ). Dahingegen zeigte die Variante E372Q eine stark erhöhte Affinität ( $K_D \sim 40 \text{ nM}$ ). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für die Komplexbildung von HK620TSP mit Oligosacchariden thermodynamische Parameter zu bestimmen. Mit Hilfe neu generierter TSP-Varianten sollte der Datensatz ausgeweitet werden, um ein verbessertes Verständnis für

die Kohlenhydratbindung in diesem System zu generieren. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Varianten erzeugt, in denen die sauren Reste des aktiven Zentrums durch Alanine anstelle der ungeladenen Säureamidanaloga (Asparagin und Glutamin) in den bereits untersuchten TSP-Varianten ersetzt wurden. Zudem wurden beide katalytisch aktiven Reste zugleich durch alle möglichen Kombinationen der erwähnten Varianten modifiziert. Diese Varianten wurden mittels Fluoreszenztitration und isothermaler Titrationskalorimetrie hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht.

### 3.6.1. Bindungsstudien mittels Fluoreszenztitration

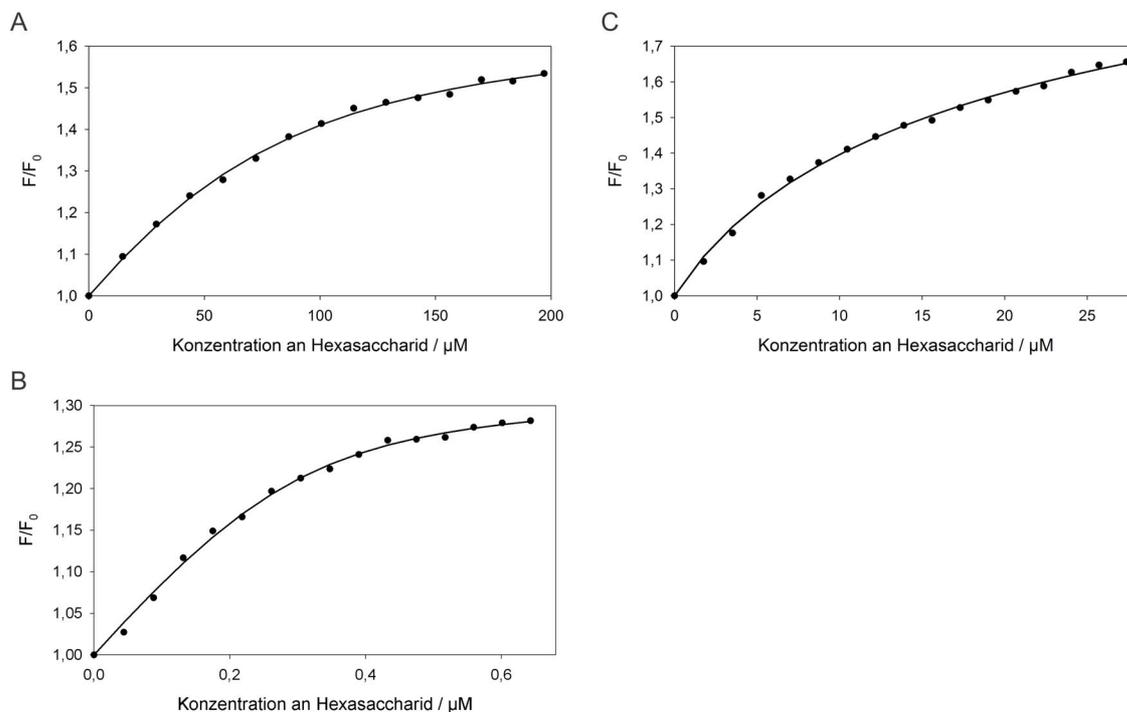
In Bindungsstudien mittels Fluoreszenz wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich bei der Zuckerbindung das Milieu bzw. die Lösungsumgebung der exponierten Tryptophane am TSP ändern und dadurch ein Anstieg der Fluoreszenz hervorgerufen wird (Abb. 3-11, vgl. auch Diskussion Abschnitt 4.4.1.). Wird die Fluoreszenz der Tryptophane bei einer Wellenlänge von 295 nm angeregt, weist das Fluoreszenzspektrum von HK620TSP bzw. der Varianten ein Emissionsmaximum bei etwa 330 nm auf. Im Zuge der Kohlenhydratbindung erhöht sich die Fluoreszenzintensität dieses Maximums.



**Abb. 3-11: Änderung der Fluoreszenz nach Bindung von Kohlenhydraten an TSP.** Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren der TSP-Variante D339N/E372Q vor (durchgezogene Linie) und nach Zugabe von Hexasaccharid des Typs O18A1 (gestrichelte Linie). Für die Spektren wurde die Fluoreszenz von 10 µg/ml Protein vor und nach Zugabe von 0,6 µM Kohlenhydrat in einer Quartz-Halbmikroküvette (Anregung: 4 mm, Emission: 10 mm) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und variierender Emissionswellenlänge gemessen. Bei reiner Kohlenhydrat-Lösung konnte keine nennenswerte Fluoreszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die gepunktete Linie markiert die Emissionswellenlänge von 347 nm, die während der Fluoreszenztitrationen zur Beobachtung der Kohlenhydratbindung genutzt wurde.

Aufgrund der Änderung der Fluoreszenzintensität von HK620TSP durch Bindung der Kohlenhydrate konnten die TSP-Varianten mit Oligosacchariden titriert und die Bindung mittels Fluoreszenz beobachtet werden.

Die Bindungseigenschaften der untersuchten Proteinvarianten lassen sich grob in drei Gruppen unterteilen. Für den Wt und die Variante D339N ergaben sich in der Fluoreszenztitration schwache Bindungsaffinitäten mit Dissoziationskonstanten über 100  $\mu\text{M}$  (Abb. 3-12 und Tab. 3-2). Für die Variante D339A wurde in diesem Experiment mit einer Dissoziationskonstante von etwa 15  $\mu\text{M}$  eine moderate Affinität bestimmt. Die restlichen TSP-Varianten mit Veränderungen an der Aminosäure E372 erwiesen sich als hochaffin gegenüber dem Hexasaccharid mit Dissoziationskonstanten zwischen 0,01 und 0,35  $\mu\text{M}$  (Abb. 3-12 und Tab. 3-2).



**Abb. 3-12: Fluoreszenztitrations von Wt-TSP (A) sowie der Varianten E372A (B) und D339A (C) mit Hexasaccharid.** Für diese Titrations wurden jeweils etwa 150 nM Proteinlösungen in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 mit 1 mM EDTA verwendet und mit unterschiedlich konzentrierten Hexasaccharid-Lösungen in dem gleichen Puffer bei 20°C titriert. Die Titrations wurden in Quartz-Halbmikroküvetten bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 347 nm durchgeführt. Die aufgetragenen Datenpunkte (ausgefüllte Kreise) wurden um die Volumenzunahme korrigiert und auf die Fluoreszenz des Proteins vor Zugabe des Kohlenhydrats bezogen ( $F_0$ ). Die Datenpunkte der Bindungskurve wurden durch nicht-lineare Anpassung (Modell vgl. Methoden 2.2.5.2.) angenähert. Die Ergebnisse dieser Anpassung sind der Tabelle 3-2 zu entnehmen.

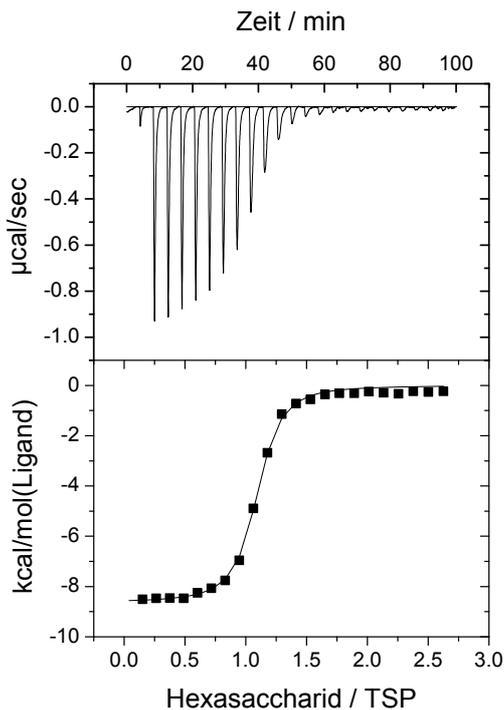
**Tabelle 3-2: Ergebnisse der Fluoreszenztitrations nach nicht-linearer Anpassung (vgl. Abb. 3-12).** Die gezeigten Werte entsprechen Mittelwerten aus Dreifachbestimmungen und der Fehler zeigt jeweils die Standardabweichung.

TSP-Variante	Dissoziationskonstante $K_D$ / $\mu\text{M}$
Wt	$129 \pm 11$
E372Q	$0,015 \pm 0,002$
E372A	$0,193 \pm 0,013$
D339N	$210 \pm 7$
D339A	$15,5 \pm 0,3$
D339N/E372Q	$0,030 \pm 0,002$
D339A/E372Q	$0,007 \pm 0,002$
D339N/E372A	$0,203 \pm 0,002$
D339A/E372A	$0,351 \pm 0,066$

### 3.6.2. Bindungsstudien mittels isothermaler Titrationskalorimetrie

Als zweite Methode zur Charakterisierung der Bindung wurde isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) genutzt. Diese Methode hat den Vorteil, dass thermodynamische Parameter wie die Bindungsenthalpie, die -entropie und die Gibbs-Energie ermittelt werden können. Die zuvor mittels Fluoreszenztitration untersuchten Varianten wurden mit Hilfe von ITC weitergehend charakterisiert. Dabei ist anzumerken, dass aufgrund der geringen Affinität und aufgrund zu geringer Bindungsenthalpien keine ITC-Messungen für den Wt und seine Variante D339N durchgeführt werden konnten.

Abbildung 3-13 zeigt beispielhaft die Titration der Variante E372A mit Hexasaccharid. Bei Zugabe von Hexasaccharid wird Wärme frei, die hier in einer Abnahme der Heizrate zur Einstellung der gleichen Temperatur in der Messzelle im Vergleich zur Referenzzelle zu erkennen ist. Mit steigender Sättigung der Bindestellen sinkt das gemessene Signal, bis schließlich eine Sättigung erreicht wird, in der nur noch Verdünnungswärmen zu sehen sind. Für die Variante E372A ergab sich aus dieser Messung eine Dissoziationskonstante von 232 nM. Zudem kann mittels ITC die Bindungsenthalpie direkt aus der gemessenen Wärme bestimmt werden und die Bindungsentropie kann aus diesem Wert und der Gibbs-Energie, die aus der Bindungskonstanten erhalten wird, berechnet werden (vgl. Methoden 2.2.5.2). Für die Variante E372A ergab sich eine Bindungsenthalpie von  $-36,1 \text{ kJ mol}^{-1}$  und ein Entropieterm ( $-T\Delta S$ ) von  $-1,7 \text{ kJ mol}^{-1}$  für die Bindung.



**Abb. 3-13: Isothermale Titrationskalorimetrie von der Variante E372A mit Hexasaccharid aus dem Stamm *E. coli* IHE3042.** Mittels ITC wurde eine 25  $\mu$ M Proteinlösung mit je 8  $\mu$ l 0,5 mM Hexasaccharid in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA bei 25°C titriert. Gezeigt ist die Heizrate nach Injektion von Hexasaccharid (oben) und die integrierte Wärmemenge bezogen auf die Menge an injiziertem Liganden. Mit Hilfe einer nicht-linearen Anpassung der integrierten Werte an das „OneSite“-Modell des MicroCal-Regressionspaketes ergab sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D=232$  nM. Für die Auswertung wurde die erste Injektion, bei der nur 3  $\mu$ l Ligand injiziert wurden, vernachlässigt.

Bezüglich der Affinität erwiesen sich alle weiteren Varianten außer D339A in den Untersuchungen mittels ITC als hochaffin im Vergleich zum Wt (Tab. 3-3). Zwischen einigen Ergebnissen aus ITC und Fluoreszenztitration wurden Diskrepanzen festgestellt: Die Varianten E372Q, D339N/E372Q und D339A/E372Q zeigten in der Fluoreszenz eine bis zu zehnfach erhöhte Affinität. Diese Diskrepanzen sollen im Verlauf dieser Arbeit diskutiert werden (vgl. Abschnitt 4.4.1.).

Hinsichtlich der Enthalpie- und Entropiebeiträge zur Bindung unterscheiden sich die TSP-Varianten E372Q und D339N/E372Q am stärksten (Tab. 3-3). Die Variante E372Q bindet das Hexasaccharid stark entropisch begünstigt, während der Enthalpieterm im Vergleich zu allen anderen Varianten am geringsten zur Bindung beiträgt. Bei der Variante D339N/E372Q stellt sich die Situation entgegengesetzt dar: Diese Variante weist verglichen mit den anderen Varianten von HK620TSP den größten enthalpischen Beitrag zur Bindung auf. Entsprechend ist bei dieser Variante schon ab 25°C ein ungünstiger Entropieterm zu verzeichnen. D339N/E372Q verursachte unter den HK620TSP-Varianten aufgrund des großen enthalpischen Beitrags zur Bindung das größte Messsignal in der ITC, was einen geringen Messfehler bedeutet. Daher wurde diese Variante für exemplarische Messungen mittels ITC verwendet, die aufgrund des hohen Materialaufwands nicht mit allen Varianten durchgeführt werden konnten.

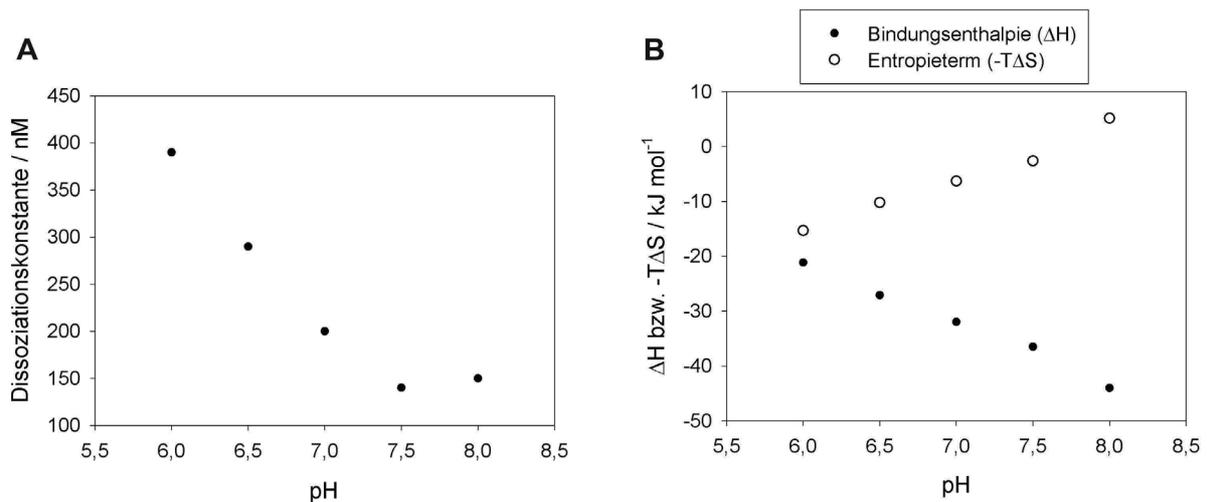
**Tabelle 3-3: Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen der Bindung von Hexasaccharid des O-Antigentyps O18A1 durch HK620TSP-Varianten mittels ITC.** Aufgelistet wurden die Ergebnisse der Anpassungen der Messdaten (vgl. Abb. 3-13). Die aus der Anpassungsroutine erhaltenen Standardabweichungen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht überall aufgeführt, betragen bei  $n$  und  $\Delta H$  jedoch unter 3%. Dabei bezeichnet  $n$  die Anzahl an Bindestellen,  $K_D$  die Dissoziationskonstante,  $\Delta G$  die Gibbs Energie, die aus  $K_D$  berechnet wurde,  $\Delta H$  die Bindungsenthalpie,  $-T\Delta S$  den Entropieterm der Bindung (Berechnung aus  $\Delta G$  und  $\Delta H$ ) und  $\Delta C_p$  die Wärmekapazitätsänderung durch Bindung. Für  $\Delta C_p$  ist der Fehler aus der linearen Regression zur Ermittlung dieses Parameters gezeigt (vgl. Abschnitt 2.2.5.2.). Eingeklammerte Werte wurden nicht in die Berechnung von  $\Delta C_p$  mit einbezogen.

Variante	$T$ / °C	$n$	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
<b>E372Q</b>	17,5	1,02	270 ± 60	-36,6	-13,6	-23,0	
	20,0	1,05	150 ± 14	-38,4	-17,9	-20,5	
	25,0	1,03	79 ± 16	-40,4	<b>-23,6</b>	<b>-16,8</b>	-1,60 ±
	30,0	1,02	96 ± 17	-40,7	-32,0	-8,7	0,05
	35,0	1,01	72 ± 13	-42,1	-40,6	-1,5	
	45,0	1,00	81 ± 9	-43,2	-57,7	14,5	
	(55,0	1,00	136 ± 13	-43,1	-81,5	38,4)	
<b>E372A</b>	15,0	0,95	189 ± 32	-37,1	-20,7	-16,4	
	20,2	0,93	192 ± 29	-37,9	-27,1	-10,8	
	25,0	1,05	232 ± 28	-37,8	-36,1	-1,7	-1,60 ±
	30,0	1,07	235 ± 33	-38,4	-44,6	6,2	0,05
	35,0	1,03	299 ± 25	-38,5	-51,9	13,4	
<b>D339N/E372Q</b>	15,0	1,09	247 ± 44	-36,4	-24,4	-12,0	
	20,2	1,06	183 ± 21	-37,8	-31,2	-6,6	
	25,0	1,07	174 ± 20	-39,0	<b>-38,8</b>	<b>0,2</b>	-1,67 ±
	30,0	1,07	137 ± 8	-39,8	-45,9	6,1	0,06
	35,0	0,98	125 ± 11	-40,7	-57,4	16,7	
	45,0	0,97	133 ± 8	-41,9	-73,5	31,7	
	(55,0	1,07	314 ± 10	-40,8	-100,1	59,3)	
<b>D339N/E372A</b>	15,0	1,09	893 ± 91	-33,0	-22,9	-10,1	
	20,2	1,06	962 ± 333	-33,8	-27,0	-6,8	
	25,0	0,97	971 ± 54	-33,9	-39,6	5,7	-1,61 ±
	30,0	1,03	901 ± 76	-35,1	-45,4	10,3	0,13
	35,0	1,04	952 ± 59	-35,4	-53,8	18,4	
<b>D339A/E372Q</b>	15,0	0,95	194 ± 51	-37,0	-17,2	-19,8	
	20,2	0,97	187 ± 25	-38,1	-24,7	-13,4	
	25,0	1,03	178 ± 22	-38,5	-32,2	-6,3	-1,69 ±
	30,0	1,03	167 ± 15	-39,3	-41,8	2,5	0,06
	35,0	1,02	164 ± 18	-40,1	-51,0	10,9	
<b>D339A/E372A</b>	15,0	0,96	228 ± 24	-36,6	-17,8	-18,8	
	20,2	0,97	262 ± 27	-36,9	-25,0	-11,9	
	25,0	1,03	394 ± 32	-36,5	-32,8	-3,7	-1,57 ±
	30,0	1,01	469 ± 29	-36,1	-41,1	5,0	0,03
	35,0	1,00	602 ± 35	-36,7	-48,9	12,2	
<b>D339A</b>	25,0	0,96	26 ± 3 μM	-26,2	-14,8	-11,4	n.d.

Neben den genannten biophysikalischen Größen kann mittels ITC auch die Wärmekapazitätsänderung der Bindung ( $\Delta C_p$ ) bestimmt werden, indem die Bindungsexperimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt werden. Für die Bindung von Hexasaccharid wurden Wärmekapazitätsänderungen für alle messbaren Varianten außer der Variante D339A bestimmt. Für die Untersuchung der Bindung dieser Variante mittels ITC wären aufgrund der geringen Affinität und der geringen Bindungsenthalpie zu große Mengen an Oligosaccharid nötig gewesen. Für die gemessenen Varianten ergaben sich Wärmekapazitätsänderungen bei Kohlenhydratbindung zwischen  $-1,57$  und  $-1,69 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  (Tab. 3-3).

### 3.6.3. Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Kohlenhydratbindung

Sowohl mittels Fluoreszenztitration als auch mit Hilfe von ITC wurde die pH-Abhängigkeit für die Bindung von Hexasaccharid am TSP bestimmt. Diese Untersuchungen ergaben, dass pH 7,5 die optimale Bedingung für Experimente zur Kohlenhydratbindung darstellt. In Abbildung 3-14 ist dies anhand des Beispiels der Hexasaccharid-Bindung durch die TSP-Variante D339N/E372Q, die mittels ITC detektiert wurde, gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Dissoziationskonstante im Bereich um einen pH-Wert von 7,5 am geringsten und somit die Affinität zum Kohlenhydrat bei diesem pH am größten ist. Aus diesem Grund wurde diese Bedingung für alle Bindungsstudien in dieser Arbeit benutzt. Mit steigenden pH-Werten ist die Bindung zunehmend enthalpisch begünstigt, während sich der Entropieterm entgegengesetzt entwickelt und der Bindungsenthalpie zunehmend entgegensteht (Abb. 3-14 B).



**Abb. 3-14: Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Kohlenhydratbindung durch TSP mittels ITC.** Gemessen wurde die Bindung von Hexasaccharid durch die TSP-Variante D339N/E372Q in Puffern mit unterschiedlichem pH-Wert. Dargestellt sind die Dissoziationskonstanten (A) sowie die Bindungsenthalpien und der Entropieterm (B) in Abhängigkeit des pH-Werts.

### 3.6.4. Affinität zu O18A1-Antigenen aus verschiedenen Stämmen

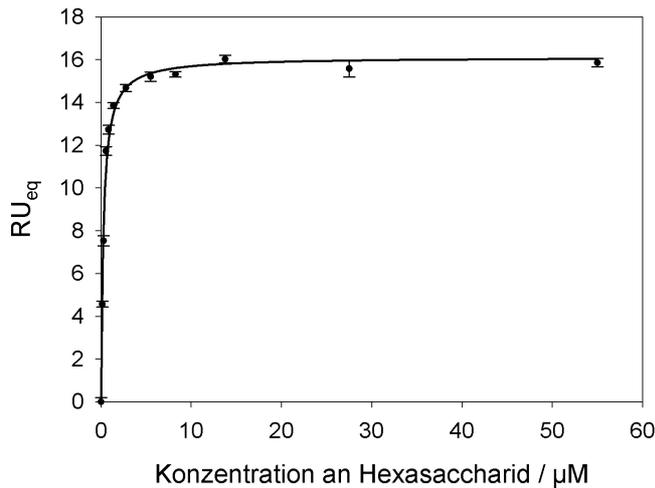
Zu den Bindungsstudien bleibt anzumerken, dass sowohl Fluoreszenztitrationen als auch Messungen mit ITC zusätzlich mit den bereits erwähnten heterogeneren Oligosacchariden aus *E. coli* H TD2158 durchgeführt wurden, um den Einfluss der Modifikationen zu beurteilen. In der Hexasaccharid-Präparation aus diesem Stamm wurden zu 10% Glucose in der Seitenkette anstelle von N-Acetylglucosamin mittels NMR gefunden (vgl. Abschnitt 3.4.). Bei Bindungsstudien mit Hexasacchariden aus *E. coli* H TD2158 und IHE3042 zeigte sich, dass ähnliche Ergebnisse für beide Oligosaccharid-Präparationen erhalten werden konnten. Dies ist in Tabelle 3-4 anhand der Bindung der jeweiligen Hexasaccharid-Präparationen durch die TSP-Variante D339N/E372Q exemplarisch gezeigt. Bei Bindung der heterogenen Hexasaccharid-Präparation aus *E. coli* H TD2158 ist eine apparent etwas geringere Affinität zu verzeichnen, die hauptsächlich durch eine leicht ungünstigere Bindungsenthalpie bedingt ist.

**Tabelle 3-4: Vergleich der Bindung von Hexasacchariden aus *E. coli* H TD2158 bzw. *E. coli* IHE3042 durch die TSP-Variante D339N/E372Q.** Die Werte wurden mittels Messung der Bindung durch ITC wie zuvor beschrieben generiert (vgl. Tab. 3-3).

Kohlenhydrat	$T$ / °C	$n$	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
<i>E. coli</i> IHE 3042	25,0	1,07	174 ± 20	-38,6	-38,8	0,20	-1,67 ± 0,06
<i>E. coli</i> H TD2158	25,0	1,02	277 ± 35	-37,4	-37,7	0,33	n.d.

### 3.6.5. Bindungsstudien mittels Oberflächenplasmonresonanz

Aufgrund der teilweise recht hohen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen aus Fluoreszenztitrationen und ITC (Tab. 3-5) wurden zur Validierung der Bindungsparameter exemplarisch Messungen zur Bindung mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) durchgeführt. Dazu wurden einige Proteinvarianten auf den entsprechenden Chips immobilisiert. Anschließend wurde nach Zugabe von Kohlenhydraten die Änderung im Brechungsindex bei Bindung des Zuckers verfolgt. In Abbildung 3-15 ist beispielhaft das Ergebnis aus solchen Messungen bei unterschiedlichen Hexasaccharid-Konzentrationen für die Variante E372Q gezeigt. In dieser Messung ergab sich für die Variante E372Q bei 20°C eine Dissoziationskonstante von 240 nM.



**Abb. 3-15: Untersuchung der Kohlenhydratbindung durch die TSP-Variante E372Q mittels Oberflächenplasmonen-resonanz (SPR).** Die TSP-Variante E372Q wurde auf einem CM5-Chip durch Aminkopplung immobilisiert und anschließend wurde die Änderung des Brechungsindex nach Zugabe verschiedener Kohlenhydrat-Konzentrationen mittels SPR verfolgt. Gezeigt ist das Signal ( $\text{RU} = \text{response units}$ ) im Gleichgewicht (eq) in Abhängigkeit von der Konzentration an Hexosaccharid. Durch nicht-lineare Anpassung (vgl. Methoden Abschnitt 2.2.5.2.) wurden die in Tabelle 3-5 gezeigte Ergebnisse ermittelt.

Dieses Ergebnis stützt das Resultat der ITC-Messung und weist eine ähnliche Diskrepanz zu der Fluoreszenzmessung auf (Tab. 3-5). Ähnliches gilt für die Variante D339N/E372A. Für Variante D339A ergab sich mittels SPR eine Dissoziationskonstante von  $33,5 \mu\text{M}$  bei  $20^\circ\text{C}$ . Dieses Ergebnis findet Übereinstimmung mit den Werten aus ITC ( $26 \mu\text{M}$ ) und Fluoreszenz ( $16 \mu\text{M}$ ). Die Ergebnisse aus Fluoreszenz und SPR stimmen für den Wt überein (jeweils etwa  $125 \mu\text{M}$ ).

**Tabelle 3-5: Gegenüberstellung der Ergebnisse aus Studien der Bindung von O18A1-Hexasaccharid durch HK620TSP bei  $20^\circ\text{C}$  mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR), isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) und Fluoreszenztitration.** Diskrepanzen zwischen Ergebnissen der Fluoreszenztitrationsen und den anderen Methoden sind kursiv und fett markiert. Die angegebenen Fehler für die Werte aus ITC und SPR entsprechen den Standardabweichungen aus der Anpassung der experimentellen Daten (vgl. Abb. 3-15). Bei den Fluoreszenz-Daten handelt es sich um Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, deren Standardabweichung als Fehler angegeben ist.

TSP-Variante	SPR $K_D / \mu\text{M}$	ITC $K_D / \mu\text{M}$	Fluoreszenz $K_D / \mu\text{M}$
Wt	$125 \pm 25$	n.d.	$129 \pm 11$
D339A	$33,5 \pm 1,5$	$26,0 \pm 3,0$ ( $25^\circ\text{C}$ )	$15,5 \pm 0,3$
D339N/E372A	$1,1 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,3$	<b><i><math>0,2 \pm 0,0</math></i></b>
E372Q	$0,24 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,01$	<b><i><math>0,02 \pm 0,00</math></i></b>

### 3.6.6. Bindungsstudien mit längeren Oligosacchariden

Die bisher behandelten Varianten des HK620TSP haben sich gegenüber längeren Oligosacchariden als nahezu inaktiv gezeigt (vgl. Ergebnisse 3.5.). Dies ermöglichte Bindungsmessungen mit zwei und drei repetitiven Einheiten. Hier sollen die Messungen mittels ITC zur Ermittlung thermodynamischer Parameter dargestellt werden. Die Werte für die Bindung

längerer Oligosaccharide entsprechen annähernd denen für die Bindung des Hexasaccharids. Es ist eine leichte Erhöhung der Affinitäten gegenüber dem Dodekasaccharid und Oktadecasaccharid im Vergleich zum Hexasaccharid bei allen Varianten zu verzeichnen (vgl. Tab. 3-6 mit 3-3 und 6-1). Der größte Unterschied in der Affinität zu Hexasaccharid bzw. Dodekasaccharid ist dabei bei der Variante D339N/E372A zu finden, bei der die Dissoziationskonstante etwa 2,5mal kleiner ist im Vergleich zu der Bindung des Hexasaccharids (vgl. Tab. 3-3 und 3-6). Die Triebkräfte für die Bindung verschieben sich dabei tendenziell dahingehend, dass die Bindung des Dodekasaccharids im Vergleich zu der des Hexasaccharids stärker entropisch begünstigt ist und weniger enthalpisch.

**Tabelle 3-6: Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen der Bindung von Dodekasaccharid des O-Antigentyps O18A1 durch HK620TSP-Varianten mittels ITC.** Die Werte wurden wie zuvor beschrieben generiert, es gelten die gleichen Abkürzungen und Anmerkungen bezüglich der Fehlerangaben (vgl. Tab. 3-3).

Variante	$T$ / °C	$n$	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
<b>E372Q</b>	25,0	1,07	67 ± 16	-40,9	-21,7	-19,2	n.d.
<b>E372A</b>	25,0	1,05	106 ± 15	-39,8	-31,7	-8,1	n.d.
<b>D339N/E372Q</b>	15,0	1,01	29 ± 12	-41,6	-19,3	-22,3	-1,62 ± 0,06
	20,2	1,02	95 ± 3	-39,3	-26,5	-12,9	
	25,0	1,01	103 ± 14	-39,8	-34,0	-5,8	
	30,0	1,05	143 ± 16	-39,8	-42,1	2,3	
	35,0	1,01	120 ± 11	-40,8	-51,9	11,1	
<b>D339N/E372A</b>	25,0	1,04	398 ± 35	-36,5	-33,3	-3,2	n.d.
<b>D339A/E372Q</b>	25,0	0,95	133 ± 20	-39,2	-28,1	-11,1	n.d.
<b>D339A/E372A</b>	25,0	0,97	249 ± 27	-37,6	-31,1	-6,5	n.d.

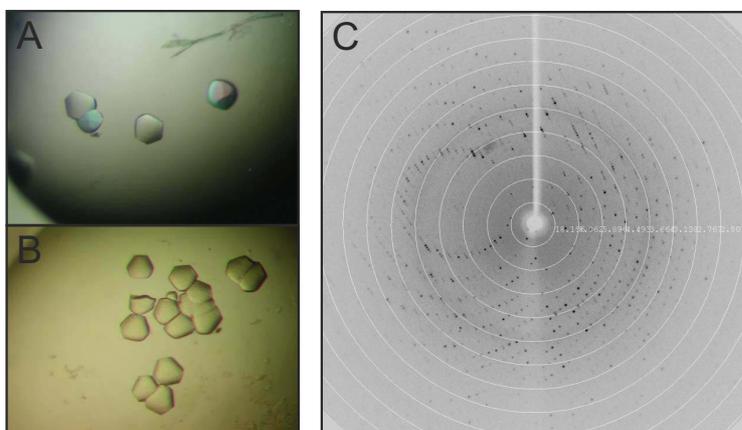
Für die Komplexbildung mit zwei bzw. drei repetitiven Einheiten (vgl. Anhang, Tab. 6-1) wurden beispielhaft Wärmekapazitätsänderungen für die Variante D339N/E372Q bestimmt. Diese entsprechen mit  $-1,62 \pm 0,06$  bzw.  $-1,55 \pm 0,03$  kJ K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> etwa der Wärmekapazitätsänderung bei Bindung von einer repetitiven Einheit ( $-1,67 \pm 0,06$  kJ K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>).

### 3.7. Untersuchungen bezüglich der Affinitätserhöhung

In den vorherigen Abschnitten wurde auf die Kohlenhydratbindung durch HK620TSP und Varianten dieses Proteins, bei denen das aktive Zentrum verändert wurde, eingegangen. In der Arbeit von C. Uetrecht und in dieser Arbeit wurden TSP-Varianten generiert, die im Vergleich zum Wt eine stark erhöhte Affinität zum Kohlenhydrat-Liganden aufweisen. Die Ursache für diese Affinitätssteigerung wurde bisher noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden Kristallstrukturen verschiedener HK620TSP-Varianten im Komplex mit Hexasaccharid gelöst, um der Frage nach der Ursache für diese hohe Affinität nachzugehen. Alle kristallographischen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heinemann am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch durchgeführt.

#### 3.7.1. Kokristallisation von HK620TSP-Varianten mit Hexasaccharid

Die Kokristallstrukturen wurden unter Anleitung von J. Müller aus der Arbeitsgruppe von U. Heinemann gelöst. Zur Strukturlösung wurden zunächst Bedingungen ermittelt, unter denen die Varianten E372Q, D339N, D339A und das Wildtyp-Protein (HK620TSPAN) mit dem Hexasaccharid kokristallisieren. Es wurden mehrere Bedingungen gefunden, unter denen ausreichend große Kristalle entstanden. Anschließend wurde jeweils eine geeignete Bedingung gesucht, unter der die Kristalle eingefroren werden konnten (sog. *Cryo*-Bedingung). Im Anschluss an die Optimierung der *Cryo*-Bedingung wurden die Kristalle auf ihre Beugung hin untersucht. Dabei zeigten die Kristalle, die in hängenden Tropfen unter einer Bedingung mit Natriumformiat (vgl. Abschnitt 2.2.5.4.) gewachsen sind, die besten Eigenschaften in ersten Röntgenbeugungstests (Abb. 3-16 C). Diese hexagonal zylindrischen Kristalle der Raumgruppe P321 hatten eine Größe von etwa 0,2 mm (Abb. 3-16 A und B).

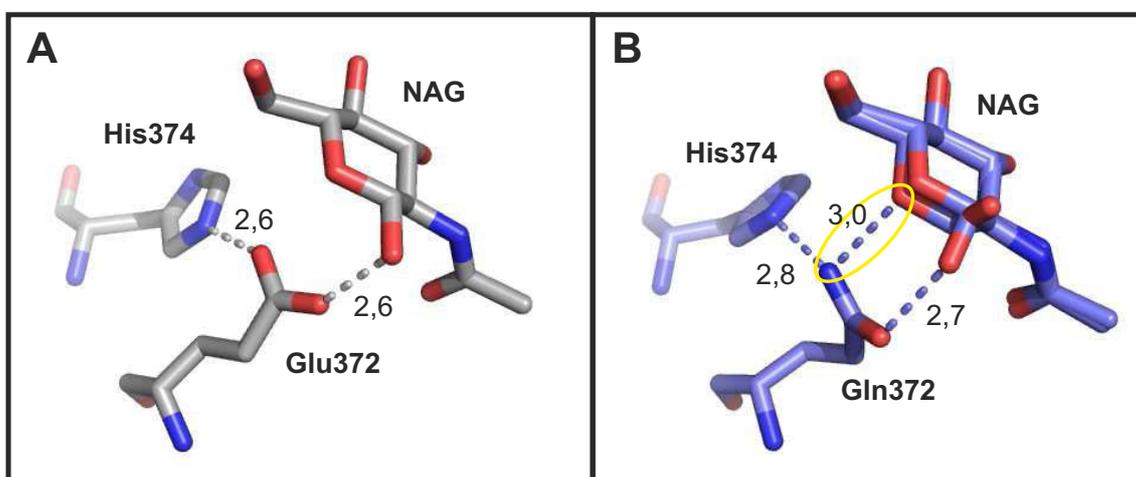


**Abb. 3-16: Kristalle der D339N-Variante (A) sowie des Wt (B).** Die etwa 200  $\mu\text{m}$  großen Kristalle sind nach zwei Tagen bei 20°C in hängenden Tropfen mit 4 mg/ml TSP, 1,4 mM Hexasaccharid, 1,6 M Natriumformiat, 91 mM NaCl, 1 mM EDTA und 66 mM Tris/HCl pH 8,5 über einem Reservoir mit 3,5 M Natriumformiat und 0,1 M TrisHCl pH 8,5 gewachsen. Die eingefrorenen Kristalle wurden zunächst bei 100 K an einer Drehanode bei der Cu-K $\alpha$ -Linie von 1,54 Å bezüglich ihrer röntgenbeugenden Eigenschaften getestet (vgl. Beugungsmuster C). Die besten Kristalle wurden danach ausgewählt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, bis sie an der BESSY Beamline 1 in Berlin Adlershof vermessen wurden.

Die Kristalle mit den aussichtsreichsten Ergebnissen in den Voruntersuchungen wurden in Berlin Adlershof mit Synchrotron-Strahlung (Bessy Beamline 1) vermessen. Die Datensätze wurden mittels molekularem Ersatz mit der bereits unter anderen Bedingungen gelösten Struktur von HK620TSP $\Delta$ N (Wt; PDB: 2VJI; Barbirz *et al.* 2008) als Modell phasiert.

Für den Wt wie auch für die drei Varianten E372Q, D339N, D339A konnten Strukturen unter diesen Bedingungen mit Auflösungen bis zu 1,5-1,35 Å gelöst werden (Statistiken vgl. Anhang Tab. 6-2). Die eingeführten Substitutionen in der Proteinsequenz waren in diesen Strukturen klar definiert. Die Proteinstrukturen haben sich durch diese einzelnen Aminosäureaustausche nicht gravierend geändert (mittlere Abweichung aus den Überlagerungen der C $\alpha$ -Atome (RMSD) zwischen 0,08 Å und 0,12 Å). Bei genauerer Inspektion der Kohlenhydratbindestelle konnten jedoch einige Unterschiede gefunden werden, die im folgenden Absatz erläutert werden sollen (vgl. Anhang, Tab. 6-3).

Die Überlagerung aus den Strukturen des Wt-TSP und der Variante E372Q jeweils im Komplex mit O18A1-Hexasaccharid ergab eine Abweichung mit einem RMSD von 0,12 Å zwischen den Positionen der C $\alpha$ -Atome. Dabei ist der veränderte Rest Gln372 in der Variante im Vergleich zum Wildtyp (E372) anders orientiert (Abb. 3-17) und weicht mit einem RMSD von fast 0,4 Å deutlich vom Durchschnitt ab.



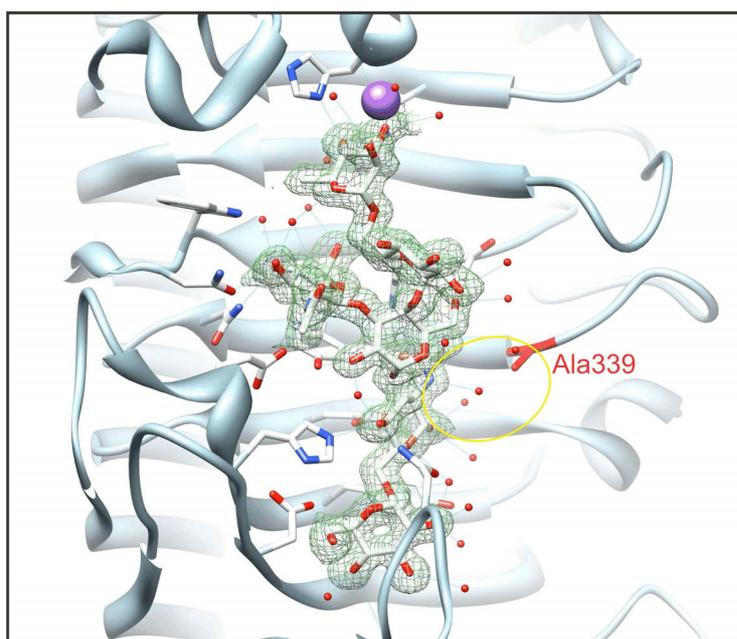
**Abb. 3-17: Veränderungen durch Einführung der Variation E372Q in HK620TSP.** Dargestellt sind das N-Acetylglucosamin (NAG) sowie die Aminosäuren 372 und 374 aus der Wt-Komplexstruktur (A, PDB: 2X85) und aus der Komplexstruktur von E372Q (B, PDB: 2X6W). Die Reste sind entsprechend beschriftet, Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet und die Distanzen (in Å) sind angegeben. Die zusätzliche Wasserstoffbrücke zum Liganden in der Struktur der Variante E372Q ist gelb markiert. In Variante E372Q sind zwei alternative Konformationen für das NAG vorhanden.

Bei der Variante E372Q konnte im Gegensatz zu den anderen hier gezeigten Kokristallstrukturen eine alternative Konformation ( $\alpha$ -Anomer) am N-Acetylglucosamin des reduzierenden Endes beobachtet werden. Diese alternative Konformation wurde für die bereits veröffent-

lichte HK620TSP-Struktur, die unter anderen Kristallisationsbedingungen erstellt wurde, ebenfalls gefunden (2VJI, Barbirz *et al.* 2008).

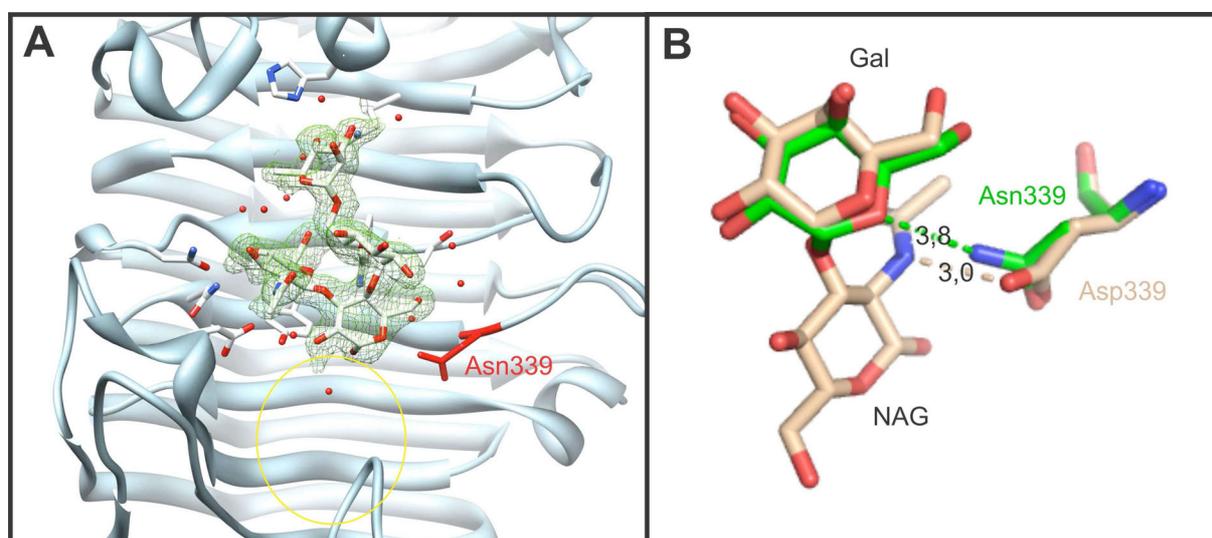
Die Aminogruppe (NE2) in dem Glutamin-Rest, welcher durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt wurde, kann als Donor für bis zu 2 Wasserstoffbrücken fungieren (McDonald & Thornton 1994). Die Carboxylgruppe (OE2) im Glutamat liegt dagegen unter physiologischen Bedingungen deprotoniert vor (isoelektrischer Punkt 3,2 bzw.  $pK_{\gamma\text{-COOH}} = 4,3$ ) (Barrett 1985). Somit kann diese funktionelle Gruppe nur als Akzeptor fungieren. Dadurch kann der variierte Rest (Gln372) eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zu einem Sauerstoff (O5) des N-Acetylglucosamins ( $\alpha$ -Anomer) im Hexasaccharid ausbilden (Abb. 3-17 B, gelb markiert). Zwischen der Hydroxylgruppe im N-Acetylglucosamin (O1 NAG, jeweils  $\beta$ -Anomer) und dem Carbonyl- bzw. Carboxyl-Sauerstoff kann in beiden Varianten eine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden.

Zwischen den  $C_{\alpha}$ -Atomen aus den Kokristallstrukturen der Variante D339A und des Wt-TSP wurde ein RMSD von 0,078 Å bestimmt. Es konnten keine konformationellen Unterschiede zwischen diesen Strukturen beobachtet werden. Durch Austausch des Aspartats durch ein Alanin sind lediglich die Wechselwirkungen zwischen dem Rest 339 und dem Zucker aufgehoben (gelbe Markierung Abb. 3-18). Dazu zählt eine Wasserstoffbrücke zu dem Stickstoff des N-Acetylglucosamins 724 (vgl. Tabelle 6-3 im Anhang). Alle weiteren Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydrat und Protein sind von der Veränderung in der Aminosäuresequenz nicht beeinflusst.



**Abb. 3-18: Die Zuckerbindestelle in der HK620TSP-Variante D339A:** Das Protein ist in der Bänderdarstellung gezeigt. Die an der Bindung des Hexasaccharids beteiligten Reste (*sticks*) sind eingezeichnet wie auch koordinierte Wassermoleküle (rote Kugeln), dabei wurde der variierte Rest Ala339 rot markiert. Der Zucker ist in seiner Differenzelektronendichte ( $2F_o - F_c$  konturiert bei  $3\sigma$ ) dargestellt (PDB: 2X6Y).

Die Positionen der C $\alpha$ -Atome der Variante D339N weichen mit einem RMSD von 0,097 Å ebenfalls nur geringfügig von denen im Wt ab. Bei der Variante D339N wurde am aktiven Zentrum interessanterweise nur Elektronendichte für ein Tetrasaccharid gefunden (Abb. 3-19). Für das N-Acetylglucosamin am reduzierenden Ende und für die verzweigte Glucose war keine Elektronendichte zu finden, für die restlichen Monosaccharide hingegen schon. Durch den Austausch des Aspartats durch ein Asparagin entfällt eine Wasserstoffbrücke zwischen der im Wildtyp vorhandenen Carboxylgruppe und dem Stickstoff des N-Acetylglucosamins am reduzierenden Ende (Abb. 3-19 B). Dies scheint dafür auszureichen, dass die letzten zwei Zuckerreste nicht mehr fixiert und sehr flexibel sind, wodurch für diese keine eindeutige Elektronendichte erhalten werden konnte (gelbe Markierung Abb. 3-19).



**Abb. 3-19: Struktur der HK620TSP-Variante D339N (A, PDB: 2X6X):** Das Protein ist in der Bänderdarstellung gezeigt, die an der Bindung des Kohlenhydrats beteiligten Reste (*sticks*) sind eingezeichnet wie auch entsprechende Wassermoleküle (rote Kugeln), dabei wurde der variierte Rest (339) rot markiert. Der Zucker ist in seiner Differenzelektronendichte ( $2F_o - F_c$  konturiert bei  $3\sigma$ ) dargestellt. Für das N-Acetylglucosamin 724 und die Glucose 725 wurde keine Elektronendichte gefunden (gelber Kreis, vgl. Abb. 3-18). **Vergleich der Reste 339 und ihrer Interaktionen mit dem Zucker zwischen der Variante D339N und dem Wt-TSP (B):** Der variierte Rest 339 ist vergleichend dargestellt. Das Asp339 im Wt (hautfarben) bildet eine 3,0 Å lange Wasserstoffbrücke zu dem Stickstoff (blau) des N-Acetylglucosamins (NAG) aus. Nach Austausch des Rests mit Asparagin (Asn) wird stattdessen eine schwache Wasserstoffbrücke (3,8 Å) zu dem Ring-Sauerstoff (rot) an der benachbarten Galactose (Gal) ausgebildet.

Die Unterschiede in den Affinitäten der untersuchten TSP-Varianten lassen sich nicht allein durch die beschriebenen Kristallstrukturen erklären. Die Variante E372Q weist eine fast 1000fach erhöhte Affinität gegenüber dem Hexasaccharid im Vergleich zum Wt-TSP auf (vgl. Tab. 3-5). In der Struktur konnten jedoch lediglich geringe Unterschiede (eine zusätzliche Wasserstoffbrücke) in der Variante gefunden werden. Die Variante D339N weist im Vergleich zum Wt eine leicht verringerte Affinität (Faktor 1,5) gegenüber dem Hexasaccharid auf, die durch die fehlende Fixierung der zwei Zuckerreste N-Acetylglucosamin 724 und

Glucose 725 durch Variation des Restes 339 erklärt werden kann. Die etwa zehnfach erhöhte Affinität der Variante D339A im Vergleich zum Wt-TSP kann durch die kristallographischen Daten nicht erklärt werden. Dieser Aminosäureaustausch des Rests D339 zu einem Alanin hat jedoch keine derartige Flexibilität im Zucker zur Folge wie der zuvor beschriebene Austausch des Rests 339 zu dem Säureamidanalogen Asparagin am gleichen Rest.

Insgesamt bleibt zu erwähnen, dass sich das kohlenhydratbindende System der TSP-Varianten sowie des Wildtyps durch zwei Merkmale von anderen ähnlichen Systemen abhebt. Zum einen ist in diesem System eine besonders große Zahl an schwachen Interaktionen wie Wasserstoffbrücken ( $19 \leq 3,5 \text{ \AA}$ ) oder hydrophobe Wechselwirkungen (8) zwischen Protein und Zucker zu verzeichnen (vgl. Tab. 6-3 im Anhang). Dabei sind einige Wasserstoffbrücken über Wasser vermittelt (etwa 24 weitere). Zum anderen werden bei der Bindung des Zuckers am Protein sehr viele Wassermoleküle (21) aus der Bindestelle verdrängt (vgl. auch Barbirz *et al.* 2008).

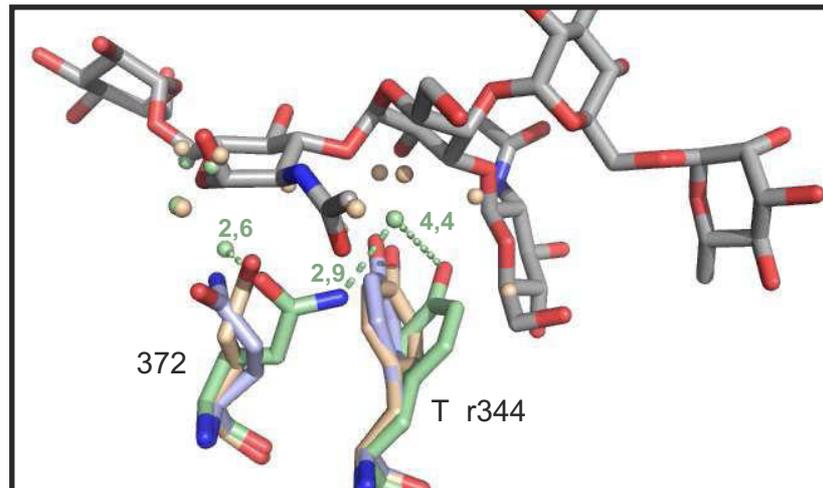
### **3.7.2. Kristallisation der ligandenfreien Variante E372Q**

Zur weiteren Untersuchung der hohen Affinität der Variante E372Q gegenüber dem Kohlenhydrat-Liganden wurde zum Vergleich die Struktur der TSP-Variante E372Q unter den im vorherigen Kapitel beschriebenen Bedingungen in Abwesenheit des Kohlenhydrat-Liganden kürzlich von U. Gohlke aus der Arbeitsgruppe von U. Heinemann gelöst. Die Struktur war mit einer Auflösung bis  $1,82 \text{ \AA}$  etwas schlechter als die zuvor beschriebenen Kokristallstrukturen (vgl. Tab. 6-2).

Zur Vereinfachung werden die Strukturen der Variante E372Q und des Wt ohne Ligand in der Bindestelle im Folgenden mit  $E372Q_{\text{ligandenfrei}}$  und  $Wt_{\text{ligandenfrei}}$  (2VJI, Barbirz *et al.* 2008) indiziert. Die Kokristallstrukturen, bei denen die Proteine im Komplex mit O18A1-Hexasaccharid kristallisiert wurden, werden verkürzt Komplexstrukturen genannt.

Die Überlagerungen der  $C_{\alpha}$ -Atome der Strukturen von  $E372Q_{\text{ligandenfrei}}$  und  $Wt_{\text{ligandenfrei}}$  bzw. der Komplexstruktur von E372Q ergaben jeweils einen RMSD von  $0,11 \text{ \AA}$ . Neben diesen recht geringen Unterschieden zwischen den gesamten Strukturen sind an der variierten Stelle verschiedene Rotamere zu finden (Abb. 3-20). Die Seitenkettenrotamere der Aminosäuren Gln372 und Tyr344 (z.T. auch His374, aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt) aus der Struktur von  $E372Q_{\text{ligandenfrei}}$  weichen deutlich von den entsprechenden Rotameren von den entsprechenden Aminosäuren in  $Wt_{\text{ligandenfrei}}$  (Glu372 und Tyr344) und der Komplex-

struktur von E372Q ab. Dabei ist zu erkennen, dass die Aminosäuren Gln372 und Tyr344 in der Variante E372Q ( $E372Q_{\text{ligandenfrei}}$  in grün) sich bei Bindung des Hexasaccharids drehen (blau), wobei die zwei an diese Reste koordinierten Wasser (grüne Kugeln) verdrängt werden. Im Wt ist die Bindestelle vorgeformt und durch die Bindung werden keine Rotationen bewirkt (Daten nicht gezeigt). Nach dieser Konformationsänderung durch die Kohlenhydratbindung bei der Variante E372Q sind die Aminosäuren 344 und 372 wie zuvor erläutert nicht genau wie im Wt orientiert (hautfarben, vgl. Abschnitt 3.7.1.).



**Abb. 3-20: Vergleich der Struktur von  $E372Q_{\text{ligandenfrei}}$  mit  $Wt_{\text{ligandenfrei}}$  und der Komplexstruktur von E372Q.** Gezeigt sind das von der Variante E372Q gebundene Hexasaccharid (grau) sowie die Aminosäuren 372 und 344 aus den verschiedenen Strukturen. In dieser Umgebung koordinierte Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt. Abstände (in Å) zu zwei Wassermolekülen sind exemplarisch eingezeichnet. Dabei sind Aminosäuren und Wasser aus der Struktur von  $E372Q_{\text{ligandenfrei}}$  grün, von  $Wt_{\text{ligandenfrei}}$  (PDB: 2VJI) hautfarben und aus der Komplexstruktur von E372Q (PDB: 2X6W) blau dargestellt.

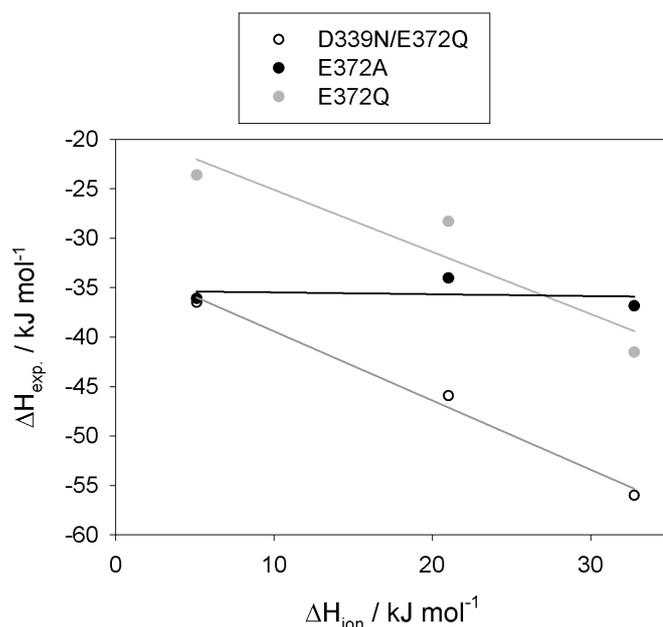
Ein detaillierter Vergleich der Wasser-Netzwerke konnte aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit der Strukturen durch unterschiedlich gute Auflösung der Wassermoleküle an dieser Stelle nicht durchgeführt werden. Zudem wurde die Struktur für  $Wt_{\text{ligandenfrei}}$  unter anderen Kristallisationsbedingungen (Barbirz *et al.* 2008) gelöst als die von  $E372Q_{\text{ligandenfrei}}$ , was die Vergleichbarkeit zusätzlich beeinträchtigt. Die Struktur von  $Wt_{\text{ligandenfrei}}$  wird zur Zeit unter vergleichbaren Bedingungen von U. Gohlke gelöst.

### 3.7.3. Protonentransfer während der Kohlenhydratbindung

Sigurskjold und Mitarbeiter beschrieben 1994 die Untersuchungen von Protonentransfer während eines Bindungsprozesses durch Messungen dieser Interaktion in Puffern mit verschiedenen Protonierungsenthalpien (Sigurskjold *et al.* 1994). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Änderungen im Protonierungsverhalten durch die verschiedenen Aminosäureaustausche als mögliche weitere Ursache für die Affinitätssteigerung

zu analysieren. Durch Auftragung der in unterschiedlichen Puffern gemessenen Bindungsenthalpien gegen die Protonierungsenthalpie der Puffer kann ein linearer Zusammenhang zwischen diesen Größen ermittelt werden. Die Steigung der erhaltenen Gerade gibt Aufschluss über die Anzahl der Protonen, die transferiert werden, und über die Richtung des Transfers. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ermittelt die reine Bindungsenthalpie, ohne dass die Protonierungseffekte einfließen. Die zuvor gezeigten Bindungsstudien wurden alle in Phosphatpuffer durchgeführt. Dieser Puffer weist eine geringe Protonierungsenthalpie (Fukada & Takahashi 1998;  $5,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) auf, so dass die in der ITC ermittelten Enthalpien den reinen Bindungsenthalpien sehr nahe kommen.

Für die beispielhaft untersuchten TSP-Varianten zeigten sich verschiedene Protonierungseffekte (Abb. 3-21). So konnte bei den Varianten E372Q und D339N/E372Q ein Transfer von etwa 0,7 Protonen vom Protein an den Puffer beobachtet werden, während bei Variante E372A kein Transfer beobachtet werden konnte. Sowohl die Varianten E372Q und D339N/E372Q als auch Variante E372A wiesen trotz der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich des Protonentransfers eine hohe Affinität gegenüber verschiedenen Oligosacchariden auf.

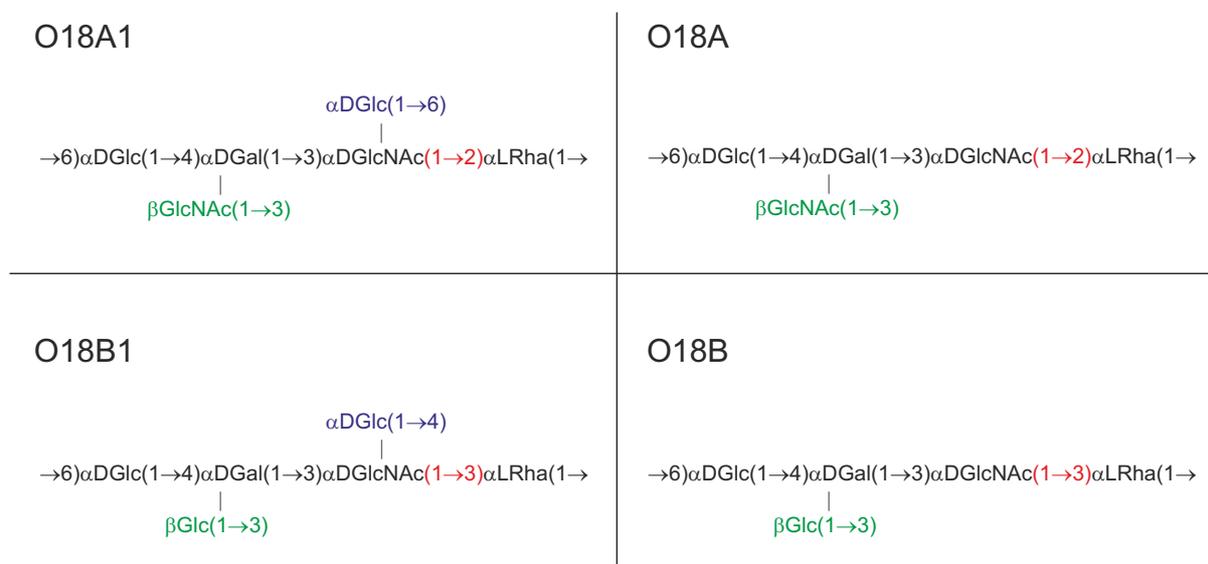


**Abb. 3-21: Analyse von Protonentransfer während des Bindungsprozesses.** Zur Abschätzung des Einflusses von Protonierungseffekten bei den verschiedenen Varianten wurden die Bindungen mittels ITC in unterschiedlichen Puffern gemessen (je 50 mM Phosphat-, HEPES-, TES-Puffer pH7,5 mit jeweils 1 mM EDTA). Die ITC-Messungen wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (vgl. Methoden 2.2.5.2. und Ergebnisse 3.6.2). Durch Auftragung der experimentell gemessenen Enthalpien gegen die Ionisierungsenthalpien der verschiedenen Puffer kann anhand der Steigung der Protonentransfer ermittelt werden.

### 3.8. Spezifität des TSP aus dem Phagen HK620

Es gibt drei natürlich vorkommende Modifikationen des O18A1-Antigens, die bereits 1986 von Pluschke mit Hilfe von Antikörpern voneinander unterschieden wurden (vgl. Abschnitt 1.6.). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob HK620TSP ausschließlich

O18A1-Antigen bindet und PS daraus hydrolytisch verdaut oder ob andere natürlich vorkommende O18-Antigene ebenfalls gebunden werden können. Diese O-Antigene unterscheiden sich von dem O18A1-Antigen durch unterschiedliche Verknüpfungen in Haupt- und Seitenketten sowie z.T. durch Austausch oder Fehlen von Seitenkettenzuckern (Abb. 3-22, vgl. Abschnitt 1.6.).



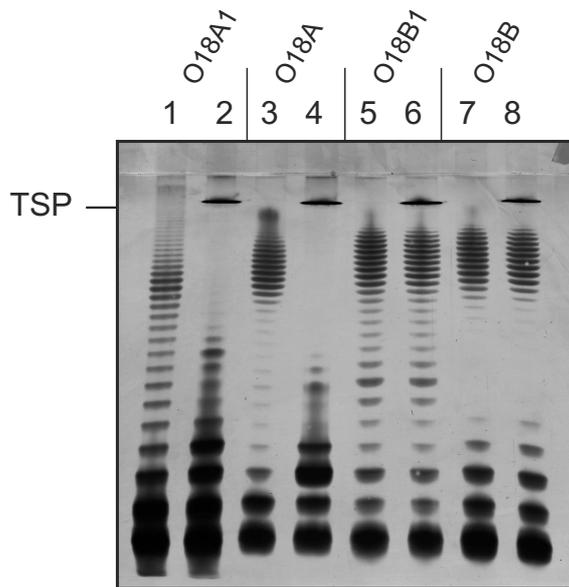
**Abb. 3-22: Die vier verschiedenen O18-Antigene nach Pluschke und Jann.** Das Antigen O18A (bzw. O18B) unterscheidet sich von O18A1 (bzw. O18B1) nur durch eine fehlende Glucose in der Seitenkette (blau). Die B-Varianten weisen im Vergleich eine Glucose anstelle des N-Acetylglucosamins in der Seitenkette auf (grün) und zeigen zudem andere Verknüpfungen in der Hauptkette (rot) (vgl. Abschnitt 1.6.).

### 3.8.1. Aktivität von HK620TSP gegenüber verschiedenen LPS

Für die Untersuchungen bezüglich der Spezifität wurden Lipopolysaccharide aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen mit den Antigenen O18A, O18B und O18B1 wie zuvor beschrieben gereinigt. Im Anschluss an die Reinigung wurden diese LPS mit HK620TSP inkubiert und die Ansätze mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert.

In Abbildung 3-23 ist das Ergebnis dieser Untersuchungen zusammengefasst. TSP des Phagen HK620 bindet nicht ausschließlich LPS mit O18A1-Antigen (Spuren 1 und 2), sondern bindet und hydrolysiert zudem O18A-Antigen-LPS, was an dem Verschwinden von längeren LPS-Ketten und der Anreicherung kürzerer Fragmente nach Inkubation mit TSP zu erkennen ist (Spuren 3 und 4). Bei dem O18A-Antigen liegen die geringsten Veränderungen in der Antigen-Struktur vor: Lediglich die Seitenkettenglucose fehlt, die Verknüpfungen sind im Vergleich zum O18A1-Antigen komplett erhalten (Abb. 3-22). Die Veränderungen in den

Verknüpfungen der Hauptkette werden vom TSP offenbar nicht toleriert und somit werden die Antigene O18B und O18B1 nicht hydrolysiert (Spuren 5-8).

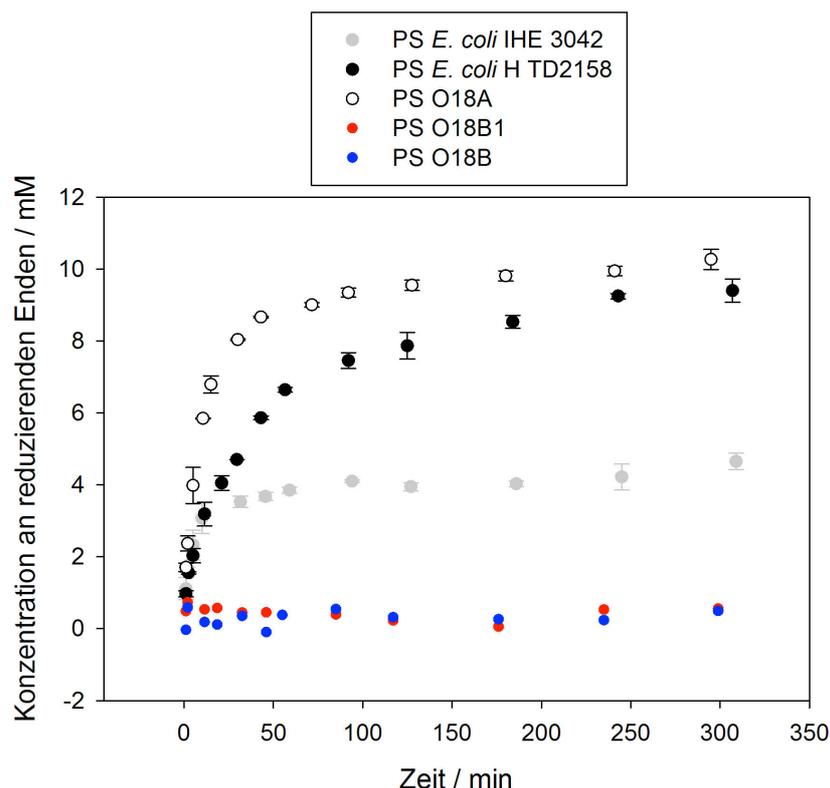


**Abb. 3-23: Aktivität von HK620TSP gegenüber LPS mit verschiedenen O18-Antigenen.** Gereinigte LPS der vier verschiedenen O18-Antigene wurden über Nacht mit TSP inkubiert (Spuren 2, 4, 6, 8) und anschließend mittels Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung der 15%igen SDS-Gele analysiert. Zum Vergleich wurden die gereinigten LPS direkt aufgetragen. Je Spur wurden 0,5 µg LPS verwendet. In den Spuren 1 und 2 wurde O18A1-LPS (aus *E. coli* H TD2158) aufgetragen, in den Spuren 3 und 4 O18A-LPS, in den Spuren 5 und 6 O18B1-LPS sowie in den Spuren 7 und 8 O18B-LPS.

### 3.8.2. Aktivität von HK620TSP gegenüber verschiedenen PS

Die Aktivität von HK620TSP gegenüber verschiedenen PS wurde wie zuvor erläutert anhand der steigenden Anzahl an reduzierenden Enden, die durch DNSA nachgewiesen werden können, untersucht. Abbildung 3-24 stellt die Ergebnisse dieser Studien mit den PS der vier verschiedenen O18-Antigene und dem O18A1-PS aus *E. coli* IHE3042 dar.

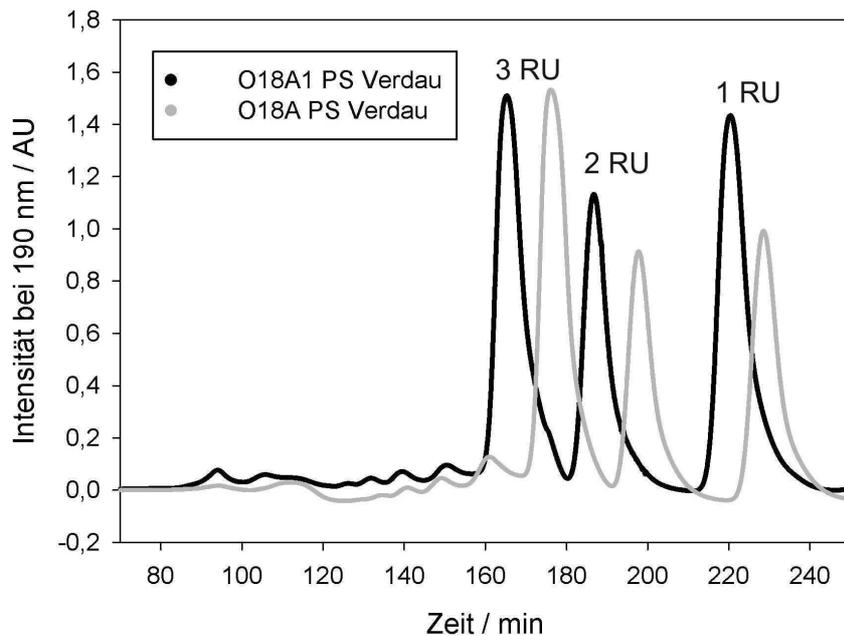
Trotz unterschiedlicher, heterogener Substrate in diesem Experiment wird von einer Substratsättigung zu Beginn der Reaktion ausgegangen, weshalb aus den Anfangssteigungen Umsatzraten abgeschätzt werden konnten. Dabei wies HK620TSP gegenüber dem PS aus O18A und O18A1 eine ähnliche Aktivität auf ( $29,1 \pm 5,9 \mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{s}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{TSP}}^{-1}$  bzw.  $21,1 \pm 3,6 \mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{s}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{TSP}}^{-1}$ ). Die O18B und O18B1-Antigene konnten wie bei den Messungen der Aktivität gegenüber den jeweiligen LPS (vgl. Abb. 3-23) durch das TSP nicht gespalten werden. Gegenüber dem PS aus *E. coli* IHE3042 wurde eine etwas reduzierte Umsatzrate von  $13,5 \pm 3,4 \mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{s}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{TSP}}^{-1}$  ermittelt. Zudem wurde aufgrund der kürzeren Ketten im PS aus *E. coli* IHE3042 (vgl. Abb. 3-7) ein im Vergleich zu den PS des Typs O18A und aus *E. coli* H TD2158 deutlich geringerer Sättigungswert (etwa 4 mM reduzierende Enden im Vergleich zu 10 mM) schon nach etwa 60 Minuten erreicht.



**Abb. 3-24: Untersuchungen der Aktivität von HK620TSP gegenüber PS aus *E. coli*-Stämmen unterschiedlicher O-Serogruppen.** Die Aktivität vom Wt wurde anhand des Verdau von verschiedenen PS untersucht, welcher mit Hilfe von DNSA anhand der Zunahme reduzierender Enden verfolgt werden kann. Es wurden 12 mg/ml PS aus verschiedenen Stämmen bzw. 10,2 mg/ml im Falle der PS der verkürzten Antigen-Typen O18A und O18B in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA bei 37°C mit 50 µg/ml TSP verdaut. Die eingesetzten PS-Mengen entsprechen gleichen Molaritäten, wenn von mittleren molaren Massen von 10 RU dieser PS zur Abschätzung ausgegangen wurde. Nach den im Diagramm gezeigten Zeiten wurden Proben entnommen und die Konzentration an reduzierenden Enden wurde mit Hilfe von DNSA nachgewiesen. Die Aktivitäten gegenüber den PS mit O18A1- und O18A-Antigen wurden dreifach bestimmt. Aufgetragen wurden die Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerbalken.

### 3.8.3. Präparation von Oligosacchariden des Antigentyps O18A

Zur Präparation von Oligosacchariden des Antigentyps O18A für Bindungsstudien wurde gereinigtes PS mit HK620TSP verdaut und die Oligosaccharide in den Verdauansätzen wurden durch Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Abbildung 3-25 zeigt ein typisches Elutionsprofil der Verdauansätze von O18A1- und O18A-PS. Es ist zu erkennen, dass die Oligosaccharide des Typs O18A entsprechend ihrer geringeren Größe zu längeren Elutionszeiten verschoben sind.

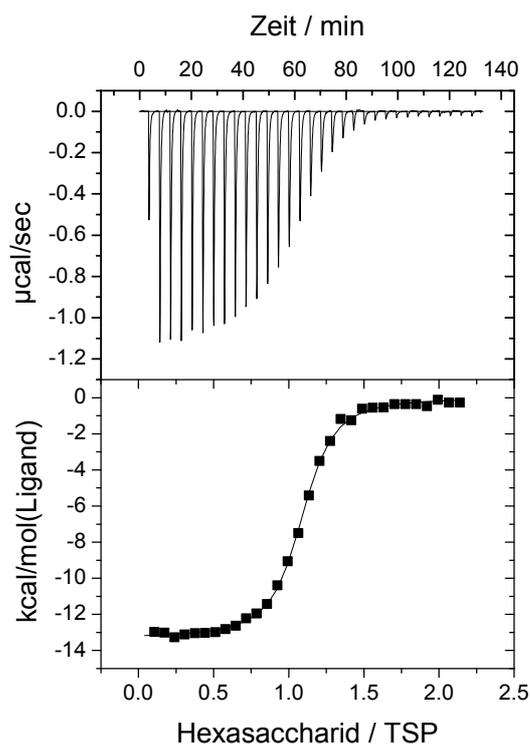


**Abb. 3-25: Chromatographische Trennung der Hauptprodukte nach PS-Verdau durch HK620TSP aus dem Phagen HK620.** Gezeigt ist das typische Elutionsprofil des Verdau von 10 mg PS aus *E. coli* H TD2158 (schwarz) sowie von 10 mg PS des Antigentyps O18A (grau) detektiert durch GlcNAc-Absorption bei 190 nm.

Die gereinigten O18A-Oligosaccharide wurden mittels Massenspektrometrie analysiert und wiesen die erwarteten Größen auf: Eine repetitive Einheit des Typs O18A hatte z.B. mit 917,06 m/z eine um 162,13 m/z verringerte Masse im Vergleich zum O18A1-Hexasaccharid, was einer fehlenden Glucose entspricht (Hertel 2011). Zudem waren in den Massenspektren keine weiteren Spezies zu finden, die auf Verunreinigungen bzw. Modifikationen des Zuckers hätten schließen lassen können.

#### 3.8.4. Bindung des O18A-Antigens durch HK620TSP

Um weitere Aufschlüsse über die Kohlenhydratbindung durch HK620TSP zu gewinnen, wurden ergänzende Bindungsstudien mit den Oligosacchariden des Typs O18A durchgeführt. Konkret wurde die Bindung von einer repetitiven Einheit (Pentasaccharid) an HK620TSP bzw. an Varianten davon mittels ITC untersucht, wodurch sich die in Tabelle 3-7 dargestellten thermodynamischen Parameter ergaben. In Abbildung 3-26 ist beispielhaft die Messung der Bindung von O18A-Pentasaccharid an die TSP-Variante D339N/E372Q zu sehen. Im Fall der Bindung des Pentasaccharids konnten auch Ergebnisse für den Wt erhalten werden, da bei der Bindung dieses Oligosaccharids durch HK620TSP im Vergleich zu Messungen mit O18A1-Hexasaccharid größere Mengen an Wärme freigesetzt werden.



**Abb. 3-26: Isothermale Titrationskalorimetrie für Variante D339N/E372Q mit Pentasaccharid des Antigentyps O18A.** Mittels ITC wurde eine 25 µM Proteinlösung mit je 6 µl 0,5 mM O18A-Pentasaccharid in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA bei 30°C titriert. Gezeigt ist die Heizrate nach Injektion von Hexasaccharid (oben) und die integrierte Wärmemenge bezogen auf die Menge an Ligand. Mit Hilfe einer nicht-linearen Anpassung der integrierten Werte an das „OneSite“-Modell des MicroCal-Reggressionspaketes ergab sich eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 283$  nM. Für die Auswertung wurde die erste Injektion, bei der nur 3 µl des Liganden injiziert wurden, vernachlässigt.

Für die Variante D339N/E372Q wurde beispielhaft die Wärmekapazitätsänderung bei Bindung von O18A-Pentasaccharid ermittelt ( $-1,38 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ). Die gemessenen Dissoziationskonstanten für die Bindung von O18A-Pentasaccharid an TSP weichen zum Teil leicht von denen ab, die für die Bindung des O18A1-Hexasaccharids gemessen wurden. Eine Tendenz ist dabei allerdings nicht ersichtlich und die Dissoziationskonstanten bewegen sich in der gleichen Größenordnung wie für die Bindung des O18A1-Hexasaccharids (vgl. Tab. 3-3 und 3-7). Bei der Interaktion mit dem Pentasaccharid trägt der Enthalpieterm für alle Varianten stärker zur Bindung bei als im Falle des längeren Hexasaccharids ( $\Delta\Delta H = -10 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Da alle TSP-Varianten für beide Oligosaccharide ungefähr die gleichen Affinitäten aufweisen, muss dem stärker begünstigenden Enthalpieterm bei Bindung des Pentasaccharids ein ungünstigerer Entropieterm entgegenstehen ( $\Delta(-T\Delta S) = 5\text{-}15 \text{ kJ mol}^{-1}$ , vgl. Tab. 3-3 und 3-7). Offensichtlich haben sich die Triebkräfte für die Bindung durch HK620TSP und seine Varianten durch Fehlen der Glucose im Oligosaccharid verändert.

**Tabelle 3-7: Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen der Bindung von O18A-Pentasaccharid durch HK620TSP mittels ITC.** Die Werte wurden wie zuvor beschrieben generiert und es gelten die gleichen Anmerkungen zu den Fehlerangaben (vgl. Tab. 3-3).

Variante	$T$ / °C	$n$	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
<b>E372Q</b>	25,0	1,06	126 ± 17	-39,4	-39,5	0,2	n.d.
<b>E372A</b>	25,0	1,05	103 ± 10	-39,9	-42,5	2,6	n.d.
<b>D339N/E372Q</b>	15,2	1,08	248 ± 31	-36,4	-38,1	1,7	-1,38 ± 0,08
	20,2	1,05	290 ± 26	-36,7	-43,4	6,7	
	25,0	0,99	255 ± 11	-37,6	-52,6	15,0	
	30,0	1,06	283 ± 14	-38,0	-55,6	17,6	
	35,0	1,04	279 ± 19	-38,6	-62,5	23,9	
45,0	1,07	543 ± 36	-38,1	-79,9	41,8		
<b>D339N/E372A</b>	25,0	1,06	662 ± 46	-35,2	-47,6	12,4	n.d.
<b>D339A/E372Q</b>	25,0	0,99	100 ± 3	-37,6	-46,6	9,0	n.d.
<b>D339A/E372A</b>	25,0	0,98	592 ± 37	-35,5	-39,2	3,7	n.d.
<b>D339A</b>	25,0	1,15	20 ± 1 μM	-26,8	-21,7	-5,1	n.d.
<b>Wt</b>	25,0	1,11	75 ± 15 μM	-23,6	-20,0	-3,6	n.d.

### 3.8.4.1. Die Bindung längerer O18A-Oligosaccharide

Für die Bindung von längeren Oligosacchariden des Typs O18A wurden thermodynamische Parameter bestimmt. Tabelle 3-8 zeigt die Ergebnisse zur Bindung des Dekasaccharids an verschiedene TSP-Varianten. Die Affinitäten gegenüber dem Dekasaccharid sind verglichen mit denen zum Pentasaccharid tendenziell leicht erhöht (Tab. 3-7 und 3-8). Die Enthalpie- und Entropieterme weisen entsprechend auch schwache Unterschiede auf. Diese leichten Tendenzen sind bei der Bindung von drei repetitiven Einheiten (Pentadecasaccharid) durch das TSP nicht wieder zu finden (vgl. Tab. 6-4 im Anhang). Die thermodynamischen Parameter der Bindung des Pentadecasaccharids entsprechen in etwa denen, die für die Interaktion des TSP mit dem Pentasaccharid zu finden waren.

**Tabelle 3-8: Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen der Bindung von Dekasaccharid des O-Antigentyps O18A durch HK620TSP mittels ITC. Die Werte wurden wie zuvor beschrieben generiert (vgl. Tab. 3-3).**

Variante	$T$ / °C	$n$	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
<b>E372Q</b>	25,0	1,05	134 ± 20	-39,2	-40,1	0,9	n.d.
<b>E372A</b>	25,0	1,03	24 ± 6	-43,5	-42,3	-1,2	n.d.
<b>D339N/E372Q</b>	15,0	1,05	134 ± 17	-37,9	-36,2	-1,7	-1,67 ± 0,10
	20,2	1,00	146 ± 21	-38,4	-44,0	5,6	
	25,0	1,06	153 ± 13	-38,8	-49,4	10,6	
	30,0	1,03	178 ± 12	-39,1	-56,7	17,6	
	35,0	0,99	166 ± 7	-40,0	-66,5	26,5	
	45,0	0,96	233 ± 9	-40,4	-87,0	46,6	
<b>D339N/E372A</b>	25,0	1,07	322 ± 5	-37,0	-47,4	10,4	n.d.
<b>D339A/E372Q</b>	25,0	1,07	80 ± 8	-40,5	-43,4	2,9	n.d.
<b>D339A/E372A</b>	25,0	1,05	292 ± 9	-37,3	-38,7	1,4	n.d.

### 3.8.4.2. Der Einfluss von organischen Lösungsmitteln

Klein und Mitarbeiter zeigten 2008, dass anhand der Bindungseigenschaften eines kohlenhydratbindenden Systems in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich hoher Konzentrationen die Triebkräfte der Interaktion näher charakterisiert werden können (Klein *et al.* 2008). Diese Methodik wurde in dieser Dissertationsarbeit angewandt, um das vorliegende Modell genauer zu charakterisieren. Normalerweise ist diese Methodik bei Proteinsystemen kaum anzuwenden, da die meisten Proteine unter diesen Bedingungen nicht stabil sind. Die außergewöhnlich hohe Stabilität von HK620TSP ermöglichte es, diese Methode zu verwenden. Die Stabilität des Proteins wurde zuvor durch Fluoreszenzspektroskopie unter den jeweiligen Lösungsmittel-Bedingungen untersucht (Daten nicht gezeigt).

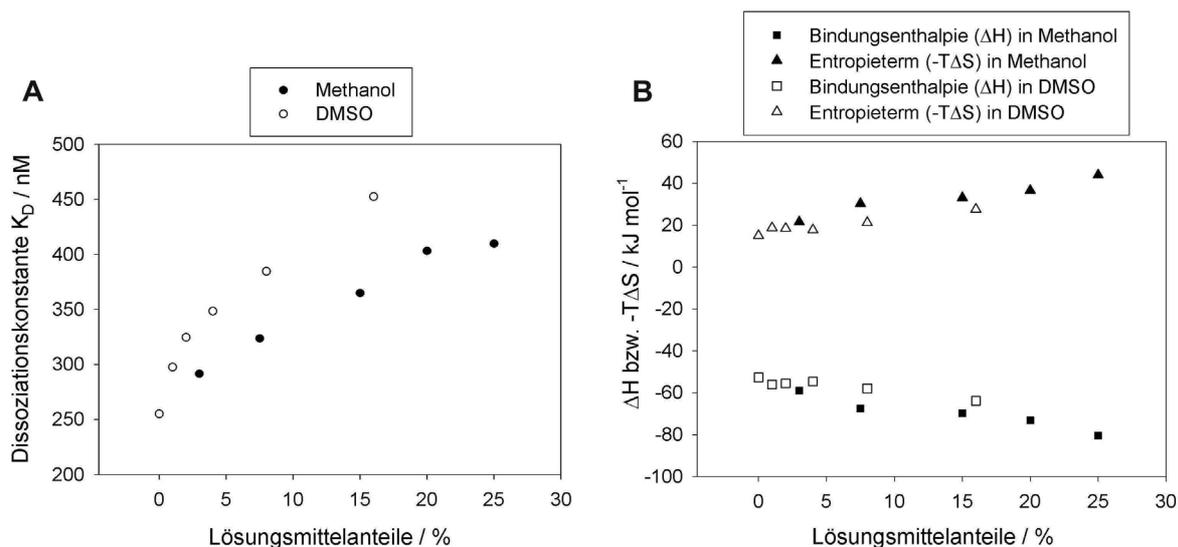
In Tabelle 3-9 sind die thermodynamischen Bindungsparameter für Experimente in unterschiedlich hohen Konzentrationen an Methanol bzw. DMSO dargestellt.

**Tabelle 3-9: Ergebnisse der thermodynamischen Studien zur Bindung von O18A-Pentasaccharid an HK620TSP-Variante D339N/E372Q in verschiedenen Lösungsmitteln mittels ITC. Die Werte wie zuvor beschrieben generiert (vgl. Tab. 3-3).**

	% Solvens	<i>n</i>	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>
<b>Methanol</b>	0	0,99	255 ± 11	-37,6	-52,6	15,0
	3	1,01	292 ± 17	-37,2	-58,8	21,6
	7,5	0,99	324 ± 11	-37,0	-67,3	30,3
	15	1,01	410 ± 32	-36,5	-71,1	34,6
	20	1,02	403 ± 17	-36,4	-72,9	36,5
	25	0,98	410 ± 32	-36,4	-80,3	43,9
	<b>DMSO</b>	0	0,99	255 ± 11	-37,6	-52,6
1		1,01	298 ± 22	-37,1	-55,8	18,7
2		0,99	325 ± 26	-37,0	-55,4	18,4
4		1,04	348 ± 16	-36,8	-54,5	17,7
8		0,97	385 ± 31	-36,6	-57,8	21,2
16		1,04	452 ± 24	-36,2	-63,7	27,5

O18A- Pentasaccharid und Protein (TSP-Variante D339N/E372Q) wurden für diese Studien jeweils mit gleichen Lösungsmittelanteilen versetzt und anschließend wurde die Oligosaccharid-Lösung zu dem Protein titriert. Für beide Lösungsmittel ist zu erkennen, dass die Dissoziationskonstanten mit steigender Konzentration an Methanol bzw. DMSO anstiegen (Abb. 3-27). Die Affinität von D339N/E372Q zu O18A-Pentasaccharid wurde dabei durch DMSO bereits bei geringeren Konzentrationen entsprechend beeinflusst. Die Dissoziationskonstanten erhöhten sich in 16% DMSO um einen Faktor von 1,8, während erst in 25% Methanol eine ähnliche Erhöhung (Faktor 1,6; jeweils bezogen auf 0% Lösungsmittel) von zu verzeichnen war.

Dabei nimmt der Enthalpieterm ab, während der entropische Term ansteigt. Dies ist bei beiden Lösungsmitteln der Fall, allerdings ist dieser Effekt bei DMSO weniger stark ausgeprägt.



**Abb. 3-27:** Änderung der Bindungsaffinitäten gegenüber O18A-Pentasaccharid (A) und der Bindungsenthalpie bzw. des Entropieterms (B) der Bindung durch die TSP-Variante D339N/E372Q in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Variante D339N/E372Q sowie das zu titrierende Oligosaccharid wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln (Methanol und DMSO) bzw. unterschiedlichen Konzentrationen davon versetzt. Anschließend wurde die Proteinlösung (25  $\mu$ M Bindestellen) mit der Pentasaccharid-Lösung (0,5 mM) mittels ITC bei 25°C titriert. Die Entwicklung der Bindungsaffinität gemessen anhand der Dissoziationskonstante ist hier aufgetragen (A) ebenso wie die Änderung der Bindungsenthalpie und des Entropieterms (B, vgl. Tab. 3-9).

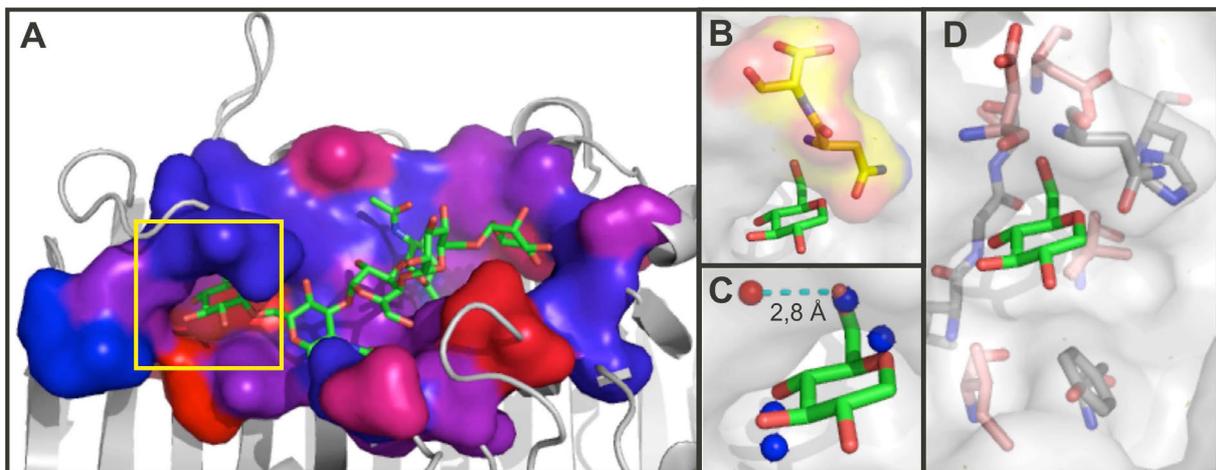
### 3.8.4.3. Die Kohlenhydrat-Bindestelle von HK620TSP

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur Bindung der O18A-Fragmente zeigten, dass durch Verkürzung des Oligosaccharids um die Glucose in der Seitenkette des Antigens die thermodynamischen Parameter der Bindung verändert wurden. Durch die vergleichende Analyse der Interaktionen verschiedener Oligosaccharide mit HK620TSP konnte der Beitrag eines einzelnen Monosaccharids (Glucose in der Seitenkette des Hexasaccharids) an der Bindung ermittelt werden.

Die Bindung der Seitenkettenglucose ist entropisch sehr günstig (vgl. Abschnitt 3.8.4.,  $\Delta(-T\Delta S) = 5-15 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Um den unerwartet hohen entropischen Beitrag der Bindung des Glucoserests näher zu verstehen, wurden die vorhandenen Strukturdaten (vgl. Abschnitt 3.7.1 bzw. Barbirz *et al.* 2008) hinsichtlich der Bindestelle für die Seitenkettenglucose auf HK620TSP unter veränderten Gesichtspunkten analysiert. Hierzu wurden die an der Bindung beteiligten Aminosäuren entsprechend ihrer Polarität eingefärbt und diese Reste in einer raumfüllenden Illustration auf die Bändermodell-Struktur projiziert. Auf diese Weise ist zu erkennen, dass die betreffende Seitenkettenglucose bei der Bindung an HK620TSP besonders stark vom Lösungsmittel abgeschirmt wird (Abb. 3-28 A). Durch Kohlenhydratbindung ist eine unterschiedlich große Änderung der Zugänglichkeit ( $\Delta ASA$ ) auf der Oberfläche der

einzelnen Monosaccharide zu verzeichnen: Die Oberfläche der besagten Seitenkettenglucose ist zu 75% bedeckt. Dahingegen weisen die anderen Monosaccharide, obwohl ihre Oberfläche z.T. durch mehrere benachbarte Monosaccharide selbst weniger Lösungsmittel-zugänglich ist, mit 21-60% einen geringeren Anteil an nicht-zugänglichen Oberflächen auf.

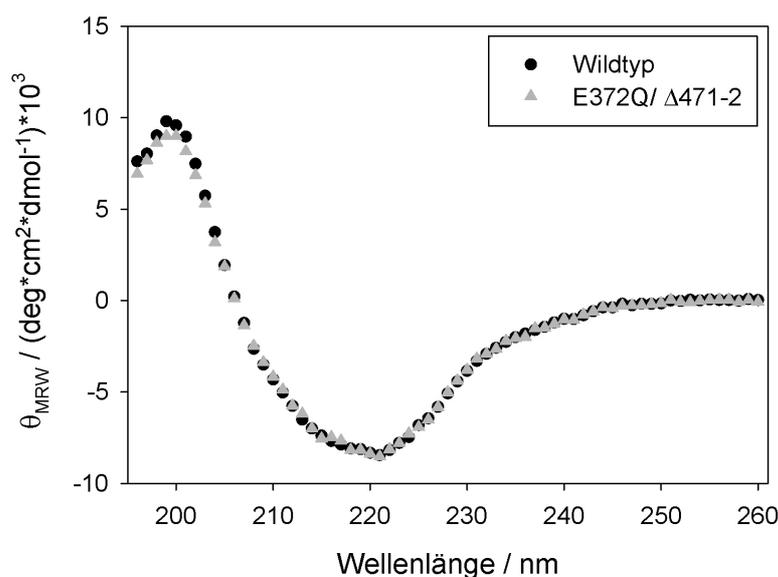
Die dafür verantwortlichen Aminosäuren (469-472) sind in einem flexiblen *turn* der parallelen  $\beta$ -Helix inkorporiert und überspannen den Glucoserest wie ein Schirm (Abb. 3-28 B zeigt die Aminosäuren 471 und 472 in Gelb). Die Kontakte der Glucose in der Seitenkette sind der Tabelle 6-3 im Anhang zu entnehmen. Einige dieser Kontakte sind in Abbildung 3-28 dargestellt. Auffällig ist, dass in der Bindungstasche einige unpolare Aminosäuren sitzen (Val395, Ile426, Leu427, Gly428, Gly468), die nicht zur Bindung der Glucose beitragen. Hier werden Kontakte zwischen hydrophilen und hydrophoben Gruppen nötig (Abb. 3-28 D in lachsfarben, vgl. Tab. 6-3 im Anhang). Zwei stabilisierende Wasserstoffbrücken mit einem Abstand von weniger als 3 Å sind zu finden (Pro469, Asp430, vgl. Tab. 6-3 im Anhang). Im Vergleich zu der Struktur von ligandenfreiem HK620TSP werden vier Wassermoleküle durch die Bindung der Glucose verdrängt (blaue Kugeln in Abb. 3-28 C), während ein strukturelles Wasser im Abstand von 2,8 Å zu einer Hydroxylgruppe des Zuckers zu finden ist (rote Kugel in Abb. 3-28 C).



**Abb. 3-28: Strukturelle Analyse der Bindung des Hexasaccharids durch HK620TSP (PDB: 2X85).** **A:** Die an der Bindung des Hexasaccharids beteiligten Aminosäuren sind raumfüllend dargestellt und entsprechend ihrer Hydrophobizität nach der Skala von Kyte und Doolittle eingefärbt (Kyte & Doolittle 1982). Dabei entspricht Rot der größten Hydrophobizität und Blau der geringsten. Der Ligand (grüne *sticks*) ist mit seinem reduzierenden Ende nach links dargestellt. Die Glucose der Seitenkette ist durch ein gelbes Kästchen hervorgehoben und detailliert dargestellt (B, C, D). **B:** Zwei Aminosäuren (Asn471 und Ser472) des *turns* sind in gelb dargestellt. **C:** Die vier blauen Kugeln zeigen Wassermoleküle aus der Proteinstruktur ohne gebundenen Zucker (PDB: 2vji). Die rote Kugel stellt das einzige durch den Zucker nicht verdrängte Wasser in der Bindetasche dar. **D:** Aminosäuren, die laut Weizmannserver (Sobolev *et al.* 1999) ungünstige Kontakte (hydrophil-hydrophob) zu der Glucose eingehen, sind lachsfarben eingefärbt (vgl. Tab. 6-3 im Anhang).

### 3.9. Herstellung der TSP-Variante E372Q/ $\Delta$ 471-2

Zur näheren funktionellen Charakterisierung der Liganden-Bindestelle auf HK620TSP wurde die Variante E372Q/ $\Delta$ 471-2 generiert. Dazu wurden aus der Variante E372Q mit Hilfe von ortsgerechter Mutagenese die zwei Aminosäuren Asn471 und Ser472 deletiert. Beide Aminosäuren sind Teil eines Schirms über der Seitenkettenglucose (vgl. Abb. 3-28 B), so dass ihre Deletion diese Bindestelle freilegen sollte. E372Q wurde als Ausgangsvariante ausgewählt, da für diese Variante eine sehr hohe Affinität zum Liganden beobachtet werden konnte (vgl. Abschnitt 3.6.2.). Die Variante E372Q/ $\Delta$ 471-2 ließ sich trotz der Deletionen unter den etablierten Bedingungen exprimieren und bis zu einer Reinheit von über 96% reinigen. Im fern-UV-Zirkulardichroismus (CD) ließ sich keine Veränderung des Sekundärstrukturgehalts feststellen: In Abbildung 3-29 sind die fern-UV-CD-Spektren für E372Q/ $\Delta$ 471-2 und dem Wt vergleichend dargestellt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass durch diese Deletionen keine größeren strukturellen Änderungen hervorgerufen wurden.



**Abb. 3-29:** Fern-UV-CD-Spektren von HK620TSP-Wt und Variante E372Q/ $\Delta$ 471-2 zur vergleichenden Abschätzung der Sekundärstruktur. Es wurden je 0,1 mg/ml Protein in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und 1 mM EDTA in 1 mm Quartz-Küvetten vermessen (vgl. Abschnitt 2.2.5.2.).

#### 3.9.1. Bindung von Oligosacchariden durch Variante E372Q/ $\Delta$ 471-2

Interessant war nun die Frage, wie sich die kohlenhydratbindenden Eigenschaften von Variante E372Q/ $\Delta$ 471-2 im Vergleich zu E372Q darstellen. Isothermale Titrationskalorimetrie mit O18A1-Hexasaccharid erwies für die neu generierte Variante E372Q/ $\Delta$ 471-2 im Vergleich zu E372Q eine um den Faktor 27 geringere Ligandenbindungsaffinität (Tabelle 3-10).

Die Affinität zu O18A-Pentasaccharid war im Gegensatz dazu nur um einen Faktor von vier verringert. Die Bindung von zwei repetitiven Einheiten (2 RU, Dekasaccharid) des O18A-Antigens durch Variante E372Q/ $\Delta$ 471-2 unterlag einer höheren Affinität als die von einer RU (Pentasaccharid) und war im Vergleich zu der Variante E372Q um einen Faktor drei verringert.

**Tabelle 3-10: Ergebnisse der thermodynamischen Untersuchungen der Bindung verschiedener Oligosaccharide durch die TSP-Varianten E372Q und E372Q/ $\Delta$ 471-2 mittels ITC.** Die Werte wie zuvor beschrieben generiert (vgl. Tab. 3-3).

<i>Variante</i>	<i>Ligand</i>	<i>n</i>	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>
<b>E372Q</b>	O18A1	1,03	79 ± 16	-40,4	-23,6	-16,8
	O18A	1,06	126 ± 17	-39,4	-39,5	0,2
	O18A 2RU	1,05	134 ± 20	-39,2	-40,1	0,9
<b>E372Q/ <math>\Delta</math>471-2</b>	O18A1	1,01	2105 ± 169	-32,4	-26,3	-6,1
	O18A	1,03	521 ± 50	-35,8	-32,9	-2,9
	O18A 2RU	1,01	336 ± 29	-37,0	-34,0	-3,0

### **3.10. Kinetische Untersuchungen der Kohlenhydratbindung**

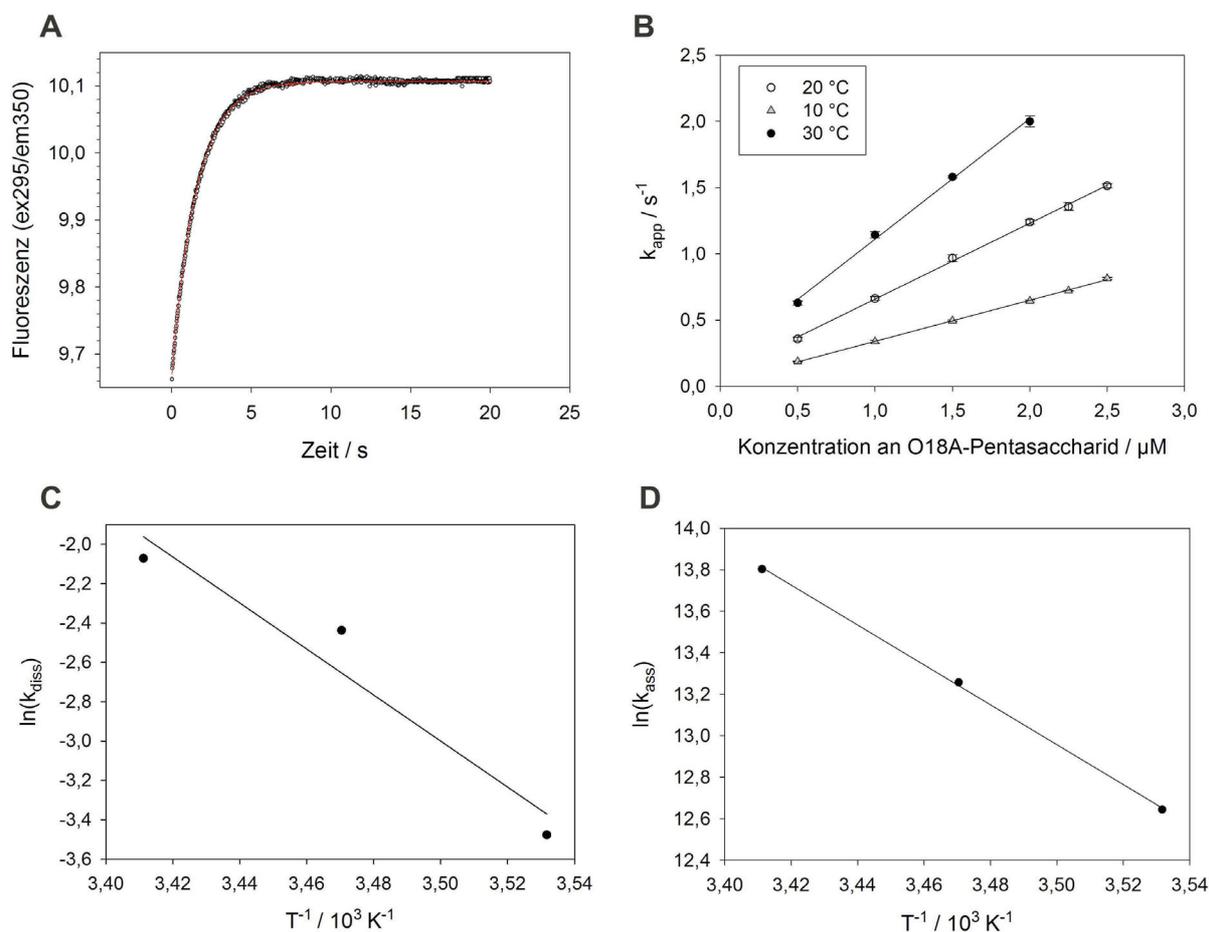
Da die Kinetik der Ligandenbindung für manuelle Mischmethoden und sogar für die zuvor dargestellten SPR-Methoden (vgl. Abschnitt 3.6.5.) zu schnell war, also in der experimentellen Totzeit bereits abgeschlossen war, wurde für die Quantifizierung der Geschwindigkeitskonstante der Kohlenhydratbindung auf *Stopped Flow* Techniken zurückgegriffen. Bei dieser Methode wurden Assoziationskinetiken gemessen, indem die beiden Bindungspartner durch zwei Spritzen in eine Messzelle injiziert wurden. Die experimentelle Totzeit liegt im Bereich von 3 ms.

Nachteilig bei dieser Methode ist der notwendige Einsatz sehr großer Mengen an Oligosacchariden. Es wurden daher beispielhafte Untersuchungen mit ausgewählten Varianten durchgeführt (Tab. 3-11). Die Assoziation wurde wie bereits für die Fluoreszenztitrationen beschrieben über die Änderung der Fluoreszenz-Eigenschaften bei Kohlenhydratbindung verfolgt (vgl. Abschnitt 3.6.1). Dabei ergab sich die beobachtete Fluoreszenz-Änderung aus

der bei kleinen Änderungen der Ligandenkonzentration gültigen Gleichung:

$$k_{app} = \frac{1}{\tau} = k_{diss} + k_{ass}(P + L).$$

Dabei ist  $\tau$  die Halbwertszeit,  $k_{app}$  die apparente Geschwindigkeitskonstante,  $k_{diss}$  und  $k_{ass}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und Assoziation, P und L die Protein- bzw. Ligandenkonzentration. Die Messung apparenter Geschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen Konzentrationen ermöglicht die Bestimmung von  $k_{ass}$  und  $k_{diss}$  (Eigen & De Mayer 1963). Die Auswertung der bei drei verschiedenen Temperaturen gemessenen Kinetiken der Bindung von O18A-Pentasaccharid durch Variante D339A/E372Q sind in Abbildung 3-30 A und B dargestellt sowie die Ergebnisse in Tabelle 3-11. Durch die Auftragung der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{diss}$  und  $k_{ass}$ ) gegen die Temperaturen ergeben sich nach Arrhenius Aktivierungsenergien von  $97 \pm 26$  bzw.  $80 \pm 2$  kJ/mol (Abb. 3-30 C und D).



**Abb. 3-30: Bestimmung der Bindungskinetik von O18A-Pentasaccharid und der TSP-Variante D339A/E372Q.** Alle Kinetiken wurden bei einer TSP-Konzentration von  $0,23 \mu\text{M}$  in  $50 \text{ mM}$  Natriumphosphatpuffer pH 7,5 und  $1 \text{ mM}$  EDTA durchgeführt. Die Kinetik bei  $10^\circ\text{C}$  und  $2 \mu\text{M}$  Pentasaccharid und die monoexponentielle Anpassung (rot) des experimentellen Datensatzes ist beispielhaft gezeigt (A). Die Auswertung der Kinetiken bei verschiedenen Temperaturen (B): Jeder Punkt stellt dabei mindestens eine Akkumulation aus 15 Messungen dar mit der Standardabweichung dieser Mittelung als Fehlerbalken. In C und D sind die Arrhenius-Diagramme für die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und Assoziation dargestellt. Lineare Regressionen ergaben Aktivierungsenergien von  $97 \pm 26 \text{ kJ mol}^{-1}$  bzw.  $80 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

Des Weiteren wurde die Bindungskinetik zwischen Variante D339A/E372Q und Hexasaccharid des Typs O18A1 exemplarisch gemessen. Dabei sind im Vergleich zu der Bindung von O18A-Pentasaccharid die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation und Dissoziation leicht herabgesetzt.

Als weiteres Ergebnis der kinetischen Untersuchungen bleibt festzuhalten, dass bei der Bindung von O18A-Pentasaccharid durch den Wt die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation stark erhöht (Faktor 238), während die der Assoziation herabgesetzt ist (Faktor 2,4).

Die aus den Kinetiken ermittelten Dissoziationskonstanten liegen in der Größenordnung der mittels ITC bestimmten Werte (vgl. Abschnitt 3.6.2. bzw. 3.8.4.).

**Tabelle 3-11: Ergebnisse der Messungen der Bindungskinetiken nach Mischungen durch Stopped Flow.** Gezeigt sind die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation und Assoziation sowie die daraus berechnete Dissoziationskonstante ( $K_D^* = k_{Diss}/k_{Ass}$ ).

Variante	Ligand	T / °C	$k_{Diss}$ / s <sup>-1</sup>	$k_{Ass}$ / M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$K_D^*$ / μM
D339A/E372Q	Pentasaccharid O18A	10	0,031	310100	0,10
		20	0,087	572300	0,15
		30	0,126	987200	0,22
Wt	Pentasaccharid O18A	10	<b>7,37</b>	130000	57
D339A/E372Q	Hexasaccharid O18A1	20	0,059	269800	0,22

### **3.11. Arbeiten mit dem Phagen HK620**

Für Studien am ganzen Phagen wurde HK620 freundlicherweise von Mireille Ansaldi von der Universität Marseille zur Verfügung gestellt. Bei HK620 handelt es sich um einen temperenten Phagen, der sich im lysogenen Zyklus als Prophage in das Bakteriengenom einbauen kann (Dhillon *et al.* 1998). Der Wechsel in den lytischen Zyklus kann durch Reize wie UV-Strahlung oder chemische Substanzen (z.B. Carbadox, Mitomycin) induziert werden (Barksdale & Arden 1974).

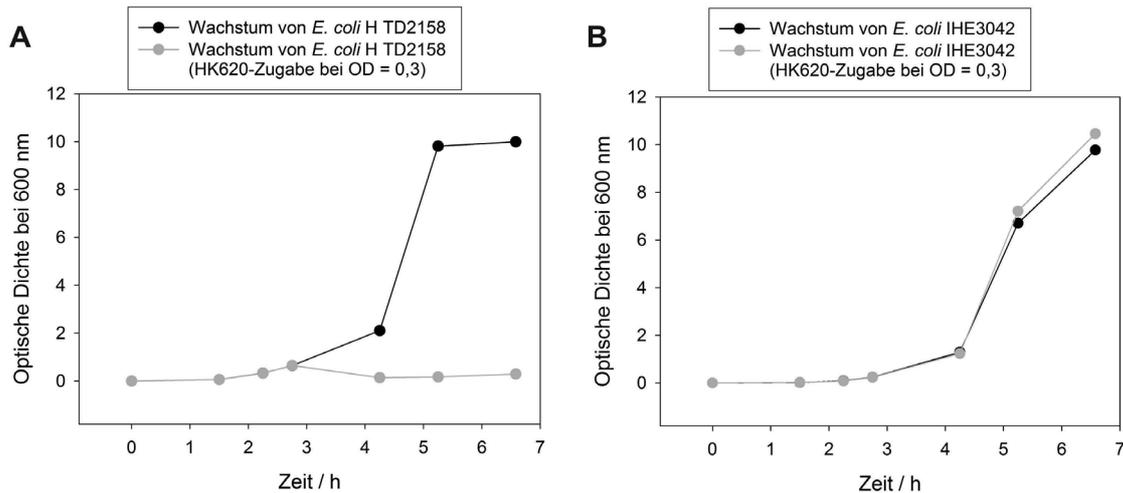
Der Phage HK620 befand sich unter den verwendeten Bedingungen (vgl. Abschnitt 2.2.6.1.) nach Infektion von *E. coli* H TD2158 im lytischen Zyklus und konnte für diese Arbeit direkt ohne Induktion auf diesem Stamm in größeren Mengen angereichert werden. Der Phage konnte nach einem für den Phagen P22 etablierten Protokoll (vgl. Abschnitt 2.2.6.1.) gereinigt und in sehr reiner Form in einem hohen Titer erhalten werden ( $1,6 \times 10^{13}$  Pfu ml<sup>-1</sup>).

#### **3.11.1. Spezifität des Phagen HK620 *in vivo***

Nachdem festgestellt worden ist, dass HK620TSP neben LPS der *O*-Serogruppe O18A1 auch LPS mit O18A-Antigen effizient binden und hydrolysieren kann, war zu vermuten, dass durch den Phagen HK620 Stämme der entsprechenden *O*-Serogruppen infiziert werden können. Stattdessen konnte jedoch nur die Infektiosität des Phagen gegenüber dem Wirtstamm *E. coli* H TD2158 in Form von Plaques auf einem Bakterienrasen beobachtet werden.

Zur Veranschaulichung dieses Befundes sind exemplarisch Trübungsmessungen dargestellt (Abb. 3-31), in denen je zwei Bakterienkulturen der Stämme *E. coli* H TD2158 und IHE3042 bis zu einer optischen Dichte von 0,3 bei 600 nm wachsen gelassen wurden und jeweils eine Kultur des jeweiligen Stammes mit HK620-Phagen infiziert wurde.

Während die Trübung bei *E. coli* H TD2158 (Abb. 3-31 A) nach Phagenzugabe nicht weiter zunahm, stieg die Bakteriendichte bei *E. coli* IHE3042 (B) unvermindert an.



**Abb. 3-31: Infektiösität des Phagen HK620 gegenüber unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen.** Die Bakterien der Stämme *E. coli* H TD2158 (A) und *E. coli* IHE3042 (B) wurden jeweils in zwei Kulturen unter gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte (OD, gemessen bei 600 nm) von 0,3 wachsen gelassen. Zu jeweils einer der beiden gleich behandelten Kulturen wurde HK620-Phage mit einer Multiplizität der Infektion von 0,1 zugegeben (vgl. Methoden 2.2.6.1.) und die OD wurde bei diesen Proben sowie bei den Kontrollen weiter verfolgt.

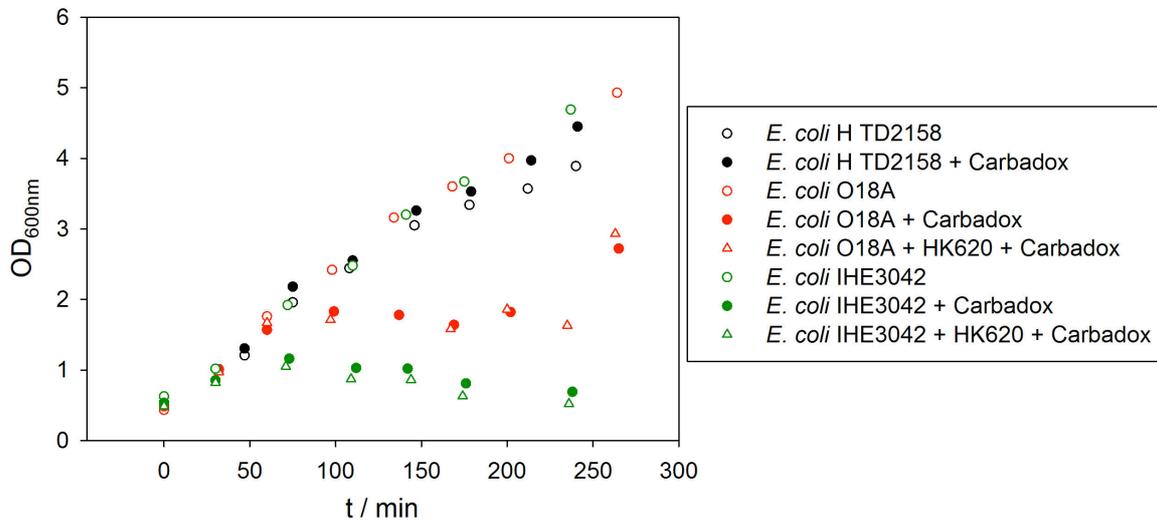
Aufgrund der Tatsache, dass einige der getesteten *E. coli*-Stämme (hier IHE3042) bei 37°C ein Kapselpolysaccharid (K5) exprimieren (Achtman *et al.* 1983) und diese Kapsel die Infektion durch den Phagen stören könnte, wurden die gleichen Experimente bei 18°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur werden die Kapselpolysaccharide zwar nicht exprimiert (F. Orskov *et al.* 1984), allerdings ist auch die Infektiösität des Phagen bei dieser Temperatur nicht mehr nachweisbar. Aufgrund dieser experimentellen Grenzen wurden die weiterführenden Experimente zur Untersuchung des Infektionsmechanismus in Form von *in vitro* Ansätzen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.11.3.).

### 3.11.2. Induktion von Prophagen

Der Phage HK620 ist in der Lage, seine DNA in das Genom von Wirtsbakterien einzubauen. Aufgrund dieser Temperenz wurde getestet, ob HK620 nach Inkubation mit den *E. coli*-Stämmen, bei denen keine Lyse beobachtet werden konnte, aus dem Lysogen induziert werden konnte.

Durch Antibiotika oder andere Stressfaktoren können Prophagen in den lytischen Zyklus gebracht werden (Barksdale & Arden 1974). Antibiotika wie Carbadox können z.T. mit der Bakterien-DNA interagieren, wodurch Reparaturmechanismen in der Zelle induziert werden, die als kollaterale Effekt die Repression des Prophagen unterbinden (Köhler *et al.* 2000).

Es wurde vermutet, dass der Phage sich evtl. in das Genom der Bakterien einbaut, bei denen keine Lyse beobachtet werden konnte. Durch Induktion mit dem Antibiotikum Carbadox konnte dies allerdings nicht bestätigt werden (Abb. 3-32).



**Abb. 3-32: Induktion von Prophagen in den lytischen Zyklus.** Die Bakterien der *E. coli*-Stämme IHE3042 (grün) und der *O*-Serogruppe O18A (rot, 10809) wurden bei 37°C kultiviert. Je eine Kultur wurde mit Bakterien, die zuvor 24 h in Anwesenheit des Phagen HK620 kultiviert wurden, angeimpft (offene Dreiecke). Alle anderen wurden wie gewohnt mit einer üN-Kultur der entsprechenden Bakterien angeimpft. Bei einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm wurde jeweils eine Kultur sowie die mit Phagen behandelten Kulturen mit Hilfe von Carbadox (1,5 µg/ml) induziert (gefüllte Kreise und offene Dreiecke). Die optische Dichte wurde weiter verfolgt. Als Kontrolle wurden jeweils Bakterien ohne Zugaben kultiviert (offene Kreise). Ebenso dienen *E. coli* H TD2158 Bakterien (mit und ohne Carbadox) als Kontrolle (schwarz, gefüllte bzw. offene Kreise).

Nach Zugabe von Carbadox zu *E. coli* IHE3042 und *E. coli* der *O*-Serogruppe O18A (10809 DSMZ) konnte eine nachlassende Trübung durch Lyse gemessen werden. Allerdings zeigten Kontrollen, bei denen die entsprechenden *E. coli*-Stämme ohne vorherige Inkubation mit dem Phagen HK620 mit Carbadox versetzt wurden, ebenfalls Zellyse. Dies bedeutet, dass in *E. coli* IHE3042 sowie *E. coli* der *O*-Serogruppe O18A andere, unbekannte Prophagen aus dem Lysogen induziert wurden.

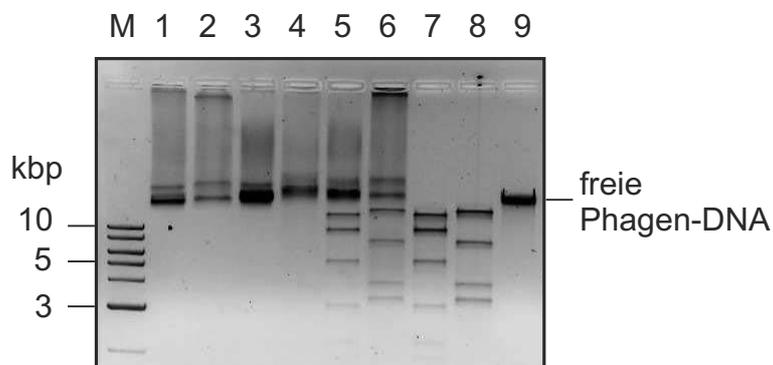
Für den Wirtstamm *E. coli* H TD2158 war bereits bekannt, dass lysogene Prophagen vorhanden sind, die durch UV-Licht induziert werden konnten (Dhillon *et al.* 1998). Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Durch Carbadox konnte kein Prophage aus dem Lysogen von *E. coli* H TD2158 induziert werden.

### 3.11.3. *In vitro* Experimente zur Infektion durch HK620

Aufgrund der zuvor beschriebenen experimentellen Grenzen (vgl. Abschnitt 3.11.1.) wurde neben den *in vivo* Studien auf *in vitro* Untersuchungen zurückgegriffen, die für Analysen des verwandten Phagen P22 in unserem Labor von D. Andres etabliert werden konnten. Mit

diesen Untersuchungen konnte für den Phagen P22 gezeigt werden, dass die DNA-Ejektion lediglich durch das Wirts-LPS in Anwesenheit von Magnesium induziert werden konnte. Für den Podovirus P22 konnte dies sowohl durch Fluoreszenz-basierte Untersuchungen als auch durch gelelektrophoretische Untersuchungen validiert werden (Andres, Hanke *et al.* 2010; Andres, Roske *et al.* 2012). Für die Untersuchungen der DNA-Ejektion mittels Fluoreszenz wurde ein DNA-interkalierender Farbstoff (Yo-Pro) verwendet, der die hochkondensierte DNA im Phagenkopf kaum binden kann. Nach Zugabe von LPS des Wirts kann ein Anstieg der Fluoreszenz durch Ejektion der DNA beobachtet werden. Mit den für den Phagen P22 etablierten Methoden wurde der Infektionsmechanismus des Phagen HK620 studiert.

Für den Phagen HK620 zeigte sich, dass die DNA-Ejektion nicht unter den von D. Andres für den Phagen P22 erarbeiteten Bedingungen induziert werden konnte. Im Gegensatz zum P22-System war der Einsatz von deutlich mehr LPS nötig, um den Ausstoß von DNA zu bewirken. Aufgrund der Lichtstreuung von LPS (vgl. Abschnitt 1.3.) wurden die Fluoreszenzmessungen bei hohen LPS-Konzentrationen stark beeinträchtigt, so dass auf alternative Methoden zurückgegriffen werden musste. Die DNA-Ejektion ließ sich auf Agarosegelen analysieren. In Abbildung 3-33 ist das Ergebnis einer solchen gelelektrophoretischen Untersuchung gezeigt.



**Abb. 3-33: Induktion der DNA-Ejektion bei dem Phagen HK620 durch Inkubation mit LPS.** Gezeigt ist ein 1%iges Agarosegel, auf dem verschiedene Proben des Phagen elektroforetisch aufgetrennt wurden, um die DNA-Ejektion zu untersuchen. Aufgetragen sind Proben, die jeweils HK620-Phagen (jeweils  $1,6 \times 10^{11}$  Pfu pro Spur) enthalten. Dabei wurden in Spur 1 lediglich Phagenpartikel aufgetragen; in Spur 2 sind Phagen zu erkennen, die mit 0,1 mg/ml DNase behandelt wurden. Bei den Proben der Spuren 3-6 handelte es sich jeweils um Phagenpartikel, die vor der Gelelektrophorese mit 1,2 mg/ml LPS aus *E. coli* H TD2158 über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Dabei wurde die DNA auf ihre DNase-Zugänglichkeit (Spur 4) und auf die Zugänglichkeit durch die Restriktionsenzyme HindIII und EcoRI getestet (Spuren 5 und 6). Zum Vergleich wurde DNA mit Guanidinium-Hydrochlorid aus Phagen extrahiert und gereinigt. Diese DNA ist in Spur 9 zu sehen und wurde zur Kontrolle ebenfalls mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI geschnitten (Spuren 7 und 8). Mit M ist der 1 kb-Marker gekennzeichnet (entsprechende Größen sind markiert). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (0,6 µg/ml im Gel) gefärbt.

Analysiert man eine Probe der Phagenpräparation mittels Gelelektrophorese erhält man zwei bis drei Banden (Spur 1, Abb. 3-33), von denen die unterste DNase-zugänglich ist (vgl. Spur 2 nach Zugabe von DNase). Diese Bande wird durch einige während der Präparation geplatze Phagen verursacht. Die DNA im Phagenkopf ist nicht zugänglich für DNase. Zudem wird

diese DNA wesentlich schlechter von Ethidiumbromid angefärbt, da diese DNA stark kondensiert ist und das Ethidiumbromid kaum in den Doppelstrang interkalieren kann.

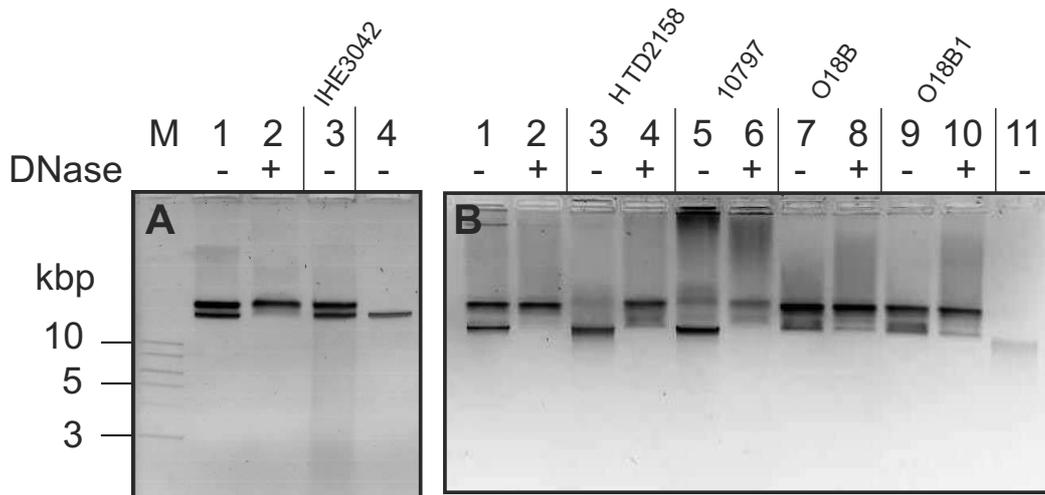
Durch Zugabe von LPS zu dem Phagen wurde die Menge an DNase-zugänglicher DNA deutlich gesteigert (untere Bande Spur 3 bzw. Spur 4 nach DNase-Zugabe). Die DNase-zugängliche DNA-Bande läuft auf der gleichen Höhe wie Kontroll-DNA, die aus Phagen präpariert wurde (Spur 9). Sowohl diese Kontroll-DNA als auch die DNA, die aus dem Phagen nach Inkubation mit LPS freigesetzt wurde, wurden durch Restriktionsenzyme in die gleichen DNA-Fragmente gespalten (vgl. die Spuren 5, 6 mit den Spuren 7, 8). Die DNA-Bande, die nach LPS-Inkubation besonders ausgeprägt ist (untere Bande Spur 3), konnte allerdings nicht komplett durch DNase oder Restriktionsenzyme verdaut werden.

#### **3.11.4. Experimente zur DNA-Ejektion mit verschiedenen LPS**

In den zuvor beschriebenen gelelektrophoretischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Ejektion von DNA aus dem Phagen HK620 lediglich durch die Anwesenheit des Wirts-LPS aus *E. coli* H TD2158 induziert werden kann. Es war daher von Interesse, ob die DNA-Ejektion zudem durch LPS aus anderen Bakterienstämmen ausgelöst werden kann, die entweder das gleiche *O*-Antigen (O18A1) oder das um eine Glucose verkürzte O18A-Antigen tragen. Das TSP wies Aktivität gegenüber LPS und PS mit den genannten *O*-Antigenen auf. *In vivo* konnte jedoch keiner der Stämme, die diese Antigene tragen, infiziert werden außer der schon beschriebene Wirts-Stamm *E. coli* H TD2158 (vgl. Abschnitt 3.11.1.)

Durch Inkubation des Phagen mit LPS aus *E. coli* IHE3042 konnte keine DNA-Ejektion induziert werden (Abb. 3-34 A). In Agarosegelen wurde das gleiche Bandenmuster beobachtet, gleich ob die Phagen zuvor mit LPS inkubiert wurden oder nicht (vgl. Spuren 1 und 3).

Weitere LPS mit verschiedenen *O*-Antigenen wurden untersucht, darunter zur Kontrolle ein weiterer *E. coli*-Stamm der *O*-Serogruppe O18A1 (DMSZ 10797). Das LPS aus diesem Stamm wurde in der Arbeit von S. Hertel charakterisiert. Dieses LPS konnte durch HK620TSP hydrolysiert werden und wies im Gegensatz zu dem LPS aus *E. coli* IHE3042 eine typische Kettenlängenverteilung auf (als *smooth* bezeichnete Bakterien) (Hertel 2011). Durch LPS dieses Stammes konnte die DNA-Ejektion induziert werden, ebenso wie durch LPS mit O18A-Antigen (nicht gezeigt). Durch Zugabe dieser LPS konnte die Menge an DNase-zugänglicher DNA erhöht werden (Spuren 5 und 6, Abb. 3-34 B). Wie zuvor auch für das Wirts-LPS beobachtet (Spuren 3 und 4, Abb. 3-34 B), konnte die DNA allerdings nicht aus allen Phagen ejiziert werden.



**Abb. 3-34: Induktion der DNA-Ejektion bei Phagen durch Inkubation mit LPS.** Gezeigt sind 1%ige Agarosegele, auf welchen Proben des HK620-Phagen (jeweils  $1,6 \times 10^{11}$  Pfu pro Spur) gelelektrophoretisch untersucht wurden. Dabei wurden auf den Spuren 1 jeweils nur Phagenpartikel aufgetragen; in den Spuren 2 sind Phagen zu erkennen, die mit 0,1 mg/ml DNase behandelt wurden. Bei den Proben der Spuren 3 bzw. 3-10 (B) handelte es sich jeweils um Phagenpartikel, die vor der Gelelektrophorese mit 1,2 mg/ml LPS über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. **A:** Es wurde LPS aus *E. coli* IHE3042 verwendet. **B:** LPS aus *E. coli* H TD2158 (3 und 4), aus einem anderen *E. coli*-Stamm der O-Serogruppe O18A1 (DSMZ 10797, 5 und 6), aus *E. coli* der O-Serogruppe O18B (DSMZ 10837, Spuren 7 und 8) und aus *E. coli* der O-Serogruppe O18B1 (DSMZ 10922, Spuren 9 und 10). Zum Vergleich wurde DNA mit Guanidinium-Hydrochlorid aus den Phagen extrahiert und gereinigt. Diese DNA ist in Spur 4 (A) bzw. 11 (B) aufgetragen. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (0,6 µg/ml im Gel) gefärbt.

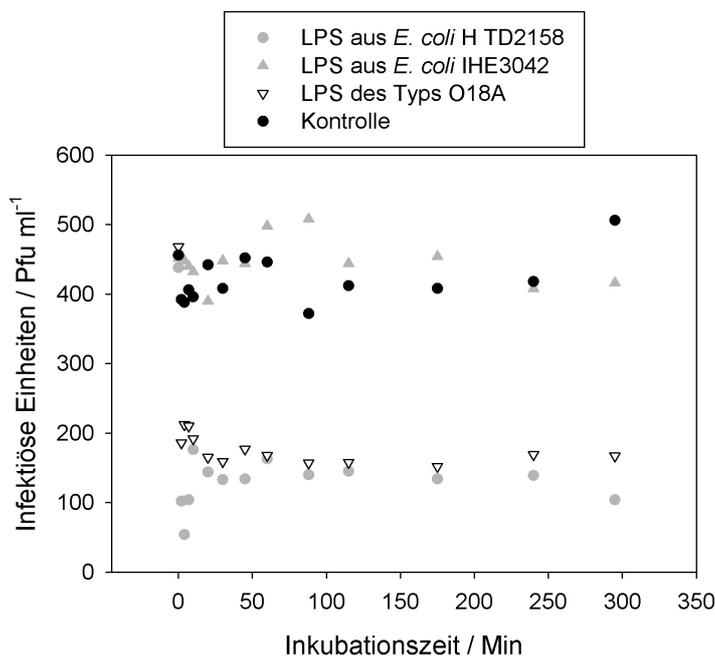
Für LPS aus Stämmen der O-Serogruppen O18B (DSMZ 10837) und O18B1 (DSMZ 10922) konnte keine Ejektion beobachtet werden (Abb. 3-34 Spuren 7-10).

### 3.11.5. Inaktivierung des Phagen HK620 durch LPS

Die Untersuchungen der DNA-Ejektion mittels Agarosegelelektrophorese waren nur ein erster qualitativer Hinweis auf die Rolle von LPS als Rezeptor, da die Ejektion und die Zugänglichkeiten der ejizierten DNA nicht vollständig waren. Eine weitere Methodik, um die Wirkung von LPS auf den Phagen zu untersuchen, waren sog. *Plating* Experimente. Dazu wurde der Phage HK620 mit LPS einiger verschiedener *E. coli*-Stämme inkubiert und anschließend auf dem Wirtstamm *E. coli* H TD2158 ausgestrichen. Durch Inkubation des Phagen P22 mit LPS aus seinem Wirtsbakterium konnte zuvor eine Inaktivierung des Phagen anhand einer abnehmenden Plaquezahl mit steigenden Inkubationszeiten beobachtet werden (Andres, Baxa *et al.* 2010).

Durch Inkubation des Phagen HK620 mit LPS aus *E. coli* H TD2158 und O18A-LPS wurde die Infektiösität des Phagen deutlich gesenkt (Abb. 3-35). Nach lediglich 5 min Inkubation mit dem Wirts-LPS waren nur noch etwa 7% der Partikel infektiös. Durch Inkubation mit LPS aus *E. coli* IHE3042 hingegen wurde die Infektiösität des Phagen HK620 nicht inhibiert. Hier

zeigte sich nahezu die gleiche Infektiösität des Phagen wie bei der Kontrolle, bei welcher der Phage ohne LPS inkubiert wurde.



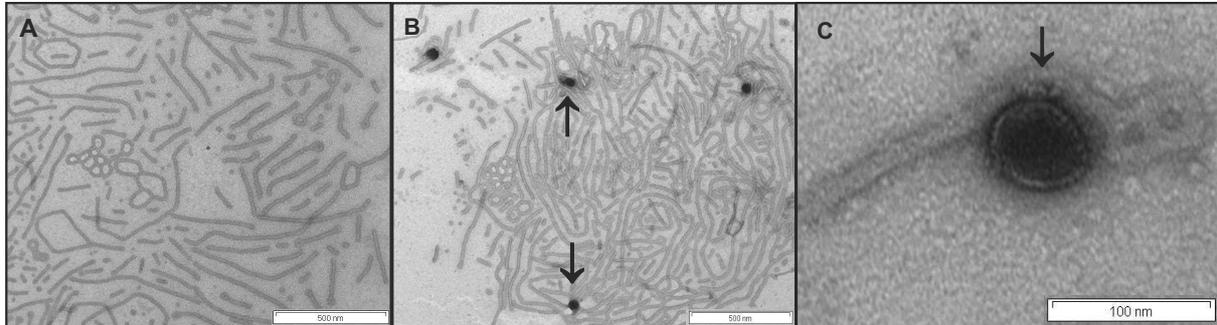
**Abb. 3-35: Inaktivierung des Phagen HK620 durch verschiedene LPS.** Phagen ( $500 \text{ Pfu ml}^{-1}$ ) wurden mit  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  LPS in 50 mM TrisHCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,6 bei 37°C inkubiert. Nach den der Abszisse zu entnehmenden Zeiten wurden Proben aus diesen Ansätzen entnommen und auf *E. coli* H TD2158 ausplatiert. Es wurden LPS aus *E. coli* H TD2158, *E. coli* IHE3042 und des Typs O18A verwendet. Zusätzlich diente ein Ansatz ohne LPS als Kontrolle.

Die Reduktion der Infektiösität des Phagen HK620 in Anwesenheit von LPS konnte anhand der Abnahme der Plaquezahl (Abb. 3-35) verfolgt werden, des Weiteren wiesen die noch vorhandenen Plaques eine andere Morphologie auf. Während normalerweise durch HK620 mehrere Ringe im Plaque zu erkennen sind (vgl. Abb. 6-3 A bzw. C und D im Anhang), die unterschiedlich klar sind, sind die Plaques nach Inkubation mit LPS kleiner und weisen nur eine Phase auf (vgl. Abb. 6-3 B und E).

### 3.11.6. Studien zur DNA-Ejektion mittels Elektronenmikroskopie

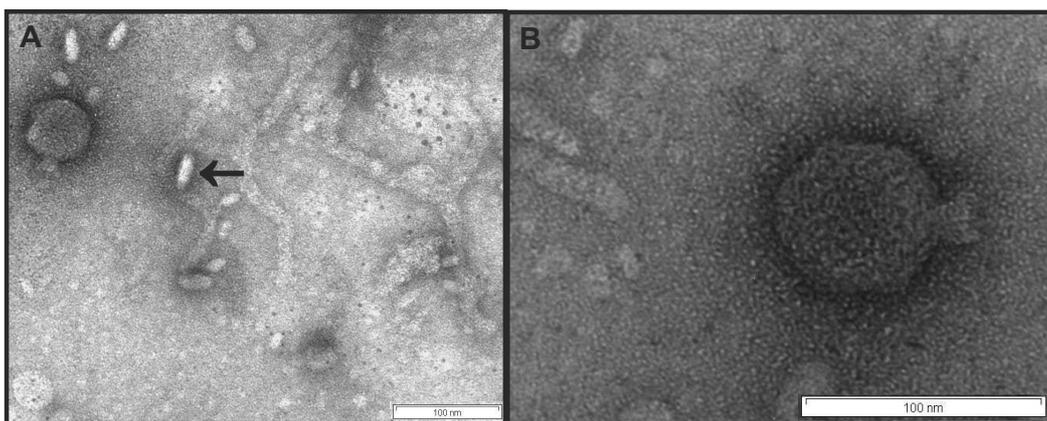
Die Bedeutung der LPS-Struktur für die Bindung als initialem Schritt der Infektion wurde mehrfach adressiert (vgl. Abschnitt 3.11.2.) Vor diesem Hintergrund war es sehr aufschlussreich, sich die Morphologie von LPS und die Wirkung dieser LPS-Strukturen auf den Phagen HK620 durch elektronenmikroskopische Aufnahmen zu vergegenwärtigen. LPS aus *E. coli* H TD2158 lag dabei in stäbchenförmigen Strukturen mit einer Breite von etwa 15-20 nm vor (Abb. 3-36 A). Die Phagen sind in Anwesenheit dieses LPS fast alle mit der Schwanzstruktur daran gebunden und haben ihre DNA ejiziert (Abb. 3-36 B und C, Aufnahmen von DNA-

gefüllten Phagen vgl. Einleitung Abb. 1-6). Bei Phagen, die ihre DNA ejiziert haben, kann der Farbstoff in das Kapsid eindringen und dieses dunkel färben (Andres, Roske *et al.* 2012). Für die Interaktion des Phagen mit LPS des Typs O18A konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (vgl. Anhang 6-4).



**Abb. 3-36: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HK620 in Anwesenheit von LPS aus *E. coli* H TD2158.**  $10^9$  Pfu/ml wurden in 50 mM TrisHCl pH 7,6, 4 mM MgCl<sub>2</sub> mit 0,1 mg/ml über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend auf Kupfernetze gegeben und in einem *negative staining* mittels Uranylacetat gefärbt. **A** zeigt reine LPS-Strukturen. Die Phagen binden mit der Schwanzstruktur an die LPS-Strukturen und haben ihre DNA ejiziert (**B** und **C**). Der Maßstab ist rechts unten gezeigt, die Länge des Balkens entspricht 500 nm (**A** und **B**) bzw. 100 nm (**C**).

LPS aus *E. coli* IHE3042 lag im Gegensatz zu dem LPS aus *E. coli* H TD2158 in unregelmäßigeren, kleinen Strukturen vor (Abb. 3-37 A, Pfeil). Das LPS aus *E. coli* IHE3042 erwies sich bereits zuvor als kurzketzig (vgl. Abschnitt 3.3.) und konnte in den Untersuchungen mittels Gelelektrophorese keine DNA-Ejektion bewirken. Dies bestätigt sich in den Untersuchungen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM), da kaum Phagen, die an die LPS-Strukturen aus IHE3042 gebunden waren, gefunden werden konnten. Zudem waren die Phagen meist noch mit DNA gefüllt (Abb. 3-37 A und B).

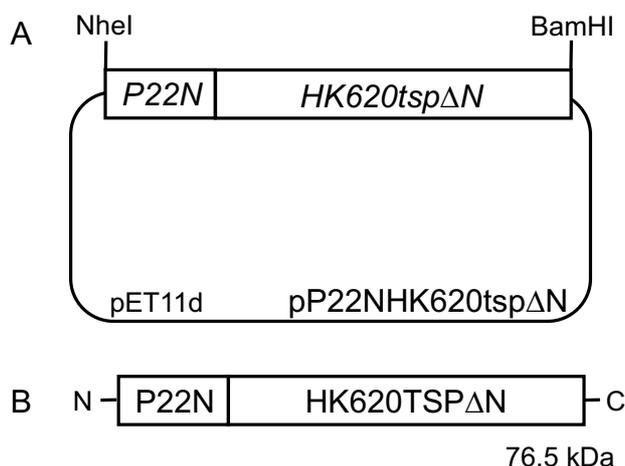


**Abb. 3-37: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Phagen HK620 in Anwesenheit von LPS aus *E. coli* IHE3042.**  $10^9$  Pfu/ml wurden in 50 mM TrisHCl pH 7,6, 4 mM MgCl<sub>2</sub> mit 0,1 mg/ml LPS aus *E. coli* IHE3042 über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend auf die Kupfernetze gegeben und in einem *negative staining* mittels Uranylacetat gefärbt. Der Maßstab ist rechts unten gezeigt, die Länge des Balkens entsprechen jeweils 100 nm.

### 3.11.7. Beeinflussung der Spezifität von Phagen

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass Erkennung und Anheftung des Phagen HK620 an LPS TSP-spezifisch sind. Vor diesem Hintergrund erschien die Fragestellung interessant, ob TSP und somit die Spezifität für bestimmte LPS zwischen verschiedenen Phagen mit ähnlichen LPS-erkennenden TSP austauschbar sind. Um einen derartigen, zu HK620 verwandten Phagen mit LPS-hydrolysierenden TSP handelt es sich bei P22. Durch den Austausch von Rezeptor-spezifischen Domänen zwischen den verwandten Phagen P22 und HK620 kann untersucht werden, ob das bisher beschriebene Ejektionsverhalten von HK620 in Anwesenheit von LPS aus *E. coli* H TD2158 auf einen anderen Phagen (P22) übertragen werden kann.

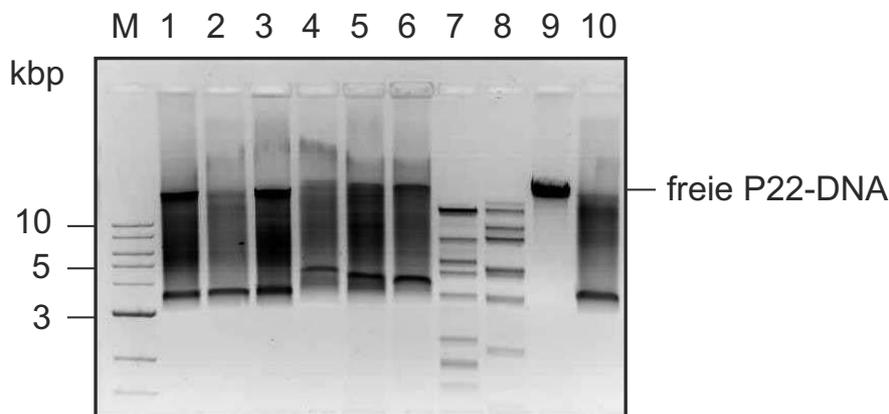
Mit Hilfe einer temperatursensitiven, lysogenen Variante des Phagen P22 in *Salmonella* Typhimurium (DB7136) ist es möglich Phagen ohne TSP (sog. Köpfe) in den Bakterien anzureichern und zu reinigen. Diese Variante des Phagen ist lysedefizient und nicht in der Lage TSP zu produzieren (vgl. Methoden 2.2.7.). Es konnten P22-Köpfe gereinigt werden, an welche anschließend *in vitro* TSP angeheftet werden können (Israel *et al.* 1967; Andres, Hanke *et al.* 2010). Durch Verwendung eines TSP, das die Anheftungsdomäne aus P22 und die Kohlenhydratbinde-Domäne aus HK620 enthält (Chimär, Abb. 3-36, vgl. Abschnitt 1.3.1. und 1.4.), wurde versucht, die Spezifität der P22-Phagen zu ändern. Dieses Chimär wurde durch sogenanntes *splicing by overlap extension* (SOE) kloniert und konnte erfolgreich unter etablierten Bedingungen exprimiert und gereinigt werden (vgl. Methoden 2.2.2.2.).



**Abb. 3-38:** Schematische Darstellung des Konstrukts (A) zur Expression des Chimärs aus N-terminaler Domäne aus P22 (P22N) und C-terminaler Domäne aus HK620 (HK620TSPΔN) (B). Das Konstrukt wurde über *splicing by overlap extension* kloniert (vgl. Methoden 2.2.2.2.).

Aufgrund der hohen Sequenzidentität in der N-terminalen Bindedomäne (Casjens & Thuman-Commike 2011) konnten an die P22-Köpfe sowohl Volllängen-TSP aus HK620 als auch das neu generierte Chimär-TSP angeheftet werden. Im Folgenden sind Ergebnisse für den Hybrid-

Phagen mit angeheftetem Chimär gezeigt, da die korrekte Assemblierung bei dieser Variante wahrscheinlicher ist. *In vivo* konnte die Infektiosität dieser Phagen nicht studiert werden, da die P22-Köpfe lysedefizient sind. Somit können sie die Bakterien selbst nach erfolgreicher Infektion nicht verlassen und es kann keine Plaque-Bildung beobachtet werden. Für die Studien der Auswirkung von Variationen im P22TSP *in vivo* wird ein sog. Amber Suppressor Bakterienstamm verwendet, bei dem eine tRNA transkribiert wird, welche die Fähigkeiten der Lyse wiederherstellt (Andres, Hanke *et al.* 2010). Ein derartig modifizierter *E. coli* H TD2158 Stamm lag nicht vor. Daher wurde *in vitro* getestet, ob die Spezifität des Phagen P22 durch Anheften der kohlenhydratbindenden Domäne aus HK620TSP beeinflusst werden konnte. In Abbildung 3-39 ist ein Ergebnis der Untersuchungen für den Hybrid-Phagen mittels Agarose-Gelelektrophorese gezeigt.



**Abb. 3-39: Induktion der DNA-Ejektion bei Hybrid-Phagen (P22-Köpfe mit Chimär-TSP) durch Inkubation mit LPS.** Gezeigt ist ein 1%iges Agarosegel, auf dem Proben mit Hybrid-Phagen (jeweils  $1,6 \times 10^{11}$  Partikel pro Spur) gelelektrophoretisch untersucht wurden. Dabei wurden auf der Spur 1 nur Phagenpartikel aufgetragen; in der Spur 2 sind Phagen zu erkennen, die mit 0,1 mg/ml DNase behandelt wurden. Bei den Proben der Spuren 3-6 handelt es sich jeweils um Phagenpartikel, die vor der Gelelektrophorese mit 1,2 mg/ml LPS aus *E. coli* H TD2158 bei 37°C über Nacht inkubiert wurden. Dabei wurde in Spur 4 anschließend auf DNase-Zugänglichkeit getestet und in den Spuren 5 und 6 wurde mit 10 U Restriktionsenzymen (AvaI und ClaI) verdaut. Zum Vergleich wurde DNA mit Guanidinium-Hydrochlorid aus den Phagen extrahiert und gereinigt. Diese DNA ist in Spur 9 aufgetragen und in den Spuren 7 und 8 mit AvaI und ClaI verdaut. In Spur 10 wurde zum Vergleich der Phage mit LPS aus *Salmonella* Typhimurium inkubiert und anschließend mit DNase behandelt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid (0,6 µg/ml im Gel) gefärbt.

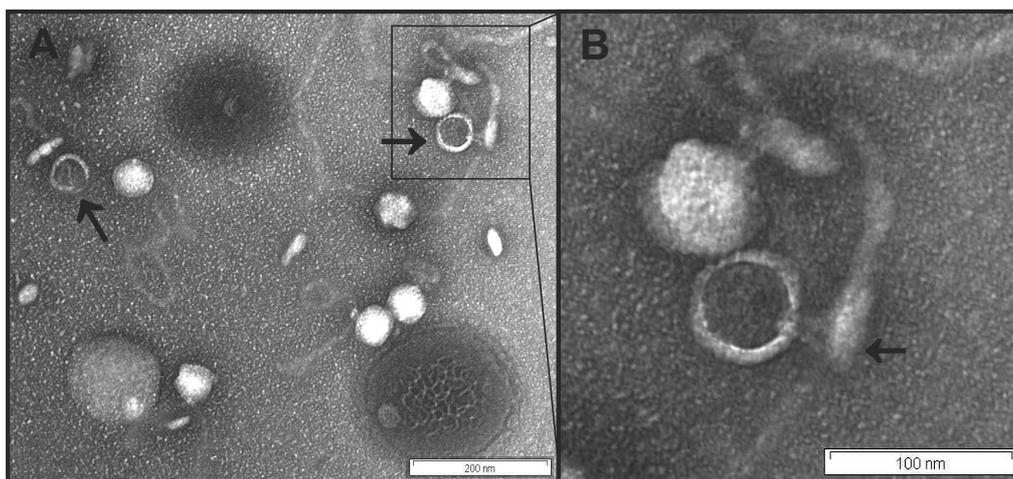
Intakter P22-Phage weist eine deutlich höhere Mobilität im Agarosegel auf als intakter HK620-Phage (vgl. Abb. 3-39 mit 3-33). Bei Präparationen des Hybrid-Phagen bzw. des Phagen P22 (Andres *et al.* 2010) zeichnen sich durch zwei distinkte Banden im Agarosegel aus (Spur 1). Davon entsteht eine aufgrund von geplatzen Phagen; es handelt sich somit um freie DNA, die zugänglich für DNase ist (vgl. Spur 1 mit 2). Diese freie DNA (Spur 9 zeigt präparierte Phagen-DNA) läuft aufgrund einer ähnlichen Genomgröße auf einer vergleichbaren Höhe wie die präparierte DNA aus HK620 (vgl. Abb. 3-33). Auffällig ist die starke undefinierte Färbung zwischen den distinkten Banden. Die Bande an intakten Phagen (die

DNA im Kapsid ist nicht DNase-zugänglich) von P22 bzw. der Hybride läuft auf einer Höhe zwischen der Marker-DNA von 3 bzw. 4 kbp.

Durch Inkubation mit LPS konnte keine DNA-Ejektion bewirkt werden: Die Menge an freier DNA ändert sich nicht in Anwesenheit von LPS (vgl. oberste Bande Spuren 1 und 3). Allerdings wurde das Laufverhalten der Phagen-DNA durch Inkubation mit dem *E. coli*-LPS und anschließendem Verdau durch DNase oder Restriktionsenzyme verändert (Spuren 4-6). Durch Inkubation mit Salmonella-LPS und anschließendem DNase-Verdau änderte sich das Laufverhalten nicht (vgl. Spuren 2 und 10).

### 3.11.8. Untersuchung der Hybrid-Phagen mittels TEM

In den DNA-Ejektionsexperimenten mittels Agarose-Gelelektrophorese konnte bei dem modifizierten Hybrid-Phagen (P22-Köpfe mit Chimär-TSP) keine DNA-Ejektion induziert werden. In Aufnahmen mittels TEM wurden die Phagen nach Inkubation mit LPS aus *E. coli* H TD2158 hauptsächlich an dieses gebunden vorgefunden (Abb. 3-40). Das LPS bildet lange stäbchenförmige Strukturen mit einer Breite von etwa 15-20 nm (vgl. 3-36 A). Bei den Chimär-Phagen sind Schwanzstrukturen zu erkennen, die an evtl. eher leicht verdickte Strukturen des LPS (20-25 nm) aus *E. coli* H TD2158 binden (Abb. 3-40 B). Leere Phagenkapside, die sich durch eine dunkle Färbung auszeichnen, waren in etwa 30% der Hybrid-Phagenkapside nach Inkubation mit LPS aus *E. coli* H TD2158 zu finden (Abb. 3-40 A).



**Abb. 3-40: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Hybrid-Phagen (P22-Köpfe mit gebundenem Chimär-TSP) in Anwesenheit von LPS aus *E. coli* H TD2158.**  $10^{10}$  Partikel/ml wurden in 50 mM TrisHCl pH 7,6, 4 mM  $MgCl_2$  mit 0,1 mg/ml LPS aus *E. coli* H TD2158 über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend auf die Kupfernetze gegeben und in einem *negative staining* mittels Uranylacetat gefärbt. Nach Inkubation mit LPS sind wenige leere Phagenköpfe zu erkennen (A, Pfeile). Der Maßstab ist rechts unten gezeigt, die Länge des Balkens entspricht 200 nm (A) bzw. 100 nm (B).

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Reinigung von Tailspike Protein-Varianten

In der vorliegenden Dissertation wurde N-terminal verkürztes TSP aus dem Phagen HK620 nach etabliertem Protokoll exprimiert und ohne Affinitäts-*tags* gereinigt (Barbirz 2005; Barbirz *et al.* 2008). Zudem wurden diverse Varianten des aktiven Zentrums sowie eine Deletionsvariante (E372Q/ $\Delta$ 471-2) generiert und ebenfalls erfolgreich exprimiert. Bei TSP handelt es sich um sehr stabile Proteine, was die Reinigung erleichtert und auch eine Reinigung im hohen Maßstab ermöglicht (Barbirz *et al.* 2009). Es konnten Ausbeuten zwischen 10 mg und 50 mg je Liter Expressionskultur erzielt werden. Die höheren Reinigungsausbeuten wurden durch zwei Optimierungen im Vergleich zu den zuvor etablierten Bedingungen erzielt: Zum einen wurden die TSP-Varianten in Autoinduktionsmedium (Studier 2005) anstelle von herkömmlichem LB-Medium exprimiert. Dieses Medium liefert sehr gute Wachstumsbedingungen für die Bakterien und induziert die Expression über den Nährstoffverbrauch zum optimalen Zeitpunkt.

Die zweite Optimierung bestand in einer zweiten Ammoniumsulfat-Fällung nach Aufschluss der Bakterien. In dem herkömmlichen Reinigungsprotokoll wurden HK620TSP sowie einige andere Proteine zunächst bei 35% Ammoniumsulfat aus dem Bakterienlysat gefällt. Danach wurde das Protein chromatographisch weitergehend gereinigt. Es erwies sich als vorteilhaft, das Protein nach erster Anreicherung aus dem Lysat durch Fällung mit 35% Ammoniumsulfat einer zweiten Fällung bei 0,5 M Ammoniumsulfat (11,6%) zu unterziehen. Bei dieser Menge an Ammoniumsulfat fiel fast nur HK620TSP aus, so dass viele Verunreinigungen abgetrennt wurden, dadurch konnte auf den letzten Chromatographieschritt (Größenausschlusschromatographie) verzichtet werden.

Bei der Reinigung der TSP $\Delta$ N-Varianten konnte eine Spezies nicht abgetrennt werden, die in der SDS-PAGE als dünne Bande unterhalb des nativen, trimeren TSP zu erkennen war (vgl. Abb. 3-2). Nach Erhitzen der Proben konnte nur noch eine Bande von monomeren HK620TSP-Varianten mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich handelt es sich somit bei der zweiten Bande, die ohne Erhitzen der Proben knapp unter dem nativen Trimer zu erkennen ist (vgl. Abb. 3-2), nicht um Fremdprotein, sondern um eine zweite TSP-Spezies, die in einer anderen Form (Intermediat, gebundene Ionen) vorliegt.

Als einziges Volllängen-TSP wurde eine Chimär-Variante mit N-terminaler Kapsidbinde-Domäne aus P22 und C-terminaler kohlenhydratbindenden Domäne aus HK620 gereinigt. Trotz ähnlicher Stabilität werden die Volllängen-TSP schlechter exprimiert und lassen sich schlechter reinigen (Ausbeute: 5 mg je Liter Expressionskultur).

## **4.2. Die Reinigung von Kohlenhydraten**

Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung der Bindung komplexer Kohlenhydrate durch TSP aus dem Coliphagen HK620. Dafür wurden polymere Kohlenhydrate (PS und LPS) aus *E. coli* isoliert und gereinigt. Anschließend wurden diese polymeren Strukturen mit Hilfe der enzymatischen Aktivität von HK620TSP in Oligosaccharide zerlegt. Die Herstellung dieser Oligosaccharide durch organische Synthese stellt momentan aufgrund ihrer Komplexität keine Alternative dar. Aufgrund der komplexen Schutzgruppen-Chemie, die für die Synthese des Hexasaccharids des Typs O18A1 notwendig wäre, wäre die Synthese trotz der großen Erfolge in der Festphasensynthese von Kohlenhydraten in den letzten Jahren (Seeberger 2008; Weishaupt *et al.* 2010) zu langwierig bzw. kostenintensiv gewesen (persönliche Mitteilung M. Lahmann bzw. Ancora Pharmaceuticals).

Als Problem bei der Reinigung erwies sich, dass LPS ein heterogenes Polymer ist und seine Synthese in der Bakterie stark durch äußere Faktoren beeinflusst wird, da LPS eine Barriere zum Schutz der Bakterien vor der Umgebung darstellt (Allende & Thomas J McIntosh 2003). So kann sich z.B. die Länge bzw. Menge an O-Antigen-PS durch bestimmte Faktoren wie Eisenmangel ändern oder das *core*-Saccharid kann durch Änderung des Expressionslevels der Synthesenzyme modifiziert oder verkürzt werden (Bravo *et al.* 2008; Frirdich *et al.* 2003). Des Weiteren können z.B. durch lysogene Konversion Modifikationen wie Acetylierungen, Glucosilierungen oder Sialanylierungen im LPS vorliegen (Seltmann & Holst 2001; Gamian *et al.* 1994; Lerouge & Vanderleyden 2002; Barksdale & Arden 1974).

Aufgrund der Herkunft der Oligosaccharide aus unterschiedlichen Stämmen und der teilweise beobachteten Hygroskopie (vgl. Abschnitt 3.4.) wurden die Konzentrationen der Oligosaccharid-Stammlösungen für die Bindungsstudien zur Standardisierung durch die Bestimmung der Konzentrationen an reduzierenden Enden sowie durch NMR mit einem internen Standard, DSS (4,4 Dimethyl -4 Silapentan-1-Sulfonsäure), verifiziert (vgl. Abb. 6-1 im Anhang).

#### **4.2.1. Die Reinigung von Kohlenhydraten aus *E. coli* H TD2158**

Der Stamm *E. coli* H TD2158, auf dem der Phage HK620 propagiert werden kann (Dhillon *et al.* 1998), wies Heterogenitäten im O-Antigen auf. Diese Modifikationen wurden in der Arbeit von C. Uetrecht 2006 mittels MALDI-MS nachgewiesen und im Zuge dieser Doktorarbeit bestätigt. In Kooperation mit Göran Widmalm (Universität Stockholm) wurden diese Heterogenitäten mittels NMR genauer untersucht und die von C. Uetrecht postulierten Modifikationen beobachtet. Die Verknüpfungen bleiben in diesen Modifikationen erhalten und es zeigte sich, dass das Polysaccharid in etwa 50% der Fälle in der Seitenkette anstelle des N-Acetylglucosamins eine Glucose trägt (O18A2, vgl. Ergebnisse Abb. 3-6, Zaccheus *et al.* 2012). Bei den gereinigten Oligosacchariden zeigte sich im Vergleich bei einer repetitiven Einheit der geringste Grad an Modifikationen in den massenspektrometrischen Untersuchungen (vgl. Ergebnisse Tab. 3-1). Durch die NMR-Studien ließen sich 10% des Hexasaccharids als O18A2-Modifikation quantifizieren.

Es erwies sich als problematisch die verschiedenen Oligosaccharide aus *E. coli* H TD2158 voneinander zu trennen, um homogenes Material für Bindungsstudien zu generieren. Eine Trennung war prinzipiell mit Hilfe eines starken Anionentauschers (HPAEC) möglich, aber aufgrund des deutlich zu hohen Materialverlusts durch HPAEC und anschließende Entsalzung, war diese Methode nicht praktikabel. Stattdessen wurde ein anderer *E. coli*-Stamm (IHE3042) als Quelle für O18A1-Oligosaccharide verwendet.

#### **4.2.2. Die Reinigung von Kohlenhydraten aus *E. coli* IHE3042**

Das O-Antigen des Stammes *E. coli* IHE3042 wurde durch Jann und Mitarbeiter 1992 charakterisiert und bot sich daher als Stamm zur Synthese von O18A1-Oligosacchariden an. Aus diesem Stamm konnten Oligosaccharide des Typs O18A1 ohne Auftreten von Modifikationen erhalten werden. Zur Synthese der PS und LPS wurden die Bakterien dafür bei 18°C kultiviert, da sie über 20°C ein Kapselpolysaccharid (K5, Achtman *et al.* 1983) exprimieren, welches die PS- bzw. LPS-Reinigung erheblich stört. Orskov und Mitarbeiter veröffentlichten 1984, dass 28 Kapselpolysaccharide in *E. coli* darunter K5 erst bei Temperaturen über 20°C exprimiert werden (F. Orskov *et al.* 1984).

LPS aus diesem Bakterienstamm (IHE3042) erwies sich als *semi-rough*, was bedeutet, dass viele kurze LPS-Ketten mit gar keinem O-Antigen oder nur wenigen repetitiven Einheit vorhanden sind. Dies wurde durch Analysen mittels SDS-PAGE (vgl. Abb. 3-7) gezeigt. Zudem wurde mittels dynamischer Lichtstreuung ein leicht verringerter Stokes Radius für

LPS aus IHE3042 (29 nm) im Vergleich zu LPS aus H TD2158 (37 nm) bestimmt. In der Elektronenmikroskopie lagen im Falle von IHE3042-LPS kleinere Strukturen als für das Wirts-LPS vor (vgl. Abschnitt 3.4. und 3.11.7.).

Diese Größenverteilung im LPS aus *E. coli* IHE3942 erschwerte die Reinigung ausreichend großer Mengen an PS (höchste erreichte Ausbeute 16 mg je Liter Bakterienkultur) und an daraus hergestellten Oligosacchariden. In den Arbeiten mit dem Phagen HK620 wurden die Bakterien darauf hin untersucht, ob ein Prophage aus dem Lysogen induziert werden kann. In dem Stamm *E. coli* IHE3042 konnte mit Hilfe von Carbadox mindestens ein Prophage induziert werden (Köhler *et al.* 2000; Barksdale & Arden 1974, vgl. Abb. 3-32). Bisher ist unbekannt, um welche Prophagen es sich handelt. Durch Reinigung der Phagen nach Induktion und anschließende Sequenzierung wäre eine Identifizierung möglich. Die geringe Kettenlänge des LPS aus *E. coli* IHE3042 könnte durch lysogene Konversion nach Infektion mit diesem, unbekanntem Phagen entstanden sein. Lysogene Konversion führte z.B. nach Infektion durch den Bakteriophagen P1 zu einer Reduktion der LPS-Länge in seinem *E. coli*-Wirt (Tomás & Kay 1984). Ebenso könnten die Heterogenitäten im O-Antigen von *E. coli* H TD2158 Resultat lysogener Konversion sein. Innerhalb dieser Arbeit konnten jedoch keine Prophagen durch Carbadox aus diesem Stamm induziert werden, obwohl die Induktion mehrerer Prophagen mittels UV-Licht beschrieben ist (Dhillon *et al.* 1998). Prinzipiell können durch Prophagen im Lysogen Modifikationen wie Acetylierungen und Glucosylierung eingeführt werden und Serotyp-Konversionen wie nach Infektion von *Salmonella* durch den Phagen  $\epsilon$ 15 können stattfinden (Uetake *et al.* 1955; Barksdale & Arden 1974; Kropinski *et al.* 2007).

#### **4.2.3. Die Reinigung von Kohlenhydraten des Antigentyps O18A**

Die Reinigung der Oligosaccharide des Typs O18A war deutlich weniger problematisch als die zuvor beschriebenen Reinigungen der O18A1-Oligosaccharide. Die Reinigung von LPS und PS aus dem Stamm 10809 (DMSZ) erbrachte ohne weitere Optimierungen hohe Ausbeuten (80 mg je Liter Bakterienkultur). Dadurch konnten schneller Oligosaccharide dieses Typs im Milligramm-Maßstab gereinigt werden. Die Ausbeuten waren hier deutlich besser als bei der zuvor beschriebenen Reinigung aus *E. coli* IHE3042 aufgrund der längeren O-Antigen-Ketten im O18A-LPS (vgl. Abb. 3-7 und 3-22, Stamm 10809).

### **4.3. Spezifität und Aktivität von TSP aus dem Phagen HK620**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass TSP aus dem Phagen HK620 nicht ausschließlich für O18A1-Oligosaccharide spezifisch ist. HK620TSP kann Oligosaccharide des Typs O18A binden und längere Saccharide dieses Typs mit einer ähnlichen Aktivität im Vergleich zum Verdau von O18A1-PS spalten (vgl. Abb. 3-23).

In massenspektrometrischen Messungen wurden bereits beschriebene Heterogenitäten in den Oligosacchariden aus *E. coli* H TD2158 gefunden. In NMR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Lösung von Hexasaccharid aus *E. coli* H TD2158 dabei die Modifikation O18A2 zu einem Anteil von etwa 10% enthält (Zaccheus *et al.* 2012). Im PS waren hingegen etwa 50% dieser Modifikationen zu finden. Das legt die Vermutung nahe, dass das O18A1-Antigen im Vergleich zu O18A2 bevorzugt durch HK620TSP gebunden wird. Dies könnte damit begründet werden, dass durch Modifikation des N-Acetylglucosamins zu einer Glucose in der Seitenkette das Wasserstoffbrücken-Netzwerk gestört wird (siehe Anhang Abb. 6-5).

In der Hexasaccharid-Lösung aus *E. coli* IHE3042 konnten entsprechende Modifikationen weder in massenspektrometrischen Messungen noch in NMR-Experimenten zur Quantifizierung nachgewiesen werden. In verschiedenen Experimenten wurde die Bindung durch TSP-Varianten mit Oligosaccharid-Lösungen aus den Stämmen *E. coli* H TD2158 und IHE3042 untersucht. Das heterogene Material aus *E. coli* H TD2158 wurde dabei geringfügig schlechter von HK620TSP-Varianten gebunden, was dadurch begründet werden kann, dass in der Hexasaccharid-Präparation 10% als O18A2 modifiziert vorlagen (Zaccheus *et al.* 2012) und somit apparent zu niedrige Dissoziationskonstanten gemessen wurden (vgl. Abschnitt 3.6.4.).

Die Varianten O18B und O18B1, die jeweils eine glykosidische Bindung mit einer anderen Verknüpfung als in O18A1 und O18A in der Hauptkette aufweisen (Jann *et al.* 1992), konnten von HK620TSP nicht erkannt werden (vgl. Abschnitt 3.8.1./2.). Das TSP aus dem Phagen HK620 toleriert also das Fehlen der Glucose in der Seitenkette (O18A-Antigen), während es Indizien dafür gibt, dass Modifikationen des N-Acetylglucosamins zu einer Glucose an der anderen Seitenkette oder eine andere Verknüpfung in der Hauptkette ( $\alpha$ 1-3 statt  $\alpha$ 1-2) nicht toleriert werden. Durch Modifikation des PS mit Hilfe einer N-Acetylglucosaminidase soll in weiterführenden Arbeiten getestet werden, wie sich das Fehlen des N-Acetylglucosamins, der zweite Rest in der Seitenkette, auf die Bindung und Aktivität von HK620TSP auswirkt.

Gegenüber den PS aus *E. coli* H TD2158 ( $21,1 \pm 3,6 \mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{s}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{TSP}}^{-1}$ ) und des Typs O18A ( $29,1 \pm 5,9 \mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{s}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{TSP}}^{-1}$ ) konnten ähnliche Umsatzraten mit Hilfe des Nachweises reduzierender Enden durch DNSA für HK620TSP ermittelt werden. Die Umsatzrate gegenüber dem PS aus *E. coli* IHE3042 ( $13,5 \pm 3,4 \mu\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{s}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{TSP}}^{-1}$ ) war leicht reduziert und aufgrund der verkürzten PS-Ketten wurde früher eine Sättigung erreicht (vgl. Abb. 3-24). Die Sensitivität dieser DNSA-Messung ist recht gering und zudem ist aufgrund der undefinierten, polymeren Substrate unterschiedlicher Herkunft keine Vergleichbarkeit gegeben. Daher wären Messungen der Aktivität mit Bestimmungen von Michaelis-Menten-Konstanten wünschenswert. Dies wäre durch die Analyse des Verdaus fluoreszenzmarkierter Oligosaccharide (zwei repetitive Einheiten) möglich. Analoges wurde für P22TSP gemessen (Baxa *et al.* 1996). Die Markierung längerer Oligosaccharide des Typs O18A1 nach dem Protokoll, welches für die Markierung der Substrate von P22TSP durch 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) etabliert wurde, blieb bislang ohne Erfolg (Kurtzke 2009). Ursache dafür war die Reaktionsträgheit des N-Acetylglucosamins am reduzierenden Ende, die in zukünftigen Arbeiten durch Markierung mit 8-Aminonaphthalen-1,3,6-Trisulfonat (ANTS) überwunden werden soll (Breadmore *et al.* 2011).

Bezüglich der qualitativ beobachteten Aktivität von HK620TSP gegenüber LPS bleibt zu erwähnen, dass das TSP dieses nicht komplett hydrolysieren kann. Analoges wurde auch für P22TSP und TSP aus dem *Shigella*-Phagen Sf6 beobachtet (Andres, Hanke *et al.* 2010). Nach Hydrolyse durch diese TSP bleibt jeweils eine relativ definierte Anzahl an repetitiven O-Antigen-Einheiten am LPS erhalten. Dies soll in Abschnitt 4.7.2. ausführlicher diskutiert werden.

### 4.3.1. Generierung inaktiver TSP-Varianten

Als Bestandteil dieser Arbeit wurden verschiedene Hydrolyse-defiziente bzw. inaktive TSP-Varianten durch Aminosäureaustausche am aktiven Zentrum generiert, exprimiert und gereinigt. Das aktive Zentrum wurde in der vorangegangenen Arbeit von C. Uetrecht durch die geringe Aktivität von zwei Variationen von HK620TSP (E372Q und D339N) identifiziert. Diese typische Anordnung des aktiven Zentrums weist mit einem Abstand von 6 Å zwischen den beiden sauren Aminosäuren (D339, E372) auf einen Mechanismus hin, bei dem während der Hydrolyse die Konfiguration beibehalten wird (Davies & Henrissat 1995).

In dieser Arbeit wurden die neu generierten Varianten D339A, E372A, D339N/E372Q, D339N/E372A, D339A/E372Q, D339A/E372A sowie die zuvor teilweise untersuchten Vari-

anten E372Q, D339N und der Wt untersucht. Alle Varianten von HK620TSP wiesen dabei nur geringe Aktivitäten gegenüber PS und LPS auf. Gegenüber LPS wurde die Aktivität dabei nur qualitativ betrachtet. Die Messungen der Aktivitäten gegenüber PS ergaben eine Reduktion der Aktivität um einen Faktor bis zu 500 für die am aktiven Zentrum veränderten Varianten. Wie bereits erwähnt ist die Sensitivität dieser Messungen von reduzierenden Enden mit Hilfe von DNSA relativ gering, weshalb zukünftig Bestimmungen von Michaelis-Menten-Konstanten anhand des Verbaus von fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden in Analogie zu Versuchen mit P22TSP erzielt werden sollen (Baxa *et al.* 1996).

In den Messungen der Aktivität gegenüber LPS konnte bei den verschiedenen Hydrolyse-defizienten Varianten von HK620TSP die Bildung hochmolekularer Komplexe im SDS-Gel detektiert werden (vgl. Abb. 3-9). Bei allen Varianten zeigten sich diese Komplexe, deren Bildung umso ausgeprägter war, je geringer die Aktivität der entsprechenden Variante zu sein schien (vgl. Abb. 6-2 im Anhang). Es wurde in der Literatur über die Rolle der enzymatischen Aktivität gegenüber LPS durch TSP für manche Phagen diskutiert. Als mögliche Gründe für die Notwendigkeit dieser Aktivität anhand des Beispiels des P22-Phagen wurde gezeigt, dass TSP das PS des LPS hydrolysiert und somit die Phagen zur Membran geführt werden (Andres, Hanke *et al.* 2010). Zudem könnten in Analogie zu dem Influenza Typ A Virus durch die hydrolytische Aktivität neue Phagen während der Lyse von Wirtszellwandfragmenten gelöst werden (C. Liu *et al.* 1995). Es kann des Weiteren an dieser Stelle für HK620 nicht ausgeschlossen werden, dass diese Hydrolyse die laterale Bewegung zu einem sekundären Rezeptor erlaubt (Baxa *et al.* 1996; Baxa *et al.* 2001). Für den Phagen P22 konnte inzwischen gezeigt werden, dass kein sekundärer Rezeptor neben dem LPS notwendig ist (Andres, Hanke *et al.* 2010). Untersuchungen mit dem Phagen HK620 bezüglich der Infektion werden in Abschnitt 4.7. diskutiert. Die beschriebene Komplexbildung der inaktiven HK620TSP-Varianten zeigt, dass die TSP ohne enzymatische Aktivität kaum vom LPS dissoziieren würden und somit der Phage weder einen potentiellen sekundären Rezeptor noch die Membran erreichen würde, um die DNA in den Wirt zu injizieren, sondern im LPS hängen bliebe.

#### **4.4. Die Kohlenhydratbindung durch HK620TSP**

Das kohlenhydratbindende System des TSP aus dem Phagen HK620 sollte genutzt werden, um Faktoren für Interaktionen von Proteinen mit Oligosacchariden und Triebkräfte dieser Wechselwirkungen zu untersuchen. Das System kann als neues Modellsystem dienen, da es

Eigenschaften besitzt, die es von bisher bekannten Systemen wie z.B. Lektinen unterscheidet. HK620TSP besitzt hydrolytische Aktivität gegenüber längeren Oligosacchariden und bindet komplexe Oligosaccharide spezifisch über ein stark ausgedehntes Wasserstoffbrücken-Netzwerk. Diese große Interaktionsfläche bietet gute Möglichkeiten für Bindungsstudien. Kohlenhydrate sind Grundlage für viele Mechanismen der Zell-Erkennung und Zell-Adhäsion wie bei der Befruchtung, im Immunsystem, bei der Zell-Differenzierung und in der Pathogen-Wirt-Erkennung (Töpfer-Petersen 1999; Crocker *et al.* 2007; Varki 2007; Lentz 1990). Dadurch und aufgrund der Tatsache, dass Krankheiten wie Krebs und chronische Entzündungen mit einer Änderung der Glykosylierung einhergehen (Dube & Bertozzi 2005), sind Kohlenhydratstrukturen als Ansatzpunkt zur Herstellung von Impfstoffen interessant (Hecht *et al.* 2009; Westerlind & Kunz 2011). Entsprechend werden Daten, die zum Verständnis von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen beitragen, helfen, Impfstoffe zu generieren und Bindungsverhalten vorherzusagen zu können. Gerade die Vorhersagen für solche Interaktionen erweisen sich bislang vor allem aufgrund von zu geringen Mengen an experimentellen Daten als problematisch (Shionyu-Mitsuyama *et al.* 2003; Taroni *et al.* 2000; Kerzmann *et al.* 2006). In dieser Arbeit konnten Aspekte der Kohlenhydratbindung durch das TSP aus dem Bakteriophagen HK620 näher untersucht werden. HK620TSP stellt aufgrund des robusten Proteingerüsts, das Variationen in der Aminosäuresequenz und sogar Deletionen toleriert, ein ausgezeichnetes Modellsystem dar (vgl. Abschnitt 4.1.). Zudem besteht eine gewisse Toleranz gegenüber Modifikationen im Kohlenhydrat-Ligand, die es erlaubte, die Bindung verschiedener Oligosaccharide an HK620TSP zu studieren.

#### **4.4.1. Affinitätssteigerung durch einzelne Aminosäureaustausche**

Die Bindungseigenschaften von HK620TSP wurden anhand von Interaktionen des N-terminal verkürzten TSP mit isolierten Oligosacchariden definierter Größe analysiert. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren konnten die Bindungseigenschaften von HK620TSP gravierend beeinflusst werden. So besitzt der Wt eine relativ schwache Affinität gegenüber Oligosacchariden des Antigentyps O18A1 ( $K_D(\text{Wt}) \approx 100 \mu\text{M}$ ). Durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure im aktiven Zentrum kann die Affinität um einen Faktor 500 erhöht werden (z.B.  $K_D(\text{E372Q}) \approx 0,2 \mu\text{M}$ , vgl. Abschnitt 3.6. und Uetrecht 2006).

Ein komplettes Verständnis dieser Affinitätssteigerung durch einzelne Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum konnte bislang nicht erlangt werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass

der Austausch von Aminosäuren am Rest E372 die Affinität von HK620TSP stärker beeinflusst als am zweiten Rest D339 des aktiven Zentrums (vgl. Abschnitt 3.6.).

Eine Analyse von Kokristallstrukturen ergab mit einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke (vgl. Abschnitt 3.7.1.) für eine der hochaffinen Varianten (E372Q) im Vergleich zu dem Wt lediglich kleine Unterschiede, die eine fast tausendfache Affinitätssteigerung nicht begründen können. In der erst kürzlich von U. Gohlke gelösten, ligandenfreien Struktur der Variante E372Q (E372Q<sub>ligandenfrei</sub>) sind einige Aminosäuren (Gln372, Tyr344, His374) im Vergleich zum Wt<sub>ligandenfrei</sub> verschoben und koordinieren zwei Wassermoleküle. Durch die Bindung des Hexasaccharids an Variante E372Q drehen sich diese Reste und verdrängen dabei diese Wassermoleküle (vgl. Abschnitt 3.7.2.). Das könnte Grundlage der erhöhten Affinität sein, eine detaillierte Analyse des Wasser-Netzwerkes konnte jedoch aufgrund der schlechter aufgelösten Struktur von E372Q<sub>ligandenfrei</sub> nicht durchgeführt werden. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Kokristallstrukturen konnte lediglich eine geringe Anzahl an Wassermolekülen aufgelöst werden ( $H_2O(E372Q_{\text{ligandenfrei}}) = 337$  vs.  $H_2O(E372Q_{\text{Komplex}}) = 687$ ).

Die Struktur von E372Q<sub>ligandenfrei</sub> stützt jedoch die Vermutung, dass die verschiedenen Varianten vor der Kohlenhydratbindung unterschiedlich hydratisiert vorliegen könnten, was Unterschiede bezüglich der Wasserverdrängung durch den Zucker hervorrufen könnte. Für ein tieferes Verständnis müssen genauere Analysen der Wasser-Netzwerke in den verschiedenen Varianten durchgeführt werden. Zumal bestimmte Wassermoleküle z.B. am Rückgrat des Proteins ungünstig sind und ihre Verdrängung energetisch vorteilhaft und Affinitäts-steigernd ist (Beuming *et al.* 2012). Zudem könnten Strukturen unter verschiedenen Lösungsmittel-Bedingungen weitere Aufschlüsse über die Dynamik der Hydratation und der strukturellen Wasser in der Bindungstasche geben (Mattos *et al.* 2006). Durch Lösungsmittel kann Wasser von Protein- und Ligandenoberflächen entzogen werden. Dabei sind meist nur strukturell wichtige (durch Wasserbrücken eingebundene) Wassermoleküle zu stark am Protein gebunden, um entfernt zu werden. Es soll an dieser Stelle jedoch erwähnt werden, dass in Kristallstrukturen nur recht unbewegliche Wassermoleküle ausreichend Elektronendichte liefern. Auf die Rolle von Wasser in der Interaktion von HK620TSP mit seinen Kohlenhydratliganden soll im Verlauf der Diskussion detaillierter eingegangen werden.

Durch die beispielhafte Untersuchung des Protonentransfers durch ITC-Messungen in Puffersystemen mit verschiedenen Protonierungsenthalpien konnten Unterschiede im Protonentransfer festgehalten werden (vgl. Abschnitt 3.7.3.). Allerdings konnten diese Unterschiede nicht als Begründung für die Affinitätssteigerung dienen, da keine Abhängigkeit der Affinität von den Eigenschaften im Protonentransfer verzeichnet werden konnten: Die Varianten E372A,

E372Q und D339N/E372Q weisen alle eine hohe Affinität zum Hexasaccharid des Typs O18A1 auf, zeigten aber unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Protonentransfers. Variante E372A bewirkt keinen Protonentransfer, während die anderen beiden Varianten während der Bindung etwa 0,7 Protonen an den Puffer transferieren. Durch die Variation E372Q wurde ein Protonen-Donor eingeführt, der mutmaßlich die Protonierung des benachbarten Histidins 374 bewirkt. Der in dem zuvor beschriebenen Experiment beobachtete Protonentransfer könnte daher rühren, dass dieses protonierte Histidin 374 das Proton an den Puffer abgibt (vgl. Abb. 3-17). Der Wt konnte in diese Untersuchungen leider nicht mit einbezogen werden, da er eine zu geringe Affinität und zu geringe Bindungsenthalpien aufwies für zuverlässige Messungen mittels ITC. Aufgrund der großen Menge an Oligosacchariden, die für diese Messungen nötig waren, wurden zudem nicht alle Varianten untersucht.

Erste kinetische Untersuchungen vertieften das Verständnis für die Affinitätssteigerung bisher nicht. Es zeigte sich lediglich, dass O18A-Pentasaccharid knapp dreimal langsamer an den Wt assoziiert als an die Variante D339A/E372Q. Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation war bei dem Wt mit einem Faktor von 240 dramatisch erhöht (vgl. Abschnitt 3.10.). Die Gründe für diese Kinetik sind noch ungeklärt. Die Variation an der Aminosäure Glu372 hat größeren Einfluss auf die Affinität von HK620TSP als Variationen an der zweiten Aminosäure im aktiven Zentrum (Asp339) (vgl. Abschnitt 3.6.). In der für die kinetischen Untersuchungen verwendete Variante D339A/E372Q dürfte sich im Bereich der Aminosäure 372 eine ähnliche Situation wie in Variante E372Q darstellen (vgl. Abschnitt 3.7.2.). Assoziation sowie Dissoziation des Kohlenhydrats aus dieser Variante bedürfen somit eventuell der Rotation der Reste Gln372, Tyr344 und His374 (s.o.). Dies dürfte ebenso wie die Wiederherstellung der Lösungsmittelverhältnisse auf dem Protein langsamer sein als im Wt, in dem eine stärker vorgeformten Bindestelle vorliegt. Zu dieser Hypothese passen die exemplarisch bestimmten Aktivierungsenergien für Variante D339A/E372Q, die mit  $80 \pm 2$  bzw.  $97 \pm 26$  kJ mol<sup>-1</sup> für die Assoziation und Dissoziation relativ hoch sind. Ein Vergleich zum Wt bezüglich der Aktivierungsenergien steht noch aus. Für die Assoziation bzw. Dissoziation von Oktasaccharid an P22TSP wurden Aktivierungsenergien von  $50 \pm 15$  bzw.  $100 \pm 10$  kJ mol<sup>-1</sup> bestimmt (Baxa *et al.* 2001). Aus den Aktivierungsenergien kann die Enthalpieänderung der Bindung für 20°C als Differenz der Aktivierungsenergien abgeschätzt werden. Dies korrelierte für P22TSP mit den gemessenen Bindungsenthalpien, was hier auch gegeben ist. Mit einem Wert von etwa  $-17$  kJ mol<sup>-1</sup> liegt die aus den Kinetiken abgeschätzte Enthalpieänderung in der gleichen Größenordnung wie die durch ITC experimentell bestimmte ( $-24,7 \pm 0,2$  kJ mol<sup>-1</sup> bei 20,2°C). Für P22TSP wurden die hohen Aktivierungs-

energien mit enthalpischen Barrieren begründet, die durch die Desolvatisierung von Protein und Ligand vor der Kohlenhydratbindung entstehen (Baxa *et al.* 2001), was für HK620TSP sicherlich auch einen wichtigen Faktor darstellt.

Aufgrund des noch lückenhaften Verständnisses für die Affinitätssteigerung durch einzelne Aminosäureaustausche in HK620TSP, werden zur Zeit noch Untersuchungen hinsichtlich der Rolle von Wasser für die Kohlenhydratbindung durchgeführt. Aus den bisher durchgeführten, kristallographischen Untersuchungen wurde ersichtlich, dass bei Bindung der Oligosaccharide viele Wassermoleküle aus der Bindungsstelle verdrängt werden. Durch Bindung des Hexasaccharids werden 21 Wassermoleküle von der Oberfläche von HK620TSP verdrängt, während bei P22TSP nur 10 Moleküle durch Bindung eines Oktasaccharids aus *S. Typhimurium* verdrängt werden. Das HK620TSP-Bindungssystem zeichnet sich zudem durch sehr viele schwache Wechselwirkungen zwischen Zucker und Protein aus (19 direkte und etwa 24 Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücken  $\leq 3,5 \text{ \AA}$ ). Dahingegen sind nur etwa 8 hydrophobe Kontakte zu verzeichnen (vgl. Tab. 6-3). Der Komplex von Oktasaccharid aus *S. Paratyphi* mit P22TSP weist mit 12 direkten sowie 30 Wasser-verbrückten Wasserstoffbrücken und 16 hydrophoben Kontakten eine ähnlich hohe Anzahl an schwachen Interaktionen zwischen Protein und Kohlenhydrat auf (Andres, Gohlke *et al.* 2012).

Verglichen mit P22TSP hat das Wt-TSP aus dem Phagen HK620 eine recht geringe Affinität zu dem Hexasaccharid ( $K_D(\text{HK620TSP}) \approx 100 \text{ \mu M}$  vs.  $K_D(\text{P22TSP}) \approx 1 \text{ \mu M}$ ). Die Affinität des P22TSP kann jedoch durch einzelne Aminosäureaustausche im HK620TSP übertroffen werden ( $K_D(\text{HK620TSP E372A}) \approx 0,2 \text{ \mu M}$ ).

Zwischen den Bindungsstudien mittels ITC und Fluoreszenztitration gab es Diskrepanzen bei den Varianten E372Q, D339N/E372Q und D339A/E372Q, was darauf zurückzuführen ist, dass die gemessenen Wärmemengen bei der Bindung in der ITC teilweise sehr gering waren (z.B. E372Q, vgl. Abschnitt 3.6.) und entsprechend der Fehler in der Bestimmung der Affinität für diese Methode relativ hoch war (bis zu 15%). Des Weiteren änderten sich die Fluoreszenzeigenschaften der Varianten bei Kohlenhydratbindung unterschiedlich stark, was die Genauigkeiten der Fluoreszenztitrationen beeinflusst. Mit Hilfe einer dritten Methode (SPR) konnten die Bindungseigenschaften jedoch validiert werden.

Die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften bei Kohlenhydratbindung könnten von einem weniger effizienten statischen Quench im Komplex verglichen mit dem dynamischen Quench durch Lösungsmittelmoleküle im ligandenfreien Protein herrühren. Die Unterschiede in der Änderung der Fluoreszenzeigenschaften bei den verschiedenen Varianten sind vermutlich

durch veränderte Wassernetzwerke an der Bindestelle und dem exponierten Tryptophan zu begründen. Dies wird im Verlauf der Diskussion noch ausführlicher behandelt.

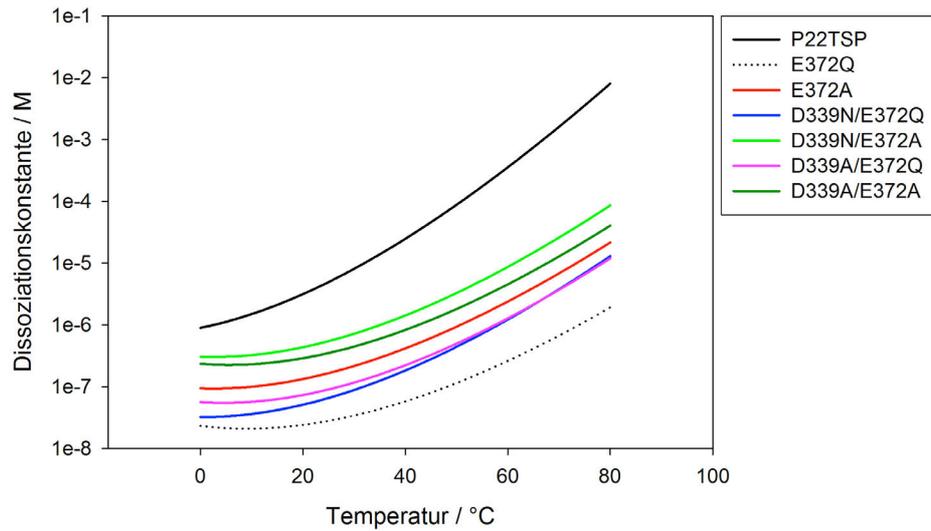
#### 4.4.2. Weitere Bindungseigenschaften von HK620TSP

Für manche Lektine (C-Typ) und andere kohlenhydratbindende Proteine ist bekannt, dass zweiwertige Ionen essentiell für die Bindung sind (Weis & Drickamer 1996; Tormo *et al.* 1996). In den ersten Kristallstrukturen des HK620TSP-Hexasaccharid-Komplexes wurden Calciumionen in der Bindestelle gefunden (Utrecht 2006; Barbirz *et al.* 2008). Entsprechend wurde überprüft, ob HK620TSP zweiwertige Ionen direkt binden kann und ob die Kohlenhydratbindung von der Anwesenheit zweiwertiger Ionen abhängt. Es konnte weder eine direkte Bindung von zweiwertigen Ionen detektiert werden noch wurde die Kohlenhydratbindung durch das TSP durch Anwesenheit zweiwertiger Ionen verändert (Daten nicht gezeigt). Die Calciumionen in der Kristallstruktur scheinen daher nicht spezifisch und nur ein Artefakt der Kristallisationsbedingungen zu sein. Für die Kristallstrukturen in der vorliegenden Arbeit wurden Bedingungen verwendet, unter denen alle gewünschten Varianten kristallisierten. In dem Kristallisationspuffer waren keine Calciumionen, es lag jedoch eine hohe Konzentration an Natriumionen vor. Entsprechend wurden zum Teil Natriumionen in den Strukturen gefunden. Zwischen den verschiedenen Strukturen sind die Positionen der Natriumionen nicht konserviert. Durch die in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse und aufgrund der Tatsache, dass Natriumionen lediglich schwach an biologische Makromoleküle assoziieren (Black *et al.* 1994), wird davon ausgegangen, dass die Bindung der Ionen nicht relevant für die Bindung ist und lediglich ein Artefakt der Kristallisationsbedingungen darstellt. Im Zuge der Dissertation wurde die pH-Abhängigkeit der Bindung durch Bindungsstudien bei verschiedenen pH-Werten ermittelt. Bei einem pH von 7,5 wurde die größte Affinität gegenüber den Oligosacchariden gemessen. Das ist aufgrund der Struktur der Kohlenhydrat-Bindestelle und des aktiven Zentrums nicht verwunderlich, da es sich bei dem aktiven Zentrum um saure Aminosäuren handelt. In einem pH-Bereich von 6-8 nimmt dabei der enthalpische Beitrag zur Kohlenhydratbindung mit steigendem pH-Wert zu, während ein zunehmend ungünstiger Entropieterm dem entgegensteht. Die Abhängigkeit von Bindungsenthalpie bzw. Entropieterm der Bindung ist vermutlich auf Unterschiede in der Solvatisierung und Protonierungseffekte zurückzuführen. Die Fragestellung ist jedoch zu komplex für genauere Spekulationen zu diesem Zeitpunkt.

Bei niedrigeren pH-Werten nimmt die Affinität entsprechend stärker ab, als wenn man die Bedingungen zu höheren pH-Werten verschiebt (vgl. Abschnitt 3.6.3.). Die geringere Affinität zwischen Kohlenhydrat und Protein bei saurem pH-Wert hat im Fall von der Bindung von N-Acetylneuraminsäure als Rezeptor auf der Wirtszelle durch Hämagglutinin aus dem Influenza Virus einen funktionellen Charakter. Im Endosom dissoziiert das Hämagglutinin bei niedrigem pH von dem Rezeptor und eine pH-induzierte Konformationsänderung in diesem Protein erlaubt die Fusion mit der Endosommembran sowie die Freisetzung des Virus ins Cytosol (Xu & I. A. Wilson 2011).

Wegen des Fehlens starker, hydrophober Kontakte, der Ermangelung hochpolarer Gruppen und der Einschränkung der Flexibilität durch die Bindung interagieren Oligosaccharide oft mit geringen Affinitäten. Die schwachen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kontakte werden von entropischen Beiträgen durch Desolvatisierung und durch Einschränkung der Beweglichkeit des Zuckers bei der Bindung begleitet (Kadirvelraj *et al.* 2008). Die Varianten von HK620TSP binden komplexe Oligosaccharide mit mittleren bis hohen Affinitäten mit Dissoziationskonstanten im mikromolaren bis in den submikromolaren Bereich.

Bei den Varianten E372Q und D339N/E372Q konnten allerdings im Gegensatz zu allen anderen Varianten überraschende Temperaturabhängigkeiten der Dissoziationskonstanten ermittelt werden. Typisch ist ein Anstieg der Dissoziationskonstanten mit steigender Temperatur (Baxa *et al.* 2001). Für die genannten Varianten ist dies erst der Fall, wenn man Messungen bei sehr hohen Temperaturen betrachtet (vgl. Tab. 3-3). Diese Messungen bei den verhältnismäßig hohen Temperaturen (55°C) wurden aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit mit den Messungen der anderen Varianten nicht mit in die Berechnung der Wärmekapazitätsänderungen einbezogen. Aufgrund der geringen Bindungsenthalpie als Messwert sind die ermittelten Dissoziationskonstanten mit einem für diese Methode großen Fehler behaftet, was diese irreführende Temperaturabhängigkeit erklärt. Ein weiterer Faktor dafür ist die geringe Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstanten im niedrigeren Temperaturbereich wie an einer Simulation in Abbildung 4-1 zu erkennen ist. Für die gezeigten Werte wurde die Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten von der Temperatur mit Hilfe von gut bestimmten Referenzwerten bei einer Temperatur von 30°C und der Wärmekapazitätsänderung durch die Bindung berechnet (vgl. Tab. 3-3). Es ist zu erkennen, dass die Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstante und somit die Thermodynamik zwischen dem System von P22TSP und den HK620TSP-Varianten lediglich verschoben ist.



**Abb. 4-1: Die Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstanten verschiedener, kohlenhydratbindender TSP im Vergleich.** Mit Hilfe der Dissoziationskonstanten von HK620TSP-Varianten (Ligand: O18A1-Hexasaccharid) bei 30°C und den Wärmekapazitätsänderungen durch die Bindungen (vgl. Tab. 3-3) wurde diese Abhängigkeit berechnet. Für P22TSP wurden publizierte Daten (Ligand Oktasaccharid aus *S. Enteritidis*) zur Berechnung benutzt (Baxa *et al.* 2001).

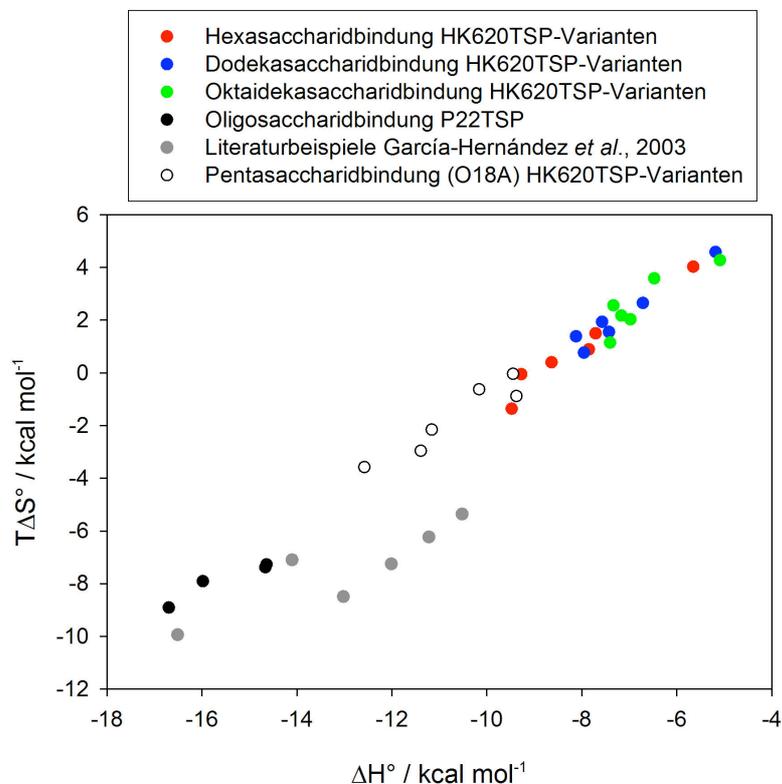
#### 4.4.3. Die Thermodynamik der Kohlenhydratbindung durch TSP

In diesem Abschnitt soll die Thermodynamik des untersuchten Systems der Bindung von O18A1-Oligosacchariden an HK620TSP diskutiert werden. Dabei soll zunächst auf Auffälligkeiten in den Untersuchungen zur Thermodynamik eingegangen werden.

Wie bereits erwähnt zeichnet sich das System der Kohlenhydratbindung durch HK620TSP besonders dadurch aus, dass viele Wassermoleküle durch die Interaktion mit Oligosacchariden verdrängt werden. So werden 21 Wassermoleküle bei Bindung des Hexasaccharids verdrängt, während im verwandten System von P22 nur 10 Wassermoleküle bei Bindung eines Oktasaccharids verdrängt werden. Dadurch bedingt unterscheiden sich die Triebkräfte der Bindung dieser beiden Systeme bei gleicher Temperatur. Typischerweise werden Kohlenhydrate unter großem Enthalpiebeitrag mit einem entgegenstehenden, ungünstigen Entropiebeitrag z.B. durch Lektine gebunden (Weis & Drickamer 1996). Eine derartige Thermodynamik ist auch bei der Kohlenhydratbindung durch P22TSP zu finden (Baxa *et al.* 2001). Die Kohlenhydratbindung durch HK620TSP ist hingegen bei 20°C enthalpisch und entropisch begünstigt. Ein Grund für diese Unterschiede ist die Verdrängung der vielen Wassermoleküle durch den Zucker bei der Bindung an HK620TSP, was entropisch begünstigt ist und den ungünstigen Entropieterm durch eingeschränkte Beweglichkeit des Zuckers durch Bindung übertrifft (Beuming *et al.* 2012). Der geringe Enthalpiebeitrag zur Bindung kann ebenfalls mit der Verdrängung der Wassermoleküle begründet werden, da das Aufbrechen der Wasserstoff-

brücken des Wassers unter enthalpischen Einbußen stattfindet (Chavelas & García-Hernández 2009). Unterschiede im Betrag des Enthalpie- und Entropieterms zwischen den verschiedenen hochaffinen TSP-Varianten sind vorhanden (vgl. Tab. 3-3) und bisher nicht komplett verstanden. Studien bezüglich der Wasser-Netzwerke bzw. Dynamik von Wassermolekülen und des Zuckers in den verschiedenen TSP-Varianten könnten ein tieferes Verständnis erzielen (vgl. Abschnitt 4.4.1.).

Anhand der ermittelten thermodynamischen Parameter für die Oligosaccharid-Bindung durch die Varianten von HK620TSP wurde eine sog. Enthalpie-Entropie-Auftragung angefertigt (Abb. 4-2). Man erhält für die Entropieterme aller gemessenen Mutanten bei Bindung verschiedener Oligosaccharide einen linearen Zusammenhang mit den gemessenen Bindungsenthalpien. Die Steigung aus diesem Zusammenhang liegt mit 1,2 im Bereich publizierter Daten (0,62 bzw. 1,1 (García-Hernández *et al.* 2003; Toone 1994). Für das kohlenhydratbindende System des HK620TSP konnte somit eine typische lineare Abhängigkeit zwischen Entropieterm und Enthalpie gefunden werden. Ob es sich bei dieser Abhängigkeit um ein Artefakt, eine Notwendigkeit oder eine spezielle Eigenschaft handelt, ist Thema ausgiebiger Diskussionen (Dunitz 1995; Hunter & Tomas 2003; Cooper *et al.* 2001).



**Abb. 4-2: Enthalpie-Entropie-Auftragung aus den gemessenen, thermodynamischen Parametern.** Für die Bindung der Varianten von HK620TSP wurde eine Steigung von 1,2 ermittelt. Zum Vergleich sind Werte für P22TSP und einige Beispiele aus García-Hernández *et al.* 2003 gezeigt, die jeweils eine Steigung von etwa 0,7 aufweisen.

Die entropische Begünstigung der Kohlenhydratbindung durch HK620TSP bei Standardtemperaturen (20°C bzw. 25°C) ist eher ungewöhnlich, es gibt jedoch Beispiele für andere entropisch getriebene zuckerbindende Systeme: Die antigene Erkennung von *Shigella flexneri* O-Antigenen durch Fab-Fragmente ist ebenfalls enthalpisch und entropisch getrieben. Vyas und Kollegen fanden heraus, dass mit steigender Saccharidlänge der Entropieterm immer größeren Einfluss als Triebkraft bekommt (N. K. Vyas *et al.* 2002). Pokorná und Mitarbeiter arbeiteten an entropisch getriebenen Interaktionen von Lektinen. Dabei handelt es sich um bakterielle Lektine, die sich durch diese außergewöhnliche Thermodynamik und ihren recht hohen Affinitäten gegenüber den Kohlenhydrat-Bindungspartnern von klassischen Lektinen unterscheiden (Pokorná *et al.* 2006).

Mit Ausnahme dieser speziellen, bakteriellen Lektine sind entropisch begünstigte Kohlenhydrat-Bindungsprozesse eher bei Antikörpern oder anderen Proteinen zu finden, die ihre Liganden mit höheren Affinitäten im Vergleich zu klassischen Lektinen und in tiefere Taschen binden (N. K. Vyas *et al.* 1991; Cygler *et al.* 1991; Weis & Drickamer 1996). Die Bindestellen dieser Proteine unterliegen oft Konformationsänderungen bei Bindung, während die Bindetasche bei klassischen Lektinen vorgeformt und flach ist. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsweisen von Lektinen und Antikörpern unterscheiden sich die Wärmekapazitätsänderungen durch die Bindung, da diese proportional zu der ligandbedeckten Oberfläche bzw. zur Änderung der Lösungsmittel-Zugänglichkeit ist (Sturtevant 1977; Gómez *et al.* 1995; Perozzo *et al.* 2004; Chavelas & García-Hernández 2009).

Im Falle von HK620TSP wurden für die verschiedenen Varianten Wärmekapazitätsänderungen von etwa  $-1,6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  bei Bindung des O18A1-Hexasaccharids gemessen. Für die Bindung von zwei repetitiven Einheiten wurde beispielhaft die Wärmekapazitätsänderung für die Variante D339N/E372Q gemessen, die mit  $-1,62 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  nicht von denen für die Bindung des Hexasaccharids abweicht. Das zeigt zusammen mit einer nur geringfügig erhöhten Affinität gegenüber längeren Oligosacchariden, dass die spezifische Kohlenhydrat-Bindestelle auf die für das Hexasaccharid beschriebene begrenzt ist (vgl. Abschnitt 3.7.). Die für die Varianten von HK620TSP beobachteten Wärmekapazitätsänderungen sind konsistent mit denen für P22TSP gemessenen. Bei der Bindung des etwas größeren Oktasaccharids aus *S. Enteritidis* durch das P22TSP wurde eine Wärmekapazitätsänderung von  $-1,84 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  gemessen (Baxa *et al.* 2001). Bei Lektinen wurden typischerweise deutlich geringere Verluste an Wärmekapazität durch Kohlenhydratbindung ( $-0,4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) gemessen, während für Antikörper stark temperaturabhängige Wärmekapazitätsänderungen bis zu  $-4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  (vgl. Abschnitt 1.2.) ermittelt wurden (Toone

1994; Sigurskjold & Bundle 1992). Die beschriebenen TSP-Systeme aus HK620 und P22 liegen somit bezüglich der Wärmekapazität der Bindung zwischen Kohlenhydratbindungen durch Lektine und Antikörper.

#### **4.5. Die Bindung von O18A-Antigen-Fragmenten**

Neben der Bindung von O18A1-Oligosacchariden wurden zudem O18A-Oligosaccharide für Bindungsstudien gereinigt, da HK620TSP Aktivität gegenüber dem O18A-PS aufwies. Das O18A-Antigen ist im Vergleich zu O18A1 nur um einen Zuckerrest verkürzt. Im O18A-Antigen fehlt die Seitenkettenglucose, so dass die kleinste repetitive Einheit des Typs O18A ein Pentasaccharid ist (Jann *et al.* 1992).

Bei den Messungen der Bindung von O18A-Pentasaccharid durch die hochaffinen HK620TSP-Varianten zeigten sich ähnliche Affinitäten wie für das O18A1-Hexasaccharid. Allerdings unterliegt die Bindung einer veränderten Thermodynamik im Vergleich zur O18A1-Bindung. Die Bindung von O18A-Pentasaccharid ist stärker enthalpisch getrieben als die Bindung von O18A1-Hexasaccharid ( $\Delta\Delta H = -10 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Da gleiche bzw. sehr ähnliche Affinitäten zu beiden Oligosacchariden vorliegen, ist entsprechend der entropische Beitrag zur Bindung nicht so günstig wie für die Interaktion mit dem O18A1-Antigen ( $\Delta(-T\Delta S) = 5-15 \text{ kJ mol}^{-1}$ , vgl. Tab. 3-3 und 3-7). Die Unterschiede in den Bindungsparametern zwischen den verschiedenen TSP-Varianten blieben dabei bestehen. Durch Fehlen der Seitenkettenglucose haben sich die Triebkräfte der Bindung verschoben und die Bindung der Oligosaccharide ist z.T. nicht mehr bzw. weniger stark entropisch begünstigt. Der lineare Zusammenhang zwischen dem Entropieterm der Bindung und der Bindungsenthalpie bleibt trotz der Verschiebung der Triebkräfte bestehen (vgl. Abb. 4-2). Die Aussagekraft dieses Zusammenhangs bleibt fraglich und es steht zur Debatte, ob es sich dabei nur um ein Artefakt handelt, dennoch soll erwähnt werden, dass dieser Zusammenhang auch hier gegeben ist (Cornish-Bowden 2002; Hunter & Tomas 2003; Cooper *et al.* 2001).

Klein und Mitarbeiter zeigten 2008, dass Untersuchungen von Bindungsparametern in Lösungsmitteln unterschiedlicher Konzentrationen ein tieferes Verständnis für den Bindungsprozess erzielen können (Klein *et al.* 2008). In besagter Arbeit wurden dabei die Wechselwirkungen zwischen biomimetischen Rezeptoren und Kohlenhydraten untersucht. Proteine sind oft unter den Lösungsmittel-Bedingungen nicht stabil, an dieser Stelle konnte jedoch die außergewöhnlich hohe Stabilität von TSP genutzt werden (Barbirz *et al.* 2009). HK620TSP-Varianten waren unter diesen Bedingungen stabil, wie zuvor mittels Fluoreszenzspektros-

kopie getestet wurde (Daten nicht gezeigt). Die Methode nach Klein und Mitarbeitern wurde exemplarisch zur Analyse der Bindung von O18A-Pentasaccharid durch die TSP-Variante D339N/E372Q verwendet.

Durch Zugabe der verschiedenen Lösungsmittel wurde Wasser von der Liganden- und Proteinoberfläche entfernt (Klein *et al.* 2008). Je höher die Konzentrationen an Lösungsmittel waren, desto weniger Wassermoleküle befinden sich noch auf der Protein- und Ligandenoberfläche und können bei der Zuckerbindung verdrängt werden. Entsprechend ist der Einsatz der Lösungsmittel entropisch ungünstig. Das Wasser steht jedoch zusätzlich als Donor und Akzeptor für Wasserstoffbrücken in Konkurrenz zu den polaren Gruppen von Protein und Ligand. Daher wurde der ungünstigste Enthalpieterm in Abwesenheit von Methanol und DMSO gemessen. DMSO weist eine geringere Polarität auf ( $Z = 71,1$ ; Polaritätsskala nach Kosower *et al.* 1963) als Methanol ( $Z = 83,6$ ; Wasser zum Vergleich:  $Z = 94,6$ ). Zudem kann DMSO selbst keine Wasserstoffbrücken ausbilden (aprotisch), wozu Methanol jedoch in der Lage ist. Beide Lösungsmittel entziehen Wasser von der Protein- und Ligandenoberfläche, Methanol kann als jedoch protisches Lösungsmittel eventuell Wasserstoffbrücken zwischen Kohlenhydrat und Protein vermitteln, ohne in starker Konkurrenz zu polaren Gruppen zu stehen. Dies könnte den günstigeren Enthalpieterm im Vergleich zu den Messungen in DMSO erklären ebenso wie den ungünstigeren Entropieterm durch Rekrutierung von einigen Methanol-Molekülen an der Bindestelle (vgl. Abschnitt 3.8.4.2.). Diese Analysen der Triebkräfte der Bindung in unterschiedlichen Lösungsmitteln betonen die Rolle des Wassers für die Bindung der Oligosaccharide durch HK620TSP. Der ungünstige Effekt auf die Entropie durch fehlendes Wasser in der Bindestelle übertrifft die positive Wirkung auf die enthalpischen Beiträge zur Bindung, so dass die Affinität zwischen Protein und Zucker bei steigenden Lösungsmittel-Konzentrationen leicht sinkt (vgl. Abschnitt 3.8.4.2.). In 16% DMSO wurde die Affinität der HK620TSP-Variante D339N/E372Q zu O18A-Pentasaccharid um einen Faktor 1,8 verringert im Vergleich zur Bindung bei 0% DMSO. Die Affinität des Lektins Hevein gegenüber N, N', N''-Triacetylchitotriose wurde hingegen durch Zugabe von DMSO (20% final) um eine Größenordnung reduziert. Aufgrund einer Kombination von MD-Simulationen und NMR-Messungen wurde vermutet, dass in dem hydrophoben Lösungsmittel DMSO vor allem das stacking von aromatischen Aminosäuren an den Zucker unterdrückt wurde (Siebert *et al.* 2000). Hydrophobe Wechselwirkungen spielen in HK620TSP vermutlich eine untergeordnete Rolle, trotzdem können Analysen mittels NMR in Kombination mit MD-Simulationen weitere Erkenntnisse liefern.

Die Ursache für die Verschiebung der Triebkräfte bei Bindung von O18A-Pentasaccharid im Vergleich zu der Komplexierung von O18A1-Hexasaccharid scheint in der Geometrie der Bindestelle und der Bindung der Seitenkettenglucose zu finden zu sein. Dies soll im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert werden. Hier bleibt anzumerken, dass die zusätzliche Bindung der Seitenkettenglucose keinen Gewinn in der Gibbs-Energie bringt, die Triebkräfte verändern sich lediglich. Darum stellt sich die Frage, wozu die Bindung dieses Zuckerrests dient. Welchen Vorteil hat die Bindung von O18A1-Oligosacchariden im Vergleich zu denen des Typs O18A für den Phagen? Es bleibt an dieser Stelle ein evolutionärer Zusammenhang zu vermuten. Es wäre möglich, dass HK620TSP aus einem O18A-bindenden TSP entstanden ist oder umgekehrt. Der einzige, in der Literatur beschriebene Phage, der spezifisch für *E. coli* mit O18A-Antigen ist, ist das Myovirus  $\Omega$ 18A (Ulmer *et al.* 1987). Ähnliche Verwandtschaften wurden auch für P22TSP gefunden, für welches homologe Proteine im Myovirus Det7 und im Siphovirus 9NA bekannt sind (Walter *et al.* 2008; Andres, Roske *et al.* 2012). Es konnte also das gleiche kohlenhydratbindende System in verschiedenen Phagen unterschiedlicher Morphologien ausgemacht werden. Ein derartiger evolutionärer Zusammenhang könnte evtl. auch für das kohlenhydratbindende System des HK620TSP gegeben sein. Über den Phagen  $\Omega$ 18A ist lediglich bekannt, dass dieser Phage spezifisch für Bakterien der O-Serogruppe O18A ist. Durch Infektion von Bakterien-Hybriden aus *E. coli* K12, die mit O18A-PS versehen wurden, konnte gezeigt werden, dass das O18A-PS vermutlich der Rezeptor ist (Ulmer *et al.* 1987). Bisher sind keine strukturellen Daten oder Sequenzdaten von dem Phagen  $\Omega$ 18A erhältlich, um diese Theorie näher zu beleuchten.

#### **4.6. Die Zuckerbindestelle in HK620TSP**

In diesem Abschnitt soll die Bindung der verschiedenen Oligosaccharide durch HK620TSP abschließend diskutiert werden. Dabei spielt die Architektur der Bindefurche eine ausschlaggebende Rolle. Die Bindung der Oligosaccharide in diese Furche zeichnet sich durch viele schwache Wechselwirkungen zwischen Protein und Zucker aus. So wurden in der Kristallstruktur des Wt mit gebundenem Hexasaccharid etwa 19 direkte und 24 Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücken ( $\leq 3,5 \text{ \AA}$ ) gefunden und nur 8 hydrophobe Kontakte. Im Gegensatz dazu stehen z.B. kohlenhydratbindende Module (CBM) aus PS-degradierenden Hydrolasen, die nur wenige Wasserstoffbrücken ausbilden und ihre Bindung hauptsächlich über *stacking* von aromatischen Aminosäuren an den Zucker bewirken.

Des Weiteren bleibt zu erwähnen, dass die Kohlenhydrat-Bindestelle im HK620TSP auf die Hexasaccharid-Bindefurche begrenzt zu sein scheint. In den Bindungsstudien gab es keinerlei Anzeichen auf eine zweite spezifische Bindestelle. Bei den Untersuchungen der Bindung längerer Oligosaccharide (2 oder 3 repetitive Einheiten) wurden nur leicht erhöhte Affinitäten erhalten im Vergleich zur Bindung des Hexasaccharids, was durch unspezifische Wechselwirkungen bedingt sein sollte (vgl. Tab. 3-3, 3-6 und 6-1). Zudem wurde in den Kokristallstrukturen keine weitere Elektronendichte für Zuckerfragmente jenseits der beschriebenen Bindestelle gefunden. Auch die ermittelten Wärmekapazitätsänderungen, die für die Bindung von einer repetitiven Einheit und zwei repetitive Einheiten des Typs O18A1 gleich sind, tragen dazu bei, eine zweite spezifische Bindestelle auszuschließen.

Zuvor wurde bereits versucht, Bindungstypen für Kohlenhydrat-Interaktionen zu unterscheiden (vgl. Abschnitt 4.4.3.). Die flache Bindungstasche in HK620TSP gleicht auf den ersten Blick eher den vorgeformten Furchen in Lektinen (Weis & Drickamer 1996; Lis & Sharon 1998; Ambrosi *et al.* 2005). Bei detaillierterer Betrachtung fällt auf, dass vor allem die Seitenkettenglucose des Hexasaccharids etwas stärker begraben ist als die anderen zugänglichen Zuckerreste, die in einer recht flachen Furche liegen. Diese Glucose wird von einer Schleife (*loop*) des Proteins abgeschirmt (75% der Glucose sind verdeckt, vgl. Abb. 3-28).

Vergleicht man die Proteinstruktur vor und nach Zuckerbindung, findet man eine mittlere Abweichung (RMSD) zwischen den jeweiligen C $\alpha$ -Atomen von 0,15 Å. Diese geringen Abweichungen zwischen den beiden Strukturen sind auch an der Bindestelle zu finden, was zeigt, dass diese vorgeformt ist. Allerdings zeigen die Reste Asn471 und Ser472 aus der Schlaufe (469-472) einen größeren RMSD von 0,6 Å. Dies spricht dafür, dass die Bindestelle vorgeformt ist, geringfügige konformationelle Änderungen an dieser Stelle durch die Bindung jedoch bedingt werden. Dies bestätigen auch einige Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen der Bindung (vgl. Abschnitt 3.10.). Es zeigte sich, dass die Bindung von O18A-Pentasaccharid an die Variante D339A/E372Q ebenso wie die Dissoziation schneller erfolgte als für O18A1-Hexasaccharid. Die Bindung der Glucose in die Tasche bedingt also eine langsamere Kinetik. Dies kann durch die Wasserverdrängung aus der Tasche und geringfügige konformationelle Änderungen begründet werden.

Aus der Bindestelle der Seitenkettenglucose werden bei Bindung der Glucose vier Wassermoleküle verdrängt, die durch die Schleife aus den Aminosäuren 469-472 teilweise abgeschirmt werden (vgl. Abschnitt 3.8.4.3.). Wenn die Glucose dort nicht gebunden wird, fehlt ein gewisser Entropiebeitrag zur Bindung. Wohingegen der Enthalpiebeitrag für die Bindung dann günstiger ist, da in der Tasche kaum enthalpisch günstige Kontakte zwischen

dem Zuckerrest und diesen Aminosäuren eingegangen werden und zudem das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken des Wassers enthalpisch ungünstig ist (Chavelas & García-Hernández 2009). Durch diese Effekte wird das Pentasaccharid des Typs O18A letztendlich mit einer ähnlichen Affinität gebunden wie das O18A1-Hexasaccharid. Der Entropiebeitrag der Bindung von O18A-Pentasaccharid ist im Vergleich zu typischen Entropiebeiträgen bei solchen Komplexbildungen immer noch günstig (bei 25°C  $-T\Delta S$  (HK620TSP-Varianten + O18A-Pentasaccharid) = 0,2-15 kJ mol<sup>-1</sup>,  $-T\Delta S$  (P22TSP + Oktasaccharid) = 38,6 kJ mol<sup>-1</sup>). Das liegt daran, dass auch ohne Bindung der Glucose 17 andere Wassermoleküle bei Kohlenhydratbindung verdrängt werden, wohingegen bei der Bindung des Oktasaccharids von der Oberfläche von P22TSP insgesamt nur 10 Wassermoleküle verdrängt werden.

Die Erstellung der Variante E372Q/Δ471-2, bei der die Bindestelle für die Seitenketten-glucose freigelegt wird, und die anschließenden Bindungsuntersuchungen mit dieser Variante stützen die Vermutung, dass die Freisetzung von vier Wassermolekülen aus der Abschirmung durch die Schleife aus den Aminosäuren 469-472 bei Bindung der Glucose entropisch sehr günstig ist. Die Bindung von O18A1-Hexasaccharid an Variante E372Q ist deutlich stärker entropiegetrieben als die Bindung an die Variante E372Q/Δ471-2 ( $\Delta(-T\Delta S) = -10,7$  kJ mol<sup>-1</sup>). Im Vergleich zu der Variante E372Q ist die Bindung des Hexasaccharids an die Variante E372Q/Δ471-2 unter enthalpischen Aspekten sogar günstiger ( $\Delta\Delta H = +2,7$  kJ/mol), da einige der oben genannten, ungünstigen Kontakte durch Deletion von zwei der abschirmenden Aminosäuren ebenfalls eliminiert wurden bzw. die enthalpisch ungünstige Verdrängung der vier Wassermoleküle aus der Tasche nicht stattfindet. Insgesamt überwiegt die Einbuße im Entropieterm, so dass die Variante E372Q/Δ471-2 eine fast 27fach geringere Affinität gegenüber dem O18A1-Hexasaccharid aufweist, während diese Variante das O18A-Pentasaccharid nur etwa viermal schwächer bindet als die Variante E372Q und das O18A-Dekasaccharid sogar nur zwei- bis dreimal schwächer.

Es wurden beispielhafte Bestimmungen der Wärmekapazitäten der Bindung von O18A-Pentasaccharid und O18A-Dekasaccharid durchgeführt. Eine Wärmekapazitätsänderung ( $\Delta C_p$ ) von -1,38 kJ K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> für das Pentasaccharid bestätigt, dass eine kleinere Fläche des Proteins durch das Pentasaccharid als durch das O18A1-Hexasaccharid bedeckt wird bzw. eine geringere Änderung in der Lösungsmittel-Zugänglichkeit durch Bindung des Pentasaccharids bewirkt wird. Wohingegen durch das Decasaccharid die gleiche Wärmekapazitätsänderung erzielt wurde wie für die Bindung des Hexasaccharids. Durch das verlängerte Oligo-

saccharid wird somit evtl. unspezifisch eine größere Fläche an Protein und Ligand bedeckt und hinsichtlich der Lösungsmittel-Zugänglichkeit beeinflusst.

Für die Wechselwirkungen von Kohlenhydraten an Proteinen stellen auch die Flexibilität der Zucker und die Änderung dieser während der Bindung einen wichtigen Faktor dar. Generell ist eine hohe, jedoch im Vergleich zu Peptiden aufgrund der Ringstruktur eingeschränkere Flexibilität von Kohlenhydraten in Lösung anerkannt (DeMarco & Robert J Woods 2008; Landström & Widmalm 2010). Durch Bindung der Oligosaccharide wird diese Flexibilität ebenso wie die einiger Aminosäuren eingeschränkt. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass Teile der Kohlenhydrate nach der Bindung noch flexibel sind (Canales *et al.* 2005). Es sind nur wenige Studien durch MD-Simulationen (Pathiaseril & R J Woods 2000; Kadirvelraj *et al.* 2006) und eine kombinierte Studie aus STD-NMR und MD-Simulationen bezüglich der Flexibilität der Kohlenhydrate während ihrer Interaktion veröffentlicht (Theillet *et al.* 2011). Untersuchungen zur Dynamik der Kohlenhydrate im System von HK620TSP bzw. der Varianten davon könnten zum Verständnis der Triebkräfte und auch der Unterschiede in der Affinität beitragen, zumal jede nicht mehr bewegliche Verknüpfung im Zucker mit einer Entropieeinbuße von etwa  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$  verbunden ist (McGavin *et al.* 2005).

Im Design von Pharmaka wird versucht, die Tatsache, dass Wasser eine wichtige Rolle in Bindungsprozessen einnehmen kann, zu nutzen. Zum einen treibt die Freisetzung von Wasser während der Bindung den Prozess. Daher sind oft Oberflächen ohne Platz zwischen Ligand und Protein mit höheren Affinitäten verbunden als Oberflächen mit wassergefüllten Lücken zwischen den Interaktionspartnern. Eine Ausnahme besteht darin, dass diese Wassermoleküle funktionell sein können und Wasserstoffbrücken vermitteln können. Zudem kann in der Peripherie gebundenes Wasser die Bindestelle ausweiten (Toone 1994; Ladbury 1996; Li & Lazaridis 2005; Clarke *et al.* 2001). Des Weiteren können sogenannte *long-range* Effekte über Wasser vermittelt sein. Diese Effekte beschreiben den Einfluss von weit entfernten Aminosäuren auf die Bindestelle und sind schwer vorherzusagen. Variationen in weit von der Bindestelle entfernten Aminosäuren können jedoch z.B. die Thermodynamik eines Systems verändern wie für Galectin-1 gezeigt (Gupta *et al.* 1996).

Spezifitäten können z.T. durch strukturelle Wasser erzielt werden wie im Fall des L-Arabinose bindenden Proteins (ABP). Die Bindung von L-Arabinose anstelle von D-Galactose führt über ein eingeschlossenes Wasser zu einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung und damit zu einer höheren Affinität (Quioco *et al.* 1989). Durch P22TSP können drei verschiedene Antigene gebunden werden. Die Spezifität für das Antigen aus *Salmonella* Para-

typhi, welches in einer anderen Konformation bindet als die anderen beiden Antigene, wird dabei durch ein strukturelles Wasser vermittelt (Andres, Gohlke *et al.* 2012).

Um Pharmaka bezüglich ihrer Bindung zu verbessern, wird versucht, Wasser in die Bindestelle einzuführen. So wurde durch Einführung einer funktionellen Gruppe in einen Inhibitor der HIV-1 Protease ein konserviertes Wasser aus der Bindestelle verdrängt, während das Wasserstoffbrücken-Netzwerk erhalten blieb. Dies steigerte die Aktivität des Inhibitors (M. Miller *et al.* 1989; Lam *et al.* 1994). Die Vorhersage von solchen Prozessen und das entsprechende Design von synthetischen Liganden stellt allerdings eine herausfordernde Aufgabe dar und ist oft mit Scheitern verbunden (Kadirvelraj *et al.* 2008).

Aufgrund der Rolle des Wassers und der zunehmenden Wichtigkeit von Prozessen der Kohlenhydrat-Erkennung ist das hier untersuchte System von Relevanz und in zukünftigen Arbeiten sollen die Prozesse während der Bindung durch weitergehende Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse, MD-Simulationen und STD-NMR noch tieferes Verständnis bringen. In dieser Arbeit wurden erste thermodynamische Daten zur Bindung von Kohlenhydraten durch HK620TSP generiert und der Satz an strukturellen Daten erweitert. Mit diesen Daten können zukünftig sogenannte Parametrisierungen von thermodynamischen Größen unternommen werden. Das heißt es können Berechnungen dieser Größen über Änderungen der Zugänglichkeiten von Oberflächen ( $\Delta$ ASA) bei der Komplexbildung durchgeführt werden (García-Hernández *et al.* 2003; Chavelas & García-Hernández 2009). Dieses Wissen wird helfen, Vorhersagen bezüglich kohlenhydratbindender Eigenschaften zu ermöglichen.

#### **4.7. Arbeiten mit dem Phagen HK620**

Die TSP aus den Phagen HK620 und P22 stellen in medizinischer Hinsicht ein interessantes System dar, da sie die Spezifität der Phagen bewirken und LPS, eine Schutzbarriere für die Bakterien, hydrolysieren (Allende & Thomas J McIntosh 2003; Barbirz *et al.* 2008; U. Eriksson *et al.* 1979). TSP oder ganze Phagen können daher benutzt werden, um Bakterien für therapeutische Zwecke oder in der Lebensmittelindustrie zu behandeln. Manche Phagen bzw. Phagenproteine befinden sich bereits in klinischen Studien, während z.B. ein Phage von *Listeria monocytogenes* schon Anwendung in der Lebensmittelindustrie findet und benutzt wird, um *Listeria monocytogenes* von entsprechenden Lebensmitteln zu eliminieren (Wendlinger *et al.* 1996; Hagens & Offerhaus 2008; Lu & Koeris 2011). Bezüglich der Möglichkeit, Phagen zur Therapie gegen Bakterien in der Lebensmittelindustrie oder als

mikrobiologisches Werkzeug einzusetzen, ist es von Interesse den Infektionsmechanismus von Phagen zu verstehen.

Der Phage P22 stellt einen Prototypen der Podoviren dar und wurde über 60 Jahre intensiv studiert, so dass Daten zur Assemblierung, DNA-Packung und Infektion generiert wurden (Israel *et al.* 1967; Strauss & King 1984; Andres, Hanke *et al.* 2010). So wurde schon früh entdeckt, dass die Infektiosität von P22-Phagen stark von der Konzentration an TSP abhängt und mindestens drei assemblierte TSP für eine Infektion notwendig sind (Israel *et al.* 1967; Strauss & King 1984; Andres, Hanke *et al.* 2010). Arbeiten von D. Andres mit dem Phagen P22 zeigten, dass LPS der einzige Rezeptor für den Phagen auf der Bakterienoberfläche ist, der notwendig ist, um die DNA-Ejektion aus dem Phagenkapsid zu initiieren (Andres, Hanke *et al.* 2010). Hinsichtlich der Vielfalt an verschiedenen Phagen und ihrer Rezeptoren, war die Entdeckung interessant, dass ein zu dem P22TSP homologes TSP in dem Siphovirus 9NA trotz der unterschiedlichen Morphologie des Phagens im Vergleich zu P22 die gleiche Wirtsspezifität bedingt. Bei dem Phagen 9NA konnte ebenso die DNA-Ejektion durch das gleiche LPS wie im Fall von P22 in Anwesenheit von Magnesiumionen initiiert werden, die Ejektion unterlag einer ähnlichen Aktivierungsenergie, jedoch einer anderen Kinetik (Andres, Hanke *et al.* 2010).

Ebenso groß wie die Vielfalt der Phagen ist die ihrer Rezeptoren. Es können Proteine, Kapselpolysaccharide, Pili oder Flagellen, Teichonsäure, verschiedene Teile des LPS oder das Peptidoglycan von Phagen erkannt werden (vgl. Einleitung 1.5; Schwartz 1975; Scholl *et al.* 2001; Raimondo *et al.* 1968; Thompson *et al.* 2010; Filippov *et al.* 2011; Lindberg 1973). Der Phage HK620 bindet wie P22 an LPS. Aufgrund der Verwandtschaft zwischen den Phagen P22 und HK620 und zwischen vielen ihrer Proteine könnte ein ähnlicher Infektionsmechanismus zu Grunde liegen (Casjens & Thuman-Commike 2011). Im Gegensatz zu den Phagen 9NA und P22, die den gleichen *Salmonella*-Wirt haben, infiziert HK620 allerdings *E. coli*. Der Phage HK620 konnte im Zuge dieser Arbeit trotz seiner Temperenz in hohen Titern aufgereinigt werden. Obwohl HK620TSP die Bindung verschiedener Kohlenhydrate toleriert, konnten durch den Phagen HK620 keine Bakterien anderer Stämme der O-Serogruppe O18A1 oder mit anderen O18-Antigenen lysiert werden. Zudem konnte bei zuvor mit HK620-Phagen behandelten Bakterien durch Induktion mit Carbadox (Barksdale & Arden 1974) keine Lyse induziert werden (vgl. Abschnitt 3.11.2.). Die durch das TSP mitgegebene Spezifität und Aktivität gegenüber dem Wirts-LPS ist somit *in vivo* nicht ausreichend, um eine Infektion des Bakteriums durch den Phagen zu bewirken. Dies kann vermutlich damit erklärt werden, dass diese Bakterien Kapselpolysaccharide aufweisen, die die Erkennung des

LPS durch den Phagen verhindern (vgl. Abschnitt 3.11.4.). Des Weiteren wäre es möglich, dass ein weiterer Rezeptor für eine erfolgreiche Infektion notwendig ist. Zudem könnten LPS-Länge oder LPS-Modifikationen eine Rolle für die Phageninfektion spielen. Aufgrund der Komplexität von *in vivo* Arbeiten wurde versucht, die Faktoren für die Infektion des Phagen HK620 anhand von *in vitro* Experimenten zu identifizieren.

#### **4.7.1. *In vitro* Untersuchungen zur DNA-Ejektion durch HK620**

Die DNA-Ejektion einiger Phagen wurde bereits *in vitro* untersucht. Dazu zählt der Phage Lambda, dessen DNA-Ejektion mittels Lichtstreuung (LS) untersucht wurde, und der Bakteriophage T5, bei dem die unterschiedlich starke Färbung der gepackten und freigesetzten DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff YoPro ausgenutzt wurde (Löf *et al.* 2007; M. Eriksson *et al.* 2007). Es konnte zudem der Proteinrezeptor FhuA in Liposomen eingefügt werden und die DNA durch den Phagen T5 in diese injiziert werden (Böhm *et al.* 2001; Plançon *et al.* 1997). Anhand des Phagen P22 wurde zum ersten Mal die *in vitro* Ejektion durch einen LPS-Rezeptor untersucht (Andres, Hanke *et al.* 2010). Die Ejektion der DNA aus den Phagen P22 und 9NA wurde in der Fluoreszenz in Anwesenheit des Farbstoffs YoPro nach Zugabe des Rezeptors beobachtet, wie zuvor für den Phagen T5 beschrieben (Andres, Hanke *et al.* 2010).

Aufgrund der Lichtstreuung von LPS konnte die DNA-Ejektion nicht wie für den Phagen Lambda anhand der Lichtstreuung der injizierten DNA beobachtet werden (s.o.). Das Fluoreszenzexperiment mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff YoPro erwies sich für Messungen der DNA-Ejektion des Phagen HK620 ebenfalls als problematisch. Das lag daran, dass bei den für P22 genutzten LPS-Mengen bei HK620 keine DNA-Ejektion beobachtet werden konnte. Es wurde versucht, die Ejektion der DNA durch höhere LPS-Konzentrationen zu initiieren, was aufgrund der starken Lichtstreuung bei größeren Konzentrationen an LPS in der Fluoreszenz nicht beobachtet werden konnte.

Daher wurde die DNA-Ejektion des Phagen HK620 mit Hilfe von Agarosegelen untersucht. Auf Agarosegelen analysierte Präparationen von HK620Phagen weisen etwa drei Banden auf (vgl. Abb. 3-33, Spur 2), von denen eine DNase-zugänglich ist. Dabei handelt es sich um Phagen, die in dem letzten Schritt der Präparation (Dialyse, um CsCl des Dichtegradienten zu entfernen) aufgeplatzt sind. Intakte Phagen zeichnen sich durch die Resistenz gegenüber DNase aus, somit wurden zwei der drei Banden intakten Phagenspezies zugeordnet.

Anhand des Anstiegs der Menge an DNase-zugänglicher DNA zeigte sich in diesen Analysen, dass erst durch die fünffache Menge an LPS aus *E. coli* H TD2158 im Vergleich zu den P22-Experimenten die Ejektion signifikant induziert werden konnte, was die Probleme in den sensitiven Fluoreszenzmessungen erklärt. In den Agarosengelen zeigte sich zudem, dass die Ejektion nicht bei allen Phagen induziert werden konnte, es war trotz der großen Menge an LPS noch eine Bande von intakten Phagen zu erkennen (vgl. Abb. 3-33, Spur 3). Zudem war die ejizierte DNA nach Zugabe von LPS z.T. nicht komplett zugänglich für DNase und Restriktionsenzyme (vgl. Abb. 3-33, Spuren 4-6). Der Restriktionsverdau mit EcoRI war dabei jedoch vollständiger als der mit HindIII oder DNase. Dieses Enzym aus *E. coli* ist eventuell in der Lage, nicht komplett ejizierte DNA aus dem Kapsid zu ziehen wie es zuvor für das Enzym EcoKI und den T7-Phagen beschrieben wurde (García & Molineux 1999).

Eine eindeutige Erklärung für die fehlende Vollständigkeit der Ejektion und der Zugänglichkeit der DNA nach Inkubation mit LPS lieferten elektronenmikroskopische Aufnahmen nicht (vgl. Abschnitt 3.11.6.). Allerdings konnte in der Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass die Phagen mit ihrer Schwanzstruktur an die LPS-Strukturen binden und nach Inkubation mit LPS aus *E. coli* H TD2158 größtenteils keine DNA mehr in den Kapsiden haben.

Durch alle durchgeführten Analysen kristallisierte sich heraus, dass die Konzentration und die Struktur des LPS einen wichtigen Faktor für die DNA-Ejektion *in vitro* darstellt. LPS aus *E. coli* weist andere Eigenschaften auf als LPS aus dem P22-Wirt *Salmonella*. So wurde in Untersuchungen mittels Lichtstreuung für das gereinigte *E. coli*-LPS ein geringerer Stokes Radius (etwa 40 nm) gefunden als für das *Salmonella*-LPS (etwa 90 nm). In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten sich ähnliche stäbchenförmige Strukturen für die LPS aus *Salmonella* Typhimurium (Andres, Roske *et al.* 2012) und *E. coli* H TD2158 (vgl. Abb. 3-36 A, Richter *et al.* 2011). Für P22 wurde gezeigt, dass die Ausbildung multilamellarer Strukturen und somit die Imitierung der Zellmembran für diese *in vitro*-Untersuchungen essentiell ist. Durch die einzelnen Bestandteile des LPS (Lipid A und PS) konnte keine DNA-Ejektion induziert werden. Die Aktivität der TSP war ebenso essentiell, um den Phagen zur Membran hin auszurichten und das sog. *Plug* Protein durch die Bewegung des Phagen entlang der LPS-Ketten gegen die Membran zu drücken (Andres, Hanke *et al.* 2010). Im Infektionsmodell für den Phagen P22, das von D. Andres vorgeschlagen wurde, spielt das *Plug* Protein (gp26) eine wichtige Rolle als sog. Drucksensor, der durch die Bewegung des Phagen zur Membran hin durch die Hydrolyse des LPS gegen die Membran gedrückt wird, wodurch vermutlich die Ejektion initiiert wird (Andres, Hanke *et al.* 2010). Das P22gp26 zeichnet sich dadurch aus, dass es enorm stabil bei gleichzeitiger Flexibilität in der sog. Lazo-Domäne (IV

vgl. Abschnitt 1.3.1./2.) ist, die am weitesten aus dem Phagen herausragt (Olia *et al.* 2007; Olia & Cingolani 2008; Bhardwaj *et al.* 2009). Diese flexible Domäne trifft zuerst auf die Membran und kann evtl. aufgrund ihrer Flexibilität in die Membran integrieren (Tang *et al.* 2005; J. Chang *et al.* 2006; Lander *et al.* 2009; Andres, Hanke *et al.* 2010). Die *Plug* Proteine (gp26) aus HK620 und P22 erwiesen sich in ersten Untersuchungen als relativ ähnlich (Bhardwaj *et al.* 2009). Allerdings wurde kürzlich die Struktur von gp26 aus HK620 gelöst und dieses Protein erwies sich im Gegensatz zu gp26 aus P22 als komplett flexibel (persönliche Mitteilung G. Cingolani). Die Eigenschaften von gp26 und dessen Interaktion mit der Membran sind vermutlich entscheidend für die Freisetzung der DNA aus dem Phagen und limitieren vermutlich die DNA-Ejektion *in vitro*. Mit dem sehr flexiblen *Plug* Protein als Sensor für die Ejektion ist es möglicherweise umso wichtiger bei *in vitro* Präparationen von LPS die Membran des Wirts gut zu imitieren.

Durch Inkubation mit LPS aus *E. coli* IHE3042 konnte die Ejektion der DNA aus dem Phagen HK620 weder im Agarosegel noch in der Elektronenmikroskopie beobachtet werden. Das LPS aus diesem Stamm erwies sich im Laufe der Untersuchungen dieser Doktorarbeit als *semi-rough*, was die Tatsache beschreibt, dass die Bakterien dieses Stammes hauptsächlich LPS mit sehr kurzen LPS-Ketten tragen. Es wurde gezeigt, dass dieser Bakterienstamm einen Prophagen im Lysogen aufweist, der durch Carbadox induziert werden konnte (vgl. Abb. 3-32). Durch den Einbau der unbekannt Phagen-DNA in das Genom der Bakterien könnte die LPS-Synthese dahingehend beeinflusst worden sein, dass hauptsächlich kurze Ketten synthetisiert werden, wie es für bestimmte Phagen gezeigt wurde (Tomás & Kay 1984). Die Struktur des LPS ist für das Bakterium wichtig als Schutzbarriere und eine minimale Länge ist zum Überleben dieser notwendig (Snyder *et al.* 1999; Allende & Thomas J McIntosh 2003). Das LPS ist durch Prophagen veränderbar und kann zudem den Umgebungsbedingungen angepasst werden (vgl. Einleitung 1.5.; Nikaido 2003). Auch *in vitro* ist die Struktur von gereinigtem LPS stark von den Umgebungsbedingungen abhängig. Die Flexibilität und Struktur von LPS sind von Faktoren wie Ionenkonzentration, Temperatur und Detergenzien bestimmt (Kastowsky *et al.* 1992; Brogden & Phillips 1988). Die Struktur des LPS wurde in dieser Arbeit mittels LS und Elektronenmikroskopie untersucht und zeigte eine typische, zuvor beschriebene, stäbchenartige Form mit einer Breite von etwa 15-20 nm in Lösung (Richter *et al.* 2011). Es wird vermutet, dass die Struktur von LPS ausschlaggebend ist für die Induktion der DNA-Ejektion *in vitro*. Dafür spricht, dass die DNA-Ejektion durch das sehr kurzkettenige LPS aus *E. coli* IHE3042 nicht induziert werden konnte. Dieses LPS zeigte in der Lichtstreuung einen reduzierten Stokes Radius (30 nm) im Vergleich zu LPS aus

*E. coli* H TD2158 (40 nm) und in der Elektronenmikroskopie konnten nur kleine Strukturen beobachtet werden (vgl. Abb. 3-36/7). Die Ausbildung multilamellarer Strukturen stellt neben der Spezifität der TSP ein wichtiger Faktor für die *in vitro* Ejektion der DNA dar: Durch Inkubation mit den LPS aus *E. coli* der O-Serogruppe O18A und zur Kontrolle eines dritten Stammes der O-Serogruppe O18A1 (10797), der lange LPS-Ketten aufweist, konnte DNA-Ejektion in Agarosegelen bzw. in Elektronenmikroskopie beobachtet werden (vgl. Abschnitt 3.11.4.). Diese LPS bilden im Gegensatz zu dem LPS aus IHE3042 ausreichend große, multilamellare Strukturen aus (vgl. Abb. 6-4), um den Phagen entsprechend auszurichten.

#### **4.7.2. Inhibition der Infektiösität des Phagen HK620 durch LPS**

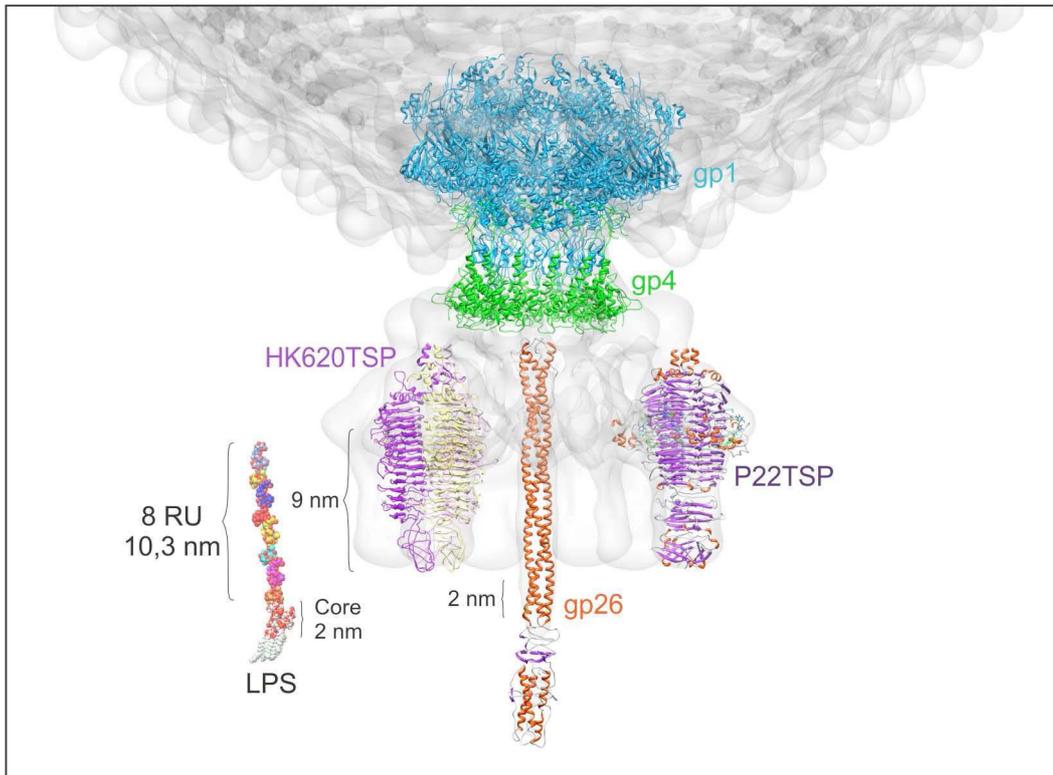
Neben den Untersuchungen der DNA-Ejektion in der Gelelektrophorese wurde die Inaktivierung des Phagen HK620 durch LPS untersucht. Es zeigte sich, dass die gleichen LPS, die in den gelelektrophoretischen Untersuchungen durch Inkubation mit dem Phagen DNA-Ejektion induzieren konnten, in diesen Untersuchungen die Infektiösität des Phagen heruntersetzten (vgl. Abschnitt 3.11.5.). Durch Inkubation von HK620-Phagen mit LPS aus *E. coli* H TD2158 sowie mit LPS des Typs O18A konnte die Anzahl an Plaques innerhalb von 5 Minuten auf 7% reduziert werden, was jeweils das Minimum darstellte; danach stieg die Zahl an Plaques wieder leicht an. Diese Minima waren reproduzierbar und könnten darin begründet sein, dass manche Phagen evtl. anfänglich sehr stark an LPS-Mizellen gebunden waren, was aber scheinbar aufgrund von zu kurzen LPS-Ketten oder anderen Faktoren nicht zur DNA-Ejektion führte. Nach Freisetzung der Phagen durch Verdau dieser LPS-Strukturen waren vermutlich nicht mehr ausreichend viele LPS-Strukturen vorhanden, welche die Ejektion induzieren konnten, und somit konnten weitere Bakterien infiziert werden, wodurch die Plaque-Zahl nach diesem Minimum anstieg. Dies könnte eventuell erklären, weshalb die Plaques nach Inkubation mit LPS aus *E. coli* H TD2158 sowie mit LPS des Typs O18A kleiner und einphasig sind (vgl. Abb. 6-3).

Zum Vergleich wurden Phagen mit Puffer inkubiert, wodurch die Infektiösität des Phagen ebenso wie bei Inkubation mit LPS aus *E. coli* IHE3042 nicht signifikant beeinflusst wurde (vgl. Abb. 3-35).

Durch die drei voneinander unabhängigen Untersuchungen der DNA-Ejektion mittels Gelelektrophorese, Elektronenmikroskopie und Inaktivierung des Phagen HK620 *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die Induktion der DNA-Ejektion durch LPS prinzipiell wie im Falle von P22 und 9NA möglich ist. Für die Signalgebung zur DNA-Ejektion scheint kein zweiter

Rezeptor notwendig zu sein. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass durch einen zweiten Rezeptor die vollständige Ejektion bei allen Partikeln erreicht werden könnte. *In vivo* könnte die Ejektion zudem durch andere Faktoren verbessert werden. So werden durch Phagen z.T. Porine kodiert, Ionenkanäle können in die Penetration involviert sein oder RNA-Polymerase bzw. Restriktionsenzyme ziehen die DNA in die Zelle (Boulanger & Letellier 1988; Nikaido 2003; García & Molineux 1999). Beim Phagen T7 wird die Menge an DNA, die in die Zelle eindringt kontrolliert. Die Proteine gp15/16 helfen, die DNA in die Zelle zu überführen (Molineux 2001; C.-Y. Chang *et al.* 2010).

Die Aktivität des TSP sowie die Struktur des LPS zur optimalen Ausrichtung des Phagen und Auslösung eines Signals durch den Druck des *Plug* Protein (gp26) gegen die Membran scheinen dabei wichtige Faktoren zu sein wie auch die Struktur des gp26 selbst. Darin stimmen die in dieser Arbeit generierten Daten mit den für den Phagen P22 beobachteten Ergebnissen überein. Dadurch kann auch erklärt werden, warum LPS durch den Phagen (zeigt das gleiche Verdauemuster auf LPS wie isolierte TSP) bzw. TSP nicht komplett verdaut wird (vgl. Abschnitt 3.4.). In Abbildung 4-3 sind die Größenverhältnisse von LPS im Vergleich zum Phagen gezeigt. Dabei ist anzumerken, dass für den Phagen HK620 sowie für einige seiner Bestandteile wie gp26 noch keine Strukturdaten veröffentlicht sind. Daher wurde das Modell von D. Andres sowie die strukturellen Daten für den verwandten Phagen P22 als Grundlage zur Abschätzung genommen und modifiziert (Andres, Hanke *et al.* 2010). Ebenso sind keine strukturellen Daten für das LPS erhältlich, die Größen und die Konformation können entsprechend abweichen. Nach Verdau des LPS durch das TSP bleiben etwa 8 repetitive Einheiten erhalten (vgl. Abb. 3-7). Diese nehmen mit 10 nm in etwa die Länge des C-Terminus bis zum aktiven Zentrum ein. Dabei wurde eine relativ gestreckte Kette an O-Antigenen zu Grunde gelegt, dies ist Spekulation und konformationelle Epitope, wie sie für andere polymere Kohlenhydratstrukturen gefunden wurden, können nicht ausgeschlossen werden (André *et al.* 2009). Unter Annahme dieses Modells stoppt die Hydrolyse durch das TSP, wenn der C-Terminus auf die *core*-Zuckerregion der LPS-Mizellen trifft. Das *Plug* Protein gp26 könnte durch die Bewegung des Phagen zur Membran hin in diese gedrückt werden, wodurch die Ejektion initiiert wird. Gp26 ist dabei nicht lang genug, um die äußere und innere Membran zu durchspannen (Andres, Hanke *et al.* 2010; Bhardwaj *et al.* 2009). Die Überquerung der DNA unterliegt somit Mechanismen, die weder für P22 noch für HK620 geklärt sind.



**Abb. 4-3: Modell zur Abschätzung der Größenverhältnisse.** Dieses Modell wurde von D. Andres für den Phagen P22 erstellt und aufgrund fehlender Daten für den Phagen HK620 als Anhaltspunkt verwendet und modifiziert (Andres, Hanke *et al.* 2010). So wurde auf die Höhe von P22TSP (PDB: 1TSP) (Steinbacher *et al.* 1996) das TSP aus dem Phagen HK620 gesetzt (HK620TSPAN, PDB: 2VJJ, Barbirz *et al.* 2008). Als Grundlage für die Abbildung des ganzen Phagen diente die Cryo-EM Struktur des Phagen P22 (EMDB: 1222) (J. Chang *et al.* 2006). Die Strukturen des Plug Proteins gp26 (orange, PDB: 2POH) (Olia *et al.* 2007) sowie der Portalstruktur aus gp1 und gp4 (PDB: 3LJ4) (Olia *et al.* 2011) sind in die Dichtekarte des Phagen angepasst worden. Für das LPS wurden die entsprechenden O-Antigen-Einheiten des Typs O18A1 verwendet, dabei ist die Konformation nicht bekannt (Jann *et al.* 1992).

### 4.7.3. Beeinflussung der Spezifität von Podoviren

Hinsichtlich der Nutzung von Phagen in der Lebensmittelindustrie, für therapeutische Zwecke oder als biotechnologisches Werkzeug ist es von Interesse die Spezifität von Phagen steuern zu können. Dies gelang bereits bei dem Phagen fd durch Austausch der rezeptorspezifischen Domäne (Lorenz *et al.* 2011). Ebenso konnte die Spezifität der bakteriziden Eigenschaften von Phagen durch Austausch ihrer sogenannten Pyocin-Schwanzfasern verändert werden (Williams *et al.* 2008).

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde versucht, die Spezifität des Phagen P22 durch Anheften von HK620TSP zu verändern. Dabei sollten das Wissen über den Phagen P22 und bekannte Techniken im Umgang mit diesem Phagen ausgenutzt werden. So ist es möglich, Phagenköpfe von P22 zu reinigen und TSP mit verschiedenen Veränderungen daran anzuhängen, um Auswirkungen auf die Infektion zu beobachten (Winston *et al.* 1979; U. Eriksson *et al.* 1979; Andres, Hanke *et al.* 2010). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie im N-

terminalen Bereich der TSP aus P22 und HK620 war es möglich das Vollängen-TSP aus HK620 direkt an dem P22-Phagen zu heften (Casjens & Thuman-Commike 2011).

Um die Intaktheit des Phagen jedoch sicherzustellen wurde ein Chimär erstellt, bei dem die kopfbindende, N-terminale Domäne aus dem Phagen P22 an die zuckerbindende Domäne aus dem HK620TSP fusioniert wurde. Dieses Chimär konnte unter etablierten Bedingungen exprimiert, gereinigt und an P22-Köpfe angeheftet werden. Der neu konstruierte Hybrid-Phage konnte *in vivo* weder *E. coli* noch *Salmonella* infizieren.

Es wurde versucht, die DNA-Ejektion dieser Phagen mit dem chimären TSP durch Inkubation mit LPS aus *E. coli* H TD2158 zu induzieren. Dies gelang nicht, jedoch wurde ein verändertes Laufverhalten der Phagen-DNA in den Agarosegelen beobachtet (vgl. Abb. 3-39). In der Elektronenmikroskopie banden fast alle Partikel an die LPS-Strukturen aus *E. coli* H TD2158. Zum Teil sahen die Stellen im LPS, an welche die Partikel assoziiert waren, leicht verdickt aus. Es wurden jedoch zu wenige Aufnahmen gemacht, um diesen Effekt zu quantifizieren. Trotz der Bindung an LPS aus *E. coli* H TD2158 waren die Hybrid-Phagen fast alle noch mit DNA gefüllt (vgl. Abb. 3-40).

Da die Phagen zwar an dem Rezeptor gebunden haben, die DNA aber nicht ejiziert haben, könnte die erfolglose *in vitro* Ejektion durch das *Plug* Protein (gp26) bedingt sein, dem als sogenannter Drucksensor und aufgrund der exponierten Lage eine besondere Rolle für das Durchdringen der Membran *in vivo* zukommen könnte (Andres, Hanke *et al.* 2010). Wie bereits beschrieben erwiesen sich die *Plug* Proteine aus HK620 und P22 zunächst als relativ ähnlich (Bhardwaj *et al.* 2009). Die kürzlich gelöste Struktur des gp26 aus HK620 weist jedoch auf eine enorme Flexibilität im Protein hin (persönliche Mitteilung G. Cingolani). Es wird vermutet, dass das gp26 des Phagen P22 nicht in passender Weise mit dem *E. coli*-LPS interagieren kann, wie es eventuell das flexiblere gp26 aus dem Phagen HK620 kann.

#### **4.8. Zusammenfassende Diskussion**

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden drei Themenstränge bearbeitet. Zum einen wurde die Bindung von Oligosacchariden des Antigen-Typs O18A1 durch HK620TSP analysiert und die Bindung durch Veränderung am TSP beeinflusst. Dafür wurden besagte Oligosaccharide gereinigt und es war möglich, Bindungsstudien mittels Fluoreszenz, ITC und SPR durchzuführen. Durch einzelne Aminosäureaustausche konnte das System dahingehend beeinflusst werden, dass die Affinitäten zu den besagten Oligosacchariden fast um ein Tausendfaches in einen Bereich von submikromolaren Bindungskonstanten gesteigert wurden. Die

Ursache für diese Affinitätssteigerung ist noch nicht gänzlich geklärt und wird weitergehend bearbeitet. In einer hochaffinen Variante wurde eine zusätzliche Wasserstoffbrücke entdeckt, was als einzige Ursache für eine tausendfache Affinitätssteigerung nicht plausibel ist. Die Verdrängung von Wassermolekülen wurde daher durch die Struktur der hochaffinen Variante E372Q ohne gebundenen Zucker analysiert. Dabei zeigten sich Verschiebungen einiger Aminosäuren an der variierten Stelle (Gln372, His374, Tyr344), wodurch zwei Wassermoleküle koordiniert werden. Diese Wasser werden bei Kohlenhydratbindung durch Rotation besagter Aminosäuren verdrängt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die in den verschiedenen Varianten vorhandenen Wasser-Netzwerke intensiver studiert werden müssen ebenso wie die Dynamik von Wasser und Kohlenhydrat bei der Bindung z.B. durch eine Kombination aus MD-Simulation und STD-NMR (Theillet *et al.* 2011).

Die Kohlenhydratbindung durch HK620TSP konnte durch erste thermodynamische Parameter weitergehend charakterisiert werden. Dieses System hebt sich von dem bisher am besten charakterisierten, kohlenhydratbindenden Modellsystem der Lektine ab. Lektine weisen meist Spezifitäten für weniger komplexe Kohlenhydrate als das HK620TSP auf und binden diese enthalpisch getrieben in flache Bindungsfurchen (Dam & Brewer 2002; Weis & Drickamer 1996). Dahingegen ist die Bindung der komplexen Oligosaccharide durch HK620TSP über ein ausgedehntes Wasserstoffbrücken-Netzwerk spezifisch und durch die Verdrängung von 21 Wassermolekülen getrieben. Das Wasser spielt in zweifacher Hinsicht eine große Rolle, da die Bindung durch Verdrängung des Wassers entropisch begünstigt ist und zum anderen viele Wasserstoffbrückenbindungen über Wassermoleküle vermittelt werden. Die Affinität des TSP zu den Oligosacchariden sowie die Architektur der Bindestelle liegen zwischen klassischen Lektinen und Antikörpern bzw. periplasmatischen Bindeproteinen, welche spezifisch gebundene Kohlenhydrate in tiefen Gruben binden (Quiococho 1986; Gabius *et al.* 2011). Die Bindung von O18A1-Oligosacchariden durch HK620TSP-Varianten ist bei Raumtemperatur enthalpisch und entropisch getrieben, was eher ungewöhnlich ist. Entropisch getriebene Bindungsprozesse wurden z.T. für manche kohlenhydratbindende Antikörper und für nicht-klassische, bakterielle Lektine gefunden (Quiococho 1986; Pokorná *et al.* 2006).

Wenn die Bindung durch HK620TSP anhand des verkürzten Oligosaccharids des Typs O18A studiert wird, verändern sich die Triebkräfte der Bindung. Durch Fehlen der Seitenketten-glucose ist die Bindung weniger stark entropisch getrieben, während der Enthalpiebeitrag zur Bindung zunimmt, wodurch sehr ähnliche Affinitäten der TSP-Varianten zu dem O18A-Pentasaccharid erzielt werden. Durch Analyse der Bindung dieses verkürzten Oligosaccharids konnte der einzelne Beitrag der Glucose zur Bindung ermittelt werden. Durch Bindung dieser

Glucose werden vier Wassermoleküle aus einer Tasche verdrängt, was entropisch stark begünstigt ist (Beuming *et al.* 2012). Unter enthalpischen Aspekten betrachtet ist die Bindung der Glucose aufgrund von einigen ungünstigen Kontakten und der Auflösung der Wasserstoffbrücken der verdrängten Wassermoleküle eher ungünstig. Die Freilegung der Bindestelle durch Deletion von zwei Aminosäuren (Asn471 und Ser472) einer abschirmenden Schleife bestätigt dies in ersten Untersuchungen. Die Bindung von O18A1-Hexasaccharid durch die Deletionsvariante ist entropisch weniger günstig als mit diesen abschirmenden Aminosäuren, während der Enthalpiebeitrag zur Bindung eher positiv beeinflusst wird. Offen bleibt die Frage, wozu die Bindung der Seitenkettenglucose dient oder ob sich HK620TSP aus einem O18A-bindenden TSP evolutionär herleitet. Mögliche Verwandtschaften zu dem O18A-bindenden Phagen  $\Omega$ 18A könnten bestehen, sind aber noch nicht untersucht. Bei diesem Phagen handelt es sich um ein Myovirus (Ulmer *et al.* 1987). Es könnte also eine Morphologie-übergreifende Verwandtschaft bestehen wie im Fall der TSP aus den Phagen P22, Det7 und 9NA. Diese TSP sind alle homolog und bedingen dieselbe Spezifität bei den Phagen (S. R. Casjens & Thuman-Commike 2011; Andres, Roske *et al.* 2012; Walter *et al.* 2008).

In dem dritten Teilprojekt der Promotionsarbeit wurde der Infektionsmechanismus von HK620 untersucht. Diese Arbeiten liegen in ihren Anfängen, dennoch konnte bereits gezeigt werden, dass prinzipiell die DNA-Ejektion durch LPS aus dem Wirt induziert werden kann und kein weiterer Rezeptor dafür notwendig ist. Entsprechend konnte der Phage durch Inkubation mit dem LPS aus dem Wirt inaktiviert werden. Darin gleicht der Phage HK620 prinzipiell dem Phagen P22.

Interessanterweise führt die Spezifität von HK620TSP, die nicht auf das O18A1-Antigen eingeschränkt ist, sondern auch O18A-LPS als Edukt toleriert, dazu, dass O18A-LPS *in vitro* den gleichen Effekt auf den HK620-Phagen hat. Ebenso konnten andere LPS mit O18A1-Antigen neben dem Wirts-LPS die DNA-Ejektion induzieren, nur das kurze LPS (*semi-rough*) aus *E. coli* IHE3042 vermochte dies nicht. Diese Ergebnisse vergegenwärtigen die Bedeutung der Struktur des LPS für die Infektion. Multilamellare LPS-Strukturen sowie eine Aktivität der TSP gegenüber diesem LPS sind notwendig, um eine Anheftung sowie Positionierung des Phagen und über eine Bewegung durch Hydrolyse einen mechanischen Druck des gp26 gegen die LPS-Mizelle zu erzeugen, wodurch die Ejektion der DNA zu induziert werden kann.

Die Struktur von LPS in Lösung unterscheidet sich von der Struktur der Bakterienmembran. Es handelt sich zudem um vielfältige, komplexe Strukturen, die neben variablen *O*-Antigen-Bereichen auch Modifikationen an dem *core*-Saccharid und am Lipid A aufweisen können (Friedrich & Whitfield 2005). Trotz ungeklärter Struktur der verwendeten LPS wurde in ersten

Experimenten versucht, die Ejektion durch Vergrößerung der LPS-Mizellen (z.B. durch verschiedene Ionen-Bedingungen) zu beeinflussen, bislang jedoch erfolglos. Durch den Einbau des LPS in definierte Liposomen könnte die DNA-Ejektion *in vitro* evtl. optimiert werden. Eine verbesserte Beobachtung der DNA-Ejektion *in vitro* könnte zudem z.B. durch *Pulsed-Field*-Elektrophorese erreicht werden. Durch diese Methode können große DNA-Fragmente besser aufgetrennt werden als in herkömmlichen Agarose-Gelelektrophoresen. Des Weiteren könnten Untersuchungen an einzelnen Phagenpartikeln in Echtzeit helfen, den Infektionsmechanismus zu verstehen (Mangenot *et al.* 2005; Grayson *et al.* 2007).

Die Änderung der Spezifität des Phagen P22 durch Anheften der kohlenhydratbindenden Domäne aus HK620TSP über die N-terminale Kapsidbinde-Domäne aus P22TSP ist bislang nicht gelungen. Da vermutlich die Struktur des *Plug* Proteins gp26 maßgeblich für das Scheitern dieses Experiments sein könnte, werden zur Zeit die Gene für HK620TSP und zusätzlich für gp26 aus dem Phagen HK620 in den Phagen P22 eingeführt. Dies ist Teil der Masterarbeit von Christin Hanke und erzielt eventuell einen Durchbruch in diesem Projekt.

## 5. Literatur

- Achtman, M. *et al.*, 1983. Six widespread bacterial clones among Escherichia coli K1 isolates. *Infection and Immunity*, 39(1), S.315–335.
- Ackermann, H.W., 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Archives of Virology*, 146(5), S.843–857.
- Ackermann, H.W., 1998. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Advances in Virus Research*, 51, S.135–201.
- Allende, D. & McIntosh, Thomas J, 2003. Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis. *Biochemistry*, 42(4), S.1101–1108.
- Ambrosi, M., Cameron, N.R. & Davis, B.G., 2005. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(9), S.1593–1608.
- André, S. *et al.*, 2009. From structural to functional glycomics: core substitutions as molecular switches for shape and lectin affinity of N-glycans. *Biological Chemistry*, 390(7), S.557–565.
- André, S. *et al.*, 2007. Wie der Zuckerkode entschlüsselt wird. *BIOspektrum*, 07.06, S.706–709.
- Andres, D., Baxa, U. *et al.*, 2010. Carbohydrate binding of Salmonella phage P22 tailspike protein and its role during host cell infection. *Biochemical Society Transactions*, 38(5), S.1386–1389.
- Andres, D., Gohlke, U. *et al.*, 2012. *Conserved structural waters mediate recognition of Salmonella O antigens by phage P22 tailspike protein*. Manuskript.
- Andres, D., Roske, Y. *et al.*, 2012. Tail morphology controls DNA release in two Salmonella phages with one lipopolysaccharide receptor recognition system. *Molecular Microbiology*, 83(6), S.1244–1253.
- Andres, D., Hanke, C. *et al.*, 2010. Tailspike interactions with lipopolysaccharide effect DNA ejection from phage P22 particles in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(47), S.36768–36775.
- Baldwin, R.L., 2007. Energetics of protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 371(2), S.283–301.
- Barbirz, S. *et al.*, 2008. Crystal structure of Escherichia coli phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related. *Molecular Microbiology*, 69(2), S.303–316.
- Barbirz, S., 2005. *Konservierte Struktur bei genetischer Mosaizität : die Tailspike Proteine dreier Phagen der Familie Podviridae*. Doktorarbeit. Universität Potsdam.
- Barbirz, S. *et al.*, 2009. Phage tailspike proteins with beta-solenoid fold as thermostable carbohydrate binding materials. *Macromolecular Bioscience*, 9(2), S.169–173.
- Barksdale, L. & Arden, S.B., 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeny, and phage conversions. *Annual Review of Microbiology*, 28, S.265–299.
- Barrett, G.C., 1985. *Chemistry and biochemistry of the amino acids*, Chapman and Hall.

- Baxa, U. *et al.*, 2001. Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike protein. *Biochemistry*, 40(17), S.5144–5150.
- Baxa, U. *et al.*, 1996. Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, Salmonella O-antigen polysaccharide. *Biophysical Journal*, 71(4), S.2040–2048.
- Beuming, T. *et al.*, 2012. Thermodynamic analysis of water molecules at the surface of proteins and applications to binding site prediction and characterization. *Proteins*, 80(3), S.871–883.
- Bhardwaj, A. *et al.*, 2009. An evolutionarily conserved family of virion tail needles related to bacteriophage P22 gp26: correlation between structural stability and length of the alpha-helical trimeric coiled coil. *Journal of Molecular Biology*, 391(1), S.227–245.
- Black, C.B., Huang, H.-W. & Cowan, J.A., 1994. Biological coordination chemistry of magnesium, sodium, and potassium ions. Protein and nucleotide binding sites. *Coordination Chemistry Reviews*, 135–136, S.165–202.
- Böhm, J. *et al.*, 2001. FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: a cryo-electron tomography study. *Current Biology: CB*, 11(15), S.1168–1175.
- Bolen, D.W. & Rose, G.D., 2008. Structure and energetics of the hydrogen-bonded backbone in protein folding. *Annual Review of Biochemistry*, 77, S.339–362.
- Boraston, A.B. *et al.*, 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 3), S.769–781.
- Botstein, D. & Herskowitz, I., 1974. Properties of hybrids between Salmonella phage P22 and coliphage lambda. *Nature*, 251(5476), S.584–589.
- Bouckaert, J. *et al.*, 1995. Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. *Proteins*, 23(4), S.510–524.
- Boulanger, P. & Letellier, L., 1988. Characterization of ion channels involved in the penetration of phage T4 DNA into Escherichia coli cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(20), S.9767–9775.
- Bravo, D. *et al.*, 2008. Growth-phase regulation of lipopolysaccharide O-antigen chain length influences serum resistance in serovars of Salmonella. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 8), S.938–946.
- Breadmore, M., Hilder, E. & Kazarian, A., 2011. Fluorophores and Chromophores for the Separation of Carbohydrates by Capillary Electrophoresis. In N. Volpi, hrsg. *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 23–51.
- Brogden, K.A. & Phillips, M., 1988. The ultrastructural morphology of endotoxins and lipopolysaccharides. *Electron Microscopy Reviews*, 1(2), S.261–278.
- Brünger, A.T., 1992. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Published online: 30 January 1992; doi:10.1038/355472a0*, 355(6359), S.472–475.
- Brüssow, H., Canchaya, C. & Hardt, W.-D., 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(3), S.560–602.
- Calendar, R., 2006. *The bacteriophages*, Oxford University Press.

- Canales, A. *et al.*, 2005. Conformational flexibility of a synthetic glycosylaminoglycan bound to a fibroblast growth factor. FGF-1 recognizes both the (1)C(4) and (2)S(O) conformations of a bioactive heparin-like hexasaccharide. *Journal of the American Chemical Society*, 127(16), S.5778–5779.
- Casjens, S.R. & Thuman-Commike, P.A., 2011. Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly. *Virology*, 411(2), S.393–415.
- Chang, C.-Y., Kemp, P. & Molineux, I.J., 2010. Gp15 and gp16 cooperate in translocating bacteriophage T7 DNA into the infected cell. *Virology*, 398(2), S.176–186.
- Chang, J. *et al.*, 2006. Cryo-EM asymmetric reconstruction of bacteriophage P22 reveals organization of its DNA packaging and infecting machinery. *Structure (London, England: 1993)*, 14(6), S.1073–1082.
- Chavelas, E.A. & García-Hernández, E., 2009. Heat capacity changes in carbohydrates and protein-carbohydrate complexes. *The Biochemical Journal*, 420(2), S.239–247.
- Chervenak, M.C. & Toone, E.J., 1995. Calorimetric analysis of the binding of lectins with overlapping carbohydrate-binding ligand specificities. *Biochemistry*, 34(16), S.5685–5695.
- Chibani-Chennoufi, S. *et al.*, 2004. Phage-host interaction: an ecological perspective. *Journal of Bacteriology*, 186(12), S.3677–3686.
- Clark, A.J. *et al.*, 2001. Nucleotide sequence of coliphage HK620 and the evolution of lambdoid phages. *Journal of Molecular Biology*, 311(4), S.657–679.
- Clark, B.E. *et al.*, 2012. A Bacterial Lipooligosaccharide that Naturally Mimics the Epitope of the HIV-Neutralizing Antibody 2G12 as a Template for Vaccine Design. *Chemistry & Biology*, 19(2), S.254–263.
- Clarke, C. *et al.*, 2001. Involvement of water in carbohydrate-protein binding. *Journal of the American Chemical Society*, 123(49), S.12238–12247.
- Cooper, A. *et al.*, 2001. Heat does not come in different colours: entropy–enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophysical Chemistry*, 93(2–3), S.215–230.
- Cornish-Bowden, A., 2002. Enthalpy-entropy compensation: a phantom phenomenon. *Journal of Biosciences*, 27(2), S.121–126.
- Creighton, T.E., 1997. *Protein structure: a practical approach*, IRL Press at Oxford University Press.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C. & Varki, A., 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 7(4), S.255–266.
- Cygler, M., Rose, D.R. & Bundle, D.R., 1991. Recognition of a cell-surface oligosaccharide of pathogenic Salmonella by an antibody Fab fragment. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5018), S.442–445.
- Dam, T.K. & Brewer, C.F., 2002. Thermodynamic Studies of Lectin–Carbohydrate Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Chemical Reviews*, 102(2), S.387–430.
- Danielczyk, A. *et al.*, 2006. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 55(11), S.1337–1347.

- Danner, M. *et al.*, 1993. Folding and assembly of phage P22 tailspike endorhamnosidase lacking the N-terminal, head-binding domain. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 215(3), S.653–661.
- Darveau, R.P. & Hancock, R.E., 1983. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *Journal of Bacteriology*, 155(2), S.831–838.
- Davies, G. & Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure (London, England: 1993)*, 3(9), S.853–859.
- DeMarco, M.L. & Woods, Robert J, 2008. Structural glycobiology: a game of snakes and ladders. *Glycobiology*, 18(6), S.426–440.
- Dhillon, T.S. *et al.*, 1998. General transducing phages like *Salmonella* phage P22 isolated using a smooth strain of *Escherichia coli* as host. *FEMS Microbiology Letters*, 161(1), S.129–133.
- Doores, K.J. *et al.*, 2010. A nonself sugar mimic of the HIV glycan shield shows enhanced antigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), S.17107–17112.
- Dube, D.H. & Bertozzi, C.R., 2005. Glycans in cancer and inflammation potential for therapeutics and diagnostics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(6), S.477–488.
- Dunitz, J.D., 1995. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chemistry & Biology*, 2(11), S.709–712.
- Eigen, M. & De Mayer, L., 1963. Relaxation methods. In *Technique of Organic Chemistry*. New York: Interscience, S. 895ff.
- Eriksson, M. *et al.*, 2007. Binding of Intercalating and Groove-Binding Cyanine Dyes to Bacteriophage T5. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(5), S.1139–1148.
- Eriksson, U. *et al.*, 1979. *Salmonella* phage glycanases: substrate specificity of the phage P22 endorhamnosidase. *The Journal of General Virology*, 43(3), S.503–511.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F., 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13), S.2606–2617.
- Filippov, A.A. *et al.*, 2011. Bacteriophage-Resistant Mutants in *Yersinia pestis*: Identification of Phage Receptors and Attenuation for Mice. *PLoS ONE*, 6(9).
- Franco, A.V., Liu, D. & Reeves, P.R., 1998. The wzz (cld) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O-antigen chain length specificity. *Journal of Bacteriology*, 180(10), S.2670–2675.
- Freeman, G.G., 1942. The preparation and properties of a specific polysaccharide from *Bact. typhosum* Ty(2): With an addendum by J. St L. Philpot, From the Department of Biochemistry, Oxford. *The Biochemical Journal*, 36(3-4), S.340–356.
- Friedrich, E. *et al.*, 2003. Overexpression of the waaZ gene leads to modification of the structure of the inner core region of *Escherichia coli* lipopolysaccharide, truncation of the outer core, and reduction of the amount of O polysaccharide on the cell surface. *Journal of Bacteriology*, 185(5), S.1659–1671.

- Frirdich, E. & Whitfield, C., 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *Journal of Endotoxin Research*, 11(3), S.133–144.
- Fukada, H. & Takahashi, K., 1998. Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. *Proteins*, 33(2), S.159–166.
- Gabius, H.-J. *et al.*, 2011. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), S.298–313.
- Gamian, A. *et al.*, 1994. Structure of the Escherichia coli 024 and 056 O-Specific Sialic-Acid-Containing Polysaccharides and Linkage of these Structures to the Core Region in Lipopolysaccharides. *European Journal of Biochemistry*, 225(3), S.1211–1220.
- García, L.R. & Molineux, I.J., 1999. Translocation and specific cleavage of bacteriophage T7 DNA in vivo by EcoKI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), S.12430–12435.
- García-Hernández, E. *et al.*, 2003. Structural energetics of protein–carbohydrate interactions: Insights derived from the study of lysozyme binding to its natural saccharide inhibitors. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 12(1), S.135–142.
- Gast, K. *et al.*, 1998. Compactness of the kinetic molten globule of bovine alpha-lactalbumin: a dynamic light scattering study. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 7(9), S.2004–2011.
- Gerstenbruch, S. *et al.*, 2010. Analysis of cross-reactive and specific anti-carbohydrate antibodies against lipopolysaccharide from Chlamydomonas reinhardtii. *Glycobiology*, 20(4), S.461–472.
- Gómez, J. *et al.*, 1995. The heat capacity of proteins. *Proteins*, 22(4), S.404–412.
- Gupta, D. *et al.*, 1996. Thermodynamics of carbohydrate binding to galectin-1 from Chinese hamster ovary cells and two mutants. A comparison with four galactose-specific plant lectins. *Biochemistry*, 35(48), S.15236–15243.
- Gupta, D. *et al.*, 1997. Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions. Binding of the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates and deoxy analogs to concanavalin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(10), S.6388–6392.
- Hagens & Offerhaus, M.L., 2008. Bacteriophages - new weapons for food safety. *Food Technology Chicago*, 62(4), S.46–54.
- Hecht, M.-L. *et al.*, 2009. Recent advances in carbohydrate-based vaccines. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(3), S.354–359.
- Hendrix, R.W. *et al.*, 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), S.2192–2197.
- Hendrix, R.W., Hatfull, G.F. & Smith, M.C.M., 2003. Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution. *Research in Microbiology*, 154(4), S.253–257.
- Hennetin, J. *et al.*, 2006. Standard conformations of beta-arches in beta-solenoid proteins. *Journal of Molecular Biology*, 358(4), S.1094–1105.

- Hertel, S., 2011. *Untersuchung der Spezifität des Phagen HK620 gegenüber verschiedenen O18-Antigenen*. Bachelorarbeit. Universität Potsdam.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R., 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9(1), S.28–32.
- Horton, R.M. *et al.*, 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77(1), S.61–68.
- Hunter, C.A. & Tomas, S., 2003. Cooperativity, partially bound states, and enthalpy-entropy compensation. *Chemistry & Biology*, 10(11), S.1023–1032.
- Israel, J.V., Anderson, T.F. & Levine, M., 1967. In vitro Morphogenesis of Phage P22 from Heads and Base-Plate Parts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(2), S.284–291.
- Jann, B. *et al.*, 1992. The O18 antigens (lipopolysaccharides) of Escherichia coli. Structural characterization of the O18A, O18A1, O18B and O18B1-specific polysaccharides. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 210(1), S.241–248.
- Jenkins, J., Mayans, O. & Pickersgill, R., 1998. Structure and Evolution of Parallel [beta]-Helix Proteins. *Journal of Structural Biology*, 122(1-2), S.236–246.
- Jones, T.A. *et al.*, 1991. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallographica. Section A, Foundations of Crystallography*, 47 ( Pt 2), S.110–119.
- Kabsch, W. & Sander, C., 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22(12), S.2577–2637.
- Kadirvelraj, R. *et al.*, 2008. Involvement of water in carbohydrate-protein binding: concanavalin A revisited. *Journal of the American Chemical Society*, 130(50), S.16933–16942.
- Kadirvelraj, R. *et al.*, 2006. Understanding the bacterial polysaccharide antigenicity of Streptococcus agalactiae versus Streptococcus pneumoniae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(21), S.8149–8154.
- Kajava, A.V. & Steven, A.C., 2006. The turn of the screw: variations of the abundant beta-solenoid motif in passenger domains of Type V secretory proteins. *Journal of Structural Biology*, 155(2), S.306–315.
- Kastowsky, M., Gutberlet, T. & Bradaczek, H., 1992. Molecular modelling of the three-dimensional structure and conformational flexibility of bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 174(14), S.4798–4806.
- Kerzmann, A., Neumann, D. & Kohlbacher, O., 2006. SLICK--scoring and energy functions for protein-carbohydrate interactions. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 46(4), S.1635–1642.
- King, J. *et al.*, 1976. Structure and assembly of the capsid of bacteriophage P22. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 276(943), S.37–49.
- King, J. & Laemmli, U.K., 1971. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *Journal of Molecular Biology*, 62(3), S.465–477.

- King, J., Lenk, E.V. & Botstein, D., 1973. Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in Salmonella phage P22. II. Morphogenetic pathway. *Journal of Molecular Biology*, 80(4), S.697–731.
- Klein, E. *et al.*, 2008. Solvent effects in carbohydrate binding by synthetic receptors: implications for the role of water in natural carbohydrate recognition. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 47(14), S.2693–2696.
- Köhler, B., Karch, H. & Schmidt, H., 2000. Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from Escherichia coli strains. *Microbiology (Reading, England)*, 146 ( Pt 5), S.1085–1090.
- Kosower, E.M., 1958. The Effect of Solvent on Spectra. I. A New Empirical Measure of Solvent Polarity: Z-Values. *J. Am. Chem. Soc.*, 80(13), S.3253–3260.
- Kropinski, A.M. *et al.*, 2007. The Genome of  $\epsilon$ 15, a Serotype-Converting, Group E1 Salmonella enterica-Specific Bacteriophage. *Virology*, 369(2), S.234–244.
- Kurtzke, J., 2009. *Interaktion von HK620 Tailspike Protein mit Oligosacchariden*. Bachelorarbeit. Universität Potsdam.
- Ladbury, J.E., 1996. Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chemistry & Biology*, 3(12), S.973–980.
- Lam, P.Y. *et al.*, 1994. Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5145), S.380–384.
- Lander, G.C. *et al.*, 2009. The P22 tail machine at subnanometer resolution reveals the architecture of an infection conduit. *Structure (London, England: 1993)*, 17(6), S.789–799.
- Landström, J. & Widmalm, G., 2010. Glycan flexibility: insights into nanosecond dynamics from a microsecond molecular dynamics simulation explaining an unusual nuclear Overhauser effect. *Carbohydrate Research*, 345(2), S.330–333.
- Lee, Y.C. & Lee, R.T., 1995. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.*, 28(8), S.321–327.
- Leforestier, A. *et al.*, 2008. Bacteriophage T5 DNA ejection under pressure. *Journal of Molecular Biology*, 384(3), S.730–739.
- Lentz, T.L., 1990. The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents. *The Journal of General Virology*, 71 ( Pt 4), S.751–766.
- Lerouge, I. & Vanderleyden, J., 2002. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), S.17–47.
- Li, Z. & Lazaridis, T., 2005. The effect of water displacement on binding thermodynamics: concanavalin A. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 109(1), S.662–670.
- Lindberg, A.A., 1973. Bacteriophage receptors. *Annual Review of Microbiology*, 27, S.205–241.
- Lis, H. & Sharon, N., 1998. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews*, 98(2), S.637–674.
- Liu, C. *et al.*, 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *Journal of Virology*, 69(2), S.1099–1106.

- Löf, D. *et al.*, 2007. Dynamic and static light scattering analysis of DNA ejection from the phage lambda. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 76(1 Pt 1), S.011914.
- Lorenz, S.H. *et al.*, 2011. The filamentous phages fd and IF1 use different mechanisms to infect *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 405(4), S.989–1003.
- Lu, T.K. & Koeris, M.S., 2011. The next generation of bacteriophage therapy. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), S.524–531.
- Mattos, C. *et al.*, 2006. Multiple solvent crystal structures: probing binding sites, plasticity and hydration. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), S.1471–1482.
- McCoy, A.J. *et al.*, 2007. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(Pt 4), S.658–674.
- McDonald, I.K. & Thornton, J.M., 1994. Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 238(5), S.777–793.
- McGavin, R.S. *et al.*, 2005. The design, synthesis and evaluation of high affinity macrocyclic carbohydrate inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(15), S.2723–2732.
- Miller, M. *et al.*, 1989. Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4934), S.1149–1152.
- Le Minor, L., Véron, M. & Popoff, M., 1982. A proposal for *Salmonella* nomenclature. *Annales De Microbiologie*, 133(2), S.245–254.
- Molineux, I.J., 2001. No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular Microbiology*, 40(1), S.1–8.
- Müller, J.J. *et al.*, 2008. An intersubunit active site between supercoiled parallel beta helices in the trimeric tailspike endorhamnosidase of *Shigella flexneri* Phage Sf6. *Structure (London, England: 1993)*, 16(5), S.766–775.
- Müller-Loennies, S. *et al.*, 2000. Characterization of high affinity monoclonal antibodies specific for chlamydial lipopolysaccharide. *Glycobiology*, 10(2), S.121–130.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 53(Pt 3), S.240–255.
- Nemecek, D. *et al.*, 2007. Subunit conformations and assembly states of a DNA-translocating motor: the terminase of bacteriophage P22. *Journal of Molecular Biology*, 374(3), S.817–836.
- Newcomer, M.E., Gilliland, G.L. & Quijcho, F.A., 1981. L-Arabinose-binding protein-sugar complex at 2.4 Å resolution. Stereochemistry and evidence for a structural change. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(24), S.13213–13217.
- Nikaido, H., 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 67(4), S.593–656.
- Olia, A.S. *et al.*, 2011. Three-dimensional structure of a viral genome-delivery portal vertex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(5), S.597–603.

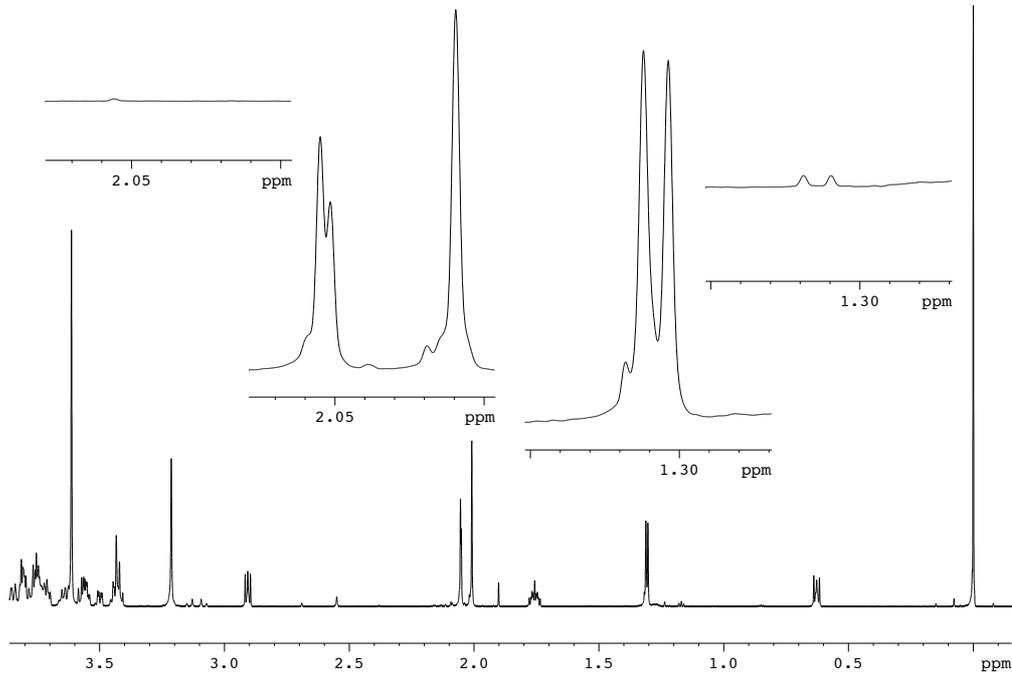
- Olia, A.S., Casjens, S.R. & Cingolani, G., 2007. Structure of phage P22 cell envelope-penetrating needle. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(12), S.1221–1226.
- Orskov, F., Sharma, V. & Orskov, I., 1984. Influence of growth temperature on the development of Escherichia coli polysaccharide K antigens. *Journal of General Microbiology*, 130(10), S.2681–2684.
- Orskov, I. *et al.*, 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli. *Bacteriological Reviews*, 41(3), S.667–710.
- Parent, K.N. *et al.*, 2010. P22 coat protein structures reveal a novel mechanism for capsid maturation: stability without auxiliary proteins or chemical crosslinks. *Structure (London, England: 1993)*, 18(3), S.390–401.
- Pathiaseril, A. & Woods, R J, 2000. Relative energies of binding for antibody-carbohydrate-antigen complexes computed from free-energy simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 122(2), S.331–338.
- Perozzo, R., Folkers, G. & Scapozza, L., 2004. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 24(1-2), S.1–52.
- Perrakis, A. *et al.*, 1997. wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple-refined dummy atomic models. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 53(Pt 4), S.448–455.
- Petty, N.K. *et al.*, 2007. Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends in Biotechnology*, 25(1), S.7–15.
- Plançon, L., Chami, M. & Letellier, L., 1997. Reconstitution of FhuA, an Escherichia coli outer membrane protein, into liposomes. Binding of phage T5 to FhuA triggers the transfer of DNA into the proteoliposomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(27), S.16868–16872.
- Pluschke, G. *et al.*, 1986. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and monoclonal antibodies as tools for the subgrouping of Escherichia coli lipopolysaccharide O18 and O23 antigens. *Infection and Immunity*, 51(1), S.286–293.
- Pokorná, M. *et al.*, 2006. Unusual Entropy-Driven Affinity of Chromobacterium violaceum Lectin CV-III toward Fucose and Mannose. *Biochemistry*, 45(24), S.7501–7510.
- Quioco, F.A., 1986. Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annual Review of Biochemistry*, 55, S.287–315.
- Quioco, F.A. & Vyas, N.K., 1984. Novel stereospecificity of the L-arabinose-binding protein. *Nature*, 310(5976), S.381–386.
- Quioco, F.A., Wilson, D.K. & Vyas, N.K., 1989. Substrate specificity and affinity of a protein modulated by bound water molecules. *Nature*, 340(6232), S.404–407.
- Raetz, C.R.H. *et al.*, 2007. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 76, S.295–329.
- Raimondo, L.M., Lundh, N.P. & Martinez, R.J., 1968. Primary adsorption site of phage PBS1: the flagellum of Bacillus subtilis. *Journal of Virology*, 2(3), S.256–264.

- Ravn, P. *et al.*, 2007. The Thomsen-Friedenreich disaccharide as antigen for in vivo tumor targeting with multivalent scFvs. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 56(9), S.1345–1357.
- Richter, W. *et al.*, 2011. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate Immunity*, 17(5), S.427–438.
- Roa, M., 1981. Receptor-triggered ejection of DNA and protein in phage lambda. *FEMS Microbiology Letters*, 11(4), S.257–262.
- Schade, S.Z., Adler, J. & Ris, H., 1967. How bacteriophage chi attacks motile bacteria. *Journal of Virology*, 1(3), S.599–609.
- Scholl, D. *et al.*, 2001. Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 75(6), S.2509–2515.
- Schwartz, M., 1975. Reversible interaction between coliphage lambda and its receptor protein. *Journal of Molecular Biology*, 99(1), S.185–201.
- Seckler, R., 1998. Folding and function of repetitive structure in the homotrimeric phage P22 tailspike protein. *Journal of Structural Biology*, 122(1-2), S.216–222.
- Seckler, R. *et al.*, 1989. Reconstitution of the thermostable trimeric phage P22 tailspike protein from denatured chains in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(20), S.11750–11753.
- Seeberger, P.H., 2008. Automated carbohydrate synthesis as platform to address fundamental aspects of glycobiology--current status and future challenges. *Carbohydrate Research*, 343(12), S.1889–1896.
- Seltmann, G. & Holst, O., 2001. *The Bacterial Cell Wall* 1. Aufl., Springer-Verlag.
- Seul, A., 2008. *Tailspike Interactions in Bacteriophage P22*. Doktorarbeit. Universität Potsdam.
- Shionyu-Mitsuyama, C. *et al.*, 2003. An empirical approach for structure-based prediction of carbohydrate-binding sites on proteins. *Protein Engineering*, 16(7), S.467–478.
- Siebert, H.C. *et al.*, 2000. A new combined computational and NMR-spectroscopical strategy for the identification of additional conformational constraints of the bound ligand in an aprotic solvent. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 1(3), S.181–195.
- Sigurskjold, B.W., Berland, C.R. & Svensson, B., 1994. Thermodynamics of inhibitor binding to the catalytic site of glucoamylase from *Aspergillus niger* determined by displacement titration calorimetry. *Biochemistry*, 33(33), S.10191–10199.
- Sigurskjold, B.W. & Bundle, D.R., 1992. Thermodynamics of oligosaccharide binding to a monoclonal antibody specific for a *Salmonella* O-antigen point to hydrophobic interactions in the binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(12), S.8371–8376.
- Snyder, S., Kim, D. & McIntosh, T J, 1999. Lipopolysaccharide bilayer structure: effect of chemotype, core mutations, divalent cations, and temperature. *Biochemistry*, 38(33), S.10758–10767.
- Sobolev, V. *et al.*, 1999. Automated analysis of interatomic contacts in proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 15(4), S.327–332.

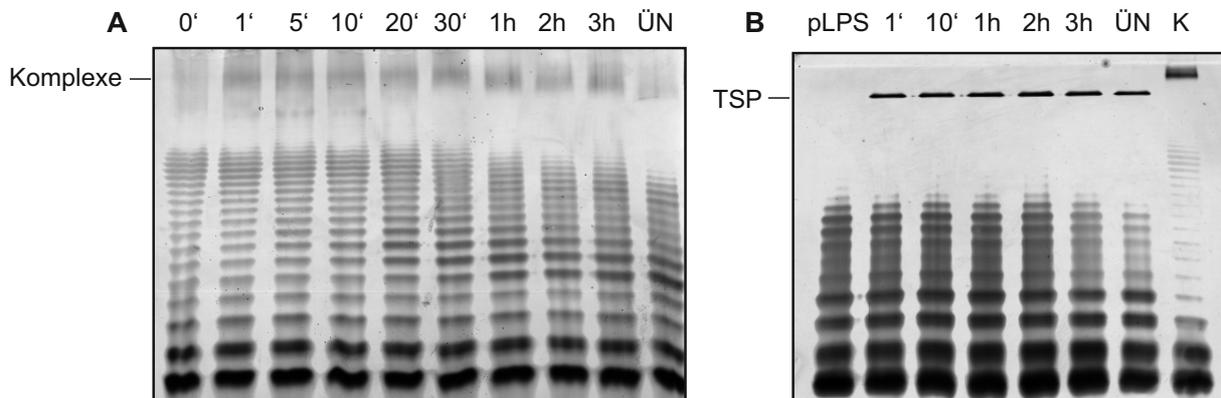
- Steinbacher, S. *et al.*, 1996. Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with Salmonella sp. O-antigen receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), S.10584–10588.
- Strauss, H. & King, J., 1984. Steps in the stabilization of newly packaged DNA during phage P22 morphogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 172(4), S.523–543.
- Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), S.207–234.
- Sturtevant, J.M., 1977. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(6), S.2236–2240.
- Suttle, C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057), S.356–361.
- Tang, L. *et al.*, 2005. Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine. *The EMBO Journal*, 24(12), S.2087–2095.
- Taroni, C., Jones, S. & Thornton, J.M., 2000. Analysis and prediction of carbohydrate binding sites. *Protein Engineering*, 13(2), S.89–98.
- Theillet, F.-X. *et al.*, 2011. Dynamic aspects of antibody:oligosaccharide complexes characterized by molecular dynamics simulations and saturation transfer difference nuclear magnetic resonance. *Glycobiology*, 21(12), S.1570–1579.
- Thompson, J.E. *et al.*, 2010. The K5 lyase KflA combines a viral tail spike structure with a bacterial polysaccharide lyase mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(31), S.23963–23969.
- Tomás, J.M. & Kay, W.W., 1984. Effect of bacteriophage P1 lysogeny on lipopolysaccharide composition and the lambda receptor of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 159(3), S.1047–1052.
- Toone, E.J., 1994. Structure and energetics of protein-carbohydrate complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(5), S.719–728.
- Töpfer-Petersen, E., 1999. Carbohydrate-based interactions on the route of a spermatozoon to fertilization. *Human Reproduction Update*, 5(4), S.314–329.
- Tormo, J. *et al.*, 1996. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose. *The EMBO Journal*, 15(21), S.5739–5751.
- Uetake, H., Nakagawa, T. & Akiba, T., 1955. The relationship of bacteriophage to antigenic changes in Group E salmonellas. *Journal of Bacteriology*, 69(5), S.571–579.
- Utrecht, C., 2006. *Wechselwirkungen des HK620-Tailspikeproteins mit Lipopolysaccharid-fragmenten*. Diplomarbeit. Universität Potsdam.
- Ulmer, E. *et al.*, 1987. Isolation and characterization of coliphage omega 18A specific for Escherichia coli O18ac strains. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene. Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 266(3-4), S.403–411.
- Varki, A., 2007. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, 446(7139), S.1023–1029.

- Vyas, N.K., 1991. Atomic features of protein-carbohydrate interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1(5), S.732–740.
- Vyas, N.K. *et al.*, 2002. Molecular recognition of oligosaccharide epitopes by a monoclonal Fab specific for *Shigella flexneri* Y lipopolysaccharide: X-ray structures and thermodynamics. *Biochemistry*, 41(46), S.13575–13586.
- Vyas, N.K., Vyas, M.N. & Quioco, F.A., 1991. Comparison of the periplasmic receptors for L-arabinose, D-glucose/D-galactose, and D-ribose. Structural and Functional Similarity. *Journal of Biological Chemistry*, 266(8), S.5226–5237.
- Weis, W.I. & Drickamer, K., 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*, 65, S.441–473.
- Weishaupt, M., Eller, S. & Seeberger, P.H., 2010. Solid phase synthesis of oligosaccharides. *Methods in Enzymology*, 478, S.463–484.
- Wendlinger, G., Loessner, M.J. & Scherer, S., 1996. Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself. *Microbiology (Reading, England)*, 142 ( Pt 4), S.985–992.
- Westerlind, U. & Kunz, H., 2011. Synthetic vaccines from tumor-associated glycopeptide antigens. *Chimia*, 65(1-2), S.30–34.
- Westphal, O. *et al.*, 1952. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung. B, A journal of chemical sciences*, 7(3), S.148–155.
- Williams, S.R. *et al.*, 2008. Retargeting R-type pyocins to generate novel bactericidal protein complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), S.3868–3876.
- Winston, F., Botstein, D. & Miller, J.H., 1979. Characterization of amber and ochre suppressors in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 137(1), S.433–439.
- Xu, R. & Wilson, I.A., 2011. Structural Characterization of an Early Fusion Intermediate of Influenza Virus Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 85(10), S.5172–5182.
- Yoder, M.D. & Jurnak, F., 1995. Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(5), S.335–342.
- Zaccheus, M.V. *et al.*, 2012. Structural studies of the O-antigen polysaccharide from *Escherichia coli* H having O18 serogroup specificity and aspects of its interaction with the tailspike endoglycosidase of the infecting bacteriophage HK620. Manuskript.

## 6. Anhang



**Abb. 6-1:  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen zur Quantifizierung der Konzentration an Hexasaccharid mit internem Standard.** Die NMR-Messungen wurden von A. Mainz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Reif (FMP, Berlin) angefertigt. Gezeigt ist ein Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -Spektrums nach 256-Scans. Für die Messungen wurden Aliquots der Hexasaccharid-Lösung lyophilisiert und anschließend in 0,2 mM DSS- $\text{D}_2\text{O}$  (4,4-Dimethyl-4-Silapentan-1-Sulfonsäure in  $\text{D}_2\text{O}$ ) aufgenommen. Die Messungen wurden an einem 750 MHz NMR Spektrometer (17.62 Tesla, Bruker Biospin) mit einem *Recycle Delay* von 20 s benutzt, um Relaxation der Substanzen zu gewährleisten. Vergrößert wurden die Signale der Methylgruppe der Rhamnose bei 1,31 ppm und die der Acetylgruppen der N-Acetylglucosamine bei 2,01 und 2,05 ppm. Außen sind zudem die Puffersignale als Referenz bei den gleichen chemischen Verschiebungen gezeigt. Die Quantifizierung erfolgte über die Integration dieser Zuckersignale. Berechnet wurde die Konzentration mit Hilfe der bekannten Konzentration des internen Standards (DSS), dessen Signale bei 0 ppm sowie bei 0,63, 1,76 und 2,9 ppm integriert wurden.



**Abb. 6-2: Aktivität der Variante D339N/E372Q gegenüber LPS.** Der Verdau von LPS aus *E. coli* H TD2158 wurde wie zuvor beschrieben anhand von SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung beobachtet. Dazu wurden 0,5 mg/ml LPS (A) bzw. mit Wt-TSP vorverdautes LPS (B, pLPS) mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  der Variante D339N/E372Q in Standardpuffer inkubiert, Proben nach den im Gel gekennzeichneten Zeiten entnommen und die Reaktion durch Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff gestoppt. Die Kontrolle (K) in Gel B entspricht der Probe in Gel A nach 20 Minuten. Je Spur wurden 0,5  $\mu\text{g}$  LPS aufgetragen.

**Tabelle 6-1: Thermodynamische Parameter aus den Bindungsstudien der TSP-Varianten mit O18A1-Oktadecasaccharid mittels ITC.** Die Werte wurden wie zuvor beschrieben generiert (vgl. Tab. 3-3).

Variante	$T$ / °C	$n$	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
E372Q	25,0	1,14	132 ± 26	-39,2	-21,3	-17,9	n.d.
E372A	25,0	1,10	139 ± 22	-39,1	-30,0	-9,1	n.d.
D339N/E372Q	15,0	1,06	53 ± 21	-40,0	-15,9	-24,1	-1,55 ± 0,03
	20,0	1,08	51 ± 17	-40,2	-23,2	-17,0	
	25,0	1,12	63 ± 14	-41,4	-30,7	-10,7	
	30,0	1,09	77 ± 7	-41,2	-39,2	-2,0	
	35,0	1,12	71 ± 7	-42,1	-46,5	4,4	
D339N/E372A	25,0	1,15	521 ± 31	-35,8	-31,0	-4,8	n.d.
D339A/E372Q	25,0	1,01	42 ± 10	-42,1	-27,1	-15,0	n.d.
D339A/E372A	25,0	1,04	242 ± 29	-37,7	-29,2	-8,5	n.d.

**Tabelle 6-2: Statistiken zu den Datensätzen und der Datenverfeinerungen der Strukturbestimmungen der TSP-Varianten.** Die Abkürzungen ges., ä. S. und Rama. stehen für gesamt, äußerste Auflösungsschale bzw. Ramachandran. Die Berechnung der R-Werte ( $R_{work}$  und  $R_{free}$ ) wurde beschrieben (vgl. Abschnitt 2.2.5.4.).  $R_{sym}$  berechnet sich aus  $R_{sym} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$ , wobei  $I$  die Intensität des gemessenen Reflexes ist und  $\langle I \rangle$  die durchschnittliche Intensität des Reflexes.

	Wt (2X85)	E372Q (2X6W)	D339N (2X6X)	D339A (2X6Y)	E372Q <sub>ligandenfrei</sub>
<b>Datensatz</b>					
Röntgenquelle	Bessy BL1				
Detektor	MARMOSAIC	MARMOSAIC	MARMOSAIC	MARMOSAIC	MARMOSAIC
Raumgruppe	P321	P321	P321	P321	P321
Wellenlänge (Å)	0,91841	0,91841	0,91841	0,91841	0,91841
Auflösung (Å)	50-1,5	43,65-1,35	37,12-1,4	43,22-1,35	50,0-1,82
Einheitszelle	74,25 / 174,44	74,53 / 174,61	74,23 / 174,29	74,34 / 174,98	74,27 / 174,67
$R_{sym}$ [%] ges./ä. S.	4,9 / 23,5	4,6 / 34,5	5,1 / 52,2	4,8 / 34,5	6,3 / 37,0
$I/(\sigma I)$ ges./ä. S.	18,2 / 4,8	16,2 / 3,0	17,1 / 2,1	15,8 / 2,6	20,0 / 4,5
Vollständigkeit [%] ges./ä. S.	88,0 / 66,0	92,9 / 71,5	90,0/72,0	91,6 / 58,5	99,7 / 98,3
Redundanz ges./ä. S.	4,1 / 3,5	3,7 / 2,6	4,7 / 3,4	3,4 / 2,3	3,9 / 5,2
<b>Verfeinerung</b>					
Auflösung (Å)	36,31 – 1,50	36,44 – 1,35	37,12 – 1,48	37,17 - 1,35	36,13 - 1,82
Reflexe	79315	115308	99237	113302	48369
$R_{work}/R_{free}$	0,165 / 0,198	0,123 / 0,157	0,158 / 0,185	0,132 / 0,170	0,167 / 0,195
<b>B-Faktoren</b>					
Protein alle Atome (Å <sup>2</sup> )	14,2	13,1	17,4	11,8	9,3

Wasser / andere Heteroatome (Å <sup>2</sup> )	19,7 / 15,9	27,7 / 13,1	17,3 / 23,9	27,3 / 12,9	20,7 / 15,5
<b>Rmsd</b>					
Bindungslänge (Å)	0,010	0,011	0,010	0,010	0,019
Bindungswinkel (°)	1,33	1,45	1,38	1,33	1,80
Torsionswinkel (°)	7,12	7,1	6,9	7,0	7,6
Rama. Statistiken erwünscht/erlaubt	97,6 / 100,0	98,0 / 100,0	98,0 / 100,0	97,7 / 100,0	97,5 / 100,0

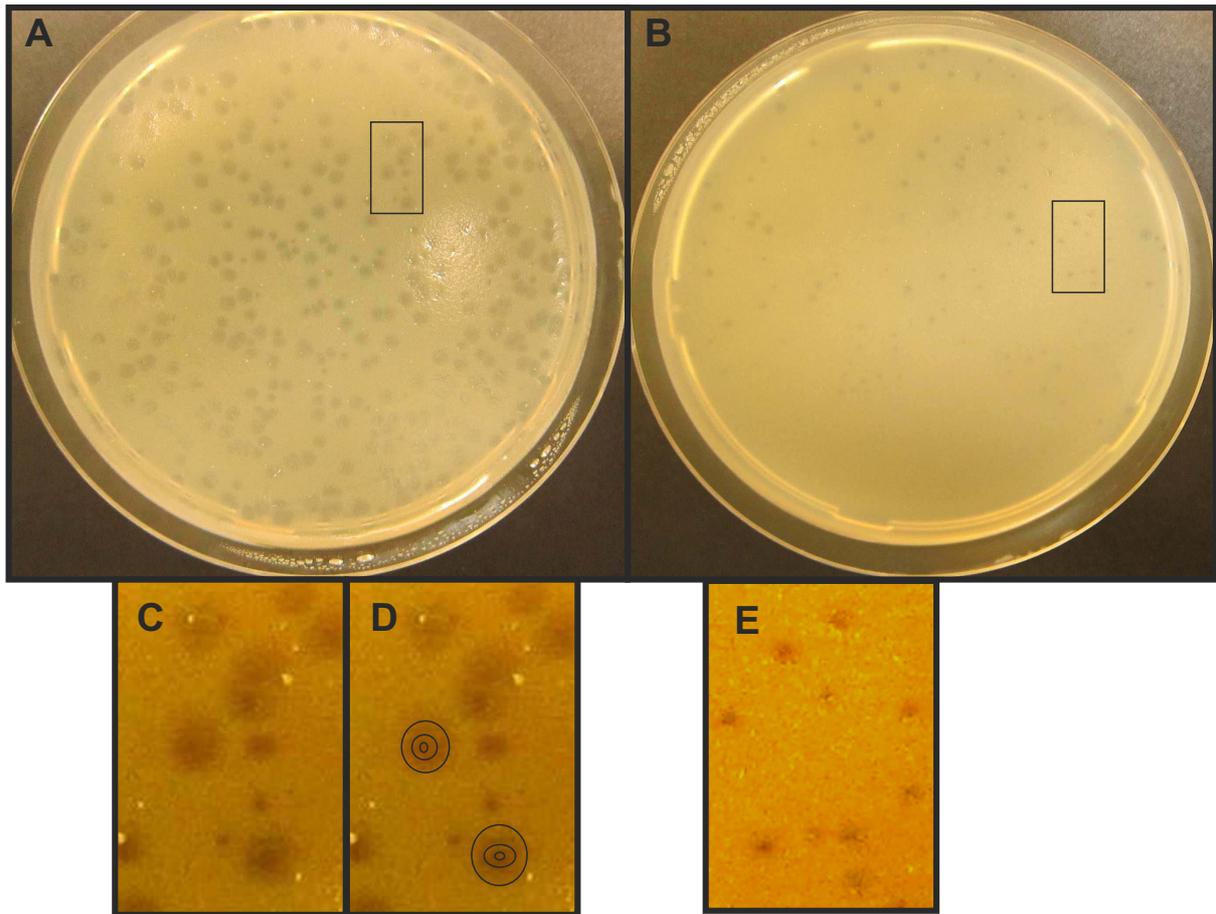
**Tabelle 6-3: Strukturelle Untersuchungen der Interaktionen zwischen O18A1-Hexasaccharid und den jeweiligen TSP-Varianten mit Hilfe von Programmen des Weizmannservers (bip.weizmann.ac.il/oca-bin/lpccsu) (Sobolev *et al.* 1999).** Spezifische Wechselwirkungen sind mit HB für Wasserstoffbrücke, Phob für hydrophobe Kontakte und DC für destabilisierende Kontakte gekennzeichnet (unspezifische mit -). Als destabilisierend werden hydrophil-hydrophobe Kontakte bezeichnet. Neben den Distanzen in Å sind die Kontaktflächen in Å<sup>2</sup> eingetragen. Einige Unterschiede zwischen den Varianten sind blau hervorgehoben. Werte in Klammern gehören zu der alternativen Konformation von NAG in Variante E372Q.

Kontakte	Wt	D339N	D339A	E372Q
Ram-Gly 211	3,5 Å; 6,1; HB	3,6 Å; 20,3; HB	3,5 Å; 5,2; HB	3,6 Å; 5,2; HB
Ram-His212	2,7 Å; 34,1; HB	2,7 Å; 30,1; HB;DC	2,7 Å; 36,5; HB;DC	2,7 Å; 30,4; HB;DC
Ram-Gln242	3,0 Å; 25,4; HB	3,0 Å; 27,4; HB	3,1 Å; 24,7; HB	3,1 Å; 30,1; HB
Ram-Phe247	3,8 Å; 31; Phob	3,8 Å; 31,4; Phob	3,8 Å; 31,4; Phob	3,8 Å; 31,4; Phob
Ram-Pro252	3,9 Å; 16; Phob,DC	4,1 Å; 16,5; Phob,DC	4,2 Å; 14,4; Phob,DC	4,2 Å; 16,8; Phob,DC
Ram-Leu282	3,7 Å; 18,4; DC	3,7 Å; 22,7; DC	3,6 Å; 17,8; DC	3,5 Å; 19,3; DC
Ram-Trp314	3,9 Å; 19,4; HB, Phob, DC	3,9 Å; 18,7; HB, Phob, DC	3,9 Å; 21,1; HB, Phob, DC	4,0 Å; 18,1; HB, Phob, DC
Glc1-Leu282	3,7 Å; 22,2; Phob, DC	3,8 Å; 26,7; DC	3,6 Å; 24,2; DC, Phob	3,7 Å; 22,6; DC, Phob
Glc1-Trp308	3,9 Å; 3,6; Phob	3,8 Å; 4,3; Phob	3,9 Å; 4,4; Phob	3,9 Å; 5,4; Phob
Gal-Leu282	3,6 Å; 6,6; DC	4,5 Å; 2,1; DC	3,6 Å; 6,5; DC	3,8 Å; 5,6; DC
Gal-Thr307	3,5 Å; 15,2; DC	3,3 Å; 27,9; DC	3,5 Å; 27,4; DC	3,4 Å; 28,2; DC
Gal-Trp308	3,6 Å; 9,2; Phob	4,0 Å; 9,5; Phob, HB	3,8 Å; 4,9; Phob	3,9 Å; 3,8; Phob
Gal-Asp339	4,4 Å; 10,6; DC	3,4 Å; 37,4; DC; HB	5,1 Å; 6,2; DC	4,2 Å; 12,6; DC
Gal-Tyr344	3,1 Å; 19,0; HB	3,1 Å; 30,0; HB	3,0 Å; 19,6; HB	2,9 Å; 20,0; HB
Gal-His397	4,1 Å; 4,9; HB	4,0 Å; 13,8; HB	4,0 Å; 5,7; HB	4,0 Å; 5,5; HB
Gal-Glu400	3,8 Å; 1,6; HB			3,6 Å; 1,6; HB
Gal-Asn471		4,5 Å; 18,0; HB		
Nag1-Trp308	3,2 Å; 35,4; -	3,3 Å; 33,7; -	3,2 Å; 36,6; -	3,2 Å; 35,0; -
Nag1-Thr311	3,7 Å; 28,3; HB, DC	3,7 Å; 29,4; HB, DC	3,7 Å; 27,4; HB, DC	3,6 Å; 32,1; HB, DC
Nag1-Gly313	4,0 Å; 10,2; HB	4,2 Å; 6,2; HB	4,0 Å; 10,0; HB	4,0 Å; 10,4; HB
Nag1-Trp314	3,4 Å; 23,8; HB	3,6 Å; 22,1; HB	3,3 Å; 24,1; HB	3,4 Å; 22,7; HB
Nag1-Asn315	2,6 Å; 24,4; HB, DC	2,7 Å; 30,3; HB, DC	2,7 Å; 22,6; HB, DC	2,7 Å; 24,1; HB, DC
Nag1-Tyr344	3,6 Å; 26,0; -	3,6 Å; 27,6; -	3,6 Å; 26,7; -	3,7 Å; 26,9; -
Nag1-Asn346	2,8 Å; 31,1; HB, DC	2,9 Å; 26,3; HB, DC	2,8 Å; 32,1; HB, DC	2,9 Å; 32,1; HB, DC
Nag1-His397	5,4; 3,1; Phob	5,5 Å; 3,8; Phob	5,6 Å; 2,2; Phob	5,4 Å; 2,5; Phob
Nag1-Ala399	3,7 Å; 31,9; Phob, DC	3,7 Å; 32,8; Phob, DC	3,8 Å; 32,5; Phob, DC	3,9 Å; 29,6; Phob, DC
Nag1-Glu400	2,9 Å; 21,4; HB, Phob, DC		3,0 Å; 22,3; HB, Phob, DC	2,9 Å; 22,0; HB, Phob, DC
Nag2-Thr307	3,5 Å; 13,9; Phob		3,6 Å; 13,5; Phob	3,7 Å; 7,9 (4,5); Phob
Nag2-Trp308	2,9 Å; 30,7; HB,		2,9 Å; 30,7; HB, DC	2,9 Å; 9,1; HB

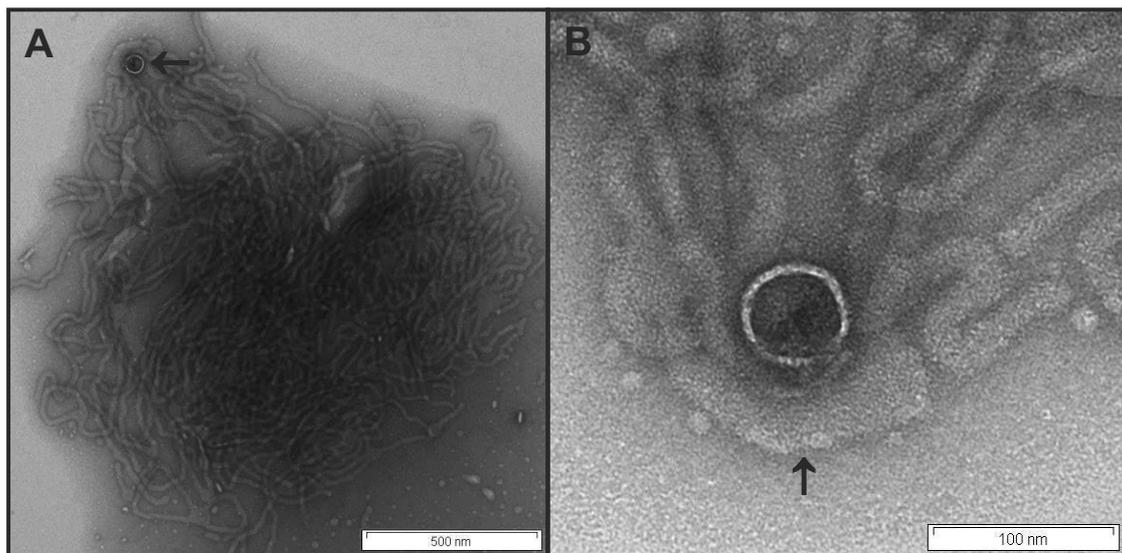
	DC			(3,0 Å; 22,3;DC,HB)
Nag2-Asp339	3,0 Å; 35,7; HB, Phob, DC		3,9 Å; 30,1; Phob, DC	3,0 Å; 22,8; Phob, HB (2,9 Å;3,2;HB)
Nag2-Ser 341	3,8 Å; 7,6; DC		3,7 Å; 14,3; DC,HB	3,2 Å; 12,4; HB, DC (3,3 Å;16,4;DC)
Nag2-Tyr344	3,2 Å; 16,3; -		3,2 Å; 15,6; -	3,2 Å; 4,2; - (3,1 Å; 12,1)
Nag2-Cys369			5,3 Å; 0,2; DC	
Nag2-Glu372	2,6 Å; 33,3; HB, DC		2,5 Å; 37,1; HB, DC	3,0 Å; 20,9; HB (2,7 Å;11,4;HB)
Nag2-His374	4,5; 3,6; -		4,5 Å; 4,3; -	4,4 Å; 1,1 (1,6); -
Nag2-Tyr393	3,5 Å; 22,0; HB		3,5 Å; 33,5; HB	3,2 Å; 18,5; HB (3,1 Å;10,0;-)
Nag2-His397	2,8 Å; 31,7; HB		2,7 Å; 32,6; HB	2,7 Å; 20,8 (10,7); HB
Nag2-Asn471	2,9 Å; 20,8; HB, DC		3,0 Å; 20,0; HB, DC	3,0 Å; 15,8; HB, DC (3,2 Å;1,5;HB,DC)
Glc2-Tyr393	4,0 Å; 12,4; HB		4,1 Å; 19,8; HB	3,9 Å; 20,3; HB
Glc2-Val395	4,0 Å; 13,1; DC		3,9 Å; 19,5; DC	3,7 Å; 26,5; DC
Glc2-His397	3,4 Å; 14,0; -		3,5 Å; 13,4; -	3,5 Å; 6,2; -
Glc2-Ile426	4,2 Å; 5,2; DC		4,1 Å; 6,0; DC	4,1 Å; 6,4; DC
Glc2-Leu427	3,4 Å; 6,1; HB		3,4 Å; 6,6; HB	3,5 Å; 5,9; HB
Glc2-Gly428	3,3 Å; 32,9; HB		3,3 Å; 26,9; HB	3,3 Å; 26,5; HB
Glc2-Ser429	4,0 Å; 5,2; HB		4,0 Å; 4,8; HB	4,1 Å; 4,0; HB
Glc2-Asp430	2,8 Å; 30,3; HB,DC		2,8 Å; 31,5; HB,DC	2,8 Å; 31,6; HB,DC
Glc2-Gly468	3,0 Å; 29,5; HB		3,0 Å; 29,6; HB	2,9 Å; 29,9; HB
Glc2-Pro469	2,7 Å; 28,1; HB, DC		2,7 Å; 27,6; HB, DC	2,7 Å; 27,6; HB, DC
Glc2-Asp470	3,6 Å; 16,9; DC		3,6 Å; 18,4; DC	3,5 Å; 17,4; HB, DC
Glc2-Asn471	3,3 Å; 23,3; HB, DC		3,4 Å; 21,7; HB, DC	3,4 Å; 22,9; HB, DC
Glc2-Arg505	4,6 ; 4,0; HB		4,6 Å; 3,6; HB	4,6 Å; 4,2; HB

**Tabelle 6-4: Thermodynamische Parameter aus den Bindungsstudien der TSP-Varianten mit O18A-Pentadecasaccharid mittels ITC. Die Werte wurden wie zuvor beschrieben generiert (vgl. Tab. 3-3).**

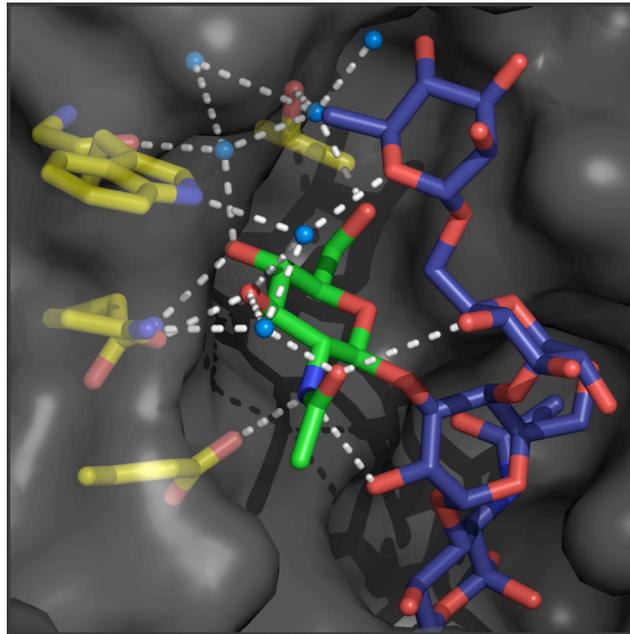
Variante	$T$ / °C	$n$	$K_D$ / nM	$\Delta G$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta H$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$-T\Delta S$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ / kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
<b>E372Q</b>	25,0	1,01	206 ± 14	-38,2	-42,0	3,8	n.d.
<b>E372A</b>	25,0	1,07	98 ± 19	-40,0	-43,2	3,2	n.d.
<b>D339N/E372Q</b>	20,2	1,03	195 ± 17	-37,6	-44,5	6,9	-1,69 ± 0,08
	25,0	1,00	323 ± 25	-37,0	-52,7	15,7	
	30,0	1,03	292 ± 18	-37,9	-58,3	20,4	
	35,0	0,97	280 ± 11	-38,6	-68,2	29,6	
	45,0	0,99	356 ± 33	-39,2	-86,5	47,3	
<b>D339N/E372A</b>	25,0	1,05	541 ± 43	-35,7	-50,2	14,5	n.d.
<b>D339A/E372Q</b>	25,0	1,03	202 ± 8	-38,2	-45,3	7,1	n.d.
<b>D339A/E372A</b>	25,0	0,95	297 ± 28	-37,3	-41,5	4,2	n.d.



**Abb. 6-3: Einfluss von LPS auf die Infektiösität des Phagen HK620.** Gezeigt sind exemplarisch 2 Platten aus dem Inhibitions-experiment (vgl. Abschnitt 3.11.5.). Dabei handelt es sich um eine Kontrolle (A), die mit Puffer inkubiert wurde, und um eine Probe, die vor dem Plattieren mit 25 µg/ml LPS aus *E. coli* H TD2158 bei 37°C inkubiert wurde (B). Durch gleiche Vergrößerung der Ausschnitte aus Abb. A und B und Verdunkelung wurde versucht, die Unterschiede in der Plaque-Morphologie deutlich abzubilden (C-E). Die Kreise (D) symbolisieren in etwa die drei Phasen in den Plaques der Kontrolle.



**Abb. 6-4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HK620-Phagen in Anwesenheit von LPS des Antigen-Typs O18A.**  $10^9$  Pfu/ml wurden in 50 mM TrisHCl pH 7,6, 4 mM MgCl<sub>2</sub> mit 0,1 mg/ml LPS des Typs O18A über Nacht bei 37°C inkubiert, anschließend auf die Kupfernetze gegeben und in einem *negative staining* mit Uranylacetat gefärbt. Der Maßstab ist rechts unten gezeigt, die Länge des Balkens entspricht 500 nm (A) bzw. 100 nm (rechts).



**Abb. 6-5: Das Wasserstoffbrücken-Netzwerk an der Bindestelle von HK620TSP für das N-Acetylglucosamin in der Seitenkette des O18A1-Antigens (PDB: 2vjj). Gezeigt sind interagierende Aminosäuren (T311, G313, N314, N346, E400) sowie Wassermoleküle (blaue Kugeln). Gestrichelte Linien beschreiben das Wasserstoffbrücken-Netzwerk um das N-Acetylglucosamin in der Seitenkette des O18A1-Antigens.**

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Robert Seckler und Stefanie Barbirz für die Bereitstellung des Themas und die Freiheiten danken, die ich während meiner Doktorarbeit genießen durfte. Zudem gilt ihnen mein besonderer Dank für das Privileg der Teilnahme an vielen internationalen Konferenzen, was mir viel Spaß bereitet hat und mich persönlich sowie meine Projekte vorangetrieben hat. Steffi, dir möchte ich zudem besonders für die gute Unterstützung am Ende der Promotion danken.

Für die gute Arbeitsatmosphäre möchte ich natürlich Robert Seckler und Stefanie Barbirz ebenso wie allen anderen Mitglieder des Arbeitskreises danken, die ich während meiner Zeit kennenlernen durfte. Besonders erwähnen möchte ich dabei Marion, Jana, Andreas, Kerstin, Franzi, Mandy, Simone, Doro, Sabine, Igor, Verena, Klaus, Natalie und Christian. Dabei sei Jana, Mandy und Misone für jegliche Unterstützung im Labor gedankt und sei es, dass ich vor lauter „Bäumen im Wald“ irgendeine Chemikalie nicht mehr gefunden habe und sie rettend zur Seite standen. Apropos Bäume- Simone, dir danke ich für die vielen gemeinsamen Yoga-Stunden, die mir den nötigen Ausgleich beschert haben.

Jasmin Kurtzke, Joan Röhl und Carolin Döring möchte ich besonders herzlich danken für die Unterstützung als Hiwis. Ihr ward nicht nur eine tolle Unterstützung, es hat vor allem sehr viel Spaß mit euch gemacht. Gleiches gilt für meine „Bachelorette“ Sophie Hertel.

Sibylle Rüstig aus der Gruppe von Prof. Koetz möchte ich sehr für die schönen TEM-Aufnahmen danken.

Andy Mainz möchte ich für die Partygespräche mit Patrick und den daraus resultierten NMR-Messungen danken, die er so schnell für mich gemessen hat und die mir sehr geholfen haben.

Ich möchte Dorothee Andres für anregende Diskussionen über Phagen danken und für die gemeinsame Zeit bei verschiedenen Konferenzen mit vielen interessanten und lustigen Momenten (japanische Toiletten werden mir immer ein Lächeln auf die Lippen zaubern).

Ich danke allen, die Korrektur gelesen haben und vor allem Verena Ezerski. Schön, dass du Christians Platz eingenommen hast. Du hast ihn würdig vertreten- es war schön mit dir!

Der Arbeitsgruppe Udo Heinemann am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin und dabei vor allem Jürgen Müller sei gedankt für die Zusammenarbeit bezüglich der gelösten Kristallstrukturen. Ulrich Gohlke danke ich für die schnelle Lösung der E372Q-Struktur und für die Arbeit an den noch nicht abgeschlossenen Strukturen.

Nun komme ich zu den „großen Helden“ (neben mir) während meiner Doktorarbeit: Natalie und Christian, euch danke ich für euer stets offenes Ohr, eure starken Schultern und eure Geduld mit meinem manchmal launischen und aufbrausendem Temperament. Ihr ward die besten Büropartner, die man sich wünschen konnte, und, euch als Freunde gefunden zu haben, war neben meiner Hochzeit das Schönste während der Promotionszeit! Christian, Jo, Jannik und Laurin: euch danke ich für die vielen schönen Abende in eurer kleinen Chaos-Familie, die Balsam für die Seele sind und die ich nicht missen möchte.

Meinen Geschwistern und meinen Eltern, Jürgen und Brigitte, möchte ich für den Rückhalt danken und für die Gewissheit, dass ihr immer da seid! Die gemeinsamen Dänemark-Urlaube, die mich während der Promotion wieder „geerdet“ haben, sollen nicht unerwähnt bleiben.

Natürlich danke ich meinem Mann, Patrick, aus tiefstem Herzen. Wir haben deine Doktorarbeit zu Beginn unserer Beziehung durchlebt und nun hast du dich mehr als revangiert und meine Launen heldenhaft ertragen. Es waren auch für dich arbeitsreiche Jahre, trotzdem hast du stets Inseln (dazu zähle ich neben den Inseln im Alltag und den tollen Urlauben auch unsere Hochzeit ☺) geschaffen und mich mit Likör43 und Folgen bei Laune gehalten. Dein immenser Glaube an mich und meine Fähigkeiten sind meine größte Triebkraft.