

Untersuchungen zur Induktion der epithelialen Abwehr durch *Pseudomonas aeruginosa*

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades

Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

Manfred Czapp

Kiel 2008

Referent/in:
Korreferent/in:.....
Tag der mündlichen Prüfung:
Zum Druck genehmigt: Kiel, den

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Barrierefunktion der Haut	4
1.2	Angeborene und erworbene Immunität	4
1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> und die epitheliale Abwehr.....	8
1.3.1	Bedeutung von <i>P. aeruginosa</i> als Krankheitserreger	8
1.3.2	<i>P. aeruginosa</i> und Cystische Fibrose.....	10
1.4	Flagellin als Induktor einer proinflammatorischen Antwort.....	11
1.5	Produktion von Rhamnolipiden	14
1.6	Ziel der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Bezugsquellen von Enzymen und Chemikalien	19
2.1.1	Enzyme und andere Proteine.....	19
2.1.2	Chemikalien	19
2.2	Geräte	19
2.3	Verbrauchsmaterialien	20
2.4	Oligonukleotide	20
2.5	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	21
2.5.1	Zellkulturmedien und Zusätze	21
2.5.2	HaCaT-Zellen.....	21
2.5.3	HEK293-Zellen.....	21
2.5.4	Primäre humane Keratinozyten.....	22
2.5.5	Subkultivierung der Zellen.....	22
2.5.6	Stimulation von Zellen.....	22
2.5.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
2.6	Bakterienstämme	23
2.6.1	Nährmedien für Bakterienkultivierung	24
2.6.2	Generierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Kulturüberständen.....	24
2.7	Isolierung und Charakterisierung von Flagellin	25
2.7.1	Flagellinisolierung	25
2.7.2	Trypsin-Verdau von Flagellin in Lösung	25
2.8	Modulatorische Eigenschaften von Rhamnolipid auf <i>P. aeruginosa</i>	26
2.8.1	Extraktion von Rhamnolipiden aus <i>Pseudomonas</i> Kulturüberständen	26

2.8.2	Kultivierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Anwesenheit von Rhamnolipiden	26
2.8.3	Trypsin-Verdau im Gel	27
2.9	Biofilm-Assay	28
2.10	Semiquantitative RT-PCR	29
2.10.1	RNA-Isolierung	29
2.10.2	Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	29
2.10.3	Reverse Transkription von RNA (cDNA-Sythese)	29
2.10.4	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	30
2.11	Proteinanalytik	31
2.11.1	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.11.2	Anfärbung der Gele	32
2.11.2.1	Coomassie Brillant Blue-Färbung	32
2.11.2.2	Silberfärbung	32
2.11.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels molaren Extinktionskoeffizienten	33
2.12	Immunologische Methoden	34
2.12.1	Western Blot	34
2.12.2	ELISA	34
2.12.2.1	IL-8 ELISA	34
2.12.2.2	hBD-2 ELISA	35
2.12.3	Hautstimulation und Immunhistochemie	36
2.13	HPLC	37
2.13.1	Gelfiltration	37
2.13.2	Anionenaustauschchromatographie	37
2.14	Massenspektrometrie	38
2.15	Darstellung der Ergebnisse	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Auswirkung von Rhamnolipid auf <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und die IL-8-Induktion des Bakterienüberstandes	40
3.1.1	Isolierung und Charakterisierung von Rhamnolipiden in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturen	40
3.1.2	Wirkung von Rhamnolipid auf die Biofilmbildung	42
3.1.3	Rhamnolipide erhöhen die IL-8-Induktion in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Kulturüberständen	44

3.1.4	Rhamnolipide scheren ein IL-8- und hBD-2-induzierendes PAM von der äußeren bakteriellen Membran ab.....	46
3.1.5	Die Modulation der Bakterienoberfläche durch Rhamnolipide ist von der CMC und der Konzentration divalenter Kationen abhängig.....	48
3.1.6	Der Effekt von Rhamnolipid auf die Bakterienoberfläche ist abhängig von der Wachstumsphase der Bakterien.....	51
3.1.7	Einfluss von Detergenzien auf <i>P. aeruginosa</i> und die IL-8-Induktion..	53
3.1.8	Charakterisierung des IL-8- und hBD-2-induzierenden Faktors aus Überständen Rhamnolipid-behandelter <i>Pseudomonaden</i>	55
3.1.9	Wirkung von Rhamnolipiden auf verschiedene <i>Pseudomonas</i> -Stämme und Mutanten	59
3.1.10	Rhamnolipide scheren Flagellin von der bakteriellen Oberfläche ab...	60
3.1.11	<i>Ex vivo</i> Untersuchungen zur Induktion von Psoriasin in der Haut.....	63
3.2	Flagellin.....	64
3.2.1	Aufreinigung von Flagellin.....	64
3.2.2	Flagellin induziert IL-8 und hBD-2 in Keratinozyten	70
3.2.3	Verschiedene Flagellinpräparationen weisen eine verminderte IL-8-Induktion in Keratinozyten auf	73
4	Diskussion	76
4.1	Biofilmbildung von <i>P. aeruginosa</i>	76
4.2	Produktion von Rhamnolipiden durch <i>P. aeruginosa</i>	79
4.3	Rhamnolipide modulieren die äußere Membran von <i>P. aeruginosa</i>	81
4.4	Isolierung und Identifizierung von Flagellin	88
4.5	Flagellin als potentielles PAM einer proinflammatorischen Reaktion	90
4.6	<i>P. aeruginosa</i> und die epitheliale Abwehr – ein Modell	94
4.7	Ausblick.....	96
5	Zusammenfassung	97
6	Summary	99
7	Anhang	101
8	Abkürzungen	109
9	Literaturverzeichnis	111
10	Danksagung	125
11	Lebenslauf	126
12	Erklärung	127

1 Einleitung

1.1 Barrierefunktion der Haut

Die Haut stellt ein Grenzorgan des menschlichen Körpers mit der Umwelt dar und ist mit einer stabilen, individuellen mikrobiellen Hautflora besiedelt. Die Erhaltung dieses Zustandes ist einer strengen Regulation unterworfen, die garantiert, dass die residenten Mikroorganismen aufgrund des großen Nährstoffangebots in ihrem Wachstum kontrolliert und die Besiedlung durch pathogene Mikroorganismen verhindert wird.

Diese Funktion erfüllt in gesunder Haut vornehmlich das *Stratum corneum*, die oberste Hautschicht, die sich aus toten keratinhaltigen Zellen, den Korneozyten, in einer lipidhaltigen Region zusammensetzt. Die Haut verfügt über verschiedene Mechanismen, Infektionen zu verhindern. Durch regelmäßige Erneuerung der Oberflächen von Haut und Schleimhäuten (Desquamation) werden adhärierende pathogene Mikroorganismen mechanisch entfernt. Eine Lipidschicht aus langkettigen Fettsäuren sowie ein relativ niedriger pH-Wert erschweren zusätzlich die Adhärenz und das Eindringen von Bakterien.

Trotz vieler Mikrotraumen und der damit verbundenen Störung dieser physikalischen Barrierefunktion der Haut sind in gesunden Menschen die tieferen Hautschichten frei von Infektionen, was darauf hindeutet, dass die Haut weitere zusätzliche Abwehrmechanismen gegen invasierende Mikroorganismen besitzt.

1.2 Angeborene und erworbene Immunität

Bei einer drohenden Invasion pathogener Mikroorganismen wird zunächst das angeborene und anschließend das adaptive Immunsystem aktiviert. Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch konserviert und kommt in allen vielzelligen Organismen vor (Hoffmann et al., 1999). Es besteht aus einem Netzwerk von verschiedenen, sofort zur Verfügung stehenden Effektorzellen, die eine schnelle Immunantwort garantieren. Dazu zählen anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, aber auch zellvermittelte Phagozytose, Aktivierung des

Komplementsystems und die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden (AMP) (Pivarcsi et al., 2005; Seelen et al., 2005; Borregaard et al., 2005; Kantari et al., 2008). Durchdringt ein Pathogen die epitheliale Barriere, wird es unverzüglich von speziellen Zellen wie neutrophile Granulozyten (für Bakterien und Pilze), Eosinophile (für Parasiten), Natürliche Killerzellen (für virusinfizierte Zellen) und Makrophagen attackiert. Die Erkennung der pathogenen Mikroorganismen erfolgt durch Rezeptoren, den sogenannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), die spezifische pathogen-assoziierte Moleküle (PAMs) erkennen (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002). Die akute Entzündungsreaktion wird hervorgerufen durch Induktion von antimikrobiellen Genen und inflammatorischen Zytokinen (Takeda et al., 2003), gefolgt von einer Phagozyten-Aktivierung und einer Abtötung der Pathogene. Eine Hauptgruppe der PRRs stellen die Toll-Like-Rezeptoren (TLRs) dar, bei denen es sich um Mitglieder einer Familie von Proteinen handelt, die strukturell verwandt sind mit den Toll-Rezeptoren von *Drosophila melanogaster*. Bislang sind zehn Mitglieder beschrieben worden, die sich hinsichtlich der Ligandenspezifität, dem Expressionsmuster und den induzierenden Zielgenen unterscheiden (Janeway, Jr. und Medzhitov, 2002; Takeda et al., 2003). Die TLR bestehen aus einer extrazellulären Domäne aus aminoterminalen leucinreichen Wiederholungen und einer carboxyterminalen transmembranen TIR-Domäne (Toll/IL-1-Rezeptor). Sie erkennen spezifische Strukturen von pathogenen Mikroorganismen (Abb. 1), und regulieren die Aktivierung von angeborenem und adaptivem Immunsystem (Pasare und Medzhitov, 2004).

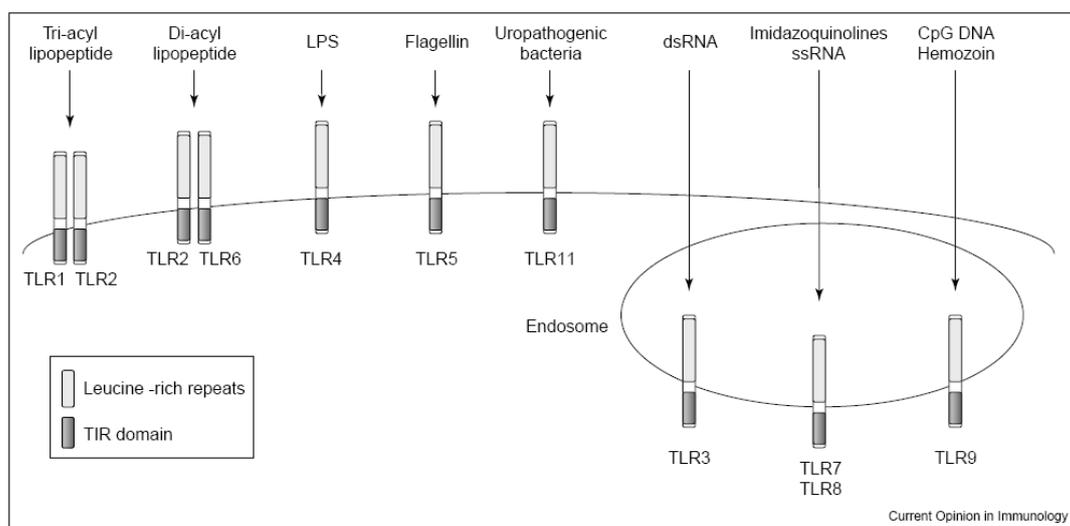


Abb. 1: Struktur und Liganden der TLR. (Kawai und Akira, 2005)

Humane Keratinozyten exprimieren konstitutiv TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 10, TLR7 und 8 hingegen nicht (Lebre et al., 2006). Die Erkennung der PAMs löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die eine Aktivierung von NF- κ B (Muzio et al., 1998) und eine Induktion von Defensinen, proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Interferon und damit eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems bewirkt.

AMPs bilden die Hauptbestandteile der angeborenen Immunität (Boman, 2000) und tragen als „chemische Barriere“ zu einer schnellen Abwehr des Körpers gegen invasierende Mikroorganismen bei. Ihre weite Verbreitung in Vertebraten, Pflanzen und Invertebraten verdeutlichen ihre Bedeutung in der angeborenen Immunität (Schröder, 1999; Schröder und Harder, 1999; Boman, 2003). Manche AMPs werden konstitutiv exprimiert und kontrollieren vermutlich Wachstum und Zusammensetzung der Normalflora, andere AMPs werden mehr oder weniger spezifisch durch Mikroorganismen oder Zytokine induziert (Harder et al., 2001; Schröder und Harder, 2006). Die meisten AMPs töten Mikroorganismen, indem sie sich aufgrund ihres amphiphilen, kationischen Charakters in die Zellmembran einlagern und Poren bilden (Ganz, 2003; Hale und Hancock, 2007; Lee et al., 2008). Daneben üben sie weitere antimikrobielle Funktionen aus, indem sie die Zellwand-, Protein- und Nukleinsynthese der Bakterien sowie enzymatische Aktivitäten inhibieren können (Brogden, 2005; Hale und Hancock, 2007). Ferner sind sie in der Lage, direkt auf die PAMs einzuwirken, indem sie zum Beispiel die Bindung zwischen LPS und LBP („LPS-binding-protein) verhindern (Scott et al., 2000).

Die humanen AMPs lassen sich in vier Hauptgruppen einteilen: Defensine, Cathelicidine, S100-Proteine und Ribonukleasen (Harder et al., 2007). Als erstes induzierbares AMP des Menschen wurde das humane β -Defensin-2 (hBD-2) aus läsionaler psoriatischer Haut isoliert (Harder et al., 1997). hBD-2 wird in Keratinozyten, im Lungenepithel und im Intestinaltrakt gebildet und ist hauptsächlich aktiv gegen Gram-negative Bakterien und Pilze (Schröder und Harder, 1999). Des Weiteren wirkt es als Chemoattraktant für dendritischen Zellen und T-Zellen (Yang et al., 1999) sowie für humane Neutrophile (Niyonsaba et al., 2004) und Mastzellen (Niyonsaba et al., 2003). Die Expression von hBD-2 in Keratinozyten wird durch Zytokine und Bakterien induziert (Krisanaprakornkit et al., 2000; Liu et al., 2002). Die Immunreaktivität in der Haut ist in den obersten Schichten (*Stratum Corneum*) lokalisiert, wo hBD-2 in lipidreichen sekretorischen Organellen („lamellar bodies“) gelagert wird. Eine wichtige Bedeutung bei der hBD-2-Induktion nimmt der

Differenzierungsgrad der Keratinozyten ein, denn hBD-2 wird nur in differenzierten Zellen gebildet (Schröder und Harder, 2006). Die Promotor-Region weist putative Bindungstellen für Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, Activator-Protein-1 (AP-1), AP-2 und NF-IL-6 auf, die zugleich in einer proinflammatorischen Antwort involviert sind (Harder et al., 2000; Wehkamp et al., 2006).

Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems setzt unmittelbar ein, wenn eine Infektion durch das angeborene Immunsystem nicht verhindert werden kann. Das adaptive Immunsystem erkennt im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem ein beliebiges Antigen und weist damit eine höhere Anpassung an verschiedene Krankheitserreger auf. Es besteht hauptsächlich aus antigen-präsentierenden Zellen (dendritische Zellen) sowie aus B- und T-Lymphozyten. Es lässt sich in eine humorale- und zellvermittelte Immunantwort unterteilen. An der humoralen, antikörpervermittelten Immunantwort sind hauptsächlich B-Lymphozyten beteiligt, die nach Kontakt mit dem Antigen in eine antikörperproduzierende Plasmazelle differenzieren. Für die zellvermittelte Reaktion hingegen sind die T-Lymphozyten verantwortlich. Es existieren zwei verschiedene Sorten von T-Zellen: T-Killerzellen, die den Tod einer Zelle herbeiführen können, und T-Helferzellen, die andere Zellen des Immunsystems (z.B. B-Lymphozyten) aktivieren können.

Die Aktivierung der Leukozyten erfolgt durch Freisetzung von spezifischen Botenstoffen, die als Zytokine oder Chemokine bezeichnet werden. Chemokine bilden eine Gruppe innerhalb der Zytokine, die die Rekrutierung von Effektorzellen zum Entzündungsherd durch einen chemotaktischen Gradienten fördern. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Migration von Immunzellen aus dem Blut ins Gewebe. Bei ihnen handelt es sich um kleine Peptide (8-14 kDa), von denen bislang mehr als 50 Liganden bekannt sind, die ihre Wirkung nach Bindung an mehr als 20 G-gekoppelten Rezeptoren ausüben können (Bromley et al., 2008). Die Einteilung der Chemokine in verschiedene Unterfamilien (CC, CXC, CXXXC, C) erfolgt aufgrund der Anordnung der konservierten N-terminalen Cysteinreste (Zlotnik und Yoshie, 2000). Bei den CC-Chemokinen, die hauptsächlich chemotaktisch auf Monozyten wirken, befinden sich die Cysteine in unmittelbarer Nachbarschaft, während bei den CXC-Chemokinen, die zum Teil Neutrophile aktivieren, eine unspezifische Aminosäure (X) zwischen den Cysteinresten vorhanden ist. Zu den CXC-Chemokinen gehört unter anderem Interleukin-8 (IL-8), welches in der Epidermis vornehmlich neutrophile Granulozyten aktiviert (Uchi et al., 2000; Gröne, 2002). In

zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass IL-8 als Antwort auf verschiedene PAMs von den Epithelien gebildet und sezerniert wird (Massion et al., 1994; DiMango et al., 1995; Akhtar et al., 2003).

Da Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sich normalerweise nicht in Epithelien aufhalten, können sie nicht für die Resistenz gegenüber drohenden Infektionen verantwortlich gemacht werden.

1.3 *Pseudomonas aeruginosa* und die epitheliale Abwehr

1.3.1 Bedeutung von *P. aeruginosa* als Krankheitserreger

Die Gattung *Pseudomonas* umfasst Gram-negative, stäbchenförmige, monotrich begeißelte Bakterien, die in die Klasse der γ -Proteobakterien eingeordnet werden. Die Pseudomonaden gehören durch ihre vielseitige Substratverwertung und der Fähigkeit zum Leben auch unter nährstoffärmsten Bedingungen zu den anspruchslosesten Bakterien und kommen ubiquitär in Böden oder Wasserhabitaten vor (Spiers et al., 2000). Sie sind aerob, d.h. sie benutzen einen oxidativen Atmungsstoffwechsel, in dem Sauerstoff als Elektronenakzeptor dient. Bei einigen Arten kann unter anaeroben Bedingungen Nitrat als alternativer Elektronenakzeptor fungieren (Zumft, 1997).

Die Pseudomonaden können als opportunistische Krankheitserreger bei geschwächten Pflanzen und Tieren auftreten. Die für die Medizin wichtigste Art ist *Pseudomonas aeruginosa*. Obwohl *P. aeruginosa* zur residenten Hautflora des Menschen gehören kann (Cogen et al., 2008), kommt es bei gesunden Menschen selten zu Infektionen. Betroffen von Infektionen sind vor allem Patienten, die an Cystischer Fibrose oder an einem geschwächten Immunsystem leiden. *P. aeruginosa* Infektionen können ebenso bei Patienten mit Verbrennungen, Trauma, nach Intubation oder Katheterisierung auftreten (Gould und Wise, 1985; Rolston und Bodey, 1992). Das Bakterium verursacht Infektionen der Lunge, des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes sowie Dermatitis, Blutvergiftungen und systemische Infektionen (Tramper-Stranders et al., 2008; Mittal et al., 2008). Ein besonderes Problem stellt *P. aeruginosa* als Erreger nosokomialer Infektionen in Krankenhäusern dar und ist an 10-20% aller Infektionen beteiligt (Bodey et al., 1983). Betroffen sind

immunsupprimierte Patienten (Vincent et al., 1995), bei denen eine Mortalität von 16% erreicht wird (Sanchez-Velazquez et al., 2006). Durch sein geringes Nährstoffbedürfnis kann es sich im feuchten Milieu ungehindert verbreiten (Leitungswasser, Waschbecken, Katheter usw.) und ist aufgrund seiner hohen Resistenz gegenüber vielen Antibiotika schwer abzutöten.

Die hohe Pathogenität von *P. aeruginosa* beruht auf einer Vielzahl von Virulenzfaktoren, die für die Invasion und Verbreitung der Bakterien verantwortlich sind. Diese PAMs werden in zwei Gruppen unterteilt: zu den zellassozierten PAMs gehören LPS, Flagellin, Typ-IV-Pili und Alginate; die extrazellulären PAMs umfassen Proteasen, Hämolsine (z.B. Rhamnolipide), Exotoxin A und Pyocyanin (Abb. 2).

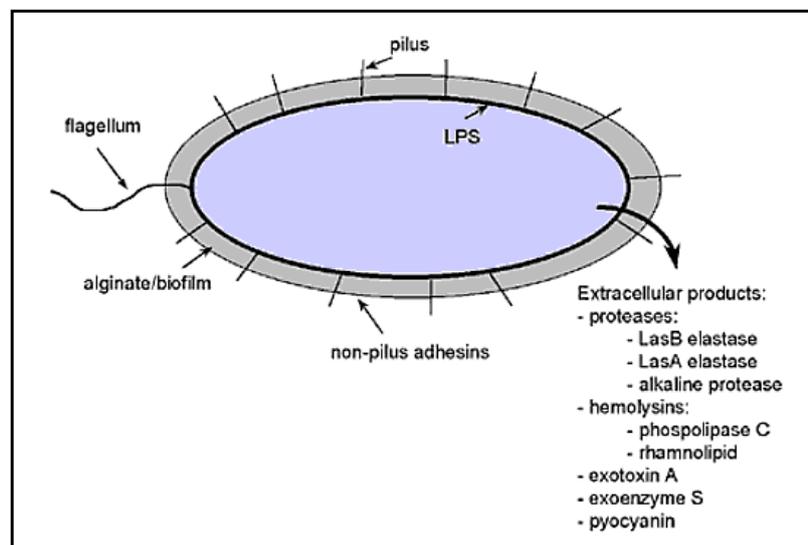


Abb. 2: Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* besitzt zellassozierte (Flagellum, Pilus, LPS, Alginate) und extrazelluläre Virulenzfaktoren wie Proteasen, Exotoxin A, Exoenzyme, Hämolsine (van Delden und Iglewski, 1998)

Zellassozierte Faktoren ermöglichen *P. aeruginosa*, einen Kontakt mit abiotischen und biotischen Grenzflächen wie z.B. der Haut herzustellen. Sie vermitteln also einen kritischen Schritt in der Kolonisierung. Nach erfolgtem Zellkontakt können verschiedene extrazelluläre Faktoren wie z.B. Toxine (ExoY, ExoS, ExoT und ExoU) über das Typ-III-Sekretionssystem in die eukaryotische Zelle injiziert werden, die durch ihre Zytotoxizität eine Invasion begünstigen (Yahr et al., 1996; Holder et al., 2001). Andere Virulenzfaktoren werden über das Typ-II-Sekretionssystem sekretiert. Zu diesen gehören Elastase, Exotoxin A und Alkaline Phosphatase, die zu einer

Invasion durch Zerstören der schützenden Glykocalix führen (Sandkvist, 2001; Cianciotto, 2005; Kipnis et al., 2006).

Von klinischer Relevanz ist zudem die Bildung von Biofilmen durch *P. aeruginosa*. Dabei handelt es sich um Gemeinschaften von Zellen, die in einer extrazellulären Matrix aus sezernierten Proteinen, Polysacchariden, DNA eingebettet sind und an einer biotischen oder abiotischen Oberfläche adhären können (Sutherland, 2001; Matsukawa und Greenberg, 2004; Allesen-Holm et al., 2006). Biofilme rufen verschiedenste Infektionen hervor (Costerton et al., 1999) und sind an 65-80% aller mikrobiellen Infektionen beteiligt (Wagner und Iglewski, 2008). Das Wachstum in einem Biofilm ermöglicht einen selektiven Vorteil gegenüber planktonisch wachsenden Bakterien, da sie resistenter gegen Destruktion durch Surfactants, Antibiotika und der Wirtabwehr sind. Die Synthese von Alginat ist zwar nicht essentiell für die Entwicklung eines Biofilms, doch wird diesem Polysaccharid eine wichtige Bedeutung bei der erhöhten Resistenz des Biofilms zugeschrieben (Hentzer et al., 2001; Wozniak et al., 2003; Leid et al., 2005).

1.3.2 *P. aeruginosa* und Cystische Fibrose

Bei der Cystischen Fibrose handelt es sich um die häufigste autosomal, rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit (Koch und Hoiby, 1993), die auf ein Gendefekt des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) beruht (Bear et al., 1992). Die Krankheit äußert sich in einer Funktionsstörung der endokrinen Drüsen, infolgedessen in der Lunge große Mengen viskoser Sekrete produziert werden. Das zähe Sekret kann vom Flimmerepithel der Trachea nur schwer abtransportiert werden und stellt einen guten Nährboden für Krankheitserreger wie *S. aureus* oder *P. aeruginosa* dar, wobei *P. aeruginosa* eine dominante Rolle bei der Lungeninfektion einnimmt (Gilligan, 1991). Bei Patienten mit Cystischer Fibrose wird die chronische und endemisch vorkommende Lungeninfektion, die mit einer hohen Mortalität einhergeht, durch die mukoide Form von *P. aeruginosa* hervorgerufen (May et al., 1991; Henry et al., 1992; Govan und Deretic, 1996). Diese ist gekennzeichnet durch die Produktion von Alginat (Pedersen et al., 1992). Charakteristisch für diese Infektionen ist die Bildung von Biofilmen, die die Bakterien resistent gegen Antibiotika und gegen die Immunabwehr des Körpers machen (Costerton et al., 1999; Singh et al., 2000; Wagner und Iglewski, 2008). In dieser

Phase der Infektion sind die mukoiden Pseudomonaden nur sehr schwer zu therapieren.

Die Zerstörung des Lungengewebes in chronischen CF-Patienten beruht auf dem massiven Influx von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) als Antwort auf die chronisch anhaltende Infektion, die gekennzeichnet ist durch oxidativen Stress sowie durch eine permanente Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 (DiMango et al., 1998; Ciofu et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass CF-Zelllinien als Antwort auf *P. aeruginosa* mehr proinflammatorische Zytokine ausschütten als normale Zelllinien (DiMango et al., 1995). Eine Überproduktion von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α) konnte zudem direkt im Sputum von CF-Patienten nachgewiesen werden (Bonfield et al., 1995; Schuster et al., 1995).

1.4 Flagellin als Induktor einer proinflammatorischen Antwort

P. aeruginosa besitzt ein einzelnes polares Flagellum, das für die Beweglichkeit und chemotaktische Funktionen des Bakteriums verantwortlich ist. Das Flagellum pathogener Bakterien trägt darüber hinaus zur Adhärenz an Zellen und anorganischen Oberflächen sowie zur Kolonisation und Invasion in der frühen Phase einer Infektion in prädisponierten Wirten bei (McSweegan und Walker, 1986; Giron et al., 2002; Lillehoj et al., 2002). Für das Flagellum von *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass es an respiratorisches Mucin (Ramphal et al., 1996; Ramphal und Arora, 2001; Lillehoj et al., 2002) oder auch an den epithelialen asialoGM1 Rezeptor (de Bentzmann et al., 1996; Feldman et al., 1998) bindet. Die Bedeutung als Virulenzfaktor wurde durch nicht-flagellierte Mutanten bestätigt, die in Mausexperimenten in ihrer Virulenz deutlich vermindert waren (Montie et al., 1982b). Das bakterielle Flagellum besteht aus einem Filament, das über einen Haken und einen Basalkörper in der äußeren Bakterienmembran verankert ist und über einen transmembranen Protonengradienten angetrieben wird (Abb. 3 A). Der Motorkomplex des Basalkörpers generiert mechanische Energie durch Rotieren des Haken und des Filaments, entweder im oder gegen den Uhrzeigersinn. Des Weiteren fungiert der Basalkörper als ein Typ-III-Sekretionsapparat, durch den Virulenzfaktoren sekretiert werden können (Macnab, 2004). Während des

Zusammenbaus des Filaments werden die Flagellin-Monomere an ihrem C-terminalen Ende durch das Chaperon FliS gebunden (Auvray et al., 2001; Ozin et al., 2003) und in ungefalteter Form über den Typ-III-Sekretionsapparat durch das Filament bis zum distalen Ende transportiert, wo es sich dann unter Kontrolle eines Cap-Proteins (FliD) selbst anfügt (Macnab, 2003).

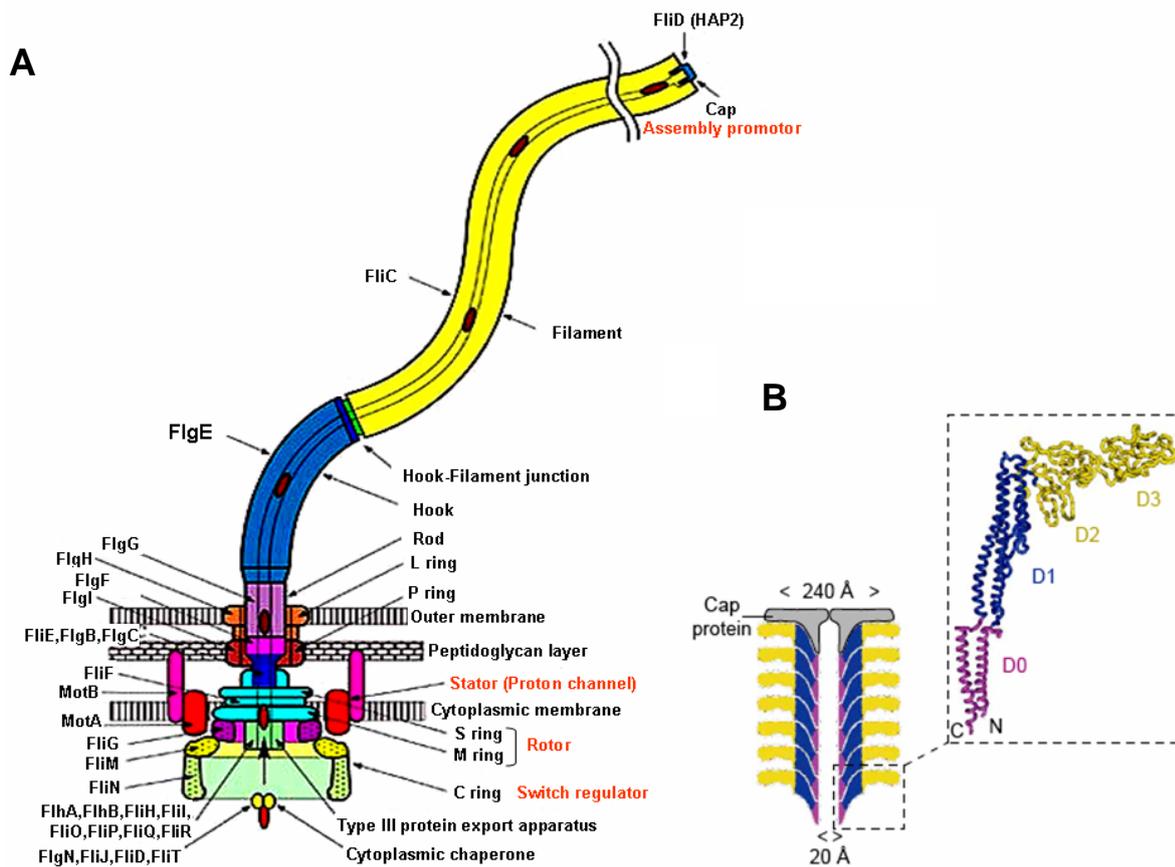


Abb. 3: Struktur und Organisation des Flagellums (*Salmonella typhimurium*) und ihrer monomeren Untereinheit Flagellin. A) Das Flagellum besteht aus einem Basalkörper, einem Haken und dem Filament. Die Rotation der Flagelle wird getrieben durch einen Protonengradienten. Der Flagellenmotor konvertiert elektrochemische Energie in Spannung durch die Interaktion von zwei Komponenten, dem Stator und dem Rotor. Der Stator besteht aus vielen Kopien von MotA und MotB, die sich zu einer größeren Einheit zusammenfügen und in der inneren Membran und im Peptidoglykan verankert sind. Der Rotor besteht aus vielen Einheiten von FliG, welche zusammen mit FliN und FliM den C-Ring formen. Die Spannung wird vom C-Ring über dem MS-Ring zum Haken und Filament übertragen. Modifiziert nach (Yonekura et al., 2002) **B)** Flagellin besteht aus den vier Domänen D0-D3: terminale α -helikale Ketten (D0, violett), die zentrale α -helikale Kette (D1, blau) und die hypervariable Region mit β -Faltblättern (D2-3, gelb). Beide helikale Ketten der D1-Domäne werden vom TLR5 erkannt (Ramos et al., 2004).

Strukturaufklärungen in *Salmonella typhimurium* zeigen, dass das Filament aus 11 umeinander gewundenen Protofilamenten besteht, die ein Polymer aus der monomeren Einheit Flagellin darstellen (Samatey et al., 2001). Flagellin weist eine äußere gebogene Gestalt auf und besteht aus vier globulären Domänen (D0-D4), von denen die D0- und D1-Domäne hoch konserviert sind (Abb. 3 B). Diese befinden sich an den N- und C-terminalen Enden des Proteins und flankieren eine zentrale Region (D2- und D3-Domäne), die hypervariabel in Größe und Zusammensetzung der Aminosäuren ist. Die axiale Interaktion zwischen den Untereinheiten erfolgt zwischen der D1-Domäne der oberen Untereinheit und der D1-Domäne sowie einem kleinen Bereich der D2-Domäne der unteren Einheit (Samatey et al., 2001).

Die meisten Isolate von *P. aeruginosa* exprimieren einen von zwei Flagellin-Typen (Typ-a und Typ-b), die sich in der Aminosäuresequenz des kodierenden Gens *fliC* als auch in Reaktionen gegen spezifische Antiseren unterscheiden (Allison et al., 1985; Spangenberg et al., 1996). Das Typ-a Flagellin lässt sich in die zwei Subtypen A1 und A2 aufteilen (Arora et al., 2004) und zeichnet sich durch seine variable Größe von 45-52 kDa aus, während das Typ-b Flagellin eine konservierte Sequenz und molekulare Masse von 53 kDa aufweist.

Die funktionelle Bedeutung von bakteriellem Flagellin als Hauptauslöser einer proinflammatorischen Antwort in Epithelzellen wird primär vermittelt durch TLR5, der bekannt ist für seine spezifische Erkennung von Flagellin (Hayashi et al., 2001; Smith et al., 2003; Andersen-Nissen et al., 2007). Flagellin aktiviert auf diese Weise NF- κ B und induziert die Expression proinflammatorischer Gene (Tallant et al., 2004). TLR5 erkennt ein konserviertes Cluster von 13 Aminosäuren auf der konvexen Oberfläche des Flagellins, das zugleich essentiell ist für die Bildung des Protofilaments sowie für die Beweglichkeit der Bakterien (Smith et al., 2003). TLR5 besitzt seinerseits eine konservierte Erkennungssequenz für Flagellin, die sich im zentralen Bereich der extrazellulären Domäne befindet (Andersen-Nissen et al., 2007).

Nähere Untersuchungen der proinflammatorischen Antwort durch Flagellin haben ergeben, dass TLR5 nicht alleine für die Erkennung von Flagellin verantwortlich ist. So wurde asialoGM1 als Ko-Rezeptor für TLR5 identifiziert, der an der Bindung von Flagellin beteiligt ist (Adamo et al., 2004; Ogushi et al., 2004). Andere Autoren hingegen verneinen die Funktion von Gangliosiden als Ko-Rezeptor, obgleich zugegebene Ganglioside die Signaltransduktion durch Flagellin inhibierten (West et al., 2005).

Die Erkennung von intrazellulärem Flagellin, das nach Infektionen mit *Salmonella typhimurium* oder *Pseudomonas aeruginosa* durch spezifische Virulenzfaktor-Transportsysteme (z.B. Typ-III-Sekretionssystem) ins Zytosol von Makrophagen gelangt, erfolgt durch Nod-like-Rezeptoren (NLR). Wichtigster Vertreter dieser Familie ist Ipaf („ICE protease activating factor“). Dieser Rezeptor bindet Flagellin und führt zu einer TLR5-unabhängigen Aktivierung von Caspase-1, welche durch eine Spaltung von pro-IL-1 β zu einer Freisetzung von IL-1 β beiträgt (Miao et al., 2007; Franchi et al., 2007; Sutterwala et al., 2007; Miao et al., 2008).

1.5 Produktion von Rhamnolipiden

P. aeruginosa sekretiert unter bestimmten Bedingungen Sekundärmetabolite, die aufgrund ihrer amphiphatischen Struktur oberflächenaktiv sind (Lang und Wullbrandt, 1999). Ein bekanntes Biodetergenz ist das Rhamnolipid, welches aus 3-Hydroxyfettsäure besteht, die durch eine β -glykosidische Bindung an ein Mono- oder Di-Rhamnose-Rest verknüpft ist (Abb.4).

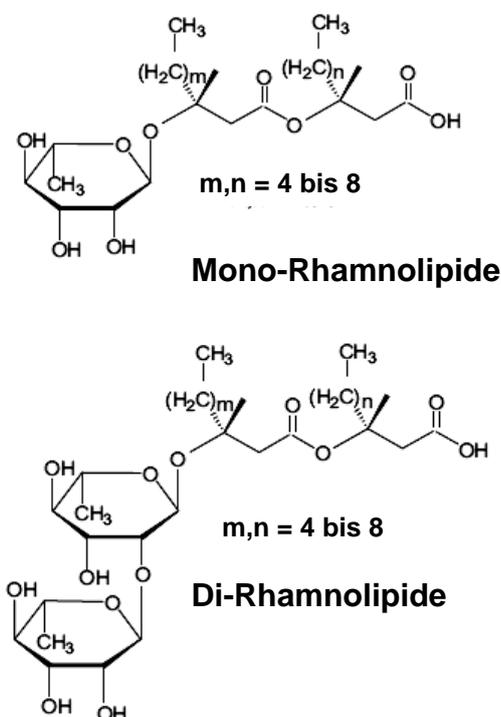


Abb. 4: Chemische Struktur von Mono- und Di-Rhamnolipiden. Modifiziert nach (Soberon-Chavez et al., 2005).

In Flüssigkulturen von *P. aeruginosa* konnten mittels Chromatographie und Massenspektrometrie mehr als 28 Kongenere nachgewiesen werden (Deziel et al., 1999). Diese Kongenere entstehen durch die unterschiedliche Länge der Alkylketten, die von C₈ bis C₁₂ variieren und in gesättigter und ungesättigter Form vorkommen können. Die zwei am häufigsten vorkommenden Rhamnolipide sind zum einen die Monoform Rhamnosyl-β-Hydroxydekanoyl-β-Hydroxydekanooat (Rha-C₁₀-C₁₀), zum anderen das Di-Rhamnolipid Rhamnosyl-Rhamnosyl-β-Hydroxydekanoyl-β-Hydroxydekanooat (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) (Rendell et al., 1990). Welche Kongenere produziert werden ist abhängig vom Bakterienstamm, von der verwendeten Kohlenstoffquelle und den Wachstumsbedingungen.

Ab einer bestimmten Konzentration, der kritischen Mizellbildungskonzentration oder CMC („critical micelle concentration“), bilden Detergenzien Mizellen aus. Bei einer Konzentration unterhalb der CMC befinden sich die oberflächenaktiven Substanzen frei und ungebunden in der sie umgebenden Flüssigkeit. Wenn die CMC erreicht ist, formen die Moleküle Mizellen, die mit steigender Konzentration zunehmen. Die abweichenden CMC-Werte der verschiedenen Rhamnolipid-Kongenere variieren aufgrund der unterschiedlich langen Fettsäureketten und der damit verbundenen Hydrophobizität zwischen 10 und 200 µg/ml (Nitschke et al., 2005). Die oberflächenaktiven Eigenschaften werden durch die Anwesenheit von ungesättigten Bindungen sowie durch die hydrophile Kopfgruppe bestimmt.

Rhamnolipide üben eine Vielfalt von Funktionen in *P. aeruginosa* aus, die Wachstum, Beweglichkeit, Biofilmbildung und Virulenz einschließen. Sie erhöhen das Wachstum der Bakterien in Anwesenheit von hydrophoben, wasserunlöslichen Substraten wie n-Alkane (Zhang und Miller, 1994), Öle (Haba et al., 2002; Nitschke et al., 2005) oder Tetrachlorethylen (Clifford et al., 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Rhamnolipide in Abhängigkeit von der CMC die Zelloberfläche von *P. aeruginosa* modulieren, indem sie LPS und Proteine der äußeren Membran abscheren und die Oberfläche dadurch hydrophober wird (Al Tahhan et al., 2000; Sotirova et al., 2007). Durch den zunehmenden physikalischen Kontakt können hydrophobe, unlösliche Substrate leichter aufgenommen werden (Zhang und Miller, 1994; Shreve et al., 1995; Noordman und Janssen, 2002). Durch die emulgierenden Eigenschaften des Biosurfaktant können hydrophobe Substanzen in Mizellen aufgenommen und dadurch deren Löslichkeit in wässriger Umgebung und deren Aufnahme durch das Bakterium erhöht werden (Koch et al., 1991; Zhang und Miller, 1994).

Rhamnolipide gehören zu den sekundären Metaboliten, d.h. ihre Produktion koinzidiert mit dem Eintreten in die stationäre Phase (Deziel et al., 1996; Medina et al., 2003). Die Regulation der Rhamnolipid-Produktion erfolgt dabei über die Zelldichte durch das Quorum-Sensing (QS) (Ochsner und Reiser, 1995; van Delden und Iglewski, 1998).

P. aeruginosa besitzt zwei miteinander interagierende QS-Systeme, die über niedermolekulare organische Signalmoleküle (Autoinduktoren) kontrolliert werden, bei denen es sich chemisch um N-Acylhomoserinlactone (AHLs) handelt (Abb. 5). Das QS-System reguliert die Synthese einer Vielzahl von Virulenzfaktoren. Das *las*-System ist für die Produktion der Elastasen (LasA und LasB) und des Exotoxins A verantwortlich (Toder et al., 1991; Gambello et al., 1993). Dieses System besteht zum einen aus dem Autoinducer-Synthase-Gen *lasI*, welches für die Synthese von 3-oxo-decanoyl-L-Homoserinlaktone (3-oxo-C12-HSL) verantwortlich ist (Pearson et al., 1994) zum anderen aus dem *lasR*-Gen, das für den Transkriptionsaktivatorprotein LasR kodiert (Gambello et al., 1993). Durch Bindung von 3-oxo-C12-HSL an LasR kommt es zur verstärkten Expression von *lasI* und damit zum Anstieg von verfügbaren Autoinducern (Seed et al., 1995) sowie zur regulierten Expression von Elastasen und Exotoxin A.

Das zweite QS-System in *P. aeruginosa* ist das *rhl*-System. Dieses besteht aus dem Autoinducer-Gen *rhlI*, welches für N-Butanoyl-L-Homoserinlaktone (C4-HSL) kodiert, sowie aus *rhlR*, welches für die Synthese des Transkriptionsaktivatorprotein RhlR verantwortlich ist (De Kievit et al., 2001). Der Komplex aus C4-HSL und RhlR kontrolliert unter anderem die Expression des *rhlAB*-Operons, das als erstes vom *rhl*-System regulierte Operon beschrieben wurde (Pearson et al., 1995). Dieses Operon kodiert für eine Rhamnosyltransferase, die für die Rhamnolipid-Synthese erforderlich ist (Ochsner und Reiser, 1995). Weiterhin beeinflusst das *rhl*-System die Expression weiterer Virulenzfaktoren wie Pyocyanin (Lau et al., 2004) und Elastase (Brint und Ohman, 1995).

Die beiden QS-Systeme agieren nicht unabhängig voneinander, sondern unterliegen einer hierarchischen Ordnung, in der das *las*-System das *rhl*-System kontrolliert (Latifi et al., 1996). Der 3-oxo-C12-HSL/LasR-Komplex aktiviert die Expression von *rhlR*, so dass die Aktivierung des *las*-Systems eine Aktivierung des *rhl*-Systems nach sich zieht. Andererseits konnte gezeigt werden, dass 3-oxo-C12-HSL die Komplexierung von C4-HSL und RhlR inhibiert (Pesci et al., 1997). Die Aktivität des

QS-System ist abhängig von den Wachstumsbedingungen und konnte in Anwesenheit von Extrakten des Sputums von CF-Patienten erhöht werden (Duan und Surette, 2007).

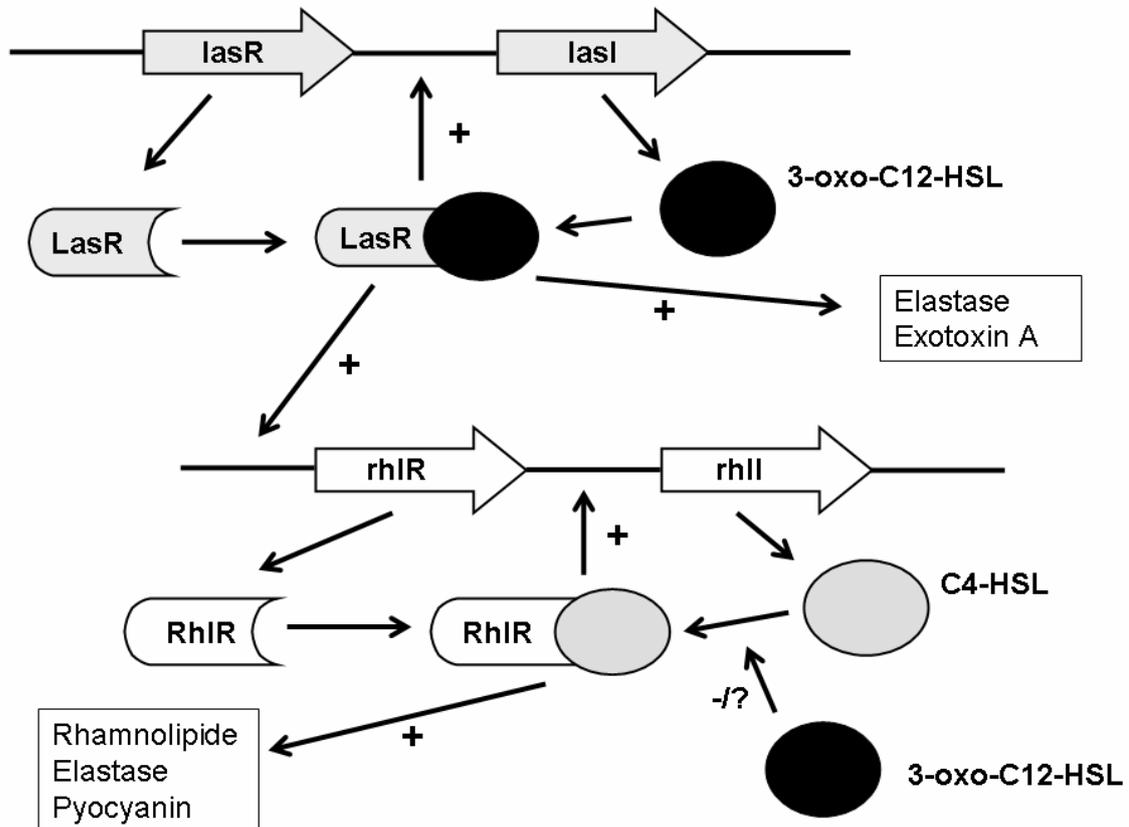


Abb. 5: Das Quorum-Sensing System in *P. aeruginosa*. Die hierarchisch angeordneten QS-Systeme Las und Rhl regulieren die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren über die Signalmoleküle 3-oxo-C12-HSL und C4-HSL. Bei hohen Zelldichten akkumulieren die von LasI bzw. RhII synthetisierten Signalmoleküle, die bei Erreichen einer Schwellenwertkonzentration an die Transkriptionsregulatoren LasR bzw. RhIR binden. Die aktivierten Komplexe LasR/3-oxo-C12-HSL bzw. RhIR/C4-HSL induzieren sowohl die Synthese der Signalmoleküle (Autoinduktion) als auch die Expression verschiedener Virulenzfaktoren. Das Las-System kontrolliert das Rhl-System, indem 3-oxo-C12-HSL die Aktivierung von RhIR durch C4-HSL inhibiert. Modifiziert nach (Whitehead et al., 2001)

Rhamnolipide sind ferner bedeutende Virulenzfaktoren, die in vielfältiger Form zu einer Infektion durch *P. aeruginosa* beitragen können. Sie besitzen zytotoxische und hämolytische Eigenschaften und sind in der Lage, die intramolekularen Interaktionen (Tight junctions) zwischen polaren Epithelzellen zu lösen, wodurch eine Invasion von Mikroorganismen ins epitheliale Gewebe begünstigt wird (Zulianello et al., 2006).

Eine weitere Eigenschaft von Rhamnolipiden ist ihre antimikrobielle Aktivität gegen grampositive und auch gegen einige gramnegative Bakterien (Haba et al., 2002; Benincasa et al., 2004). Je nach Art der Rhamnolipide zeigen sie eine hohe antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* und *Serratia marcescens* sowie gegen Gram-positive Keime wie *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und *Streptococcus faecalis* (Haba et al., 2002; Benincasa et al., 2004).

1.6 Ziel der Arbeit

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Entzündungsreaktion von *P. aeruginosa* in der Haut. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Überstände von mukoiden, adhären gewachsenen *P. aeruginosa* Kulturen in Keratinozyten die Expression von antimikrobiellen Peptiden und proinflammatorischen Zytokinen induzierten (Schwichtenberg, 2003). In den Kulturüberständen dieses Isolates konnte ein IL-8-induzierender Faktor identifiziert werden, der schwach anionisch war und eine Größe von ungefähr 65 kDa aufwies (Schwichtenberg, 2003). Untersuchungen mit *P. aeruginosa* Mutanten, die spezifische Mutationen im Quorum-Sensing aufwiesen, ließen vermuten, dass Rhamnolipide für die Induktion von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden von Bedeutung sind. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Rhamnolipid auf die Freisetzung potentieller PAMs untersucht werden. Dazu sollten die modulierenden Eigenschaften von Rhamnolipid auf Bakterienoberflächen und ihr Beitrag zu einer Immunreaktivität des Bakterienüberstandes in Keratinozyten analysiert werden. Des Weiteren sollte der Faktor der induzierenden proinflammatorischen Aktivität identifiziert und charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen von Enzymen und Chemikalien

2.1.1 Enzyme und andere Proteine

Proteinase K	Fluka
Trypsin (bovine modified)	Roche
Reverse Transkriptase (Superskript™ II)	Invitrogen

2.1.2 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Roth oder Merck bezogen.

Acetonitril	Promochem GmbH
EDTA	Gibco
H ₂ O (für HPLC)	Promochem GmbH
Methanol	Promochem GmbH
Polymyxin B	Fluka
Rhamnolipide (JBR515)	Jeneil Biosurfactant (USA)
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Geräte

Schüttelinkubator	Infors
Zentrifugen	
Centrifuge 5417 R und 5804 R	Eppendorf
Photometer	
Sunrise	Tecan
Biophotometer	Eppendorf
Zweistrahlspektralphotometer (150-20)	Hitachi

Lyophilisator

Vakuumpumpe KAS 16	Pfeiffer Vacuum
Alpha 2-4 LSC	Christ

Gelkammer (SDS-PAGE)

Mini-Protean III-System	Biorad
-------------------------	--------

HPLC-Anlagen

Mini Q	Anionenaustauscher	PC	3.2/3, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Mini S	Kationenaustauscher	PC	3.2/3, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Superdex 75	Gelfiltrationssäule	PC	3.2/30, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Massenspektrometer	„QTOF II“, Micromass, Manchester		

2.3 Verbrauchsmaterialien

12-Loch und 24-Loch Kultur-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (200 ml, 75 cm ³)	Sarstedt, Nümbrecht
96-Loch Platten für ELISA	MaxiSorp™; Nunc, Roskilde, Dänemark
Sterilfilter (0,45 und 0,2 µm Porenweite)	Schleicher und Schuell, Dassen
Stericup-Filtersystem	Millipore GmbH, Eschborn

2.4 Oligonukleotide**Primersequenzen für RT-PCR**

IL-8 Fwd:	CTTTCAGAGACAGCAGAGCAC
IL-8 Rev:	ACTGTTGAGGTAAGATGGTGGA
GAPDH Fwd:	CCAGCCGAGCCACATGGCTC
GAPDH Rev:	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
Oligo (dT)	

2.5 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.5.1 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)	Cell Concepts, Umkirch
Zusätze:	
FCS	Bioconcept, Umkirch
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypsin/EDTA (10x, ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)	Gibco BRL, Eggenstein

2.5.2 HaCaT-Zellen

Bei der Zelllinie HaCaT (human adult low calcium temperature keratinocytes) handelt es sich um immortalisierte Keratinozyten, die sich in Wachstum und Differenzierung wie primäre Keratinozyten verhalten.

Die HaCaT-Zellen wurden in DMEM angezüchtet, dem 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin und 10% fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurde. Das FCS wurde zuvor für 10 min bei 65°C inaktiviert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ in 200 ml Kulturflaschen (Sarstedt).

2.5.3 HEK293-Zellen

Bei den HEK293-Zellen (human embryonic kidney cells) handelt es sich um menschliche Embryonenzellen aus der Niere, wobei in einigen Quellen auch ein neuronaler Ursprung diskutiert wird (Shaw et al., 2002). Charakteristisch für diese Zelllinie und von großer Bedeutung für die Versuche in der vorliegenden Arbeit ist die schwache Expression von TLR5-Rezeptoren.

Die HEK293-Zellen wurden in DMEM angezüchtet, dem 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamin und 20% hitzeinaktiviertes, fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ in 200 ml Kulturflaschen (Sarstedt).

2.5.4 Primäre humane Keratinozyten

Als primäre Keratinozyten werden Keratinozyten bezeichnet, die direkt aus intaktem Gewebe isoliert wurden und unter Zellkulturbedingungen nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen. Humane Keratinozyten wurden aus frischen Vorhäuten isoliert, die bei entsprechenden Operationen anfielen. Die Anzucht der Keratinozyten erfolgte in EpiLife-Medium unter Zusatz epidermaler Wachstumsfaktoren, wenig Kalzium sowie von Pencillin/Streptomycin in 75 cm² Zellkulturgefäßen wie unter 2.5.2 beschrieben. Die Lebensfähigkeit der Keratinozyten beschränkte sich auf ca. 3-4 Subkultivierungen, wobei die Keratinozyten in der Regel bereits in der zweiten Passage benutzt wurden.

2.5.5 Subkultivierung der Zellen

Bei einer Konfluenz von ungefähr 90% wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 5 ml einer 0,1%-igen Trypsin- / 0,02%-igen EDTA – Lösung inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen gelöst hatten. Die Inkubationszeit sollte 10 min nicht überschreiten, um die Zellen vor proteolytischen Verdau durch das Trypsin zu bewahren. Nach Ablösen der adhären Zellen wurde der tryptische Verdau durch Zugabe von 5 ml FCS-haltigem DMEM abgestoppt. Die Zellen wurden bei 800 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in frischem DMEM bzw. EpiLife resuspendiert. Die Zellen wurden entweder in neue Kulturflaschen oder für Stimulationsversuche zu je 500 µl in 24-Loch-Platten bzw. zu je 1ml in 12-Loch-Platten ausgesät.

2.5.6 Stimulation von Zellen

Die in Loch-Platten ausgesäten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90-100% kultiviert. Es ist beobachtet worden, dass eine hohe Konfluenz für die Sezernierung von hBD-2 essentiell war. Vor der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium durch 500 µl DMEM ohne FCS ersetzt. In Abwesenheit von FCS synchronisieren sich die Zellen in einer Wachstumsphase, zudem werden dadurch unerwünschte Effekte von undefinierten Produkten im FCS auf die Stimulation

ausgeschlossen. Die zu stimulierenden Substanzen wurden direkt in die Löcher pipettiert.

2.5.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen in Flüssigstickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zellen einer Kultur zunächst trypsinisiert, um sie von der Kulturflasche abzulösen und mit FCS-haltigem Medium gewaschen (s. 2.5.5). Nach Zentrifugation für 5 min bei 800 x g und anschließendem Dekantieren des Überstandes erfolgte eine Überführung des Zellpräzipitats in 2 ml Nährmedium, welches zuvor mit 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), versetzt wurde. Nach sofortigem Einfrieren der Zellen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ konnten diese nach 24 h in den Flüssigstickstoff überführt werden. Zum Auftauen wurden die in Flüssigstickstoff tiefgefrorenen Zellen kurz bei 37°C aufgewärmt und noch im gefrorenen Zustand zusammen mit 10 ml DMEM in Zellkulturflaschen überführt. Nach 24 h erfolgte dann eine Subkultivierung der Zellen.

2.6 Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienart	ATCC- Nummer	NCTC- Nummer	Eigenschaften	Referenz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33358	11446		(Liu et al., 1983)
PAK			Wildtyp	(Liu et al., 1983)
PAK Δ <i>fliC</i>			<i>fliC</i> -Gen deletiert	(Dasgupta et al., 2003)
PAO1			Ausgangsstamm für Mutanten	(Holloway und Morgan, 1986)
PAO1 Δ <i>pilA</i>			<i>pilA</i> -Gen deletiert	(Klausen et al., 2003)
PAO1 Δ <i>fliM</i>			<i>fliM</i> -Gen deletiert	(Klausen et al., 2003)

Die $\Delta pilA$ und $\Delta fliM$ – Mutanten wurden freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. Dr. J. Heesemann vom Max von Pettenhofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie in München, der PAK (Wildtyp) sowie die dazugehörige $\Delta fliC$ -Mutante freundlicherweise von Dr. Ramphal von der University of Florida, Gainesville, USA.

2.6.1 Nährmedien für Bakterienkultivierung

TSB-Medium	Caso-Broth von FLUKA (30 g/l)	
M9-Medium	400 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	22 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
	20 mM	Ammoniumchlorid
	8,5 mM	Natriumchlorid
	2 mM	Magnesiumsulfat
	30 mM	Glucose

2.6.2 Generierung von *Pseudomonas aeruginosa* Kulturüberständen

Zur Untersuchung von sezernierten IL-8-induzierenden Faktoren wurden Überstände aus verschiedenen kultivierten *P. aeruginosa*-Kulturen hergestellt. Dazu wurden zunächst Vorkulturen in 20 ml TSB-Medium bis zu einer OD_{600} von 1 angezchtet. Anschließend wurden 200 ml TSB-Medium aus der Vorkultur mit einer OD von 0,1 angeimpft und in einem 1L-Kolben über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet im gleichen Volumen Wasser resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert und das Pellet in 20 ml frisches Medium aufgenommen. Durch das Waschen der Zellen wurde erreicht, dass Stoffwechselendprodukte und andere assoziierte Faktoren keinen Einfluss auf die folgende Kultivierung und die Bestimmung der IL-8-induzierenden Aktivität des Überstandes ausübten.

Je nach Versuchsanordnung wurden die weiteren Kulturbedingungen in einigen Parametern variiert. Die Bakterien wurden für weitere 20 h entweder als Suspensionskultur bei 200 Upm und 37°C oder als statische Kultur in 200 ml-Kulturflaschen bei 37°C kultiviert. Als Medien wurden sowohl TSB-Komplexmedium

als auch definiertes Minimalmedium (M9-Medium) verwendet. Für die Generierung der bakteriellen Überstände wurden die Kulturen erneut bei 6000 Upm für 10 min zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert.

2.7 Isolierung und Charakterisierung von Flagellin

2.7.1 Flagellinisolierung

Zur Anreicherung von Flagellin wurde *P. aeruginosa* in TSB-Medium für 24 h bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (6000 Upm, 10 min) geerntet, das Pellet wurde in einem geringen Volumen PBS aufgenommen und durch Vortexen resuspendiert. Die geschorene Suspension wurde für 10 min bei 65°C inkubiert, um das Flagellinfilament von der Bakterienmembran zu lösen, und anschließend zentrifugiert (11000 Upm, 30 min, 4°C). Der Überstand mit den gelösten Flagellen wurde sterilfiltriert und über Nacht bei 4°C mit 0,1 M MgCl₂ versetzt. Durch erneutes Zentrifugieren bei 11000 Upm für 30 min wurde das Flagellin präzipitiert. Das Pellet wurde in einem geringen Volumen Wasser aufgenommen und für weitere Anwendungen bei 4°C gelagert. Bis zu diesem Aufreinigungsschritt wurde die Probe als Flagellinanreicherung bezeichnet, da im präzipitierten Pellet noch andere Komponenten der äußeren Membran vorhanden waren. Für die weitere Aufreinigung wurde die Flagellinanreicherung chromatographisch aufgetrennt (s. 2.13).

2.7.2 Trypsin-Verdau von Flagellin in Lösung

Zum Verdau von Flagellin mit Trypsin wurden zunächst 10 µl einer HPLC-Fraktion, das einer Proteinmenge von ungefähr 1 µg entsprach, mit 20 µl 100 mM NH₄HCO₃ versetzt und 30 min bei 55°C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 200 ng modifiziertem Trypsin (Roche), welches zuvor mit 2%-iger Essigsäure aktiviert worden war. Die Hydrolyse wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt und anschließend in einem Eppendorf-Konzentrator eingengt und massenspektrometrisch analysiert (s. 2.14).

2.8 Modulatorische Eigenschaften von Rhamnolipid auf *P. aeruginosa*

2.8.1 Extraktion von Rhamnolipiden aus *Pseudomonas* Kulturüberständen

Für die Extraktion von Rhamnolipiden aus Überständen von *P. aeruginosa* wurde PAO1 in 1%-iger Peptonlösung mit 1% Glucose für 3 Tage bei 200 Upm und 37°C kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6000 Upm, 10 min) von der Kultur getrennt und der Überstand sterilfiltriert. Es erfolgte eine Ansäuerung des Kulturüberstandes mit HCl auf pH 3 und ein anschließendes Ausschütteln mit Ethylacetat, wobei sich das Rhamnolipid in der organische Phase löste. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, die Ethylacetat-Phasen vereinigt und schließlich in einem Eppendorf-Konzentrator das Lösungsmittel entfernt. Das resultierende Konzentrat wurde in weiteren Untersuchungen massenspektrometrisch analysiert (s. 2.14).

2.8.2 Kultivierung von *Pseudomonas aeruginosa* in Anwesenheit von Rhamnolipiden

Um den Einfluss von Rhamnolipid auf die IL-8-induzierende Aktivität zu untersuchen, wurden *Pseudomonas*-Kulturen mit authentischem Rhamnolipid (JBR515, Jeneil) versetzt. Die Bakterien wurden zunächst als Vorkulturen in TSB-Medium bis zur späten logarithmischen Phase (OD_{600} : 0,8-0,9) kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen bei 6000 Upm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Wasser resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (6000 Upm, 10 min) wurde das Pellet in ein geringes Volumen Medium aufgenommen und frisches Medium (M9-Medium) mit einer OD von 0,1 angeimpft. Die Medien enthielten entweder kein Rhamnolipid (Negativkontrolle) oder definierte Mengen, die zu Kultivierungsbeginn zugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte je nach Bedingung entweder als Suspensionskultur in 100 ml bzw. 1 Liter-Kolben bei 200 Upm und 37°C oder als statische Kultur in 200 ml Kulturflaschen bei 37°C. Das Kulturvolumen betrug jeweils 20% des Gefäßes. Nach der Inkubation wurden die Kulturen für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert.

Um zu verifizieren, dass Rhamnolipide den induzierenden Faktor von der äußeren Membran abscheren und nicht die Neusynthese eines PAMs in den Bakterien induzieren, wurde *P. aeruginosa* ATCC 33354 mit einer OD_{600} von 0,1 in M9-Minimalmedium inokuliert. Die Bakterien wurden unter planktonischen Bedingungen bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Während der logarithmischen Phase (OD_{600} : 0,5) wurden die Bakterien durch Zugabe von Tetrazyklin (200 ng/ml) inaktiviert. Die Kulturen wurden aliquotiert und für weitere 1 h, 2 h und 16 h in An- und Abwesenheit von Rhamnolipiden (150 µg/ml) kultiviert. Die Suspension wurde zentrifugiert (600 Upm, 10 min) und der Überstand sterilfiltriert. Die induzierende Aktivität wurde mit dem Überstand eines gleichen Aliquots verglichen, bei dem die Bakterien zuvor bei 65°C für 10 min hitzeinaktiviert wurden.

2.8.3 Trypsin-Verdau im Gel

Um das Flagellin in den Überständen Rhamnolipid-behandelter Bakterien massenspektrometrisch untersuchen zu können, musste es entsprechend rein vorliegen. Dazu war es notwendig, das Protein mittels SDS-PAGE aufzutrennen und im Gel mit Trypsin zu verdauen.

Der Kulturüberstand von PAO1 (s. 2.8.2) wurde mit 0,5 M NaCl über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend bei 11000 Upm für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem geringen Volumen Wasser aufgenommen und auf ein 10%-iges Tricine-SDS-Gel geladen. Nach dem Lauf wurde das Gel für 20 min mit Coomassie-Farbstoff angefärbt und darauffolgend mit Entfärber behandelt, bis die Banden gut sichtbar waren (s. 2.11.2.1). Die Bande bei 50 kDa, die hypothetisch das Flagellin darstellte, wurde mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten und in kleine Würfel von ungefähr 1 mm³ geschnitten. Die Gelstücke wurden solange mit 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ und 100 µl 50% Acetonitril gewaschen, bis die blaue Farbe verschwunden war. Dann wurden 100 µl 100% Acetonitril zugegeben, woraufhin die Gelstücke weiß mit einem klaren Überstand wurden. Der Überstand wurde nach 10 min abgenommen und die Gelstücke im Eppendorf-Konzentrator für 15 min getrocknet.

Anschließend erfolgte die Hydrolyse, indem 20 µl 50 mM NH₄HCO₃ mit 200 ng Trypsin zugegeben wurde. Das Trypsin ist derart modifiziert, dass es sich selbst nicht verdaut. Das Trypsin ist vor Zugabe zu den Gelstücken mit 2%-iger Essigsäure

aktiviert worden. Zunächst erfolgte eine Inkubation für 30 min auf Eis und darauf folgend über Nacht bei 37°C.

Nach der Hydrolyse wurde eine Extraktion der Fragmente aus den Gelstücken durchgeführt. Dazu wurden die Gelstücke für jeweils 20 min einmal mit 100 µl 20 mM NH₄HCO₃, zweimal mit 100 µl 1% TFA / 50% Acetonitril und einmal mit 100 µl 100% Acetonitril behandelt. Die Überstände wurden nach jedem Inkubationsschritt abgenommen, vereinigt und einkonzentriert.

2.9 Biofilm-Assay

Die Bestimmung und Quantifizierung der Biofilmbildung wurde in Anlehnung an O'Toole and Kolter (1998) durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Fähigkeit der Bakterien, auf PVC Biofilme zu bilden.

P. aeruginosa wurde zunächst als Vorkultur planktonisch (200 U_{pm}, 37°C) in TSB-Medium bis in die logarithmische Phase kultiviert. Anschließend wurde die Kultur mit TSB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und dann jeweils 1 ml in 24-Loch-Platten zugegeben. In dieser Phase wurden, abhängig von der Versuchsanordnung, Rhamnolipide in verschiedenen Konzentrationen (15, 30 und 60 µg/ml) zugegeben. Nach einer statischen Inkubation bei 37°C für 20 h wurde der Überstand abgenommen, sterilfiltriert und in Stimulationsexperimenten verwendet. Die Löcher wurden dreimal mit Wasser gewaschen und für 30 min getrocknet. Daraufhin wurde 1,2 ml einer 0,4%-igen Kristallviolett-Lösung in jedes Loch pipettiert und für 30 min inkubiert. Nach der Färbung wurden die Löcher dreimal mit Wasser gewaschen. Der Biofilm wurde als violetter Ring an den Seitenwänden der Löcher sichtbar. Für die quantitative Analyse wurde das vom Biofilm gebundene Kristallviolett in 1,2 ml 95%-igem Ethanol gelöst, 200 µl der Lösung in 96-Loch-Mikrotiter-Platten überführt und die Menge des Kristallvioletts in der Entfärberlösung bei 620 nm in einem Multikanal-Photometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) gemessen.

Um den Effekt von Rhamnolipiden auf adhärente Zellen zu untersuchen, wurden nach statischer Kultivierung und Waschen der Löcher einige Löcher mit H₂O und andere mit verschiedenen Konzentrationen an Rhamnolipiden (60, 300 und 600 µg/ml) für weitere 3 h inkubiert. Nach Abnehmen des Überstandes erfolgte die bereits beschriebene Färbung mit Kristallviolett.

2.10 Semiquantitative RT-PCR

2.10.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus den kultivierten Keratinozyten wurde mittels „TRIzolTM“-Reagenz gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Zur RNA-Isolierung aus Keratinozyten, die in einer 12-Loch-Platte kultiviert worden waren, wurde jeweils 0,5 ml Reagenz pro Vertiefung hinzugegeben. Die isolierte RNA wurde in 25 µl 25%-Formamid-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C verwahrt.

2.10.2 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren aus den RNA-Isolierungen erfolgte photometrisch durch die Bestimmung der Absorption. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}). Eine A_{260} -Extinktion von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 41,2 µg/ml (Sambrook, 1989).

Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung wurde über ihren Gehalt an Proteinverunreinigungen überprüft. Das charakteristische Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit einer Nukleinsäureprobe bestimmen. Dieser liegt idealerweise zwischen 1,5 und 2,0.

2.10.3 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Sythese)

Zur weiteren Analyse wurde die aus Zellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Bei diesem Prozeß der reversen Transkription wird die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase genutzt, welche aus einer RNA-Vorlage die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert (Gallo, 1971). Für einen Reaktionsansatz wurden 1 µg Gesamt-RNA und 1,5 µl Oligo(dT)-Primer (20 µM) mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl gebracht. Dieser Ansatz wurde für 10 min in einem Thermoblock auf 70°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben, und sofort auf Eis gestellt. Hinzugefügt wurden:

- 4 µl 5x Reaktionspuffer
- 2 µl DTT (0,1 M DDT)
- 1 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Reverse Transkriptase (Superscript II)

Die reverse Transkription erfolgte für 1 h bei 42 °C (Anhybridisierung der Oligo(dT)-Primer und Synthese der cDNA). Anschließend wurde die Lösung zwecks Inaktivierung des Enzyms für 5 min auf 90 °C erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert, nachdem die Probe mit 180 µl H₂O auf 200 µl Gesamtvolumen gebracht wurde.

2.10.4 Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Kombination von reverser Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht es, die Genexpression auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Dabei können auch mRNA-Moleküle nachgewiesen werden, die nur in geringer Konzentration in der Zelle vorkommen.

Nachdem die mRNA mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben worden war, wurde diese in einer PCR-Analyse mit zwei genspezifischen Primern amplifiziert. Es wurden Intron-überspannende Primer eingesetzt, um die cDNA von genomischer DNA unterscheiden zu können. Zur Ermittlung eines internen Standards wurden die Primer verwendet, die ein spezifisches, 360 Bp großes Fragment der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) synthetisieren, die in Epithelzellen konstant exprimiert wird. Die in diesen Reaktionen verwendeten Primer sind in 2.4 aufgeführt.

Die PCR-Reaktionen erfolgten dabei unter Verwendung eines Realtime-Cyclers der Firma Roche (Light Cycler). Dabei wurden 10 ng cDNA in folgendem Reaktionsansatz verwendet:

- 5,8 µl H₂O
- 1,2 µl MgCl₂
- 1 µl Enzymlösung
- je 0,5 µl der Gen-spezifischen Primer (10 µM)

Anschließend konnten mittels Standardkurven für die jeweiligen Gene genaue Angaben zu der entsprechenden relativen mRNA Expression gemacht werden.

2.11 Proteinanalytik

2.11.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen erfolgte mittels Tricine-SDS-PAGE (Schägger, 2006). Bei dieser Methode werden Proteine in einem Polyacrylamid-Gel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Durch Inkubation mit negativ geladenem SDS werden nicht-kovalente Proteinaggregate aufgelöst und die Eigenladungen der Proteine maskiert. Dadurch ist das Verhältnis von Ladung zu Größe für jedes Protein annähernd gleich, so dass diese im Gel proportional zu ihrem Molekulargewicht wandern.

Die verwendeten Gele bestanden aus einem 10%-igen bzw. 12%-igen Trenn- und einem 4%-igem Sammelgel. Letzteres diente zum Sammeln der Proben, um allen Molekülen den gleichen Startpunkt zu ermöglichen. Im folgenden, höher konzentrierten Trenngel wurden die Proben entsprechend ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt.

Tabelle 2: Zusammensetzung eines SDS-Gels:

	Trenngel (12%)	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Acrylamid (30%)	2 ml	1,67 ml	0,63 ml
Gel-Puffer (3M Tris; pH = 8,45; 0,3% SDS)	1,67 ml	1,67 ml	1,55 ml
Glycerol (87%)	0,77 ml	0,77 ml	-
H ₂ O	0,53 ml	0,87ml	2,04 ml
APS (10%)	25 µl	25 µl	75 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	7,5 µl
Gesamtvolumen pro Gel	5 ml	5 ml	5 ml

Die aufzutrennenden Proben wurden mit einem Probenpuffer (4% (w/v) SDS, 60% (w/v) Glycerol, 0,3 M Tris, 0,01% Coomassie-Brillant Blue G250) versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Diese Probenvorbereitung ist ein essentieller Schritt für den Erfolg der SDS-PAGE. Proteine, welche die gleiche Anzahl von Aminosäuren aufweisen, können aufgrund von Unterschieden in ihrer Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur ein unterschiedliches Laufverhalten aufweisen, das nicht ihrem Molekulargewicht entspricht. Um diese Unterschiede auszugleichen und die Proteine in eine gleiche Form zu bringen, wurden diese Strukturen durch Denaturierung mittels SDS und Hitze behandelt. Die Trennung erfolgte im Mini-Protean III-System (Biorad) unter Verwendung eines Kathoden- (0,1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1% SDS) und Anodenpuffers (1 M Tris, pH 8,9). Als Größenstandard wurde „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet.

2.11.2 Anfärbung der Gele

2.11.2.1 Coomassie Brillant Blue-Färbung

Zur Anfärbung der Proteine wurde das Gel für 30 min in Coomassie Brillant Blue (0,2% w/v Coomassie Brillant Blue G250, 7% v/v Essigsäure, 25% v/v EtOH) unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung dekantiert und eine Entfärberlösung (7% v/v Essigsäure, 25% v/v Isopropanol) zugegeben. Die Entfärbung wurde gestoppt, sobald das Gel entfärbt und die Banden gut zu erkennen waren.

2.11.2.2 Silberfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine im SDS-Gel mit Hilfe der Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernik (1988) sichtbar gemacht. Diese Methode zeichnet sich im Vergleich zu coomassiegefärbten Gelen durch ihre hohe Sensitivität aus. Zuerst werden die Proteine durch eine Fixierlösung im Gel fixiert, damit sie nicht weiter im Gel diffundieren können. Während der Inkubation mit Silbernitrat lagern sich Silberionen an die Proteine. Durch Zugabe von Formaldehyd beim Entwickeln wird das Silbernitrat zu elementarem Silber reduziert, welches die

Proteine als schwarze Banden erscheinen lässt. Die verschiedenen Inkubations- und Waschschriffe können der Tabelle entnommen werden.

Tabelle 3: Silberfärbung (Heukeshoven und Dernick, 1988)

Arbeitsschritt	Lösung	Dauer (min)
Fixierung	Ethanol (30%) Essigsäure (10%)	30
Farmers Reducers	Natriumacetat (0,4 M) Ethanol (30%) Natriumthiosulfat (0,1%) Glutaraldehyd (0,2%)	30
Waschen	H ₂ O	3 x 10
Anfärben	Silbernitrat (0,1%) Formaldehyd	30
Entwickeln	Natriumcarbonat (1,25%) Formaldehyd	30
Stoppen	Essigsäure (5%)	

2.11.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels molaren Extinktionskoeffizienten

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration des gereinigten Flagellins wurde die Extinktion der Proteine bei $\lambda = 280$ nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, in geringem Maße auch Phenylalanin. Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes berechnet werden, welches besagt, dass die Lichtextinktion bei einer bestimmten Wellenlänge proportional zur Konzentration des Proteins ist, wenn die Schichtdicke der Lösung gleich bleibt:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

wobei E = Extinktion bei 280 nm; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient in $M^{-1}cm^{-1}$; c = Konzentration des Proteins in M; d = Schichtdicke der Küvette in cm.

Der molare Extinktionskoeffizient ist spezifisch für ein Protein und wurde für das Flagellin, dessen Aminosäuresequenz bekannt ist, mit Hilfe des Analyseprogramms „ProtParam“ berechnet (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>).

2.12 Immunologische Methoden

2.12.1 Western Blot

Die Detektion von Flagellin in einem Proteingemisch aus *P. aeruginosa* ATCC 33354 erfolgte in einem Western Blot. Das Protein wurde zunächst in einer 12%-igen Tricine SDS-PAGE (siehe 2.11.1) aufgetrennt und anschließend mit einer Protean III-Western Blot-Apparatur (BioRad) für 1 h bei einer Stromstärke von 0,15 A auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,2 µm, GE Healthcare) transferiert. Der Transferpuffer bestand aus 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS und 20% EtOH (pH 9,2).

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 5% Magermilchpulver/0,05% PBS-T schüttelnd inkubiert. Die Membran wurde darauf mit dem primären Antikörper Kaninchen-anti-FliC in einer 1:1000 Verdünnung in 5% Magermilchpulver / PBS-T über Nacht bei 4°C behandelt. Die Membran wurde darauf zweimal für 15 min bei Raumtemperatur in PBS-T gewaschen und mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) in einer 1:2000 Verdünnung (in 5% Magermilchpulver) für 1 h schüttelnd inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Detektion mit Hilfe des Substrates (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce) nach Angaben des Herstellers. Die Dokumentation wurde mit dem „Diana III Digital CCD Imaging System“ (Raytest) durchgeführt.

2.12.2 ELISA

2.12.2.1 IL-8 ELISA

Die Detektion und Quantifizierung von IL-8 in Zellüberständen wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISA (DuoSet ELISA Development System, R&D) nach Angaben des

Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 96-Loch-Platten (MaxiSorp™; Nunc, Roskilde, Dänemark) mit 4 µg/ml anti-IL-8 Antikörper in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween20) die freien Proteinbindungsstellen mit einer Blockierungslösung (1% BSA, 5% Sucrose in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. In der folgenden Prozedur erfolgte nach jedem Inkubationsschritt ein dreimaliges Waschen der Löcher. Die Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Verdünnungen der Antikörper wurden mit einem Puffer bestehend aus 0,1% BSA, 0,05% Tween 20 in PBS vorgenommen. Nach der Blockierung wurden die Zellüberstände sowie eine Standardreihe mit IL-8 zugegeben und für zwei Stunden inkubiert. Der Standard wurde in einer 1:2 Verdünnungsreihe aufgetragen, wobei die höchste Konzentration bei 2000 pg/ml lag und die niedrigste bei 31,25 pg/ml. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit 20 ng/ml Biotin-konjugiertem anti-IL-8 Antikörper, gefolgt von Streptavidin-HRP in einer 1:200 Verdünnung für 30 min. Die Substratreaktion erfolgte mit o-Phenylendiamindihydrochlorid (Sigma) als Substrat. Dazu wurde eine Tablette in 25 ml Citratpuffer (17 mM Zitronensäuremonohydrat, 33 mM Dinatriumhydrogenphosphat) mit 20 µl H₂O₂ gegeben und gelöst. Nach dem Abstoppen der Farbreaktion mit 50 µl 2 N H₂SO₄ wurde die Extinktion bei 492 nm in einem Multikanal-Photometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) gemessen.

2.12.2.2 hBD-2 ELISA

Zur Detektion von hBD-2 Protein in Zellüberständen wurde eine 96-Loch-Platte über Nacht bei 4°C mit 50 µl Anti- hBD-2 Antikörper aus der Ziege (PeproTech, Rocky Hill, NJ) mit einer Konzentration von 1 µg/ml in 0,05 M Carbonat-Puffer (pH 9,6) beschichtet. Im nächsten Schritt wurden die Löcher mit 200 µl 1%-iger BSA-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur „geblockt“, um alle unspezifischen Bindungsstellen an der Lochwand abzudecken. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween 20 wurden jeweils 100 µl der Zellüberstände sowie eines seriell verdünnten Standards aus natürlichem hBD-2 einpipettiert und für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer dreimaliger Waschschrift, um die ungebundenen Proteine zu entfernen. Dann wurden die Proben mit 50 µl biotinyliertem anti-hBD-2 Antikörper aus der Ziege (PeproTech) in einer Konzentration von 0,2 µg/ml versetzt

und für 30 min inkubiert. Die Verdünnung des zweiten Antikörpers erfolgte in PBS + 0,1% Tween 20. Nach dreimaligem Waschen wurde das Entwickler-Agenz 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS; Roche Diagnostics) zugegeben und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde die Absorption bei 405 nm in einem Multikanal-Photometer (Sunrise, Tecan, Crailsheim) gemessen.

2.12.3 Hautstimulation und Immunhistochemie

Hautgewebestücke wurden mit Rhamnolipiden (30 µg/ml) und / oder Flagellinanreicherungen (s. 2.7.1) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (5% CO₂) bei 37°C für 48 h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Hautgewebestücke.

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden diese Hautgewebestücke in Paraffin eingebettet. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 µm verwendet. Vor der Färbung wurden die Schnitte entparaffinisiert, rehydriert und anschließend durch eine zwanzigminütige Inkubation in 10 mM Citratpuffer bei 80°C demaskiert. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte durch Inkubation mit 10% Ziegenerum (DAKO), 0,1% BSA und 0,2% Glycin in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl) für 10 min. Die immunhistochemische Färbung wurde für 16 h bei 4°C mit monoklonalem Maus-anti-Psoriasin-Antikörper in wasserdampfgesättigter Atmosphäre durchgeführt. Die Schnitte wurden mit TBS gespült und für 30 min mit biotinyliertem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:100 v/v verdünnt in TBS/1% BSA, Vector) inkubiert. Nach wiederholtem Spülen mit TBS wurde die Detektion des sekundären Antikörpers mittels des Vectastain ABC-AP[®]-Systems (Vector) nach Angaben des Herstellers für 30 min durchgeführt. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurde das Vector Red Alkalische Phosphatase-Substrat-Kit (Vector) eingesetzt. Für die Gegenfärbung wurde Hämatoxilin verwendet. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die statt mit spezifischem Primärantikörper mit Präimmenserum inkubiert wurden und Schnitte ohne die Zugabe von Primärantikörper. Die Analyse der Schnitte wurde an einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss) durchgeführt

2.13 HPLC

2.13.1 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration wird ausgenutzt, dass Partikel des Säulenfüllmaterials Poren definierten Durchmessers haben. Große Moleküle können in diese Poren nicht hinein diffundieren, werden also ausgeschlossen (Größenausschlusschromatographie), kleine Moleküle können dagegen in die Poren eindringen. Dadurch werden größere Moleküle in einem Flüssigkeitsstrom schneller durch die Säule transportiert als kleine Moleküle.

Zur Auftrennung des IL-8-induzierenden Faktors nach dem Molekulargewicht wurde eine Gelfiltration mit Hilfe der „Superdex 75 PC 3.2/30“- Säule (Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) auf einer EttanTM-System-Anlage bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden die UV-Absorption bei den Wellenlängen 215 nm, 254 nm und 280 nm gemessen.

Die Säule wurde in einem Vorlauf mit definierten Eichsubstanzen (Konzentration jeweils 500 µg/ml, Auftragsvolumen 25 µl) kalibriert.

Substanz	Molekularmasse (KDa)
Blue Dextran	>75
Bovines Albumin	67
Ovalbumin	43
Cytochrom C	12
L-Tryptophan	0,2

Bei der Chromatographie von Flagellinanreicherungen wurden die Proben entweder mit HCl oder Ameisensäure angesäuert (pH1-2), zentrifugiert (8000 Upm, 3 min) und der Überstand auf die Säule geladen. Als Laufmittel wurde Wasser verwendet.

2.13.2 Anionenaustauschchromatographie

Um Aussagen über Ladungseigenschaft von Flagellin zu treffen und einen Aufreinigungszweck zu erzielen, wurden Flagellinanreicherungen von PAO1 ohne Vorbehandlung über einen Anionentauscher (Mini Q PC 3.2/3) aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0 % bis 100 % Puffer B

innerhalb von 20 min bei einer Flussrate von 80 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Puffer der verschiedenen Ionentauscher Säulen können der Tabelle entnommen werden. Die Fraktionierung der aufgearbeiteten Flagellinproben erfolgte im Autosampler:

	Puffer A	Puffer B
Mini Q	20 mM Tris- H_2O , pH 8	Puffer A + 1 M NaCl, pH 8

2.14 Massenspektrometrie

Die Detektion des aufgereinigten Flagellins und Rhamnolipids wurde mittels Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS) in einem Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid-Massenspektrometer („QTOF II“, Micromass, Manchester, UK) durchgeführt. Die Messung erfolgte je nach Art der vorliegenden Proben im positiven Modus (Flagellin) bzw. negativen Modus (Rhamnolipid) im Elektrospray- oder im Nanospray-Modus (Nano-ESI).

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit einer Natriumjodid-Lösung (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Isopropanol) in einem Bereich von 80-2000 m/z (Masse/Ladungsverhältnis). Die Proben wurden in einem polaren und gut verdampfbaren Lösungsmittel gelöst (50% Acetonitril / 0,02% Ameisensäure bei ESI-MS bzw. 60% Methanol / 5% Ameisensäure bei MS/MS) und mit einer Geschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert.

Die tryptischen Peptidfragmente wurden entsalzt und mittels Nanoelektrospray-Ionisation und Massenspektrometrie analysiert. Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) ermöglicht die Erzeugung und Identifizierung von Fragment-Ionen aus einem ausgewählten Ion. Die Fragmentierung kann durch einen Prozess erreicht werden, welcher „collision-induced dissociation“ (CID) genannt wird. Dabei wird ein ausgewähltes Ion mit Argon-Atomen zum Kollidieren gebracht, was in einer Fragmentierung resultiert. Die Cone Voltage und die Kollisionsenergie wurden für jedes Peptid optimiert. Die Kollisionsenergie variierte zwischen 17 und 40 eV mit Argon. Die aufgenommenen Daten wurden mit der Software „MassLynx 4“ ausgewertet und die monoisotopische Masse mittels „Maximum Entropy 3“ (MaxEnt3) bestimmt. Alle Massen der Fingerprintdaten wurden mit Hilfe des Mascot-Programms (Matrix Science, Boston, Massachusetts) in der SWISS-PROT Proteindatenbank gesucht.

2.15 Darstellung der Ergebnisse

Die im Ergebnisteil aufgeführten Diagramme stellen, sofern nicht anders erwähnt, repräsentative Werte für mehrfach durchgeführte Experimente dar. Die angegebenen Messwerte sind jeweils die Mittelwerte aus Dreifachmessungen, die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken aufgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswirkung von Rhamnolipid auf *Pseudomonas aeruginosa* und die IL-8-Induktion des Bakterienüberstandes

P. aeruginosa sekretiert unter bestimmten Bedingungen Sekundärmetabolite, die aufgrund ihrer amphipatischen Struktur oberflächenaktiv sind (Biosurfaktants). Dazu gehören Glykolipide, die aus einem hydrophilen Zuckeranteil und einem lipophilen Fettsäureanteil bestehen. Ein wichtiger Vertreter dieser Biosurfaktants ist das Rhamnolipid, bei dem es sich um ein anionisches Glykolipid mit Rhamnose als Zuckerbestandteil handelt.

Rhamnolipide sind bedeutende Virulenzfaktoren, die in vielfältiger Form zu einer Infektion durch *P. aeruginosa* beitragen können. Sie erleichtern eine Invasion von Mikroorganismen ins epitheliale Gewebe (Zulianello et al., 2006) und verändern in Abhängigkeit von der CMC die Oberflächenstrukturen der äußeren bakteriellen Membran (Al Tahhan et al., 2000; Sotirova et al., 2007). Einige dieser Oberflächenstrukturen gehören zur Gruppe der PAMs, die in Epithelzellen eine proinflammatorischen Antwort hervorrufen können.

In den folgenden Untersuchungen wurde der Effekt von Rhamnolipid auf *P. aeruginosa* und die daraus resultierende IL-8-Antwort der Bakterienüberstände in epithelialen Zellen analysiert.

3.1.1 Isolierung und Charakterisierung von Rhamnolipiden in *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen

Für die Isolierung und Charakterisierung von Rhamnolipiden wurde PAO1 für 3 Tage unter planktonischen Bedingungen in 1% Pepton und 1% Glukose kultiviert (s. 2.8.1). Die Rhamnolipide wurden durch Ansäuerung der Kulturüberstände angereichert (Rahman et al., 2002) und charakterisiert. Die entstandenen Präzipitate waren löslich in Ethylacetat oder in Wasser bei einem pH-Wert von 10. Unter diesen Bedingungen besitzen Lösungen wie Rhamnolipide Surfactant-Eigenschaften (Rahman et al., 2002). Massenspektrometrische Analysen (ESI-MS) im negativen Ionisations-Modus

zeigten zwei dominante Peaks bei m/z 503 und 649 (Abb. 6 A), die mit der elementaren Zusammensetzung $C_{26} H_{48} O_9$ and $C_{32} H_{58} O_{13}$ einhergehen. Diese entsprachen den Rhamnolipidkongeneren Rha- C_{10} - C_{10} (kalkulierte Masse: m/z 504) und Rha-Rha- C_{10} - C_{10} (kalkulierte Masse: m/z 650).

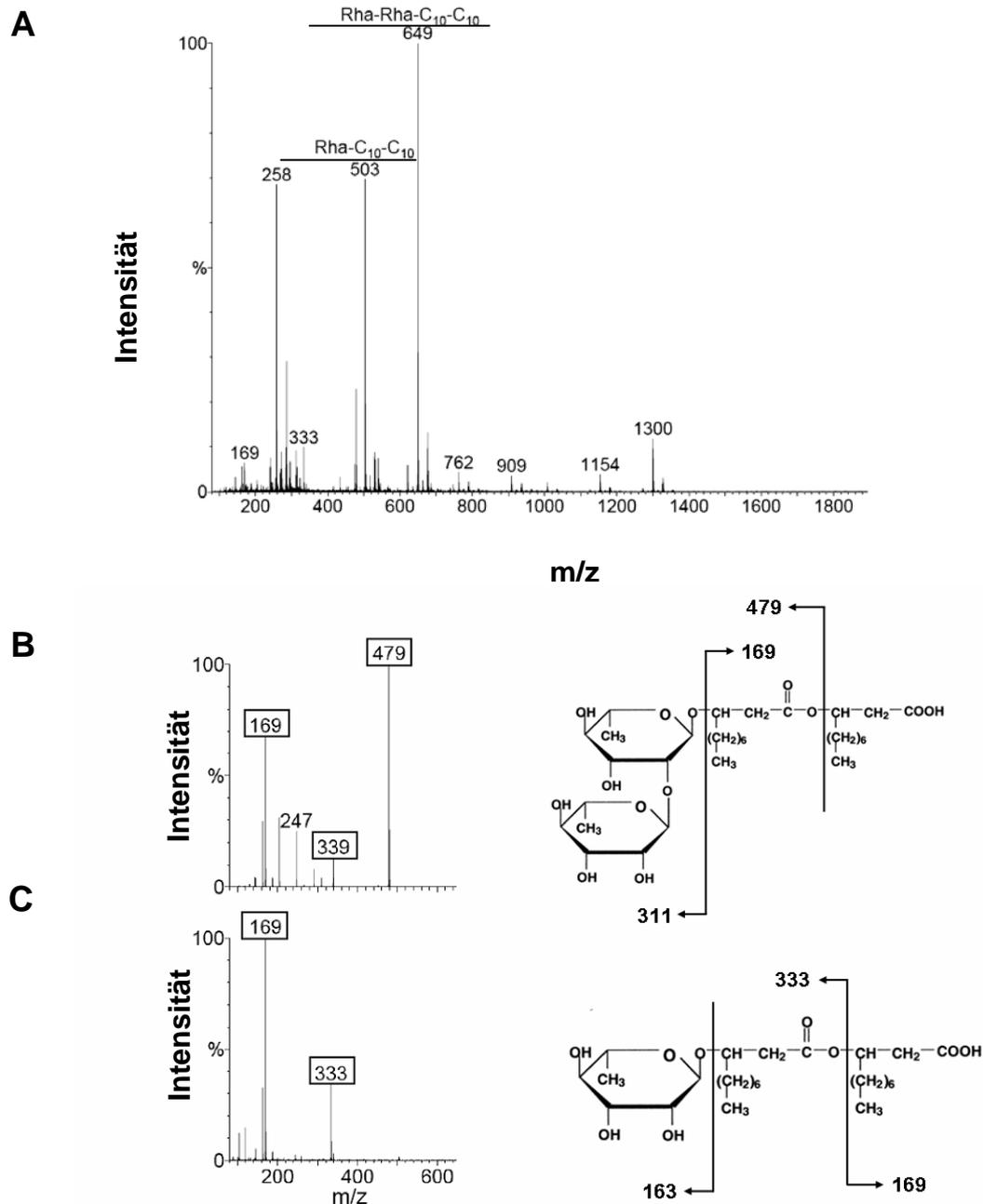


Abb. 6: Identifizierung von Rhamnolipiden in Bakterienüberständen. A) ESI-MS-Analyse von isoliertem Rhamnolipid aus Kulturüberständen von PAO1 im negativen Modus. Identifizierung von Rha- C_{10} - C_{10} bei m/z 503 und Rha-Rha- C_{10} - C_{10} bei m/z 649. **B-C)** Fragmentierungsmuster (MS/MS) von Rha-Rha- C_{10} - C_{10} mit charakteristischen Fragment-Ionen bei m/z 479, 339 und 169 (B) und von Rha- C_{10} - C_{10} mit definierten Fragment-Ionen bei m/z 333 und 169 (C). Modifiziert nach (Olvera et al., 1999)

MS/MS-Untersuchungen, die Produktion und Identifizierung von Fragment-Ionen aus einem ausgewählten Ion ermöglichen, ergaben spezifische Ionen-Fragmentierungen, die charakteristisch für das jeweilige Kongener sind. Rha-C₁₀-C₁₀ wies Massenspektren bei m/z 169, 339 und 479 auf (Abb. 6 B), Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ bei m/z 169 und 333 (Abb. 6, C). Der Verlust von 170 Da eines neutralen Moleküls stammte von 2,3-Dekanoat, welches eine typische Fragmentation von 3-Hydroxy-substituierten Fettsäuren, wie Rhamnolipid, darstellt (Déziel et al., 1999 und 2000). Ein Vergleich der Massenspektren des isolierten Rhamnolipids mit käuflich erworbenem Rhamnolipid der Firma Jeneil Biosurfactants (JBR515) ergab eine hohe Identität (Daten nicht gezeigt), so dass in den folgenden Versuchsanordnungen JBR515 verwendet wurde.

3.1.2 Wirkung von Rhamnolipid auf die Biofilmbildung

Die Ausbildung von Biofilmen ist ein wichtiger Prozess bei der Besiedlung von Oberflächen durch Pseudomonaden und beruht auf der Adhärenz der Bakterien. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Rhamnolipide wichtige Funktionen bei diesem Prozess ausüben (Pamp und Tolker-Nielsen, 2007).

Die Messung der Biofilmbildung erfolgte mit Hilfe eines Assays, in dem Bakterien in einer 24-Loch-Platte kultiviert und die adhärenierten Zellen mit Kristallviolett angefärbt wurden (s. 2.9). Die Bakterien adhärenierten unter diesen Bedingungen an der flüssig/gasförmigen Phasengrenze und bildeten einen Ring innerhalb der Vertiefung der Loch-Platte.

Eine Bestimmung der Biofilmbildung von verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen ergab unterschiedliche Resultate. *P. aeruginosa* ATCC 33354 zeigte als einziger Stamm eine Biofilmbildung, während die anderen Stämme (ATCC 33348, PAO1, PAO1 Δ *pilA* und PAO1 Δ *flhM*) im Vergleich zur Kontrolle ohne Bakterien keine signifikante Adhärenz aufwiesen (Abb. 7 A). Zugleich wurden die dazugehörigen sterilfiltrierten Bakterienüberstände auf HaCaT-Keratinocyten inkubiert, um einen Zusammenhang von Biofilmbildung und der Freisetzung von PAMs herzustellen. Die IL-8-Induktion in den Keratinocyten durch die Bakterienüberstände korrelierte nicht mit der Biofilmbildung (Abb. 7 A). Eine hohe IL-8-Antwort war in Überständen von *P. aeruginosa* ATCC 33354, ATCC 33348 und PAO1 festzustellen, während die

Induktion der Überstände der beiden Mutanten PAO1 Δ *pilA* und PAO1 Δ *fliM* sehr niedrig waren (Abb. 7 A).

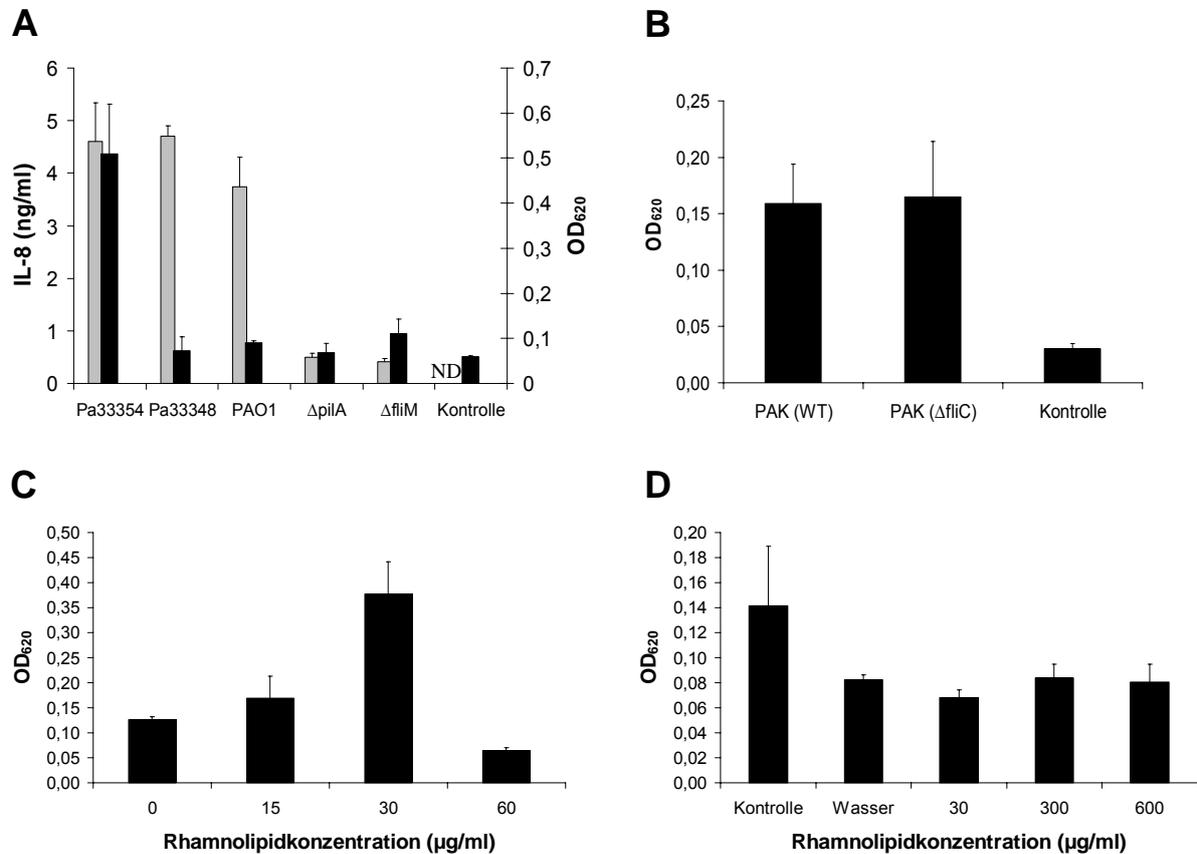


Abb. 7: Einfluss von Rhamnolipid auf die Biofilmbildung von *P. aeruginosa*. **A)** Verschiedene Stämme von *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) wurden in TSB-Medium statisch in 24-Loch-Platten für 24 h kultiviert und die adhärennten Zellen mit Kristallviolett gefärbt und bei einer OD₆₂₀ quantifiziert (schwarze Balken). Der Kulturüberstand wurde sterilfiltriert und für 20 h auf HaCaT-Keratinocyten stimuliert. Die IL-8-Induktion ist in den grauen Balken wiedergegeben. **B)** Biofilm-Assay mit einer aflagellierten Mutanten (PAK Δ *fliC*) und dem dazugehörigen Wildtyp (PAK^{WT}) **C)** *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurde in TSB-Medium in Ab- und Anwesenheit von verschiedenen Rhamnolipidkonzentrationen (15, 30 und 60 μ g/ml) kultiviert und die Biofilmbildung bestimmt. **D)** *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurde unter den beschriebenen Bedingungen in 24-Loch-Platten kultiviert und die adhärennten Bakterien anschließend für 3 h mit H₂O und verschiedenen Rhamnolipidkonzentrationen versetzt. Die Kontrolle stellt die ursprüngliche Adhärenz dar. ND = nicht detektierbar

Die Funktion von Flagellen bei der Initiation der Biofilmbildung ist umstritten (O'Toole and Kolter, 1998; Klausen et al., 2003). In Untersuchungen zur Ausbildung von Biofilmen wurde eine aflagellierte Mutante (PAK Δ *fliC*) verwendet und mit dem

dazugehörigen flagellierten Wildtyp (PAKWT) verglichen (Abb. 7 B). Bei der Biofilmbildung beider Bakterien wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt, was darauf schließen lässt, dass Flagellen unter diesen Bedingungen nicht essentiell für Biofilmbildung waren.

In den folgenden Untersuchungen sollte die Wirkung der Rhamnolipide auf die Biofilmbildung sowie auf bereits bestehende Biofilme analysiert werden.

In einem analogen Experiment wurde *P. aeruginosa* ATCC 33354 zu Beginn der Kultivierung mit verschiedenen Konzentrationen Rhamnolipid versetzt und die Biofilmbildung bestimmt (Abb. 7 C). In niedrigen Konzentrationen erhöhte Rhamnolipid die Biofilmbildung mit einem Maximum bei 30 µg/ml, während bei steigender Konzentration (60 µg/ml) die Biofilmbildung reduziert wurde. Dies zeigt, dass Rhamnolipide die Biofilmbildung konzentrationsabhängig beeinflussen. In niedrigen Konzentrationen wirken sie fördernd und in höheren Konzentrationen (>CMC) inhibierend.

Zur Analyse des Einflusses von Rhamnolipiden auf bereits adhärenzte Bakterien wurde *P. aeruginosa* ATCC 33354 in 24-Loch-Platten für 24 h kultiviert und anschließend analog zu den vorigen Versuchen die Biofilmbildung bestimmt (Kontrolle). Der ausgebildete Biofilm wurde daraufhin für weitere 3 h in H₂O bzw. in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen Rhamnolipid weiter inkubiert (Abb. 7 D). Eine Kristallviolett-färbung erbrachte im Vergleich mit der Wasserkontrolle keinen Effekt von Rhamnolipid auf die Ablösung von adhärenzten Bakterien aus dem Biofilm.

3.1.3 Rhamnolipide erhöhen die IL-8-Induktion in *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturüberständen

In folgenden Untersuchungen wurde die Freisetzung von IL-8-induzierenden PAMs in den Kulturüberstand in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen analysiert. Aufgrund seiner modulierenden Eigenschaft von bakteriellen Oberflächen sollte gleichzeitig der Einfluss von Rhamnolipid überprüft werden. Dazu wurden Wachstumskurven planktonischer und statischer Kulturen von *P. aeruginosa* ATCC 33354 sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit (150 µg/ml) von Rhamnolipid in TSB-Medium durchgeführt.

Die Überstände Rhamnolipid-behandelter Bakterien wiesen im Vergleich zu Überständen unbehandelter Bakterien eine deutliche höhere IL-8-Induktion auf (Abb. 8 A und B). Das zugesetzte Rhamnolipid hatte dabei keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien, da die Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) der Rhamnolipid-behandelten Kulturen nahezu identisch mit den Kontrollkulturen war. Ferner wurde festgestellt, dass Rhamnolipide in den hier eingesetzten Konzentrationen per se keine Induktion von IL-8 in HaCaT-Zellen hervorriefen (Daten nicht gezeigt).

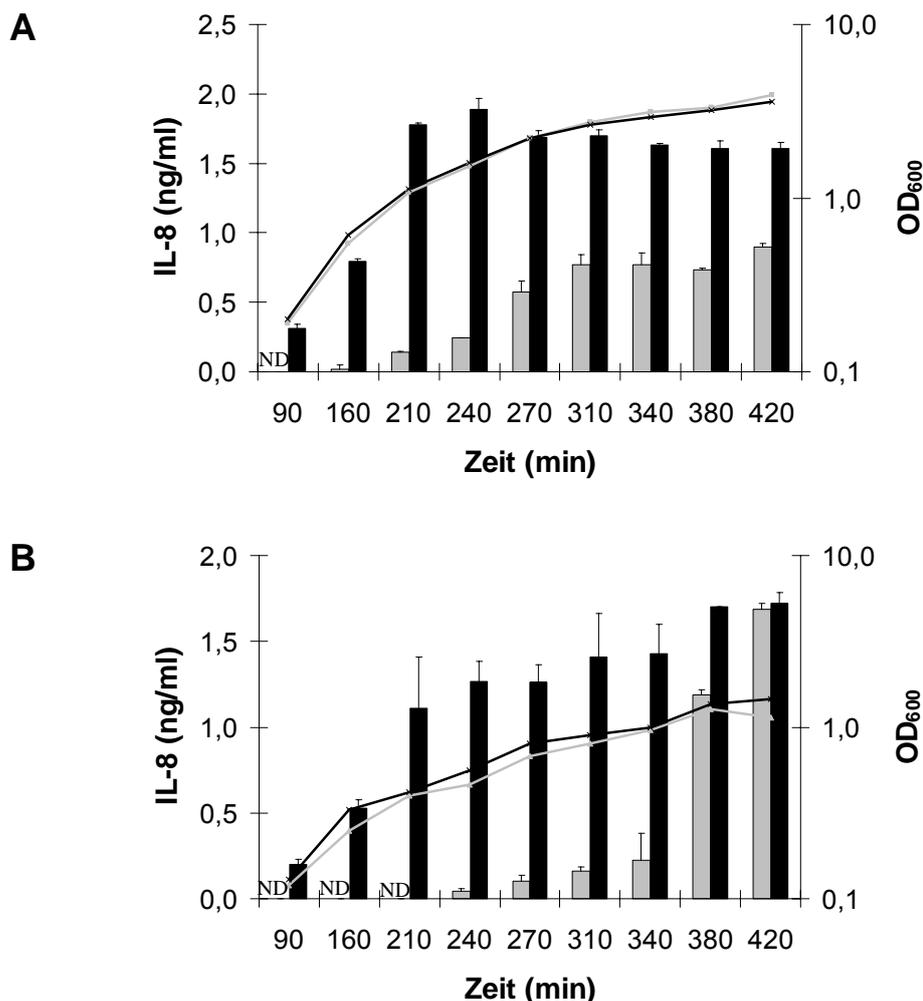


Abb. 8: Rhamnolipide erhöhen die IL-8-Induktion von Kulturüberständen. *P. aeruginosa* (ATCC 33354) wurde in TSB-Medium entweder planktonisch bei 200 Upm (A) oder statisch in Kulturflaschen (B) kultiviert. Dargestellt ist die IL-8-Induktion der Kulturüberstände von Rhamnolipid-behandelten Kulturen (schwarzen Balken) im Vergleich zu Kulturen, denen kein Rhamnolipid zugesetzt wurde (graue Balken). Das Wachstum der Bakterien wurde durch Ermittlung der OD_{600} verfolgt. Die graue Linie zeigt die OD der Kontrollkultur, die schwarze Linie die OD der Kultur mit Rhamnolipid. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots der Kulturen abgenommen, zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Stimulation der HaCaT-Zellen erfolgte mit 4 μ l bakteriellem Überstand/ml Zellkulturmedium über 20 h. ND = nicht detektierbar

Kulturüberstände Rhamnolipid-behandelter Bakterien induzierten im Gegensatz zu den Kontrollkulturen ohne Rhamnolipid bereits nach 90 min eine IL-8-Induktion in Keratinozyten. Eine steigende IL-8-Induktion korrelierte während der Kultivierung mit Zunahme der Bakterienzahl (Abb. 8 A und B). Dies deutet darauf hin, dass der IL-8-induzierende Faktor unter planktonischen sowie unter statischen Bedingungen per se und unabhängig von der Wachstumsphase der Bakterien vorhanden ist und durch die Anwesenheit von Rhamnolipiden ins Medium abgegeben wurde.

Überstände planktonischer Kulturen zeigten in Anwesenheit von Rhamnolipiden nach 210 min eine maximale IL-8-Induktion (1,8 ng/ml), die über den weiteren Verlauf des Wachstums konstant blieb (Abb 8 A). Vergleichend induzierten die Überstände planktonischer Kontrollkulturen erst nach 310 min eine maximale IL-8-Induktion, die um ungefähr 50% reduziert war (0,8 ng/ml). Die Behandlung statisch wachsender Kulturen mit Rhamnolipid führte zu einer ähnlichen Induktionssteigerung (Abb. 8 B). Die Überstände der statischen Kontrollkultur wiesen im Vergleich zu planktonischen Kulturen mit zunehmender Kulturdauer eine erhöhte IL-8-Aktivität auf, die nach 420 min identisch war mit der Aktivität Rhamnolipid-behandelter Bakterien (Abb. 8 B).

3.1.4 Rhamnolipide scheren ein IL-8- und hBD-2-induzierendes PAM von der äußeren bakteriellen Membran ab

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte eine Beteiligung von Rhamnolipid an der Freisetzung eines IL-8-induzierenden Faktors gezeigt werden. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob Rhamnolipide einen auf der äußeren Membran vorhandenen, induzierenden Faktor abscheren oder ob sie die Produktion und Sezernierung eines solchen PAMs induzieren. Rhamnolipide werden während der stationären Phase unter Kontrolle des Quorum-Sensing produziert. Das Quorum-Sensing wiederum ist in der Regulation von verschiedenen metabolischen Prozessen während der stationären Phase involviert, die zur Produktion und Sezernierung verschiedener PAMs führen kann (Schuster und Greenberg, 2006).

Die schnelle Sekretion des PAMs nach Zugabe von Rhamnolipid in den vorangegangenen Experimenten (s. Abb. 8 A und B) deutete darauf hin, dass der Faktor von der äußeren Membran abgeschert wird. Um einen induktiven Prozess von

Rhamnolipid auszuschließen, wurde die Translation der Bakterien durch Zugabe von Tetrazyklin inhibiert. Hierzu wurde *P. aeruginosa* ATCC 33354 in M9-Medium unter planktonischen Bedingungen kultiviert. Während der logarithmischen Phase (OD: 0,5) wurde Tetrazyklin (200 ng/ml) zugesetzt, und die Kultur für 1 h, 2 h und 16 h weiter inkubiert (Abb. 9 A und B). Die Wirkung des Antibiotikums wurde durch Überprüfen der Optischen Dichte kontrolliert, die in den mit Tetrazyklin behandelten Kulturen stagnierte, die Kontrollen ohne Tetrazyklin wuchsen weiter (Daten nicht gezeigt). In den Überständen der Kontrollkulturen ohne Rhamnolipide war keine Induktion zu beobachten, obgleich der Faktor auf den Bakterien vorhanden war. Eine Hitzebehandlung der Bakterien (65°C für 10 min) führte zu einer Freisetzung von PAMs der äußeren Membran (Ochoa-Repáraz et al., 2004) und damit zu einer Induktion von hBD-2 und IL-8 auf Keratinozyten.

Eine Koinkubation der Bakterien mit Rhamnolipiden hingegen führte zu einer Sekretion von hBD-2 und IL-8 in HaCaT-Keratinozyten nach Stimulationsexperimenten mit diesen Überständen. Dabei erfolgte die Induktion bereits nach 1 h und blieb über 16 h nahezu konstant.

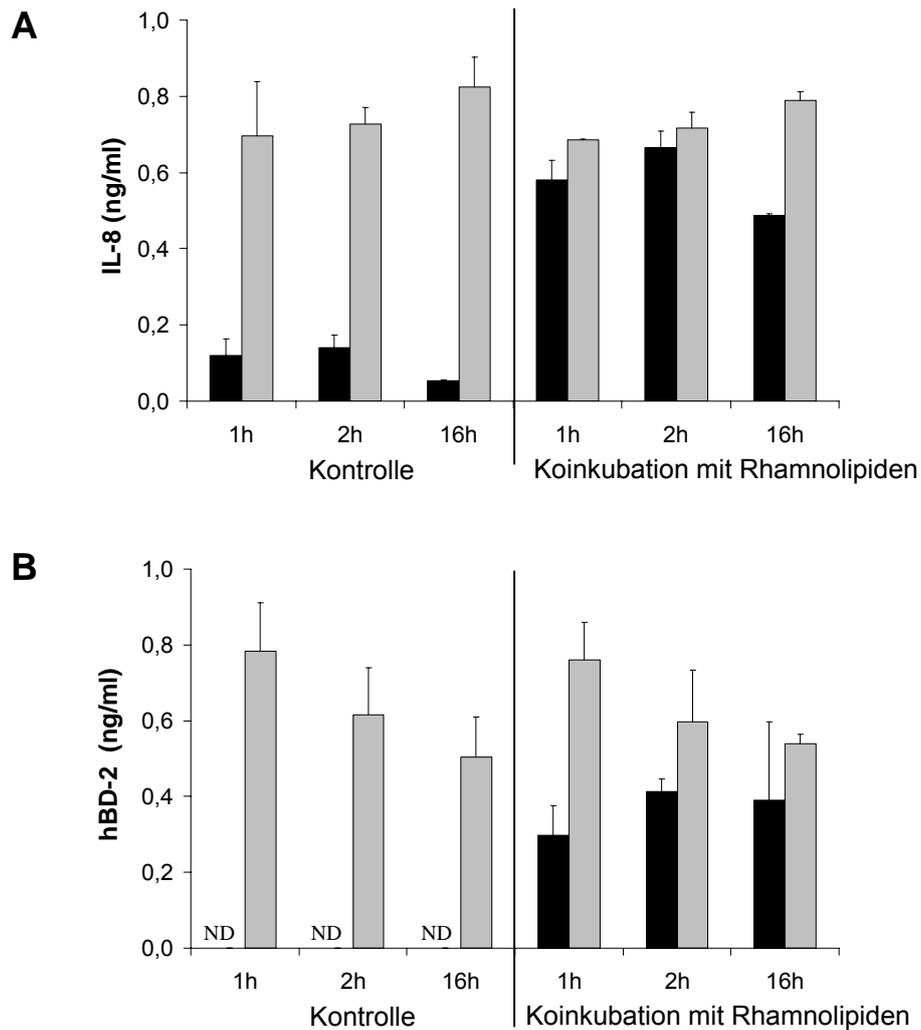


Abb. 9: Rhamnolipid schert IL-8- und hBD-2-induzierende PAMs von der Oberfläche von *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurde unter planktonischen Bedingungen in M9-Minimalmedium kultiviert. Die Bakterien wurden während der logarithmischen Phase (OD_{600} : 0.5) durch Zugabe von Tetrazyklin (200 ng/ml) inaktiviert. Die Kulturen wurden aliquotiert und für 1 h, 2 h und 16 h in An- und Abwesenheit von Rhamnolipiden (150 μ g/ml) weiter inkubiert. HaCaT-Keratinozyten wurden mit sterilfiltrierten und hitzeinaktivierten bakteriellen Kulturüberständen (10 μ l/ml) stimuliert und die Sekretion von IL-8 (A) und hBD-2 (B) im ELISA quantifiziert. Die grauen Balken entsprechen der Sekretion durch hitzeinaktivierte Überstände, schwarze Balken der durch sterilfiltrierte Überstände. ND = nicht detektierbar.

3.1.5 Die Modulation der Bakterienoberfläche durch Rhamnolipide ist von der CMC und der Konzentration divalenter Kationen abhängig

In der Literatur wird beschrieben, dass der Effekt von Rhamnolipiden auf die Zelloberfläche von Bakterien konzentrationsabhängig ist (Al Tahhan et al., 2000;

Sotirova et al., 2007). In folgenden Untersuchungen wurde die IL-8- und hBD-2-induzierende Aktivität der Kulturüberstände in Keratinozyten in Abhängigkeit von der Rhamnolipidkonzentration analysiert. *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Rhamnolipid in M9-Medium unter planktonischen Bedingungen kultiviert und Aliquots des Bakterienüberstandes auf HaCaT-Keratinozyten getestet (Abb. 10 A).

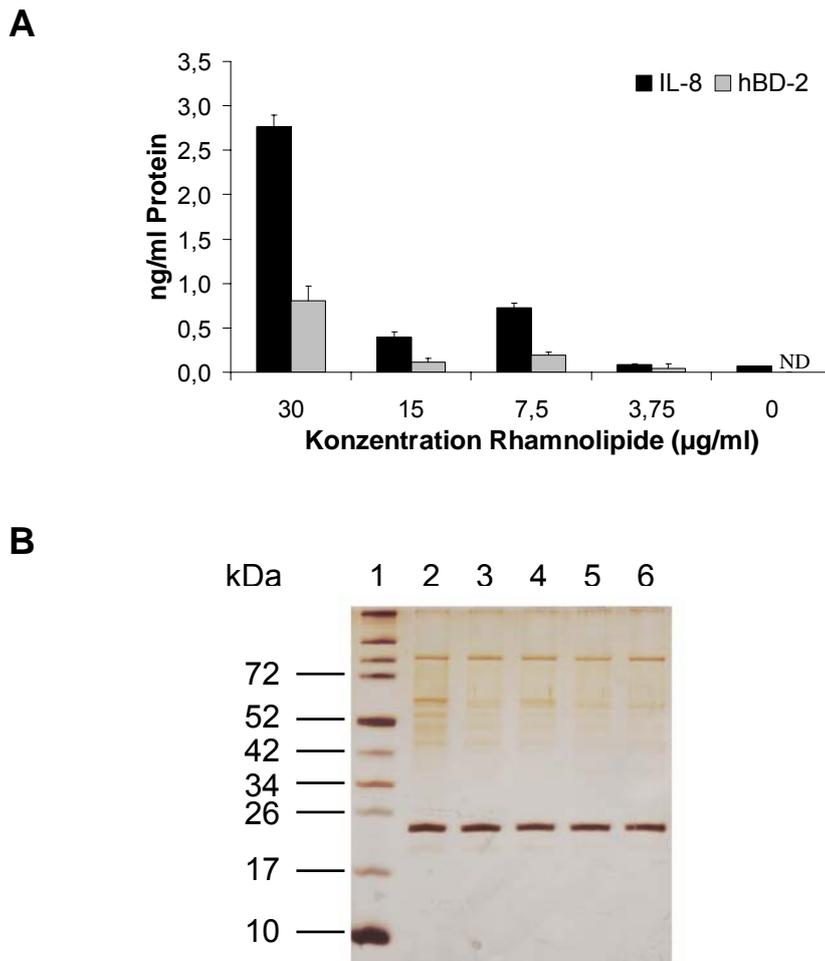


Abb. 10: Die IL-8- und hBD-2-induzierende Aktivität von Überständen Rhamnolipid-behandelter Bakterien ist konzentrationsabhängig. A) *P. aeruginosa* (ATCC 33354) wurde in TSB-Medium bis zur logarithmischen Phase inkubiert, in Wasser gewaschen und mit einer anfänglichen OD_{600} von 0,1 in M9-Medium bei 200 Upm und 37°C mit verschiedenen Konzentrationen Rhamnolipid für 20 h kultiviert. Die Überstände wurden sterilfiltriert und für 20 h auf HaCaT-Zellen getestet. Schwarze Balken geben die IL-8-Induktion wieder, graue Balken die von hBD-2. **B)** Gelelektrophoretische Auftrennung der Bakterienüberstände in einer 12%-iger SDS-PAGE mit Detektion durch Silberfärbung: (1) „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“, (2-6) Kulturüberstände mit 30 µg/ml Rhamnolipid (2), 15 µg/ml (3), 7,5 µg/ml (4), 3,25 µg/ml (5) und ohne Rhamnolipide (6). ND = nicht detektierbar

Die Konzentrationsschwelle der durch Rhamnolipid-vermittelten IL-8- und hBD-2-induzierenden Aktivität liegt bei 30 µg/ml. Während die Überstände von Bakterien, die mit 30 µg/ml Rhamnolipid behandelt wurden, eine hohe IL-8-Antwort induzierten (2,7 ng/ml), konnte im Vergleich mit 15 µg/ml Rhamnolipid nur eine 15%-ige Induktion ermittelt werden (0,4 ng/ml). Die hBD-2 Aktivität war im Vergleich absolut gesehen geringer, zeigte aber eine ähnliche Tendenz. Die maximale hBD-2 Sekretion von 0,8 ng/ml konnte auch hier aus der Stimulation mit Überständen von Bakterien, die mit 30 µg/ml Rhamnolipid behandelt wurden, ermittelt werden. In Anwesenheit von niedrigeren Rhamnolipidkonzentrationen betrug die hBD-2 Sekretion im Vergleich lediglich 12-25%.

Die CMC des verwendeten Rhamnolipids (Jeneil, JBR515) wird in der Literatur in wässriger Lösung mit 0,02% bzw. 30 µg/ml (Urum und Pekdemir, 2004) angegeben. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die CMC eine entscheidende Rolle beim Abscheren des induzierenden Faktors einnimmt. Dabei handelt es sich um einen Alles-oder-Nichts-Mechanismus. Eine weitere Erhöhung der Rhamnolipidkonzentration ergab keine Steigerung der IL-8- und hBD-2-induzierenden Aktivität der entsprechenden Überstände (Daten nicht gezeigt). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Bakterienüberstände ergab zwischen den verschiedenen Proben keinen großen Unterschied im Bandenmuster, lediglich in der höheren Intensität der Banden im aktiven Überstand (Abb. 10 B, vergleiche Spur 2 mit Spuren 3-6).

Es ist bekannt, dass Rhamnolipide aufgrund ihrer anionischen Struktur Kationen binden. In weiteren Kultivierungs- und Stimulationsexperimenten wurde untersucht, ob divalente Kationen die modulierende Eigenschaft von Rhamnolipid beeinflussen. *P. aeruginosa* wurde dazu in Anwesenheit von Rhamnolipiden und verschiedenen Konzentrationen CaCl₂ planktonisch in M9-Minimalmedium kultiviert und die Überstände hinsichtlich ihrer IL-8-Induktion analysiert (Abb. 11).

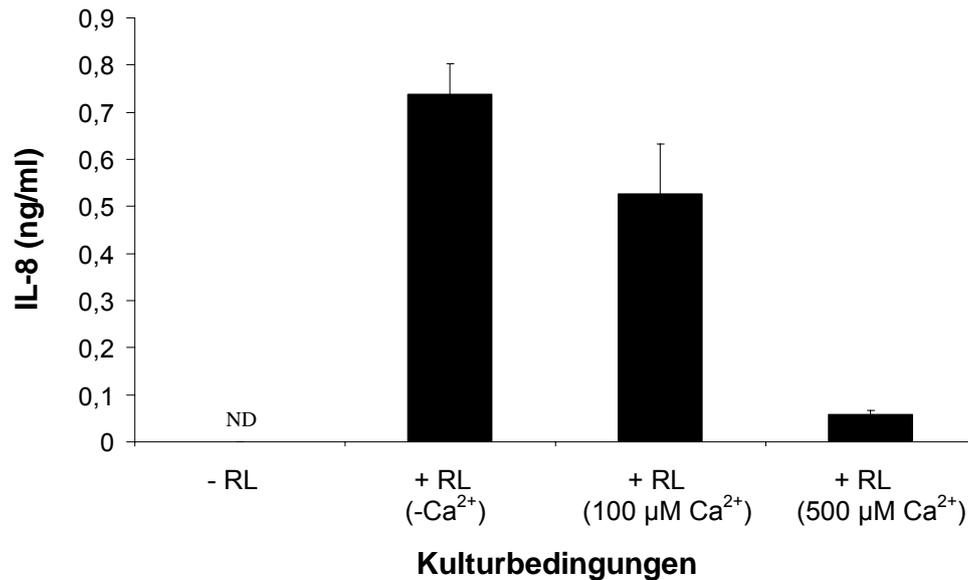


Abb. 11: Ca²⁺- Ionen inhibieren den abscherenden Effekt von Rhamnolipiden. *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurde in M9-Minimalmedium unter planktonischen Bedingungen (200 Upm, 37°C) für 24 h in Anwesenheit von Rhamnolipiden (+ RL, 150 µg/ml) und verschiedenen Konzentrationen von CaCl₂ (100 und 500 µM) kultiviert. Als Negativkontrollen dienten Kulturen ohne Rhamnolipid (-RL), als Positivkontrollen Kulturen mit Rhamnolipid und ohne CaCl₂. ND = nicht detektierbar

Der Kulturüberstand Rhamnolipid-behandelter Bakterien besaß im Vergleich zur Kontrolle ohne Detergenz eine erhöhte Immunreaktivität. Diese verringerte sich allerdings mit zunehmender Menge an Ca²⁺-Ionen. Nach Zugabe von 100 µM CaCl₂ sank die IL-8-induzierende Aktivität auf ca. 70% des Ausgangswertes, nach Zugabe von 500 µM CaCl₂ sogar auf <10%.

3.1.6 Der Effekt von Rhamnolipid auf die Bakterienoberfläche ist abhängig von der Wachstumsphase der Bakterien

In den vorangegangenen Experimenten wurde das Rhamnolipid in der Regel zu Beginn der Kultivierung dem Medium zugesetzt. In den nachfolgenden Versuchen wurde die Wirkung von Rhamnolipiden auf Bakterien in verschiedenen Wachstumsphasen analysiert. Dazu wurde *P. aeruginosa* in M9-Minimalmedium unter planktonischen Bedingungen kultiviert und zu bestimmten Zeiten mit Rhamnolipiden (150 µg/ml) versetzt. Der Überstand wurde nach einer

anschließenden Inkubation über 20 h abgenommen und zu HaCaT-Keratinocyten gegeben (Abb. 12).

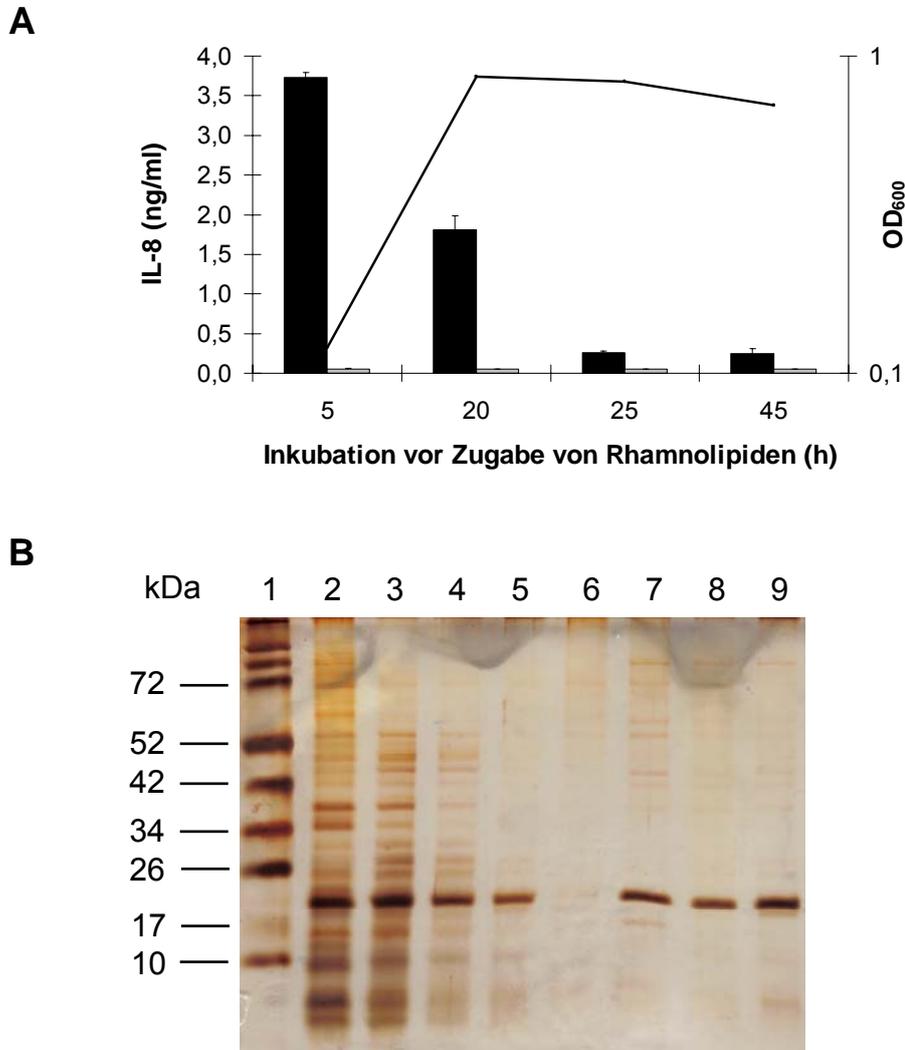


Abb. 12: Die oberflächen-modulierenden Eigenschaften von Rhamnolipiden hängt von der Wachstumsphase der Bakterien ab. A) *P. aeruginosa* (ATCC 33354) wurde in M9-Medium bei 200 Upm und 37°C kultiviert. Nach 5, 20, 25 und 45 h wurden Aliquots von der Kultur abgenommen, Rhamnolipid (150 µg/ml) zugegeben und für weitere 20 h inkubiert. Die Kontrollen enthielten keine extern zugegebenen Rhamnolipide. Die Bakterien wurden zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Stimulation erfolgte für 20 h auf HaCaT-Zellen. Die schwarzen Balken stellen die IL-8-Induktion von Überständen Rhamnolipid behandelter Bakterien dar, die grauen Balken die IL-8-Induktion der unbehandelten Kontrollen. **B)** SDS-PAGE der Kulturüberstände mit Detektion durch Silberfärbung. 1) „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“; 2-5) Überstände von *P. aeruginosa* ATCC 33354 mit Zugabe von Rhamnolipid nach 5 h (2), 20 h (3), 25 h (4) und 45 h (5) Kultivierung; 6-9) Überstände von Kontrollkulturen ohne externe Rhamnolipide nach 5 h (6), 20 h (7), 25 h (8) und 45 h (9).

Die Erhöhung der IL-8-induzierenden Aktivität durch Behandlung der Bakterien mit Rhamnolipiden zeigte eine Abhängigkeit von der Wachstumsphase der Bakterien. Wie in Abb. 12 A zu erkennen nahm die IL-8-Induktion mit zunehmender Wachstumsdauer der Bakterien ab. Die Zugabe von Rhamnolipiden zu einer 5 h inkubierten *Pseudomonas*-Kultur rief eine ausgeprägte IL-8-Induktion des Bakterienüberstandes in HaCaT-Keratinocyten hervor. Wurden Rhamnolipide zu einer 20 h inkubierten Kultur gegeben, reduzierte sich die IL-8-Induktion um 50%. Nach 25 und 45 h befanden sich die Bakterien bereits in der Sterbephase und entließen nach Zugabe von Rhamnolipid keinen IL-8-induzierenden Faktor ins Medium. Folglich wurde dieser abhängig von der Wachstumsphase der Bakterien lediglich während der logarithmischen und frühen stationären Phase abgesichert. Gelelektrophoretische Untersuchungen der Überstände ergaben, dass der Gehalt von Rhamnolipid abgeschorenen Oberflächenstrukturen der Kulturen mit zunehmender Wachstumsphase geringer wurde (Abb. 12 B, Spuren 2-5). Diese Abnahme korrelierte ebenfalls mit einer niedrigen IL-8-Induktion. Die Überstände der Kontrollkulturen, denen kein externes Rhamnolipid zugegeben worden war, zeigten ein schwaches Bandenmuster (Abb. 12, B, Spuren 6-9).

3.1.7 Einfluss von Detergenzien auf *P. aeruginosa* und die IL-8-Induktion

Im Folgenden wurde untersucht, ob die beschriebenen Eigenschaften des anionischen Detergenzes Rhamnolipid von spezifischer Natur sind. Dazu wurden Bakterien unter identischen Bedingungen in Anwesenheit von anderen Detergenzien kultiviert und die Kulturüberstände analysiert. Als Alternativen wurden Tween 20 (Polysorbat 20) und Triton X-100 (Octoxinol-9) verwendet, bei denen es sich um nichtionische Tenside handelt (Abb. 13 A).

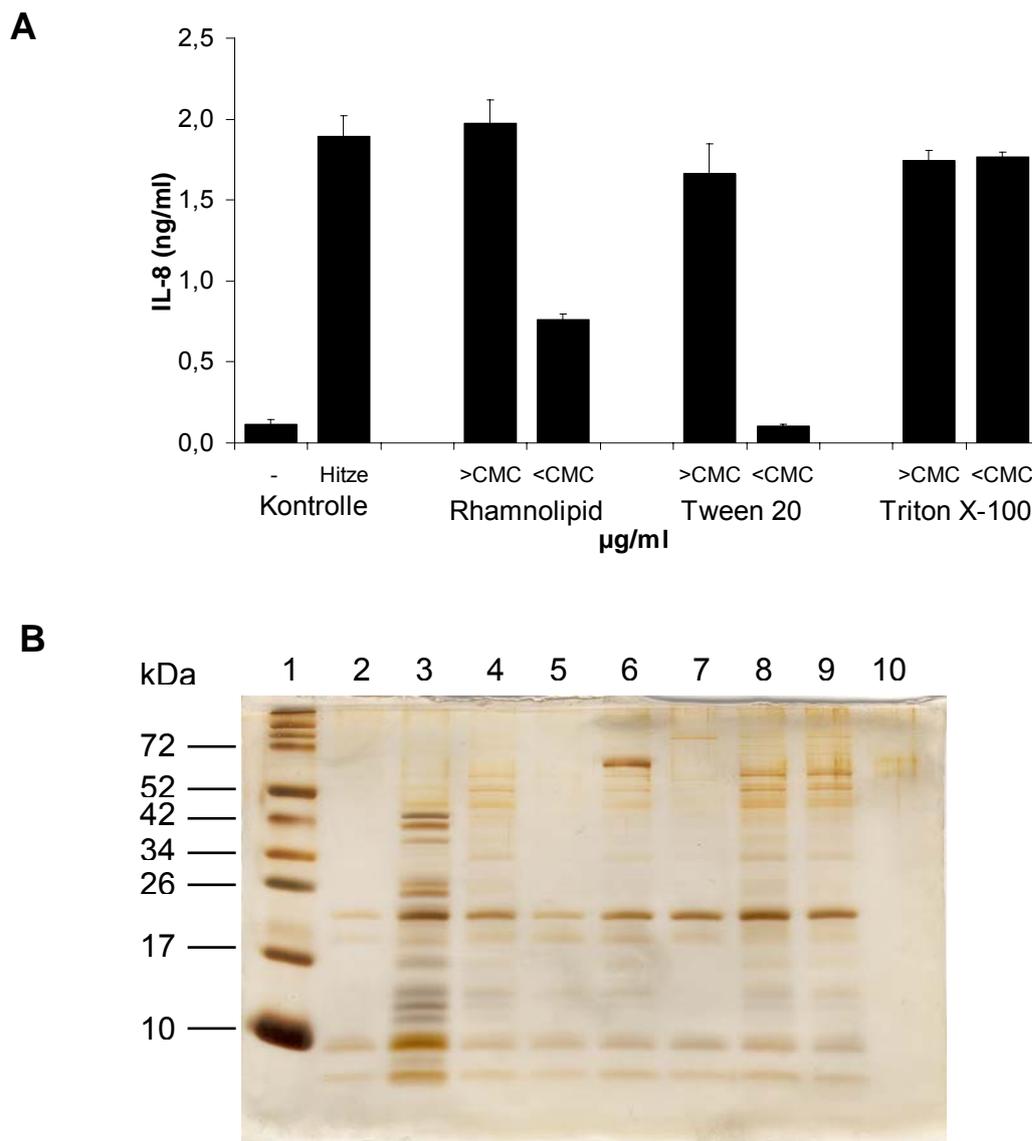


Abb. 13: Die IL-8-induzierende Aktivität beruht auf der Eigenschaft von Rhamnolipiden als Detergenz. A) *P. aeruginosa* (ATCC 33354) wurde in M9-Medium bei 200 Upm und 37°C mit jeweils 500 (>CMC) bzw. 50 µg/ml (<CMC) Rhamnolipid (15%-ige Lösung), Tween 20 und Triton X-100 für 20 h inkubiert. Die Kontrolle stellte eine Kultur ohne Detergenz dar. Die Hitzebehandlung der Kontrollkultur wurde bei 65°C für 10 min durchgeführt. Die Überstände wurden sterilfiltriert und für 20 h auf HaCaTs getestet. **B)** SDS-PAGE der M9-Überstände mit Detektion durch Silberfärbung. (1, „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“; 2-9) Kulturüberstände von *P. aeruginosa* ATCC 33354: 2) ohne Detergenz; 3) Überstand hitzeinaktivierter Bakterien; 4) Rhamnolipid (>CMC); 5) Rhamnolipid (<CMC); 6) Tween 20 (>CMC); 7) Tween 20 (<CMC); 8) TritonX-100 (>CMC); 9) Triton X-100 (<CMC); 10) Rhamnolipid JBR515 (75 µg/ml)

Die Freisetzung des IL-8-induzierenden Faktors von der Bakterienoberfläche ist ein Prozess, der nicht auf die spezifische Interaktion von Rhamnolipiden, sondern auf

seine Eigenschaft als Detergenz zurückzuführen ist. Die Verwendung der Detergenzien Tween 20 und Triton X-100 führte im Vergleich zu Rhamnolipiden bei einer eingesetzten Konzentration von 500 µg/ml zu einer ähnlichen Steigerung der IL-8-Induktion nach Stimulation in HaCaT-Keratinocyten. Die Zugabe der Detergenzien unterhalb der CMC (50 µg/ml) ergab bei Rhamnolipiden und Tween 20 eine reduzierte bzw. eine fehlende IL-8-Induktion, während die Aktivität bei Triton X-100 gleich blieb.

Die Aktivität korrelierte bei diesem Prozess mit der vermehrten Freisetzung von Oberflächenstrukturen in den Bakterienüberstand (Abb. 13 B). Das Bandenmuster von unbehandelten sterilfiltrierten Überständen (Spur 2) wies nur wenige schwache Banden auf, während in den Überständen Detergenz-behandelter Bakterien ein Anstieg der Bandenzahl detektiert werden konnte. Überstände von *P. aeruginosa* Kulturen, die mit Detergenzien in Konzentrationen oberhalb der CMC behandelt wurden, zeigten ein gleiches Bandenmuster (Spuren 4, 6 und 8) und waren intensiver als die von Bakterienüberständen, denen Rhamnolipide unterhalb der CMC zugesetzt wurden (vergleiche Spuren 4 und 5; 6 und 7; 8 und 9). Die geringste Bandenintensität wurde in Bakterienüberständen nach Behandlung mit Tween 20 und Rhamnolipiden unterhalb der CMC detektiert (Spuren 5 und 7), die höchste Bandenintensität in Überständen hitzeinaktivierter Bakterien (Spur 3).

3.1.8 Charakterisierung des IL-8- und hBD-2-induzierenden Faktors aus Überständen Rhamnolipid-behandelter *Pseudomonaden*

In der Literatur wird beschrieben, dass Rhamnolipide die Bakterienoberflächen modifizieren, indem sie Proteine und LPS abscheren, die als potentielle PAMs wirken können (Al Tahhan et al., 2000; Sotirova et al., 2007). In weiterführenden Untersuchungen wurden Kulturüberstände systematisch hinsichtlich Eigenschaften und Natur des IL-8-induzierenden Faktors analysiert.

Zur Überprüfung der Beteiligung von LPS an der proinflammatorischen Reaktion wurde der Überstand Rhamnolipid-behandelter Bakterien mit Polymyxin B versetzt und die Induktor-Aktivität auf HaCaT-Zellen ermittelt. Polymyxin B ist ein zyklisches, amphipatisches Peptid, welches das LPS neutralisiert, indem es spezifisch an das Lipid A bindet (Cardoso et al., 2007). Die IL-8-Induktion des Überstandes wurde

durch diese Behandlung nicht beeinflusst (Abb. 14 A). Stimulationen mit kommerziellem LPS (Sigma-Aldrich) führten ebenfalls zu keiner IL-8-Induktion (Daten nicht gezeigt).

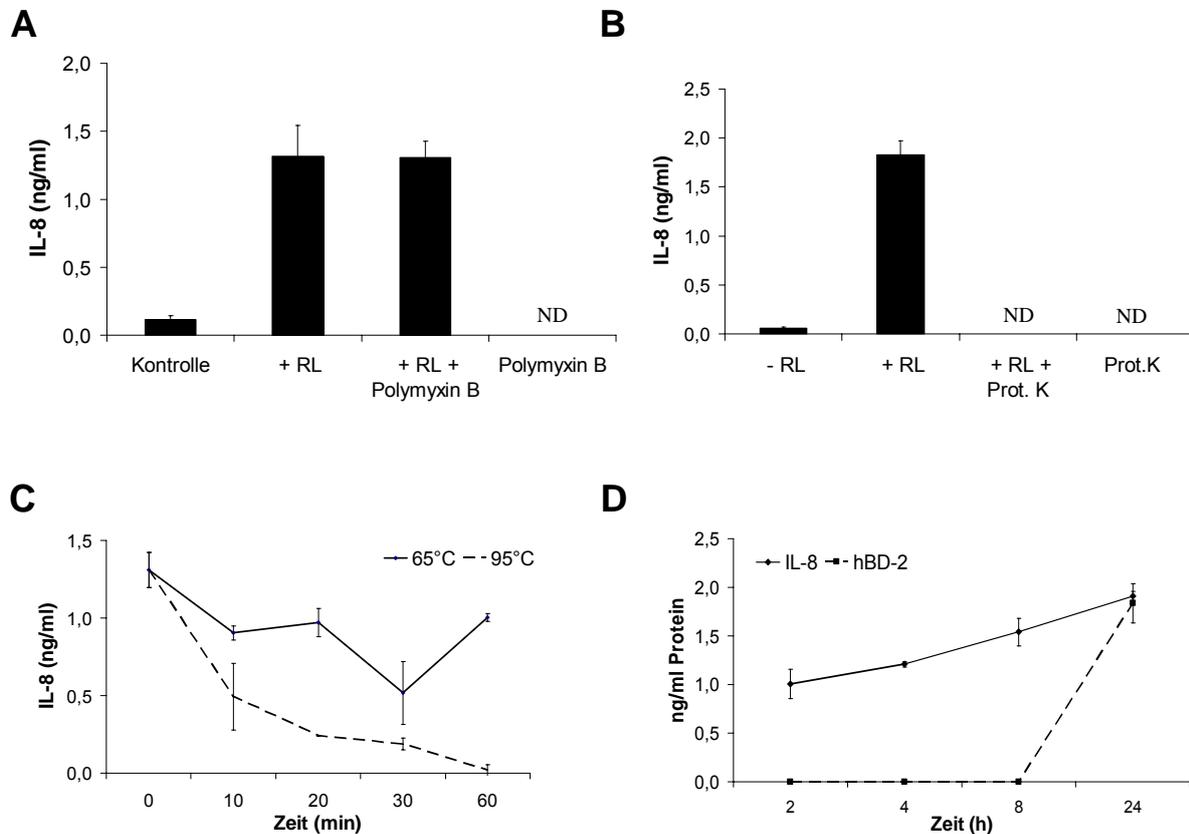


Abb. 14: Eigenschaften des IL-8-induzierenden Faktors. Kulturüberstände Rhamnolipid-behandelter *Pseudomonaden* ATCC 33354 (+RL) wurde mit 10 µg/ml Polymyxin B (**A**) sowie für 4 h bei Raumtemperatur mit 150 µg/ml Proteinase K (**B**) inkubiert und für 15 h auf HaCaTs stimuliert. Die Proteinase K wurde zuvor für 15 min bei 85°C inaktiviert. Den Kontrollkulturen wurde kein externes Rhamnolipid zugesetzt (-RL). **C**) Der Überstand Rhamnolipid-behandelter Bakterien wurde für 10, 20, 30 und 60 min bei 65°C (durchgehende Linie) und 95°C (gestrichelte Linie) inkubiert und auf HaCaT-Zellen stimuliert. **D**) HaCaT-Keratinocyten wurden für 2, 4, 8 und 24 h mit Überständen Rhamnolipid-behandelter Bakterien stimuliert. Die Zellüberstände wurden mittels ELISA auf IL-8 (durchgehende Linie) und hBD-2 (gestrichelte Linie) untersucht. ND = nicht detektiert

Eine Vielzahl von PAMs sind Proteine. Ob es sich bei dem hier beschriebenen IL-8-induzierenden Faktor ebenfalls um ein Protein handelt, wurde wie folgt untersucht. Überstände Rhamnolipid-behandelter Bakterien wurden mit Proteinase K verdaut und die Proteinase K anschließend inaktiviert. In Stimulationsexperimenten war eine IL-8-Induktion infolge dieser Behandlung im Gegensatz zum Ausgangsüberstand

nicht mehr detektierbar (Abb. 14 B). Der induzierende Faktor war demzufolge Proteinase K-sensitiv.

Untersuchungen zur Hitzestabilität des induzierenden Faktors zeigten, dass die IL-8-induzierende Aktivität nach einer 60 min anhaltenden Inkubation bei 65°C auf 75% zurückging. Erfolgte die Inkubation bei 95°C konnte ein schneller, stetiger Verlust der IL-8-Induktion beobachtet werden, der nach 60 min nur noch 1,5% der ursprünglichen Aktivität aufwies (Abb. 14 C).

Analysen zur Zeitkinetik der Induktion in Keratinozyten wurden mit dem Überstand Rhamnolipid-behandelter *Pseudomonaden* (ATCC 33354) durchgeführt. Dazu wurden HaCaT-Keratinozyten für 2 h, 4 h, 8 h und 16 h Überständen inkubiert und die Zellüberstände hinsichtlich IL-8- und hBD-2-Freisetzung untersucht (Abb. 14 D). Während die Sezernierung von hBD-2 zwischen 8 h und 24 h erfolgte, war eine Freisetzung von IL-8 bereits nach 2 h zu beobachten.

Untersuchungen zur Molekularmasse des induzierenden Faktors wurden mit Hilfe der Gelfiltration durchgeführt. Da Detergenzien bei der chromatographischen Auftrennung stören, wurden die Rhamnolipide durch Ansäuern und anschließender Extraktion mit Chloroform-Methanol aus dem Bakterienüberstand entfernt. Die organische Phase enthielt das Rhamnolipid, die wässrige Phase mit dem induzierenden Faktor wurde nach Lyophilisation an einer Superdex G75-HPLC-Säule aufgetrennt (Abb. 15 A). Die induzierende Aktivität wurde im Bereich des vorderen Ausschlussvolumens (V_{∞}) zwischen 9-13 min eluiert. Sie besitzt demnach eine Molekularmasse von 50-70 kDa. Die HPLC-Fractionen, in denen nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung eine erhöhte Menge an Membranbestandteilen detektiert wurde, führten zu einer gesteigerten IL-8-Induktion in HaCaT-Keratinozyten (Abb. 15 B).

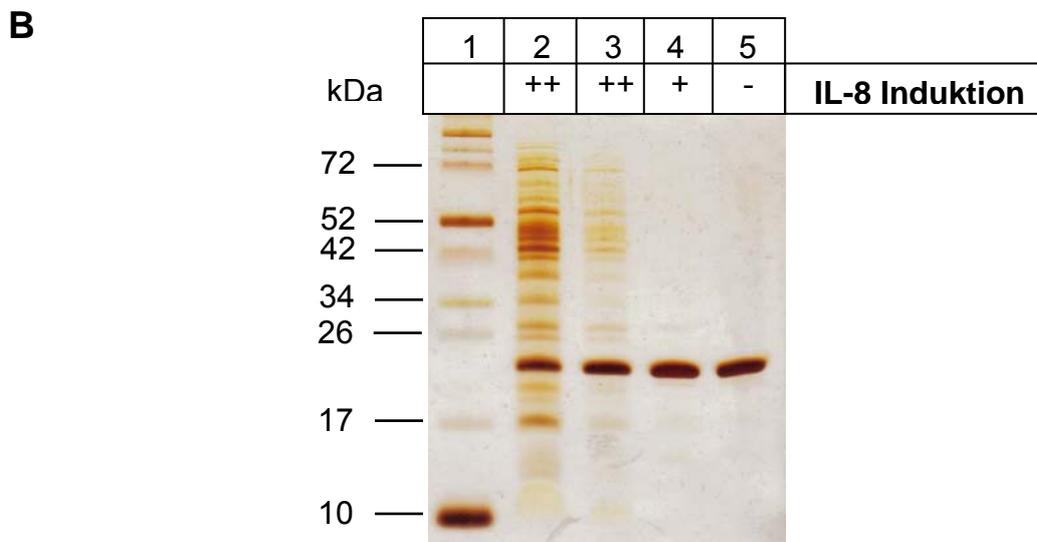
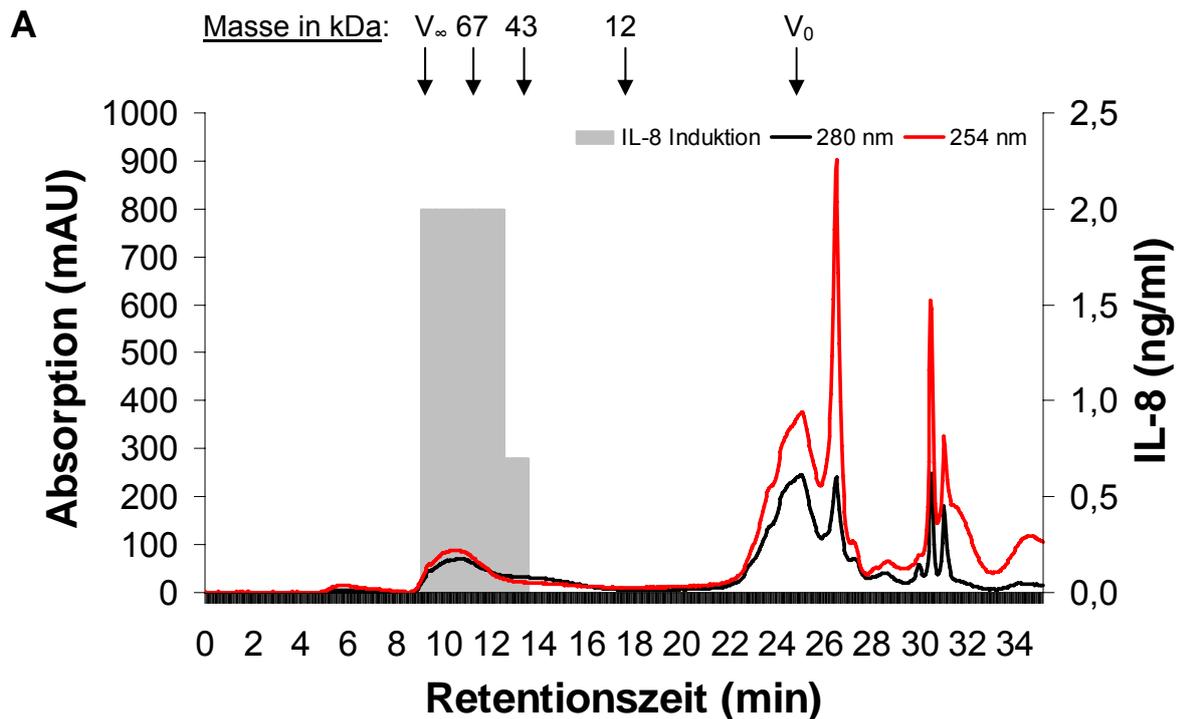


Abb. 15: Größenaufreinigung des IL-8-induzierenden Faktors mit Hilfe von Gelfiltration. (A) Bakterienüberstand von *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurde mit Ameisensäure angesäuert und mit Chloroform-Methanol ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde über die Superdex G75 gegeben und die Fraktionen auf IL-8-Induktion in HaCaT-Zellen getestet. Die IL-8-induzierenden Fraktionen sind in grau dargestellt. Die Absorption wurde bei 254 nm (rot) und 280 nm (schwarz) gemessen. V_{∞} ist das vordere Ausschlussvolumen, V_0 das hintere Ausschlussvolumen. **(B)** SDS-PAGE (12%) der Fraktionen von 10-14 min. 1) „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ 2) 10-11,25 min 3) 11,25-12,5 min 4) 12,5-13,75 min und 5) 13,75-15 min. Darstellung der aktiven Fraktionen (++ >2 ng/ml, + >1 ng/ml, - keine Aktivität).

3.1.9 Wirkung von Rhamnolipiden auf verschiedene *Pseudomonas*-Stämme und Mutanten

Der Effekt von Rhamnolipiden auf die Bakterienoberfläche wurde in den vorangegangenen Experimenten ausschließlich bei *P. aeruginosa* ATCC 33354 untersucht. In den nachfolgenden Untersuchungen wurden verschiedene *Pseudomonas*-Stämme und isogene Mutanten mit Rhamnolipiden versetzt und die Kulturüberstände hinsichtlich einer IL-8-Induktion in Keratinozyten untersucht (Abb. 16). Die PAO1 Δ *pilA*-Mutante zeichnet sich dadurch aus, dass das Strukturgen für die Typ-IV-Pili deletiert ist. In der PAO1 Δ *fliM*-Mutante fehlt die Synthese des FliM-Proteins, welches ein Bestandteil des C-Ringes des Flagellinapparates darstellt. Der Zusammenbau der Flagellen ist dadurch gestört, so dass die Mutante kein Filament aufbauen kann. Beide Mutanten wurden aus dem PAO1 generiert. Die PAK Δ *fliC*-Mutante zeichnet sich ebenfalls durch fehlende Flagellen aus, da das Strukturgen des monomeren Flagellins des PAK Stammes deletiert wurde.

Die Bakterien wurden unter planktonischen Bedingungen in TSB-Medium in An- und Abwesenheit von Rhamnolipiden kultiviert. Nach 3 h wurden die Bakterien abgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert und für die Stimulation auf HaCaT-Keratinozyten verwendet (Abb 16).

Die höchsten IL-8-Induktionen erfolgten in den Überständen der beiden Referenzstämme PAKWT und PAO1 in Anwesenheit von Rhamnolipiden. Die Kontrollkulturen ohne Zugabe von Rhamnolipid löste eine 6-fache bzw 72-fache geringere Induktion in Keratinozyten aus. Die Überstände der isogenen aflagellierten Mutanten (PAK Δ *fliC* / PAO1 Δ *fliM*) konnten weder in Ab- noch in Anwesenheit von Rhamnolipid einen IL-8-induzierenden Effekt in HaCaT-Keratinozyten bewirken. Ein ähnliches Resultat wurde mit Überständen der PAO1 Δ *pilA*-Mutante erzielt. Die IL-8-Induktion von Überständen Rhamnolipid-behandelter Bakterien fiel im Vergleich zum Wildtyp um das 5-fache geringer aus.

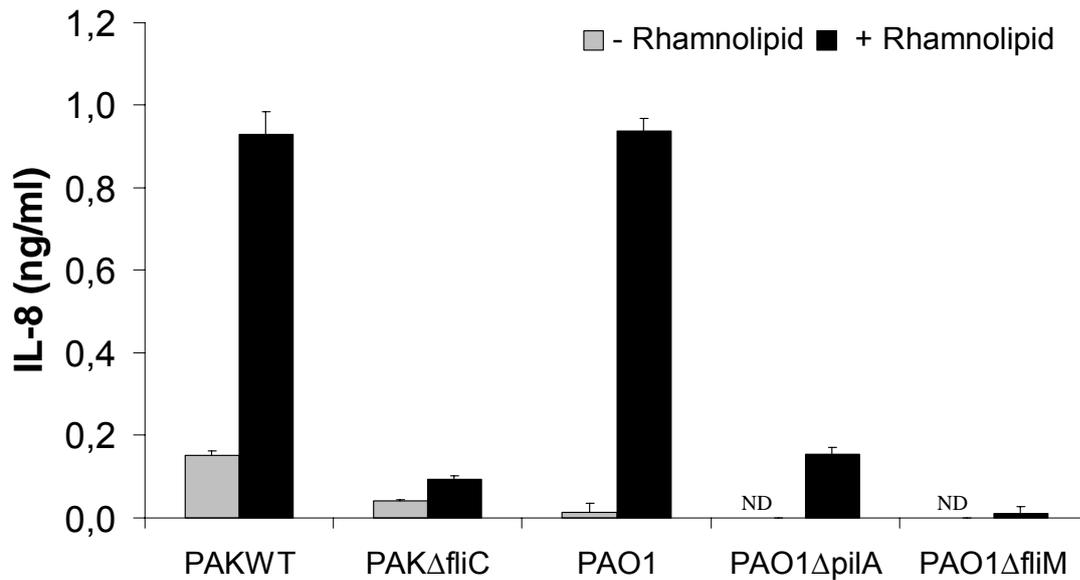


Abb. 16: IL-8-induzierende Aktivität Rhamnolipid-behandelter *Pseudomonaden*. Die *Pseudomonas*-Stämme wurden in An- bzw. Abwesenheit von Rhamnolipiden für 3 h in TSB-Medium und unter planktonischen Bedingungen kultiviert. Die Bakterienkulturen wurden abgenommen, zentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die IL-8-induzierende Aktivität von Überständen Rhamnolipid-behandelter Bakterien (schwarze Balken) und unbehandelter Bakterien (graue Balken) wurde auf HaCaT-Keratinocyten bestimmt. Für die Versuche wurden PAO1, PAO1Δ*pilA*-Mutante, PAO1Δ*fliM*-Mutante, PAKWT und PAKΔ*fliC* verwendet. ND = nicht detektierbar.

3.1.10 Rhamnolipide scheren Flagellin von der bakteriellen Oberfläche ab

Die bisherigen Daten lassen vermuten, dass es sich bei dem IL-8- und hBD-2-induzierenden Faktor um ein Protein handelt. Die fehlende Induktion in Überständen Rhamnolipid-behandelter PAO1Δ*fliM*- bzw. PAKΔ*fliC*-Mutanten (s. Abb. 16) deutet darauf hin, dass Flagellin für die Induktion von IL-8 und hBD-2 verantwortlich ist.

Der Nachweis, dass Rhamnolipide Flagellin von der Bakterienoberfläche von *P. aeruginosa* ATCC 33354 abscheren, wurde zunächst durch Western-Blot-Analysen erbracht (Abb. 17). Es ist zu erkennen, dass in den Überständen von *P. aeruginosa* ATCC 33354 nach Behandlung mit Rhamnolipiden (Spur 1) mehr Flagellin vorhanden ist als in der entsprechenden Negativkontrolle (Spur 2), in welcher keine Rhamnolipide eingesetzt wurden. Eine Freisetzung geringer Mengen

von Flagellin konnte auch in den Kulturen ohne Zugabe von Rhamnolipid detektiert werden („Leakage“).

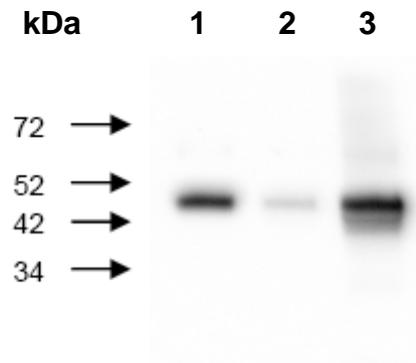
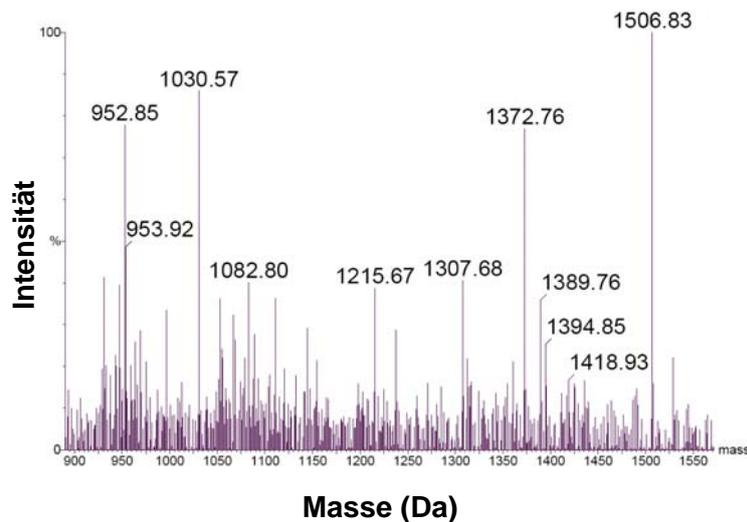


Abb. 17: Western-Blot-Detektion von Flagellin in Bakterienüberständen. Kulturüberstände von *P. aeruginosa* ATCC 33354 mit Rhamnolipid (Spur 1) und ohne Rhamnolipid (Spur 2) wurden in einer 12%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Flagellin im Western-Blot detektiert. In Spur 3 ist angereichertes Flagellin als Positivkontrolle aufgetragen worden.

Eine eindeutige Identifizierung des Flagellins erfolgte durch Massenspektrometrie. Dazu wurden Kulturüberstände von PAO1 in Anwesenheit von Rhamnolipiden hergestellt (s. 2.8.2) und das Flagellin mit 0,5 M NaCl gefällt. Das Pellet wurde gelelektrophoretisch durch eine SDS-PAGE-Analyse aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Farbstoff angefärbt. Die entsprechende Bande bei ca. 50 kDa wurde ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Nano-ESI-MS/MS Untersuchungen der tryptischen Peptidfragmente mit anschließender Datenbanksuche (Mascot) identifizierten sieben definierte Fragmente, die durch MS/MS-Analysen eindeutig dem Flagellin von *P. aeruginosa* zugeordnet werden konnten (Abb. 18).

A



B

Position	m/z gemessen	Masse [M+H] ⁺ erhalten [Da]	Masse [M+H] ⁺ geschätzt [Da]	Sequenz
54-66	686,91	1371,8134	1371,7470	LSNQISGLNVATR
115-125	608,34	1214,6734	1214,6255	EVAQAQELTR
126-135	527,77	1053,5334	1053,5091	ISDTTTFGGR
209-219	516,29	1030,5734	1029,5454	NIAAAGDSAK
295-308	695,39	1388,7734	1388,7511	GVLTITSATGENVK
309-324	753,91	1505,8134	1505,7838	FQAQTGTATAGQVAVK
417-425	472,27	942,5334	942,4883	ADLGAVQNR

1	MALTVNTNIA	SLNTQRNLNA	SSNDLNTSLQ	RLTTGYRINS	AKDDAAGLQI
51	SNRLSNQISG	LNVATR NAND	GISLAQTAEG	ALQQSTNILQ	RIRDLALQSA
101	NGSNSDADRA	ALQKE VAAQ	AE LTRISDTT	TF GGRKLLDG	SFGTTSFQVG
151	SNAYETIDIS	LQNASASAIG	SYQVGSNGAG	TVASVAGTAT	ASGIASGTVN
201	LVGGGQVKNI	AIAAG DSAKA	IAEKMDGAIP	NLSARARTVF	TADVSGVTGG
251	SLNFDVTVGS	NTVSLAGVTS	TQDLADQLNS	NSSKLGITAS	INDK GVL TIT
301	SAT GENVKFG	AQT GTATAGQ	VAV KVQSDG	KFEAAAKNVV	AAGTAATTTI
351	VTGYVQLNSP	TAYSVSGTGT	QASQVFGNAS	AAQKSSVASV	DISTADGAQN
401	AIAVVDNALA	AIDAQR ADLG	AVQ NRFKNTI	DNLTNISENA	TNARSRIKDT
451	DFAAETAALS	KNQVLQQAGT	AILAQANQLP	QAVLSLLR	

Abb. 18: ESI-MS/MS-Untersuchungen identifizierten Flagellin in Überständen Rhamnolipid-behandelter *Pseudomonaden* (PAO1). Der Kulturüberstand von PAO1 wurde konzentriert und gelelektrophoretisch in einem 10%-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Bande bei 50 kDa wurde ausgeschnitten und im Gel mit Trypsin verdaut. Der Verdau wurde mit Hilfe ESI-MS/MS analysiert und mit Flagellinfragmenten aus Datenbanken abgeglichen. **(A)** MS-Spektren des verdauten Flagellins. Die Ermittlung der Massen erfolgte durch eine MaxEnt3-Auswertung der Rohdaten (m/z). **(B)** Tabellarisch sind die m/z-Daten der Fragmente sowie die identifizierten Massen und Sequenzen aufgeführt. Übereinstimmende Peptid-Fragmente, die eindeutig durch MS/MS-Analysen identifiziert worden waren, sind in der unteren kompletten Aminosäuresequenz von PAO1-Flagellin fett hervorgehoben, während nicht detektierte Peptide unmarkiert sind.

3.1.11 *Ex vivo* Untersuchungen zur Induktion von Psoriasin in der Haut

Für Rhamnolipide ist beschrieben worden, dass sie *in vitro* durch Veränderung der Tight-Junctions die Barrierefunktion von Lungenepithel schädigen können (Zulianello et al., 2006). Mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen sollte die Wirkung von Rhamnolipiden und Flagellin als abgeschertes PAM *ex vivo* in Hautpräparaten untersucht werden. Die Haut wurde zusätzlich mit dem PAM Flagellin behandelt und die Induktion des antimikrobiellen Proteins Psoriasin mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers durch Immunfärbung nachgewiesen. Es ist bekannt, dass Flagellin in Keratinozyten Psoriasin induziert (Abtin et al., 2008). In Abb. 19 ist zu erkennen, dass weder mit Rhamnolipid (B) noch mit Flagellin (C) alleine Psoriasin detektiert wurde. Erst wenn die Haut mit beiden Faktoren zusammen inkubiert wurde, war eine Psoriasinsekretion detektierbar (Abb. 19, D).

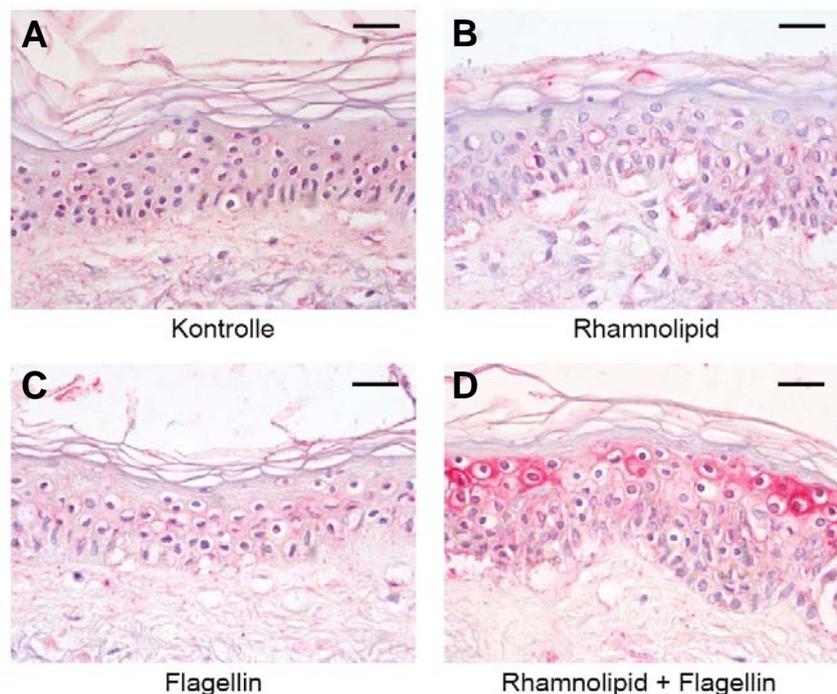


Abb. 19: Koinkubation von Rhamnolipid und Flagellin induziert Psoriasin Sekretion in der Haut.

Gezeigt ist eine immunhistochemische Färbung mit Psoriasin-Antikörper in Hautpräparaten, die entweder in Anwesenheit von Rhamnolipid (B), Flagellin (C) oder Rhamnolipid und Flagellin (D) inkubiert wurden. In einer Kontrollreaktion wurde keiner der beiden Faktoren eingesetzt (A). Eine ausgeprägte Immunreaktivität (rote Färbung) erfolgte in suprabasalen Keratinozyten der Epidermis nur nach Koinkubation von Rhamnolipid mit Flagellin (D). Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 25 Mikrometer.

3.2 Flagellin

In Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass Rhamnolipide Flagellin von der Bakterienoberfläche abscheren. Flagellin bildet die monomere, globuläre Einheit des Flagellenfilamentes begeißelter Bakterien und wird als wichtiger Virulenzfaktor beschrieben. Flagellin gilt als Hauptkomponente einer proinflammatorischen Antwort sowie der Induktion von antimikrobiellen Proteinen in Epithelzellen (Zeng et al., 2003; Abtin et al., 2008).

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte das Flagellin von *P. aeruginosa* charakterisiert und die Virulenz analysiert werden.

3.2.1 Aufreinigung von Flagellin

Für die folgenden Untersuchungen wurde in der Regel Flagellin von PAO1 eingesetzt. Die Anreicherung des Flagellins erfolgte durch mechanisches Abscheren der Oberflächenproteine und einer anschließenden milden Hitzebehandlung der Bakterien (s. 2.7.1). Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe verschiedener chromatographischer Methoden. Erhaltene Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer proinflammatorischen Aktivität auf HaCaT-Keratinocyten getestet.

Da das Flagellin einen pI von 5,4 besitzt, ist es im Neutralen negativ geladen. Aufgrund dessen wurde eine erste Auftrennung des Flagellins mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Abb. 20).

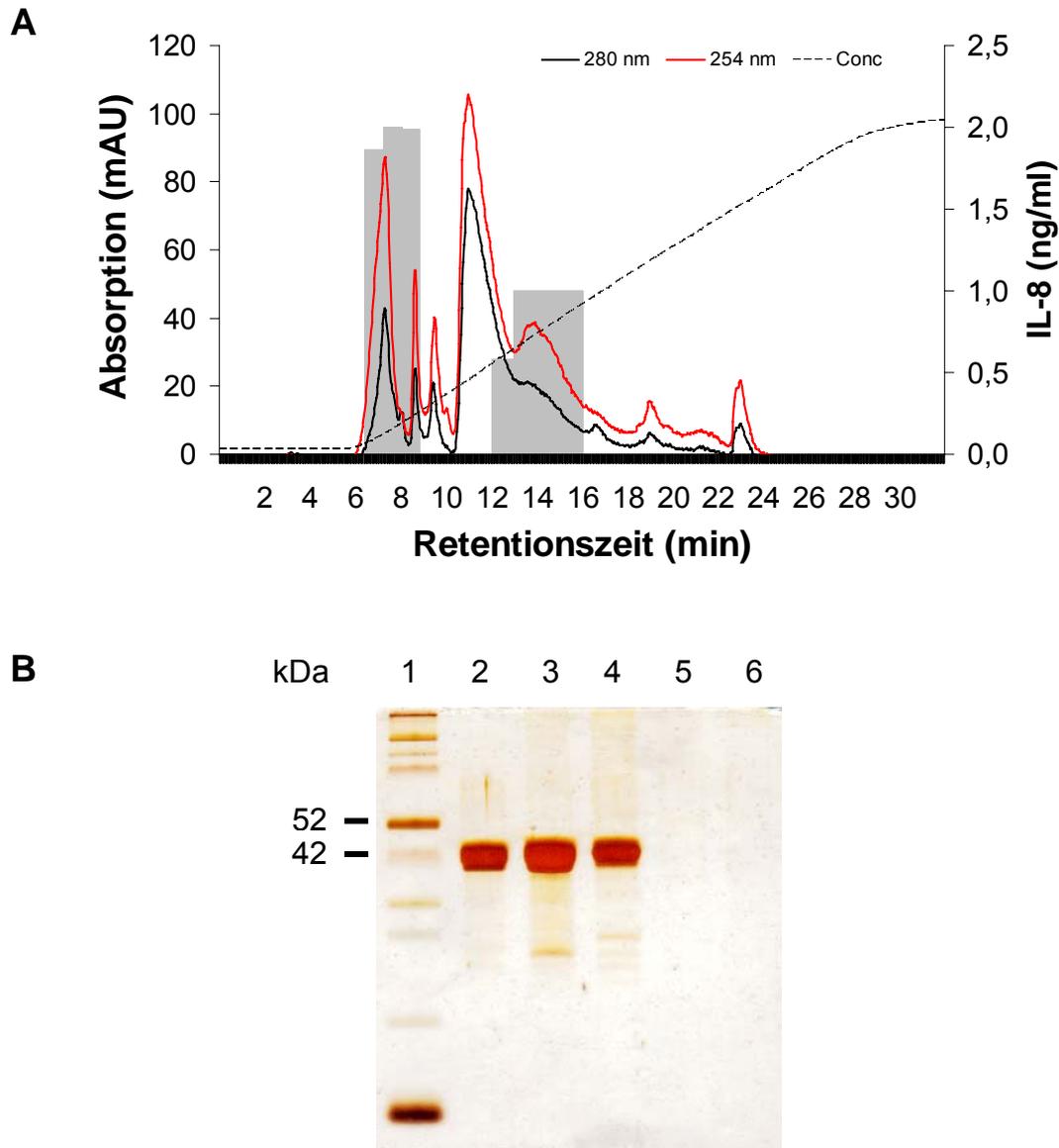
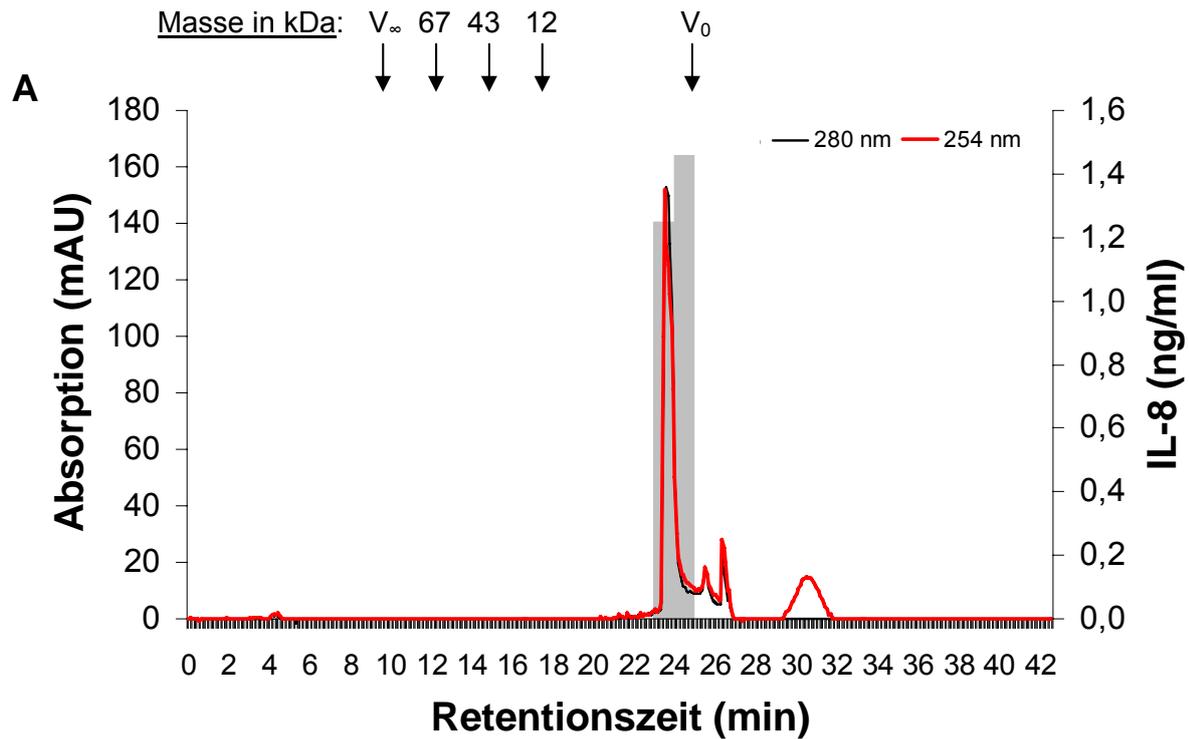


Abb. 20: Anionenaustauschchromatographie von Flagellin. Flagellinanreicherungen (s. 2.7.1) wurden ohne weitere Behandlung über eine Mini Q-Säule **(A)** aufgetrennt. Die UV-Absorption wurde bei 254 nm (rote Linie) und bei 280 nm (schwarze Linie) gemessen. Die gestrichelte Linie (Conc) stellt den Salzgradienten dar, mit dem das Flagellin von der Säule eluiert wurde. Die grauen Zonen umfassen die Fraktionen, in denen eine IL-8-Induktion nachgewiesen werden konnte. **(B)** Tricine-SDS-PAGE (10%ig) der HPLC-Fraktionen nach Mini Q-Auftrennung. 1) „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“; 2-6) HPLC-Fraktionen nach Retentionszeit von: 2) 6 min; 3) 7 min; 4) 8 min; 5) 14 min; 6) 15 min;

Nach Auftrennung der Flagellinanreicherung über einen Anionenaustauscher (Mini Q) wurde die IL-8-induzierende Aktivität nach 6-8 min und nach 12-16 min (Abb. 20 A) eluiert. SDS-PAGE-Analysen zeigten, dass das Flagellin in den vorderen Fraktionen (Abb. 20 B, Spuren 2-4) vorhanden war, während in den hinteren aktiven

Fraktionen (Abb. 20 B, Spuren 5-6) kein Flagellin mittels Silberfärbung detektierbar war.

Eine weitere effektive Aufreinigung wurde mit Hilfe der Größenaufschlusschromatographie erzielt (Gelfiltration, siehe 2.13.1). Dazu wurden Flagellinanreicherungen von PAO1 mit Ameisensäure auf pH 2 angesäuert und an einer Superdex G75-Säule aufgetrennt (Abb. 21 A). Die HPLC-Fraktionen wurden hinsichtlich ihrer IL-8-induzierenden Eigenschaften in HaCaT-Keratinocyten untersucht. Das Flagellin eluierte nach einer Retentionszeit von 23-24 min, in der eigentlich nur niedermolekulare Substanzen von der Säule eluieren. Dabei stellte sich die Ansäuerung des Flagellins vor dem Auftragen als wichtige Voraussetzung bei der Auftrennung heraus. Trennte man das Flagellin bei neutralem pH-Wert auf, wurde es erwartungsgemäß bei einer Retentionszeit von ungefähr 10 min eluiert. Allerdings waren die Fraktionen noch mit zahlreichen anderen Produkten verunreinigt (Daten nicht gezeigt).



B

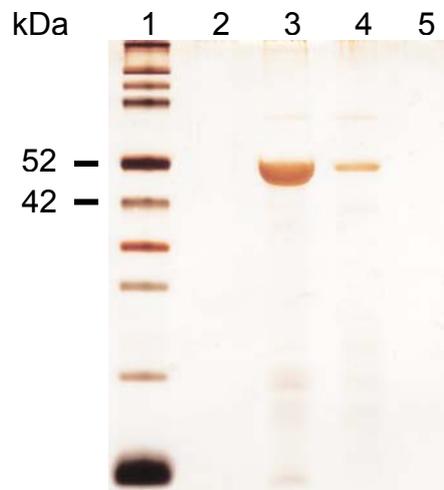


Abb. 21: Aufreinigung von Flagellin. A) Flagellinanreicherungen (siehe 2.7.1) von PAO1 wurden mit Ameisensäure angesäuert, zentrifugiert und der Überstand über Größenaufschlusschromatographie (Superdex G75) aufgetrennt (V_{∞} = vorderes Ausschlussvolumen, V_0 = hinteres Ausschlussvolumen). Als Laufmittel wurde H_2O eingesetzt. Die schwarze Linie gibt die Extinktion bei 280 nm und die rote Linie die Extinktion bei 254 nm wieder. **B)** Fraktionen der Superdex wurden in einem 12%-igem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung detektiert. 1) „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“; 2-5) HPLC-Fraktionen nach einer Retentionszeit von 22 min (2), 23 min (3), 24 min (4) und 25 min (5).

Die Massenbestimmung und Identifizierung von Flagellin erfolgte mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen (Abb. 22 und 23).

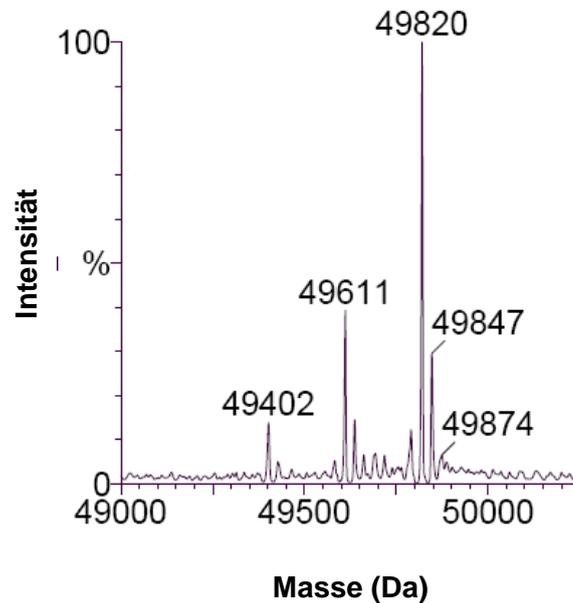
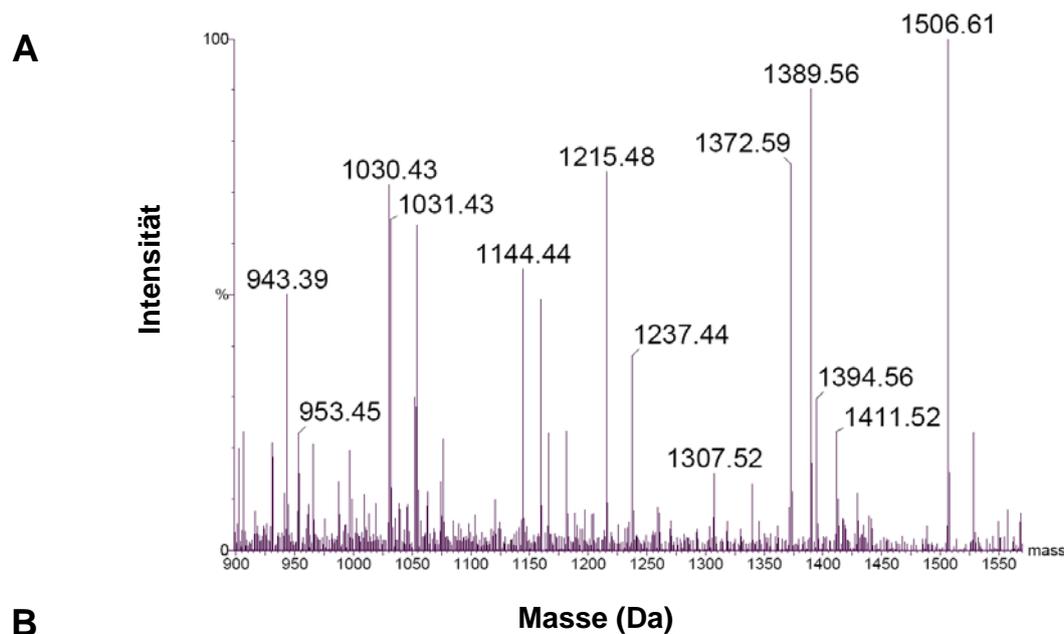


Abb. 22: ESI-MS von Flagellin aus PAO. Aufgereinigtes Flagellin wurde in Lösungsmittel (50% Acetonitril, 0,02% Ameisensäure) im positiven Modus gemessen und das Molekulargewicht mit Hilfe einer MaxEnt1-Auswertung in MassLynx bestimmt.

Demnach besitzt das Flagellin von PAO1 eine Masse von 49820 Da, die allerdings die theoretische Masse von 49111 Da um 709 Da übertrifft. Diese Differenz resultiert laut Literatur aus der Glykosylierung des Proteins, die zu einer vergrößerten Masse des Proteins führt. In den ESI-MS Daten fanden sich neben der Hauptmasse zwei kleinere Massen bei 49611 Da und 49402 Da. Diese Nebenmassen resultieren aus zusätzlichen Massen von 291 Da sowie zwei Resten von jeweils 209 Da.

Die Identifizierung der Peptidsequenz erfolgte mittels Nano-MS/MS durch die Analyse spezifischer Massenmuster (Peptid-Massenfingerprinting) bzw. von Teilsequenzen, die sich aus der Analyse von Fragment-Ionen-Massenspektren ableiten (Abb. 23).



Position	m/z gemessen	Masse [M+H] ⁺ erhalten [Da]	Masse [M+H] ⁺ geschätzt [Da]	Sequenz
54-66	686,824	1371,6334	1371,7470	LSNQISGLNVATR
115-125	608,264	1214,5134	1214,6255	EVAAQQAELTR
126-135	527,724	1053,4334	1053,5091	ISDTTTFGGR
225-235	572,754	1143,4934	1143,5706	MDGAIPNLSAR
285-294	516,244	1030,4734	1030,5659	LGITASINDK
295-308	695,314	1388,6134	1388,7511	GVLTITSATGENVK
309-324	753,834	1505,6534	1505,7838	FGAQTGTATAGQVAVK
417-425	472,204	942,3934	942,4883	ADLGAVQNR

1	MALTVNTNIA	SLNTQQRNLNA	SSNDLNTSLQ	RLTTGYRINS	AKDDAAGLQI
51	SNR LSNQISG	LN VATR N AND	GISLAQTAEG	ALQOSTNILQ	RIRDLALQSA
101	NGSNSDADRA	ALQ KEVAAQQ	AELTRISDTT	TFGGR KLLDG	SFGTTSFQVG
151	SNAYETIDIS	LQNASASAIG	SYQVGSNGAG	TVASVAGTAT	ASGIASGTVN
201	LVGGGQVKNI	AIAAGDSAKA	IAEK MDGAIP	NLSAR ARTVF	TADVSGVTGG
251	SLNFDVTVGS	NTVSLAGVTS	TQDLADQLNS	NSSK LGITAS	INDKGVLTIT
301	SATGENVKFG	AQTGTATAGQ	VAVK VQGS	KFEAAAKNVV	AAGTAATTTI
351	VTGYVQLNSP	TAYSVSGTGT	QASQVFGNAS	AAQKSSVASV	DISTADGAQN
401	AIAVVDNALA	AIDAQR ADLG	AVQNR FKNTI	DNLTNISENA	TNARSRIKDT
451	DFAAETAALS	KNQVLQQAGT	A ILAQA NQLP	QAVLSLLR	

Abb. 23: Identifizierung des PAO1-Flagellins durch MS/MS. A) ESI-MS-Spektrum der Flagellin-Fragmente nach Trypsin-Verdau. Die m/z-Werte wurden mit Hilfe einer MaxEnt3-Auswertung bestimmt. **B)** Tabellarische Darstellung der in der Peptidatenbank gefundenen Fragmente vom verdauten Flagellin. Angegeben sind die Positionen der Fragmente im Protein, die erhaltenen und theoretischen Massen sowie die gefundenen Sequenzen. Unten ist die Gesamtsequenz vom PAO1-Flagellin abgebildet, die fett hervorgehobenen Aminosäuren stellen die gefundenen Fragmente dar.

Das Flagellin wurde mit Trypsin verdaut und die Massen des Verdauproduktes gemessen. Das Spektrum mit den Massen wurde zur Identifizierung an eine Datenbanksuchmaschine (Mascot) gesendet, wo die experimentell gewonnenen Massen mit den errechneten Daten verglichen wurden. Die Proteinsequenzdatenbanken errechnen unter Berücksichtigung der Spaltregeln des Enzyms und weiterer Randbedingungen (z.B. Taxonomie) die theoretisch entstehenden Peptide des virtuellen Verdaus. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und Übereinstimmungen als Resultate ausgegeben. Je nach Massengenauigkeit können Proteine bereits anhand weniger Peptidmassen (3-10) identifiziert werden. In diesem Fall wurden nach einem Trypsin-Verdau acht Peptide erkannt, die dem Flagellin von *P. aeruginosa* zugeordnet werden konnten (Abb. 23). Bei MS-MS-Experimenten an Peptiden des Verdauproduktes traten Fragmentierungen an den Peptidbindungen auf, insbesondere zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff, wobei es primär zur Ausbildung von sogenannten b- und y-Ionen-Serien kommt. Mit Hilfe der erhaltenen Fragmentspektren konnten die Sequenzen rekonstruiert und dem Flagellin zugeordnet werden (Daten befinden sich im Anhang).

3.2.2 Flagellin induziert IL-8 und hBD-2 in Keratinozyten

In der Literatur wird Flagellin als Hauptkomponente einer inflammatorischen Antwort sowie Induktion antimikrobieller Proteine beschrieben (Abtin et al., 2008). Zur Verifizierung der Bedeutung des Flagellins von *P. aeruginosa* bei der hier beobachteten proinflammatorischen Antwort wurden Bakterienüberstände des PAK-Wildtypstammes sowie der Flagellin-defizienten PAK Δ *fliC*-Mutanten auf ihre IL-8-induzierende Aktivität hin untersucht. Während Überstände des Wildtyps eine Induktion von IL-8 auslösten, zeigten Überstände der PAK Δ *fliC*-Mutanten keine Aktivität (Abb. 24 A).

Flagellin gilt als hitzeresistentes Protein (Gewirtz et al., 2001). Wie in Abb. 24 B dargestellt, wird die IL-8-Freisetzung durch Hitzebehandlung des Flagellins bei 95°C mit einer gleichzeitigen Ansäuerung auf pH2 nicht vermindert. Um auszuschließen, dass die Flagellinpräparationen nicht-proteinogene Komponenten enthielt, die eine IL-8-Freisetzung in Keratinozyten bewirkten, wurden mit Proteinase K behandelte

Präparationen in Stimulationsversuchen auf HaCaT- Keratinozyten getestet. Abb. 24 B zeigt, dass die IL-8-induzierende Aktivität vollständig mit Proteinase K aufgehoben wurde.

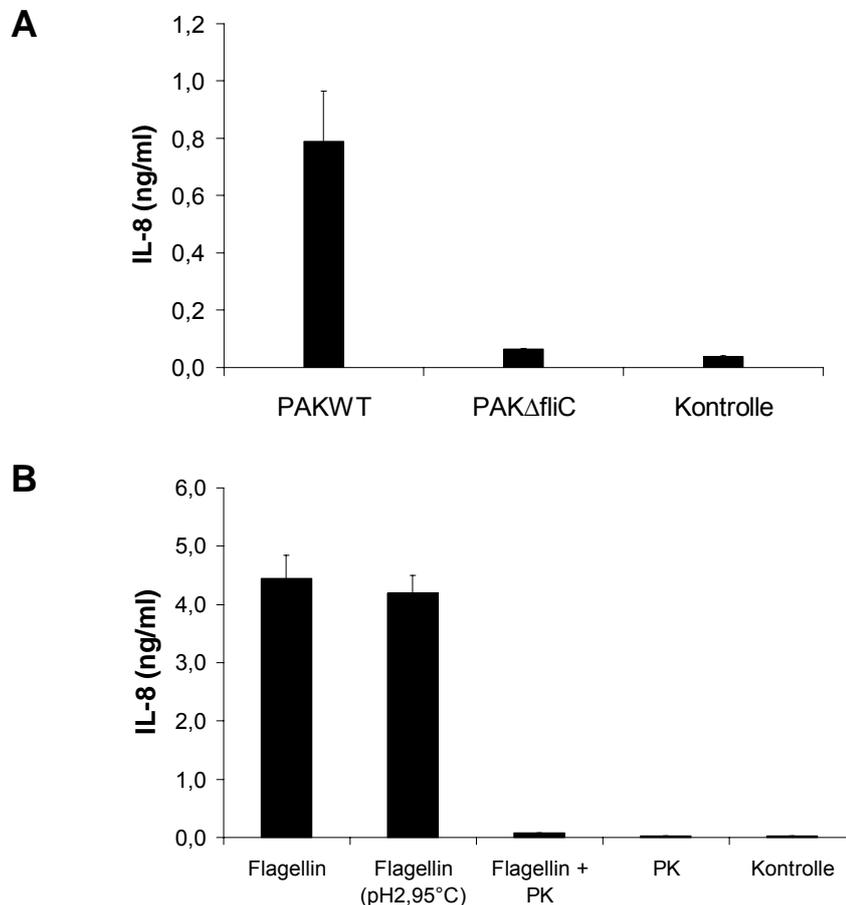


Abb. 24: Flagellin als Hauptkomponente einer proinflammatorischen Antwort. (A) PAKWT und PAK Δ fliC wurden über Nacht bei 37°C und 200 Upm in TSB-Medium kultiviert, die Kulturüberstände sterilfiltriert und für 20 h auf HaCaT-Keratinozyten stimuliert. **(B)** Stimulation von HaCaT-Keratinozyten mit Proteinase K- (PK) oder Hitze-behandeltem Flagellin. HaCaT-Zellen wurden für 20 h mit Flagellin stimuliert, welches zuvor 3 h mit Proteinase K (150 μ g/ml) bzw. 2 h bei einem pH-Wert von 2 bei 95°C inkubiert worden war. Die Proteinase K wurde nach der Hitzeinaktivierung ebenfalls auf Keratinozyten stimuliert, um eine Sezernierung von IL-8 durch die Protease auszuschließen.

In folgenden Analysen wurde der dosis- und zeitabhängige Effekt von Flagellin unterschiedlicher Bakteriengattungen auf Epithelzellen untersucht. Dabei stellte sich das Flagellin von *P. aeruginosa* und *S. typhimurium* als potenter Stimulus einer IL-8- (Abb. 25 A) sowie einer hBD-2-Antwort (Abb. 25 B) heraus. Bereits eine Konzentration von 1 ng/ml beider Flagelline reichte aus, um eine Reaktion

auszulösen. Eine Konzentrationssteigerung auf 10 ng/ml führte zur maximalen Sezernierung von IL-8 und hBD-2. Eine weitere Erhöhung der Flagellinkonzentration konnte die IL-8- bzw. hBD-2-Antwort nicht weiter steigern.

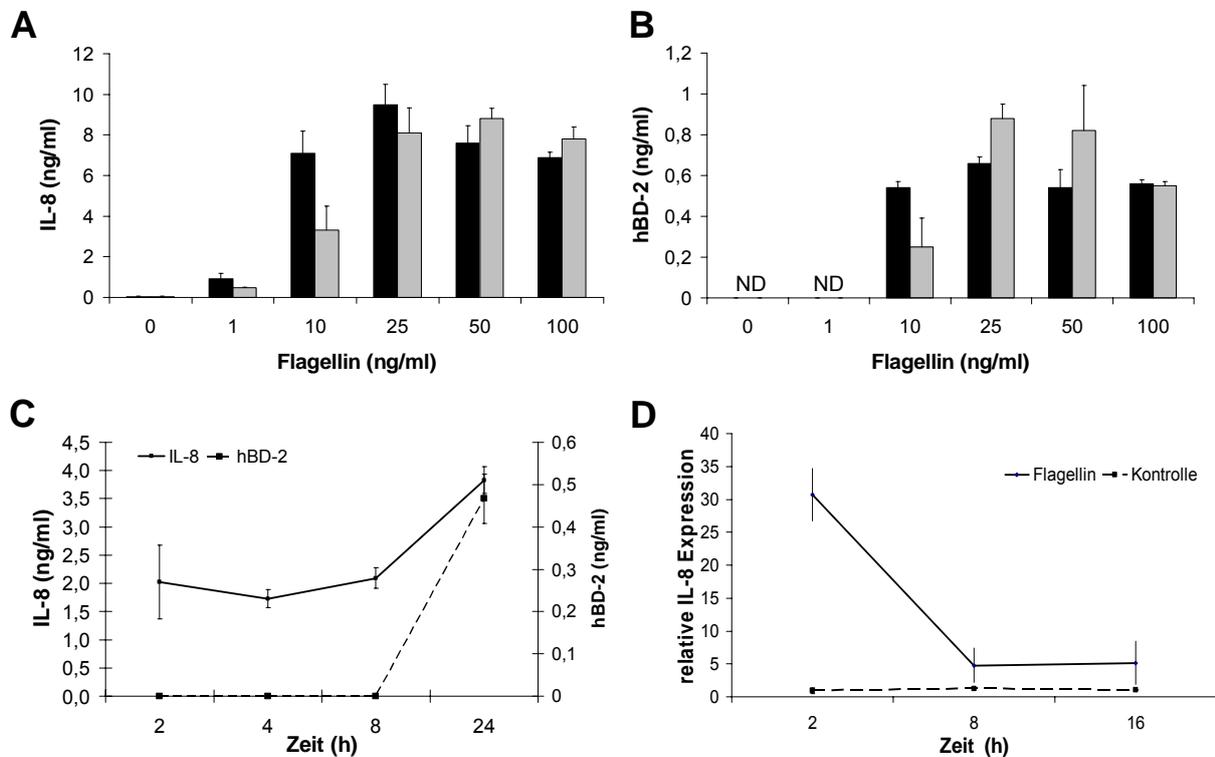


Abb. 25: Dosis- und zeitabhängiger Effekt von Flagellin auf die IL-8- und hBD-2-Induktion. HaCaT-Zellen wurden für 20 h mit den angegebenen Konzentrationen Flagellin stimuliert. Die Zellüberstände wurden mittels ELISA auf die Sezernierung von IL-8 (**A**) und hBD-2 (**B**) untersucht. Die schwarzen Balken geben die IL-8-Induktion nach Stimulationen mit Flagellin aus *P. aeruginosa* ATCC 33354 an, die grauen Balken mit Flagellin aus *Salmonella typhimurium*. **C**) HaCaT-Zellen wurden mit Flagellin von *P. aeruginosa* stimuliert und die Zellüberstände nach 2, 4, 8 und 24 h abgenommen und die Sekretion von IL-8 (schwarze Linie) und hBD-2 (gestrichelte Linie) untersucht. **D**) Primäre Keratinozyten wurden für 2, 8 und 16 h mit Flagellin (schwarze Linie) stimuliert und die relative mRNA-Expression gemessen. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle (gestrichelte Linie). ND = nicht detektierbar.

In Zeitkinetiken konnte eine Sezernierung von IL-8 bereits zwei Stunden nach Stimulation von Keratinozyten mit Flagellin detektiert werden. Die maximale Freisetzung wurde nach 24 h erreicht. Im Gegensatz dazu wurde das antimikrobielle Protein hBD-2 erst nach mehr als 8 h sezerniert (Abb. 25 C). Untersuchungen der relativen IL-8-mRNA-Expression zeigten, dass eine zweistündige Stimulation mit

Flagellin zur einer maximalen Induktion der IL-8-mRNA führte. Nach Inkubationszeiten von 8 h und 16 h war die mRNA Expression um den Faktor 6 reduziert (Abb. 25 D).

In der Literatur ist beschrieben, dass der primäre Rezeptor für die Erkennung von Flagellin TLR5 ist. Daher wurden Stimulationsversuche mit Flagellin in der HEK293-Zelllinie durchgeführt, die diesen Rezeptor nur sehr schwach exprimieren (Abb. 26).

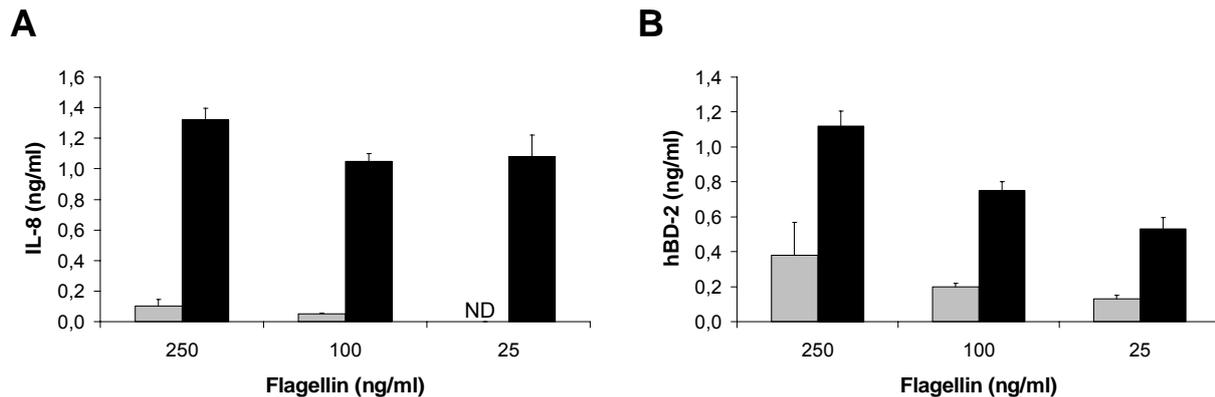


Abb. 26: Induktion von IL-8 und hBD-2 in HaCaT- und HEK293-Zellen durch Flagellin. Flagellin von *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurde in den angegebenen Konzentrationen für die Stimulation verwendet. IL-8- und hBD-2-Sekretion der Zellkulturüberstände der HaCaT-Zellen (schwarze Balken) und HEK293-Zellen (graue Balken) wurden mittels ELISA quantifiziert. ND = nicht detektiert

Die Freisetzung von IL-8 (Abb. 26 A) und hBD-2 (Abb. 26 B) nach Stimulation mit Flagellin betrug in den HEK293-Zellen im Vergleich zu den HaCaT-Zellen weniger als 10%, bei hBD-2 waren es noch 25-30%.

3.2.3 Verschiedene Flagellinpräparationen weisen eine verminderte IL-8-Induktion in Keratinozyten auf

In den vorigen Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 wurde Flagellin als Hauptkomponente einer proinflammatorischen Antwort beschrieben. Im Laufe der Untersuchungen wurden unter bestimmten Bedingungen Präparationen von Flagellin hergestellt, die eine verringerte IL-8- oder hBD-2-Induktion in Keratinozyten auslösten.

Kultivierte man *P. aeruginosa* ATCC 33354 für 63 h in M9-Minimalmedium (s. 2.6.2), stellte man fest, dass der Kulturüberstand einer statischen Kultur eine höhere IL-8-

Sezernierung (1,6 ng/ml) in Keratinozyten bewirkte als der Überstand einer planktonischen Kultur (0,35 ng/ml). Die Anwesenheit von Rhamnolipiden während der Kultivierung erhöhte die Immunreaktivität der Überstände sowohl der statischen Kultur (3,6 ng/ml) als auch der planktonischen Kultur (3,8 ng/ml).

In Western-Blot-Analysen wurde in allen Überständen Flagellin detektiert, welches nicht mit der Induktion von IL-8 korrelierte (Abb. 27). In Suspensionskulturen wurde Flagellin ins Medium abgegeben, welches eine geringe IL-8-Antwort induzierte (Spur 4). Obwohl im Vergleich das Flagellin in Überständen statischer Kulturen eine geringere Intensität besaß, verfügte es über eine höhere Immunaktivität (Spur 2). Die Kulturüberstände Rhamnolipid-behandelter Bakterien wiesen die höchsten IL-8-Induktionen auf (Spur 1 und 3).



Abb. 27: Unterschiedliche Aktivitäten von Flagellin in Bakterienüberständen. *P. aeruginosa* ATCC 33354 wurde in M9-Minimalmedium als statische Kultur oder als Suspensionskultur in An- und Abwesenheit von Rhamnolipiden für 63 h kultiviert. Die Kulturüberstände wurden sterilfiltriert und das Flagellin mittels Western-Blot detektiert. Spur 1: statisch, mit Rhamnolipid; Spur 2: statisch, ohne Rhamnolipid; Spur 3: Suspensionskultur mit Rhamnolipide; Spur 4: Suspensionskultur ohne Rhamnolipid. Die Überstände wurden für 20 h auf HaCaT-Keratinozyten stimuliert.

Eine weitere Veränderung der induzierenden Aktivität des Flagellins wurde nach Behandlung mit Säuren beobachtet. Diese Proben zeigten nach einer Größenauftrennung (Superdex75) in der Gelelektrophorese ein verändertes Laufverhalten und würden demnach ein geringeres Molekulargewicht besitzen (Abb. 28, Spur 2). Mit dem niedrigeren Molekulargewicht korrelierte ein Verlust der Induktion von IL-8 in HaCaT-Keratinozyten.

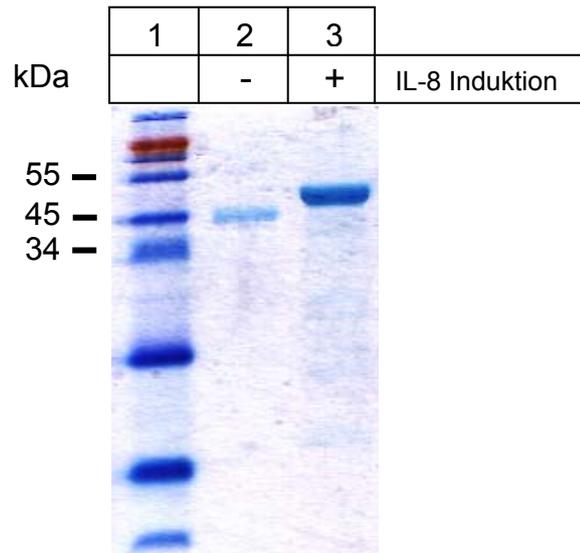


Abb. 28: Angesäuerte Flagellinpräparationen von PAO1 besitzen eine unterschiedliche IL-8-Induktion. Gelelektrophoretische Aufreinigung in einem 12%-igen Tricine-SDS-Gel mit folgender Detektion der Proteine durch Coomassie-Färbung. (1) SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard; (2) mit HCl behandeltes Flagellin und (3) Flagellinaufreinigung nach chromatographischer Auftrennung. Die IL-8-Induktion ist als vorhanden (+) oder fehlend (-) dargestellt.

Um nachzuweisen, dass es sich bei der niedriger laufenden Bande um Flagellin handelt, wurde diese aus dem Gel ausgeschnitten und einem Im-Gel-Verdau mit Trypsin unterzogen (siehe 2.8.3). MS/MS-Untersuchungen bestätigten dieses Protein als Flagellin (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war ein klinisches Isolat von *P. aeruginosa*, das eine mukoide Morphologie zeigte und als adhärenter Phänotyp wuchs. In den Kulturüberständen dieses Isolates konnte ein IL-8-induzierender Faktor identifiziert werden, der schwach anionisch war und eine Größe von ungefähr 65 kDa aufwies (Schwichtenberg, 2003). Untersuchungen mit *P. aeruginosa*-Mutanten, die spezifische Mutationen im Quorum-Sensing aufwiesen, ließen vermuten, dass Rhamnolipide für die Induktion von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden in Keratinozyten von Bedeutung sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung von Rhamnolipiden in Entzündungsreaktionen untersucht und der IL-8-induzierende Faktor in Kulturüberständen identifiziert werden.

4.1 Biofilmbildung von *P. aeruginosa*

Biofilme sind definiert als Mikroorganismen, die eingebettet in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) an sich selbst oder an Oberflächen adhären (Costerton et al., 1995). Die Besiedlung erfolgt vornehmlich an Grenzflächen, die sich durch den Übergang zweier Aggregatzustände auszeichnen. Die Entwicklung von Biofilmen kann in fünf Abschnitte eingeteilt werden (Abb. 29) (Sauer et al., 2002; Wagner und Iglewski, 2008).

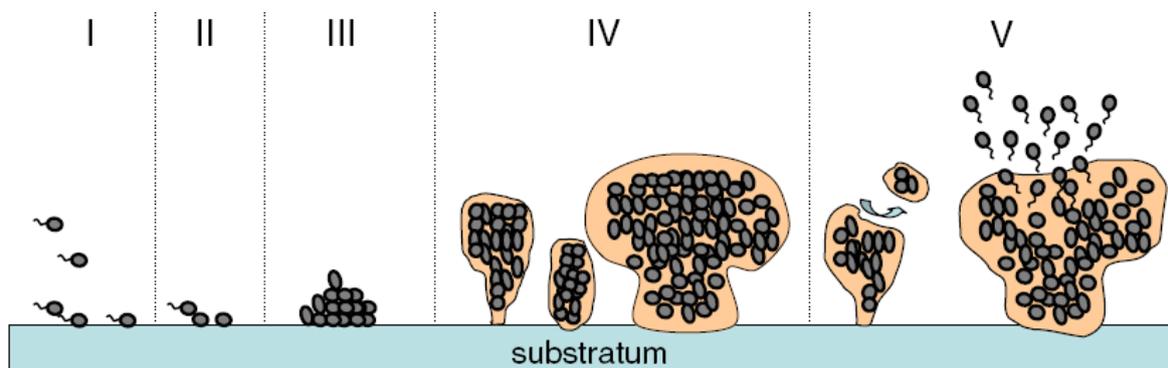


Abb. 29: Model der Biofilmbildung von *P. aeruginosa*. Bakterien adhären zuerst reversibel (I) und später irreversibel (II) an die Oberfläche. Charakteristisch ist die Produktion von Alginat und der Verlust der Flagellen. Es bilden sich Mikrokolonien (III), gefolgt von komplexen dreidimensionalen, pilzförmigen Strukturen aus „stalks“ und „caps“ (IV). In der letzten Phase werden Bakterien aus dem Biofilm entlassen (V). aus (Wagner und Iglewski, 2008)

Die Entstehung von Biofilmen basiert prinzipiell auf der Anheftung (Adhäsion) von Mikroorganismen an eine biotische oder abiotische Oberfläche (das Substratum), der Vermehrung zu Mikrokolonien und deren Zusammenwachsen zu differenzierten, dreidimensionalen Strukturen.

Der Biofilm bietet den Mikroorganismen die Möglichkeit, auch unter ungünstigen Umgebungsbedingungen zu überleben. Das Leben in einem Biofilm kann eine erhöhte Resistenz dieser Organismen gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmitteln oder der Immunabwehr des Wirtes bewirken (Hoyle und Costerton, 1991; Costerton et al., 1999; Prakash et al., 2003). In der gelartigen Matrix von Biofilmen kommt es zu einer Nährstoffanreicherung, was besonders in oligotropher Umgebung von Vorteil für die Biofilmorganismen ist.

In Form von Besiedlungen des Darmes, der Schleimhäute und der Haut sind Biofilme entscheidend für die menschliche Gesundheit. Wenn diese aus dem Gleichgewicht geraten, können sie zu schweren Krankheiten führen. In der medizinischen Mikrobiologie hat sich *P. aeruginosa* insbesondere durch Studien zu Infektionen in CF-Patienten zum Modelorganismus der Biofilmbildung entwickelt (Singh et al., 2000). Die Bildung vieler extrazellulärer Produkte von Bakterien, darunter zahlreiche Pathogenitätsfaktoren, wird durch das QS-System gesteuert (Wagner und Iglewski, 2008). Vorversuche zur Sekretion von Zytokinen und AMPs aus stimulierten Keratinozyten deuteten darauf hin, dass die hier zu untersuchenden PAMPs ebenfalls mit der Biofilmbildung assoziiert sind (Schwichtenberg, 2003). Aufgrund dieser Beobachtung sollte im Rahmen dieser Arbeit die Biofilmbildung sowie die Freisetzung Zytokin-induzierender PAMPs in den Kulturüberstand untersucht werden. Die Untersuchungen zur Biofilmbildung wurden mit Hilfe eines Assays durchgeführt, in dem die adhärennten Zellen an einer abiotischen Oberfläche (fest/flüssig) detektiert wurden. Von den getesteten Wildtyp-Stämmen bildeten lediglich der PAK und dessen Ursprungsstamm ATCC 33354 nach 24 h einen Biofilm, während der ATCC-Stamm 33348 und PAO1 keine Adhärenz zeigten (s. Abb. 7 A). Untersuchungen der IL-8-induzierenden Aktivität der entsprechenden Bakterienüberstände korrelierte nicht mit der Biofilmbildung, da die Überstände von nicht adhärennten PAO1 und *P. aeruginosa* ATCC 33348 ähnliche IL-8-Induktionen in Keratinozyten auslösten wie Überstände der adhärennten Stämme PAK und ATCC 33354. (s. Abb. 7 A).

Die Biofilmbildung vereint die Einflüsse der Beweglichkeit, der Rhamnolipidproduktion und der Zelloberflächen-Beschaffenheit. In weiteren Biofilm-Assays sollten diese Einflüsse auf die Entwicklung eines Biofilms analysiert werden. Rhamnolipide üben viele Funktionen in der strukturellen Biofilmbildung bei *P. aeruginosa* aus, die von Pamp und Tolker-Nielsen (2007) zusammengefasst wurden. i) Sie sind notwendig für die initiale Mikrokolonie-Bildung, ii) sie erleichtern die oberflächenassoziierte Bewegung (Kohler et al., 2000; Deziel et al., 2003) und die Ausbildung von pilzförmigen Strukturen in Biofilmen, iii) sie verhindern die Kolonisation von Kanälen zwischen den pilzförmigen Strukturen (Davey et al., 2003; Espinosa-Urgel, 2003) und iv) sie sind beteiligt an der Auflösung von Biofilmen (Boles et al., 2005).

Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen (Davey et al., 2003) konnte auch in dieser Arbeit ein Einfluss der Rhamnolipidkonzentration auf die adhärenen Eigenschaften festgestellt werden. Eine Koinkubation mit niedrigen Konzentrationen Rhamnolipide (30 µg/ml) erhöhte die Adhäsion der Bakterien an Oberflächen, während höhere Konzentrationen (60 µg/ml) inhibierend wirken (s. Abb. 7 C). Dieses Ergebnis stimmt mit der Ansicht überein, dass Rhamnolipide in geringen Konzentrationen die bakterielle Migration fördern (Kohler et al., 2000; Caiazza et al., 2005; Tremblay et al., 2007) und dadurch die Adhärenz der Bakterien an die Oberfläche erleichtern. Unterstützt wird eine Adhärenz zusätzlich durch die Aufhebung von Abstoßungskräften zwischen Bakterium und Oberfläche, was ebenfalls auf Funktionen der Rhamnolipide zurückgeführt werden kann (Zhang und Miller, 1994; Al Tahhan et al., 2000).

Es stellt sich die Frage, inwiefern Rhamnolipide in der Natur bei der Initiation der Biofilmbildung beitragen. Rhamnolipide werden normalerweise in Abhängigkeit von der Bakteriendichte während der frühen stationären Phase synthetisiert (Medina et al., 2003). Untersuchungen zur Synthese von Rhamnolipiden in Biofilmen wiesen eine Expression des *rhIAB*-Operons erst zu einem späten Zeitpunkt nach, in dem sich bereits Mikrokolonien und die ersten Strukturen („stalks“) gebildet haben (Lequette und Greenberg, 2005). Dadurch würde dem Biosurfaktant eher eine Funktion bei der Entwicklung der späteren Biofilm-Struktur („caps“) zukommen. Dies wird auch durch Beobachtungen unterstützt, dass Rhamnolipid-defiziente Mutanten eine abnormale flache Struktur aufweisen (Davey et al., 2003). Andererseits besteht die Möglichkeit, dass *P. aeruginosa* unabhängig von der Bakteriendichte geringe

Mengen Rhamnolipid produziert, die sich an der Membran anreichern und die ausreichend sind für eine erleichterte Mikrokoloniebildung in der frühen Phase der Biofilmentwicklung. Bei einer erhöhten Bakteriendichte wird das Rhamnolipid über das Quorum-Sensing exprimiert und übernimmt seine Funktion bei der weiteren Entwicklung des Biofilms (Pamp und Tolker-Nielsen, 2007).

Das Abtrennen der Mikroorganismen von der Biofilmgemeinschaft stellt eine wichtige physiologische Eigenschaft dar, die das Zurückkehren in planktonische Lebensweise bei ungeeigneten Nischenverhältnissen, beispielsweise Nährstoffmangel, ermöglicht und somit das Aufsuchen einer geeigneten Lebensumgebung und das Fortbestehen der Population sichert. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen allerdings, dass die Exposition von Rhamnolipiden zu einem gebildeten Biofilm keinen signifikanten Effekt verursachte (s. Abb. 7 D), was darauf hindeutet, dass unter den verwendeten Versuchsbedingungen die Anwesenheit von Rhamnolipiden nicht notwendig für das Ablösen der Bakterien aus dem Biofilm war. Es wäre denkbar, dass der Biofilm noch nicht weit genug ausgebildet worden war, um Bakterien aus dem Verbund zu lösen.

Neben Rhamnolipiden wird auch eine Beteiligung von Flagellin und Typ-IV-Pili an der Anheftung an Grenzflächen diskutiert (O'Toole und Kolter, 1998; Klausen et al., 2003). Dabei sind die Funktionen von Flagellen und Typ-IV-Pili bei der Initiation der Biofilmbildung umstritten. O'Toole et al. (1998) schreiben den Flagellen eine essentielle Bedeutung bei der Bildung von Monolayern auf einer abiotischen Oberfläche zu, während die Typ-IV-Pili eine Funktion bei der späteren Bildung von Mikrokolonien besitzen. Andere Autoren hingegen sind der Meinung, dass die Bindung an die Oberfläche unabhängig von Flagellen oder Typ-IV-Pili durch klonales Wachstum erfolgt (Klausen et al., 2003). Sie sprechen den Anhängseln lediglich eine Bedeutung bei der Strukturbildung des Biofilms und der Ausbildung der „cap“-Strukturen in der vierten Phase zu, da entsprechende Mutanten statt der pilzförmigen Strukturen nur abgeflachte Formen bildeten (Barken et al., 2008).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Biofilm-Assays bestätigen teilweise die Beobachtungen von Klausen et al. Die Ausbildung von Flagellin hatte keinen Einfluss auf die Adhärenz an Polystyrol (s. Abb. 7 B)

4.2 Produktion von Rhamnolipiden durch *P. aeruginosa*

Rhamnolipide gehören zu den Biosurfaktants und bestehen aus einem Dimer aus 3-Hydroxyfettsäuren und einem Mono- oder Di-Rhamnose-Rest. In Flüssigkulturen von

P. aeruginosa konnten bereits 28 individuelle Kongenere von Rhamnolipiden charakterisiert werden (Deziel et al., 1999). Die Produktion von Rhamnolipiden erfolgt unter definierten Wachstumsbedingungen. Essentiell ist eine Wachstumslimitierung, hervorgerufen durch Einschränkung von Stickstoffquellen und multivalenten Ionen verbunden mit einem gleichzeitig hohen Angebot von Kohlenstoffquellen (Nitschke et al., 2005). Für die Überproduktion von Rhamnolipiden eignen sich vor allem hydrophobe Substanzen wie n-Alkane oder Triglyceride, aber auch Glucose, Mannitol und Glycerol (Deziel et al., 2000; Nitschke et al., 2005).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde PAO1 unter Nährstofflimitation in 1% Pepton und 1% Glucose für 3 Tage unter planktonischen Bedingungen kultiviert. Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff (C/N-Verhältnis) im verwendeten Medium betrug ungefähr 18/1. Unter idealen Bedingungen sollte das C/N-Verhältnis im Medium mindestens 16/1 bis 18/1 betragen, ab einem Verhältnis von weniger als 11/1 werden deutlich weniger Rhamnolipide synthetisiert (Guerra-Santos et al., 1984).

Die Anreicherung der Rhamnolipide aus dem Bakterienüberstand wurde aufgrund ihres hydrophoben Charakters durch Ausschütteln mit Ethylacetat erreicht. Die Zusammensetzung und Struktur des angereicherten Gemisches wurde mittels Massenspektrometrie (ESI-MS und MS/MS) analysiert (s. Abb. 6). Eine gute Ionisierung des Rhamnolipids mit geringer Fragmentierung des primären Moleküls wurde durch ESI-MS Untersuchungen im negativen Modus erreicht. Die ionisierten Moleküle wurden aufgrund ihres Verhältnisses von Masse zur Ladung (m/z) getrennt und detektiert. Ähnlich wie bei Déziel et al. (2000) wurden im Überstand von PAO1 zwei dominante Kongenere nachgewiesen, die am häufigsten in Flüssigkulturen gebildet werden (Rendell et al., 1990). Bei diesen handelte es sich um Mono-Rhamnolipid Rha-C₁₀-C₁₀ (m/z 503) und Di-Rhamnolipid Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ (m/z 649) (s. Abb. 6 A). Diese Ionen wurden in MS/MS-Untersuchungen in einer Kollisionskammer fragmentiert und ergaben spezifische Ion-Fragmentierungen, die charakteristisch für das jeweilige Kongener waren (Abb. 6 B und C) (Deziel et al., 2000; Heyd et al., 2008).

Welche Bedeutung haben Rhamnolipide für Gram-negative Bakterien wie *P. aeruginosa*?

Rhamnolipide sind amphipatische Moleküle mit hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften, die als Detergenz oder Emulgator fungieren. Sie sind oberflächenaktiv und vermögen ab einer kritischen Konzentration Mizellen zu bilden. Diese Konzentration wird als „critical micelle concentration“ (CMC) bezeichnet. Die „Biosurfactants“ können hydrophobe Substanzen in Mizellen lösen und dadurch die Wasserlöslichkeit dieser Substanzen und damit ihre Aufnahme in die Zelle erhöhen (Noordman und Janssen, 2002). Ferner können sie die Zelloberfläche der Bakterien durch Entfernen von LPS und Oberflächenproteinen hydrophober machen, so dass die Assoziation der Zellen mit hydrophoben Substanzen erhöht wird (Al Tahhan et al., 2000). Die Anreicherung dieser Oberflächenstrukturen in Kulturüberständen infolge einer Behandlung der Bakterien mit Rhamnolipid konnte unter anderem in gelelektrophoretischen Auftrennungen nachgewiesen werden (s. Abb. 10 B, 12 B und 13 B).

4.3 Rhamnolipide modulieren die äußere Membran von *P. aeruginosa*

Die reduzierte Induktivität von Deletionsmutanten des Quorum-Sensing-Systems ($\Delta rhII$) in früheren Untersuchungen sprach für eine Beteiligung des von *Pseudomonas* produzierten Rhamnolipids bei der Freisetzung IL-8- und hBD-2-induzierender PAMs (Schwichtenberg, 2003).

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der oberflächenmodulierenden Eigenschaft von Rhamnolipiden auf die äußere Membran von *P. aeruginosa* und die Freisetzung potentieller PAMs in den Kulturüberstand.

In Wachstumsexperimenten mit *P. aeruginosa* konnte eine erhöhte Freisetzung hBD-2- und IL-8-induzierender PAMs nach Behandlung mit Rhamnolipid nachgewiesen werden, die unabhängig von Kulturbedingungen wie Nährstoffangebot oder Gasaustausch war (s. Abb. 8). Die Beobachtung, dass zugegebene Rhamnolipide diesen Effekt bereits in der frühen Wachstumsphase ausübten, per se aber in den eingesetzten Konzentrationen keine hBD-2 und IL-8-Sekretion in Keratinozyten induzierten, führte zu der Annahme, dass sie einen bereits auf den Bakterien vorhanden induzierenden Faktor ins Medium entfernten.

Rhamnolipide gehören zu den sekundären Metaboliten, d.h. ihre Produktion koinzidiert mit dem Eintreten in die stationäre Phase (Deziel et al., 1996; Medina et al., 2003). Die Regulation der Rhamnolipid-Produktion erfolgt dabei über die

Zelldichte durch das Quorum-Sensing (Ochsner und Reiser, 1995). Da das Quorum-Sensing die Expression vieler Virulenzfaktoren auf Transkriptionsebene reguliert (van Delden und Iglewski, 1998), wurde zunächst sichergestellt, dass die Zugabe von Rhamnolipid keinen Einfluss auf die Neusynthese eines PAMs ausübte. Durch Behandlung mit Tetrazyklin wurden Bakterien während der logarithmischen Phase, in welcher das Rhamnolipid-Operon nicht exprimiert wird (Medina et al., 2003), in einen „inaktiven“ Zustand überführt. Tetrazykline führen durch Bindung an die Ribosomen zu einer Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese und hemmen somit das Wachstum der Bakterien (bakteriostatische Wirkung). Zugegebenes Rhamnolipid erhöhte auch in diesem „inaktiven“ Zustand der Bakterien innerhalb kürzester Zeit die hBD-2- und IL-8-induzierende Aktivität des Überstandes (s. Abb. 9), was verdeutlicht, dass ein vorhandenes PAM von der äußeren Membran abgeschert wurde. Dieser Effekt wird durch die Beobachtung bestätigt, dass Überstände hitzeinaktivierter Bakterien unabhängig von der Wachstumsphase eine erhöhte IL-8- und hBD-2-Sekretion in Keratinozyten induzierten (s. Abb. 9). Eine Hitzeinaktivierung von Gram-negativen Bakterien vermindert die Integrität der äußeren Membran und führt zu einem Verlust von Membranbestandteilen und LPS-Bausteinen (Katsui *et al.*, 1982; Tsuchido *et al.*, 1985) sowie verschiedener Oberflächenstrukturen wie Flagellin oder Pili (Ochoa-Repáraz et al., 2004). Frühere Untersuchungen ergaben, dass hitzeinaktivierte Gram-negative Bakterien sowie deren Überstände in der Lage sind, hBD-2 und IL-8 in verschiedenen Epithelzelllinien zu induzieren (Harder et al., 2000; Schlee et al., 2007). Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Kulturüberstände Rhamnolipid- und hitzebehandelter Bakterien ergab ein ähnliches Bandenmuster (s. Abb. 13 B). Dies impliziert, dass durch Rhamnolipide ähnlich wie bei einer milden Hitzeinaktivierung die gleichen PAMs von der Bakterienoberfläche ins Medium freigesetzt werden. Zu den wichtigsten IL-8-induzierenden PAMs der äußeren Membran gehören LPS, Typ IV-Pili und Flagellin (Abb. 30).

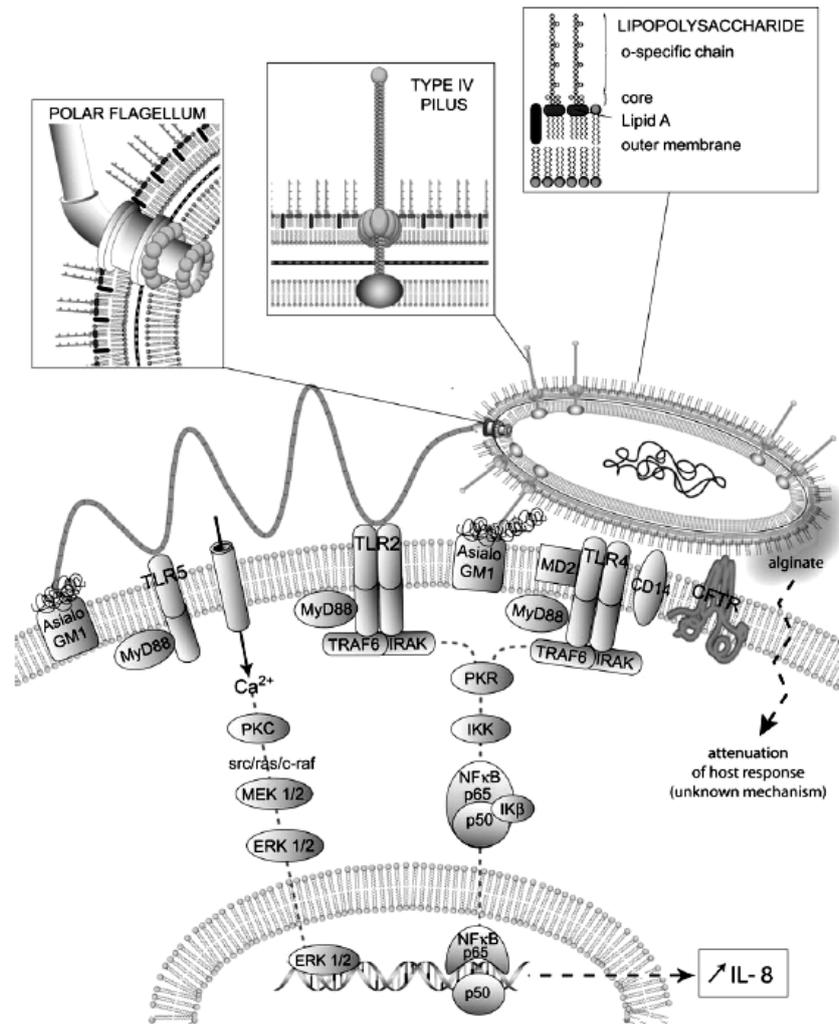


Abb. 30: Überblick über zellassoziierte Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*. Die wichtigsten Strukturen auf der Oberfläche der äußeren bakteriellen Membran sind Flagellen, Typ-IV-Pili und LPS, die potentielle PAMPs darstellen. Sie induzieren über TLR2, 4 und 5 bzw. über AsialoGM1 eine proinflammatorische Reaktion in der eukaryontischen Zelle. aus (Kipnis et al., 2006)

Ein Großteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien besteht aus LPS, welches in seiner Struktur aus drei Komponenten besteht. Das Lipid A ist in der hydrophoben Region der äußeren Membran verankert. Die negative geladene Kern-Region enthält einen einheitlichen Zucker (2-Keto-3-Desoxyoctonsäure, KDO), welcher durch Mg^{2+} -Ionen an der Membranoberfläche stabilisiert wird. Die dritte Komponente ist das O-Antigen, welches aus langen Ketten sich wiederholender Oligosaccharide besteht. Rhamnolipide können über zwei prinzipielle Mechanismen das LPS von der Membran lösen. Erstens könnte das Rhamnolipid aufgrund seiner Detergenzeigenschaften das LPS direkt aus der Membran lösen, zweitens durch

seine Eigenschaft, divalente Kationen, wie z.B. die LPS-stabilisierenden Mg^{2+} -Ionen, abzufangen (Herman et al., 1995; Mulligan et al., 2001). Die zweite Möglichkeit würde dem Effekt von EDTA entsprechen, welches ebenfalls durch Komplexierung der stabilisierenden Mg^{2+} -Ionen die LPS-LPS-Interaktionen unterbricht (Nikaido und Vaara, 1985). LPS wird als PAM beschrieben, welches über TLR4 in Epithelzellen eine inflammatorische Wirkung hervorrufen kann (Ernst et al., 1999; Lebre et al., 2007). In Übereinstimmung mit früheren Studien wurde mit LPS in Konzentrationen bis 10 $\mu\text{g/ml}$ keine IL-8- oder hBD-2-Induktion in Keratinozyten festgestellt (Harder et al., 2000). Eine Stimulation mit kommerziellem LPS von *P. aeruginosa* in entsprechenden Konzentrationen rief keine Induktion von IL-8 oder hBD-2 in Keratinozyten hervor (Daten nicht gezeigt). Eine Behandlung des Bakterienüberstandes mit Polymyxin B, einem zyklischen, amphipatischen Peptid, welches das LPS neutralisiert, indem es spezifisch an das Lipid A bindet (Cardoso et al., 2007), führte zu keiner Verminderung der Induktivität (s. Abb. 14 A). Aufgrund dessen konnte LPS als induzierender Faktor ausgeschlossen werden.

Eine Behandlung des Überstandes mit Proteinase K hingegen führte zu einem kompletten Verlust der Aktivität, was auf ein Protein als induzierenden Faktor hinwies (s. Abb. 14 B). Größenaufschlusschromatographien mit Überständen Rhamnolipid-behandelter Pseudomonaden und sich anschließenden Induktionsexperimenten in HaCaT Keratinozyten deuteten auf ein Protein im Größenbereich von 50-60 kDa hin (s. Abb. 15 A). Ein gut beschriebenes PAM in dieser molekularen Größenordnung ist Flagellin. Die fehlende Induktion in Überständen Rhamnolipid-behandelter „aflagellierter“ Mutanten (*PAO1 Δ fliM* und *PAK Δ fliC*) bestätigte, dass es sich bei dem gesuchten Faktor um Flagellin handelt (s. Abb. 16). Die Identifizierung des Flagellins in Kulturüberständen Rhamnolipid-behandelter Bakterien erfolgte in Western-Blot-Analysen (s. Abb. 17) und massenspektrometrischen Untersuchungen (s. Abb. 18). Dies ist bis zu diesem Zeitpunkt die erste Beschreibung, die davon berichtet, dass in Anwesenheit von Rhamnolipiden das proinflammatorische PAM Flagellin durch Abscheren von der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien in den Überstand gelangt.

Die fehlende Induktion im Kulturüberstand einer Rhamnolipid-behandelten *PAO1 Δ pilA*-Mutante (s. Abb. 16) muss kritisch betrachtet werden. In Untersuchungen zur Beweglichkeit konnte im Vergleich zum Referenzstamm PAO1 ein reduziertes Schwimmverhalten der Mutante in 0,3%-igen Agarplatten festgestellt

werden, die ungefähr der PAO1 Δ *fliM*-Mutanten entsprach (Daten nicht gezeigt). Da diese Form der Bewegung durch Flagellen vermittelt ist, ist zu vermuten, dass in der PAO1 Δ *pilA*-Mutante die Ausbildung von Flagellen gestört ist.

In weiteren Analysen wurde nachgewiesen, dass das Flagellin nur von der äußeren Membran abgeschert wird, wenn Rhamnolipide in Konzentrationen oberhalb der CMC eingesetzt wurden (s. Abb. 10 A). Dies stimmt mit bisherigen Untersuchungen überein, die einen Anstieg des extrazellulären Proteingehaltes bei Rhamnolipidkonzentrationen oberhalb der CMC beschreiben (s. Abb. 10 B) (Sotirova et al., 2007). Die CMC der verwendeten Rhamnolipid-Lösungen (JBR515) betrug unter den verwendeten Bedingungen ungefähr 30 μ g/ml (Urum und Pekdemir, 2004) und stellte zugleich die unterste Grenze der Konzentration dar, bei der ein induzierender Faktor in den Überstand abgegeben wurde (s. Abb. 10 A). Beim Unterschreiten der CMC verminderte sich die induzierende Aktivität des Überstandes. Dies deutet auf einen Alles-oder-Nichts-Mechanismus hin. Durch die Ausbildung von Mizellen wurden die Oberflächenstrukturen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus von der äußeren Membran entfernt.

Durch Zugabe von Kationen ließ sich dieser Mechanismus unterbinden (s. Abb. 11), was in ihrer Eigenschaft zu begründen ist, die CMC von Biosurfaktants zu erhöhen (Helvacı et al., 2004). Die Kationen beeinflussen die Carboxylgruppen des Rhamnolipids, welche bei einem neutralen pH-Wert negativ geladen sind und die Rhamnolipidmoleküle durch elektrostatische Kräfte zusammenhalten. Die negative Ladung wird durch die Kationen maskiert, was in dicht gepackten Monolayern und einer Herabsetzung der CMC resultiert (Helvacı et al., 2004).

Die Verwendung anderer Detergenzien spricht dafür, dass der Effekt nicht spezifisch für Rhamnolipid ist, sondern auf seine Eigenschaft als Detergenz zurückzuführen ist. Die Zugabe der beiden nichtionischen Detergenzien Tween 20 und Triton X-100 führte im Vergleich zu einer nicht behandelten Kontrollkultur ähnlich wie Rhamnolipid zu einer signifikanten Steigerung der induzierenden Aktivität (s. Abb. 13 A). SDS-PAGE-Analysen zeigten mehr Bakterienbestandteile in den Überständen, die mit einer erhöhten Induktion korrelierten (Abb. 13 B).

In den meisten Experimenten wurden Rhamnolipide stets zu Beginn der Kultivierung zugegeben. In weiteren Untersuchungen sollte der Effekt von Rhamnolipid auf Bakterien analysiert werden, die sich in verschiedenen Wachstumsphasen befanden. Dabei stellte sich heraus, dass sich die IL-8-induzierende Aktivität in den

Überständen von Bakterien, die sich in einer späteren Wachstumsphase befanden, verringerte (s. Abb. 12 A). Der Rückgang der Induktion korrelierte dabei mit einer Abnahme abgescherter Bakterienbestandteile, die mittels SDS-PAGE detektiert werden konnten (s. Abb. 12 B).

Welche Mechanismen regulieren die Synthese von Flagellin in Abhängigkeit von der Wachstumsphase?

Die Expression des Flagellenapparates gram-negativer Bakterien mit mehr als 40 Genen ist ein komplexer und energetisch aufwendiger Prozess, der wachstumsabhängig einer Reihe von Regulationen unterworfen ist (Laub et al., 2000; England und Gøber, 2001). Die Genprodukte beinhalten regulatorische Proteine, strukturelle Komponenten der Flagellin-Sekretion und des zusammengebauten Apparates sowie des Chemotaxis-Maschinerie. Um eine maximale Effizienz der Expression zu gewährleisten, benutzt *P. aeruginosa* hierarchisch angeordnete Netzwerke, die in vier Klassen eingeteilt werden können (Dasgupta et al., 2003). Es wäre also denkbar, dass das Bakterium diese Energie unter nährstofflimitierenden Bedingungen nicht mehr aufwendet.

In verschiedenen Studien konnte eine Abhängigkeit der Flagellinsynthese von der Wachstumsphase der Bakterien festgestellt werden. In *E. coli* wurde eine steigende Zahl von Flagellen bis zur späten exponentiellen Phase nachgewiesen, die bei Erreichen der späten stationären Phase in einem kompletten Verlust resultierte (Kalir et al., 2001; Makinoshima et al., 2003). In *P. aeruginosa* könnte unter physiologischen Bedingungen das Quorum-Sensing regulierte Rhamnolipid, welches zu Beginn der stationären Phase gebildet wird, für das Abscheren der Flagellen verantwortlich sein. Die Zugabe des „Biosurfactants“ zu Bakterien, die sich bereits in späteren Wachstumsphasen befanden, führte dementsprechend nicht zu einer Freisetzung von Flagellin (s. Abb. 12).

Eine besondere Bedeutung bei der wachstumsabhängigen Regulation der Flagellinsynthese nimmt das Alginat ein. Die Alginatsynthese ist ebenfalls abhängig von der Wachstumsphase und erfolgt vornehmlich in der frühen und späten stationären Phase (Leitao und Sa-Correia, 1995). Bei Alginat handelt es sich um ein lineares Kopolymer von D-Mannuronsäure und dem C5-Epimer von L-Glucuronsäure, die durch eine β -1,4-Bindung verknüpft sind. Das Schlüsselenzym der Alginatsynthese ist die GDP-Mannose Dehydrogenase, welche vom *algD*-Gen kodiert wird. Die Beobachtung, dass in der Mehrheit von CF-Isolaten keine Flagellen

zu finden waren, führte zu der Annahme, dass die Flagellin-Synthese herunterreguliert wurde. Dabei zeigte sich, dass die Synthese von Flagellin auf Transkriptionsebene durch die Bildung von Alginate inhibiert wird (Garrett et al., 1999; Tart et al., 2005; Tart et al., 2006). Der mukoider Phänotyp wird hervorgerufen durch den alternativen Sigma-Faktor AlgT, welcher unter physiologischen Bedingungen durch den Anti-Sigma-Faktor MucA supprimiert wird (Abb. 31). Die Inaktivierung von MucA durch bestimmte äußerliche Bedingungen führt zu einer Deregulation von AlgT, welches die Expression von regulatorischen Genen positiv kontrolliert. Eines dieser Intermediate ist AmrZ, welches als Aktivator von *algD* und als Repressor des Flagellen-Regulators *fleQ* fungiert. Letzterer gilt als ein „master switch“ des Flagellen-Regulons, über den fast alle Gene für die Flagellin-Synthese kontrolliert werden (Arora et al., 1997; Dasgupta et al., 2003).

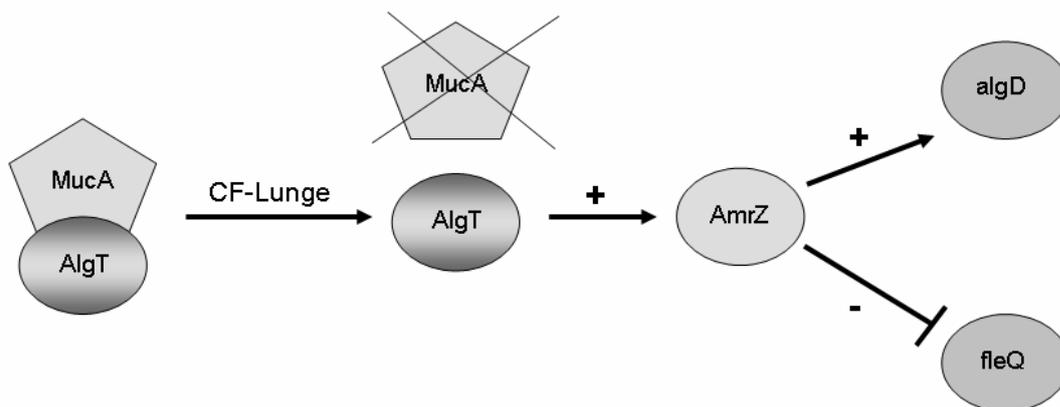


Abb. 31: Modell für die durch AlgT vermittelte inverse Regulation von Flagellinsynthese und Alginateproduktion in mukoiden, nicht beweglichen *P. aeruginosa* CF-Isolaten. Unter physiologischen Bedingungen inhibiert der Anti-Sigma-Faktor MucA die Aktivität des Sigma-Faktors AlgT. Bestimmte Bedingungen resultieren in einer Inaktivierung von *mucA*, wodurch *algT* aktiviert wird. AlgT erhöht die Aktivität von AmrZ, welches eine duale Funktion als Repressor von *fleQ* und als Aktivator von *algD* besitzt. Modifiziert nach (Tart et al., 2006).

Während des Krankheitsverlaufes in CF-Patienten verändern die Bakterien ihren beweglichen, nicht-mukoiden Phänotyp zu einer mukoiden, nicht beweglichen Form. Rhamnolipide könnten einen entscheidenden Beitrag dazu leisten. Die Existenz von Rhamnolipiden konnte schon vor einigen Jahren im Sputum von CF-Patienten nachgewiesen werden (Kownatzki et al., 1987). Die Aktivierung des Rhl-abhängigen Quorum-Sensing-Systems und der damit verbundenen Repression von Flagellin (Wolfgang et al., 2004) könnte in einer Abspaltung von Flagellin von angesiedelten

Pseudomonaden durch Rhamnolipid resultieren. Dies würde auch die starke Immunantwort bei der Erstbesiedlung von CF-Patienten erklären. Die Ausbildung eines mukoiden Phänotyps und das Fehlen von Flagellin ermöglichen den Bakterien eine gute Anpassung und selektive Vorteile in der Lunge (Cobb et al., 2004). Das Alginate bildet eine Barriere, welche die Bakterien vor Schädigungen durch das Immunsystem oder Antibiotika schützt (Pedersen et al., 1990; Leid et al., 2005). Da Flagellin als potenter Induktor einer proinflammatorischen Antwort wirkt, entgeht das Bakterium durch das Abstellen der Flagellinsynthese einer Immunantwort. Ein weiteres Merkmal beim Übergang zu einer chronischen Entzündung ist der Übergang der Bakterien zu einer polyagglutinen Form, in der die Bakterien aufgrund von Veränderungen der O-Serogruppen verklumpen und dadurch schwerer zu töten sind (Ojeniyi, 1994). Für diesen Prozess könnten die Rhamnolipide ebenfalls maßgeblich verantwortlich sein, indem sie das LPS von der äußeren Bakterienmembran entfernen und die Oberfläche dadurch hydrophober machen.

4.4 Isolierung und Identifizierung von Flagellin

Nachdem das Flagellin als abgescherter Faktor in Kulturüberständen Rhamnolipid-behandelter Pseudomonaden identifiziert worden war, sollte dieses PAM in folgenden Untersuchungen isoliert und hinsichtlich seiner Virulenz analysiert werden. Die Isolierung des Flagellins erfolgt in der Literatur meist durch mechanisches Abscheren und Ultrazentrifugation bzw. Salzfällung (Montie et al., 1982a; Allison et al., 1985). Durch diese Prozedur werden allerdings möglicherweise noch weitere potentielle PAMs angereichert. Eine Aufreinigung des Flagellins wurde durch den Einsatz von Ionenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration erreicht (Ogushi et al., 2001; Gewirtz et al., 2001). Das b-Typ-Flagellin von PAO1 besitzt einen isoelektronischen Punkt von ca. 5,4 und trägt damit in neutraler Umgebung überschüssige negative Ladungen. Bei einer Auftrennung über einen Anionenaustauscher (Mini Q) eluierte das Flagellin nach 6-8 min (s. Abb. 20 A und B). Die induzierende Aktivität der HPLC-Fractionen nach einer Retentionszeit von 12-16 min wiesen in der gelelektrophoretischen Auftrennung keine Flagellinbanden auf, was darauf schließen lässt, dass entweder Flagellin in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze vorhanden war oder dass es sich bei der induzierenden Aktivität um einen anderen Faktor handelte.

Eine weitere Aufreinigung des Flagellins wurde mit Hilfe einer Größenaufschlusschromatographie (Superdex G75) unter isokratischen Bedingungen mit Wasser als Laufmittel durchgeführt (s. Abb. 21 A). Überraschenderweise eluierte das Flagellin bei einer Retentionszeit von 23-24 min, also in einem Bereich, in dem nur niedermolekulare Substanzen erwartet werden. Dieser Effekt ist dadurch zu erklären, dass die Superdex-Säule nicht nur streng nach der Molekularmasse trennt, sondern auch andere Eigenschaften besitzt, die einen Einfluss auf die Bindung des Flagellins ausüben. Als Gelfiltrationsmaterialien werden Partikel aus hydrophilen Polymeren benutzt, die möglichst inert, druckstabil, ungeladen und von uniformer Größe sein sollten. Bei der Superdex 75 wird ein hochvernetztes Agarosematerial verwendet, das kovalent mit Dextran verbunden ist. Die Tatsache, dass angesäuertes Flagellin, welches einen Überschuss an positiven Ladungen trägt, erst spät von der Säule eluierte, deutet auf eine unspezifische Eigenschaft der Superdex-Säule als Ionentauscher hin. Dieser Effekt wurde gezielt ausgenutzt, um unerwünschte Proteine ähnlicher Größe auszuschließen.

Interessant und ungewöhnlich war eine chromatographische Auftrennung des Flagellins in einer Reversed-Phase-Säule (C_{21}) mittels eines Acetonitrilgradienten. Da Acetonitril toxisch auf Keratinozyten wirkt, wurden die Proben zuvor lyophilisiert und in einer entsprechenden Menge Wasser aufgenommen. Es zeigte sich, dass die erhaltenen Fraktionen nach einer Stimulation auf HaCaT-Keratinozyten keine IL-8- und hBD-2-induzierende Aktivität aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen, die in früheren Untersuchungen mit Kulturüberständen von *P. aeruginosa* gemacht worden waren (Dissertation Schwichtenberg, 2003). Dort konnte gezeigt werden, dass sowohl die Säurebehandlung als auch die Menge an Acetonitril die Eigenschaft des induzierenden Faktors beeinträchtigten.

Die Identifizierung des b-Typ-Flagellins aus PAO1 erfolgte primär mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen. ESI-MS Daten bezifferten die Molekularmasse von Flagellin auf 49820 Da, daneben traten noch zwei kleinere Massen von 49611 Da und 49402 Da auf (s. Abb. 22). Die theoretische Masse beträgt allerdings 49111 Da, wodurch eine Differenz von 709 bzw. 500 und 291 Da entsteht. Diese Massendifferenz von insgesamt 1,4% kommt durch posttranslationale Modifikationen in Form von Glykosylierungen zustande (Verma et al., 2006). Die Masse bei 49402 Da korreliert mit der Addition von zwei Desoxyhexose-Resten (je

146 Da) an das Flagellin-Protein. Die beiden anderen Massen bei 49611 Da und 49820 Da bestehen aus einem Flagellin mit zwei Desoxyhexose-Resten, an denen entweder eine (49611 Da) oder zwei (49820 Da) Reste mit einer unbekannt Masse von 209 Da angehängt sind (Verma et al. 2006). Der Zuckeranteil des Flagellins, der aus der Differenz der beobachteten mit der erwarteten Masse des Flagellins errechnet wird, ist in anderen Bakterien zum Teil noch erheblich größer. So beträgt dieser in *Helicobacter pylori* 4,2% und in *Campylobacter jejuni* sogar 10,4-12,1% (Schirm et al., 2005).

4.5 Flagellin als potentiell PAM einer proinflammatorischen Reaktion

Die wichtige Bedeutung von Flagellin bei einer Entzündungsreaktion ist in der Literatur beschrieben (Montie et al., 1982b; Abtin et al., 2008) und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 24 A). Es zeigte sich, dass in Kulturüberständen von Flagellin-defizienten Pseudomonaden ($PAK\Delta fliC$) im Vergleich zum Wildtyp ($PAKWT$) keine IL-8-induzierende Aktivität festgestellt werden konnte. Zusammen mit der Beobachtung, dass aufgereinigtes Flagellin ausreichend ist, um eine IL-8- und hBD-2-Antwort hervorzurufen, lässt die Vermutung aufkommen, dass Flagellin das einzig relevante PAM in den hier untersuchten Kulturüberständen ist. Physikochemikalische Untersuchungen charakterisieren Flagellin als ein Proteinase sensitives Molekül, das sehr resistent gegenüber Säure- und Hitzebehandlung ist (s. Abb. 24 B). Diese Beobachtungen schließen nicht-proteinogene Moleküle sowie hitzelabile Proteine als induzierende Faktoren aus (Ogushi et al., 2001; Rochon und Romling, 2006).

Dosisabhängige Untersuchungen verdeutlichen die hohe Virulenz des Flagellins, da bereits 1 ng/ml Flagellin eine proinflammatorische Antwort in Keratinozyten auslöste (s. Abb. 25 A) (Abtin et al., 2008). Die Zeitkinetik der Freisetzung von IL-8 und hBD-2 in Keratinozyten nach Stimulation mit Flagellin unterscheidet sich voneinander (Abtin et al., 2008). hBD-2 wird erst 8 h nach Zugabe von Flagellin von den Keratinozyten sekretiert, während IL-8 bereits nach 2 h im Zellüberstand nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 25 C). Vergleichbare Kinetiken einer Induktion antimikrobieller Proteine wurden durch andere Autoren bei der Expression von Psoriasin nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen in Keratinozyten beobachtet (Gläser et al., 2005). Eine autokrine Wirkung von IL-8 auf die Expression von hBD-2 ist

unwahrscheinlich, da IL-8 keine Auswirkung auf die Expression von hBD-2 besitzt (Abtin et al., 2008). Die frühe Sekretion von IL-8 bereits 2 h nach Zugabe von Flagellin zu den Keratinozyten könnte durch präformiertes IL-8 zustande kommen, welches relativ schnell ins Medium abgegeben werden kann. Schon in früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass IL-8 bereits präformiert in Keratinozyten vorliegt und durch Stimulation freigesetzt werden kann (Sticherling et al., 1991). Untersuchungen zur Induktion zeigten allerdings, dass die mRNA von IL-8 im Gegensatz zu hBD-2 schon nach zwei Stunden gebildet wurde (s. Abb. 25 D).

Im Kontrast zu den bisherigen Erkenntnissen konnte unter bestimmten Wachstumsbedingungen Flagellin mit verminderter Immunreaktivität detektiert werden. Wie in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bereits beschrieben (Schwichtenberg, 2003), waren nur Bakterienüberstände statischer MG-Kulturen aktiv, während planktonische Kulturen eine geringere IL-8-Induktion aufwiesen (s. Abb. 8). Die Menge von akkumuliertem Flagellin im Kulturüberstand steigt mit zunehmender Belüftung an (Komoriya et al., 1999) und war dementsprechend in den Überständen planktonischer, geschüttelter Kulturen größer als in statischen Kulturen (s. Abb. X). Interessanterweise konnte in den planktonischen Kulturen trotz der größeren Flagellinmenge im Überstand eine verminderte IL-8-Induktion nachgewiesen werden (s. Abb. 27).

Obgleich es zahlreiche Studien gibt, die Flagellin als induzierenden Faktor beschreiben, besteht dennoch die theoretische Möglichkeit, dass ein bisher unbekannter Faktor an das Protein assoziiert ist und für seine Effekte verantwortlich ist. Der unmissverständliche Nachweis könnte durch ultrareines Flagellin oder durch rekombinantes Flagellin erbracht werden.

Andererseits könnte *P. aeruginosa* unter planktonischen Wachstumsbedingungen einen Inhibitor bilden, der an das Flagellin bindet und die Erkennung durch die eukaryotische Zelle unterbindet. In früheren Untersuchungen konnte bereits in Kulturüberständen von *P. aeruginosa* ein säurelabiler Inhibitor der hBD-2 induzierenden Aktivität nachgewiesen werden (Schwichtenberg, 2003).

Von Bakterien der α - und ϵ -Proteobacteria ist bekannt, dass das Flagellin nicht von TLR5 erkannt wird und damit keine Immunantwort hervorruft (Lee et al., 2003; Andersen-Nissen et al., 2005). TLR5 erkennt eine evolutiv konservierte Region des Flagellins, welche für den Zusammenbau des Filamentes und für die Beweglichkeit benötigt wird. Das Flagellin der α - und ϵ -Proteobacteria besitzt spezifische

Veränderungen innerhalb dieser Erkennungsstelle, die eine Erkennung durch TLR5 verhindern, zugleich aber auch kompensatorische Veränderungen im Molekül, welche die Beweglichkeit erhalten.

Eine weitere Möglichkeit, wie das Flagellin von *P. aeruginosa* in seiner Virulenz verändert werden kann, besteht in einer Deglykosylierung des Proteins. In Untersuchungen zur Virulenz konnte gezeigt werden, dass nicht-glykosyliertes Flagellin eine verringerte Immunantwort auslöste (Verma et al., 2005; Arora et al., 2005). Nach Behandlung des PAO1-Flagellins mit Säure wurde ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE beobachtet, das ein um ungefähr 3-4 kDa geringeres Molekulargewicht impliziert (s. Abb. 28). Diese Flagellinpräparation zeichnete sich durch eine fehlende IL-8-Induktion in Keratinozyten aus. Eine Deglykosylierung des Flagellins vom PAO1-Stamm ist allerdings im Gegensatz zum PAK-Stamm nicht gekennzeichnet durch ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE (Arora et al., 2001; Miller et al., 2008). In massenspektrometrischen Untersuchungen des trypsinverdauten Flagellins konnten nur Teilfragmente identifiziert werden, die nicht ausschließen konnten, dass durch die Säurebehandlung ein Teil des Proteinrückgrates abgespalten wurde. Es ist bekannt, dass in monomerem Flagellin die konservierte D0-Domäne mit den C- und N-terminalen Enden in ungeordneter Form vorliegt, während die anderen Domänen D1-D3 kompakt gefaltet sind (Ramos et al., 2004). Es wäre also möglich, dass diese Struktur durch intensive Säurebehandlung abgespalten wird. Die Erkennung des Flagellins durch die eukaryotische Zelle erfolgt primär durch TLR5 (Smith et al., 2003; Andersen-Nissen et al., 2007). Da die konservierten Domänen essentiell für die Erkennung durch TLR5 sind, könnte die reduzierte IL-8-Induktion auf eine fehlende Bindung an den Rezeptor zurückzuführen sein.

Die Abhängigkeit einer IL-8- und hBD-2-Antwort von TLR5 durch Flagellin wurde in dieser Arbeit durch Stimulation auf HEK293-Zellen, welche eine limitierte Expression von TLR5 aufweisen, dargestellt (s. Abb. 26). Eine <10%-ige IL-8- sowie 25-30%-ige hBD2-Antwort im Vergleich zu Stimulationen in HaCaT-Keratinozyten zeigte die wichtige Funktion von TLR5. Die noch vorhandene Restinduktion ist durch eine minimale Menge von TLR5 oder durch eine Erkennung von Flagellin durch einen anderen Rezeptor zu erklären. Die Induktion durch Flagellin wurde neben TLR5 auch in Zusammenhang mit dem Gangliosid asialoGM1 und TLR2 in Verbindung gebracht (Adamo et al., 2004). Die Beteiligung von asialoGM1 an der Flagellinerkennung

gewann mit zunehmender Forschung an Bedeutung (McNamara et al., 2001; Ogushi et al., 2004; Du et al., 2006), während einige Autoren dem Gangliosid eine Funktion als Ko-Rezeptor von TLR5 absprechen (West et al., 2005).

Passend zu diesen Ergebnissen waren Beobachtungen in unserer Arbeitsgruppe, dass in si-RNA-Experimenten die Flagellin bedingte IL-8- und hBD-2-Induktion abhängig war von MyD88, dem universellen Adapter-Protein der TLR5-Erkennung (persönliche Mitteilung Dr. Julia Kobliyakova).

Der TLR-Signalweg beginnt mit der Bindung des PAMs an den transmembranen TLR5 und der Rekrutierung des cytosolischen Adapters MyD88, der mit der Toll-IL-1-Domäne interagiert (Abb. 32).

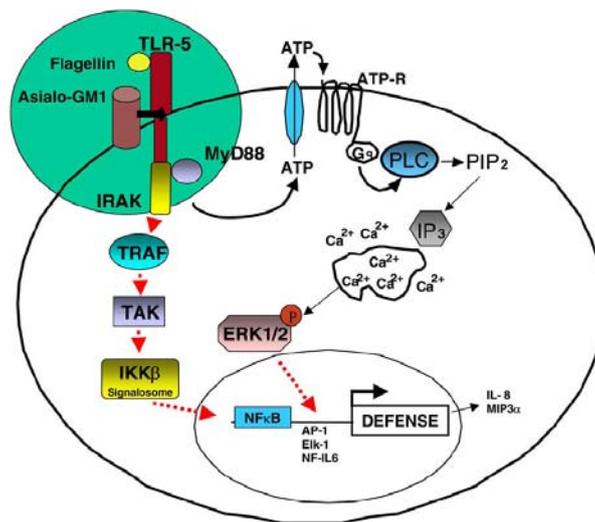


Abb. 32: TLR5-Signalwege nach Stimulation mit Flagellin. Flagellin bewirkt eine Assoziation zwischen TLR5 und AsialoGM1. Die Expression von Zytokinen und Defensinen können über NF-κB oder ERK1/2 erfolgen, die über zwei verschiedenen Signalwege aktiviert werden können. In Abwesenheit von extrazellulärem ATP wird NF-κB aktiviert. Wenn ATP autokrin freigesetzt wird, bindet und aktiviert es einen G-Protein gekoppelten Nukleotid-Rezeptor auf der Zelloberfläche, welches zu einer Sezernierung von Ca²⁺-Mobilisierung und Phosphorylierung von Erk1/2 führt. Aus (McNamara et al., 2006)

MyD88 stellt eine zentrale Komponente dar und rekrutiert die Serin/Threonin-Kinase IRAK (IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase). Von diesem Punkt aus gabelt sich der Signalweg auf. Der eine führt über Phosphorylierung von TNF-α-Rezeptor-assoziiertem Faktor (TRAF6) und TRAF-assoziiierter Kinase (TAK) zu einem IKK-Komplex, welcher letztlich zu einer Aktivierung von NF-κB führt. Die Regulation von vielen Zytokinen (auch IL-8) und Defensinen erfolgt NF-κB-unabhängig über andere

Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1. Dieser alternative Signalweg ist abhängig von der Sezernierung von ATP aus der Zelle, wo es an einen G-Protein gekoppelten Nukleotid-Rezeptor auf der Zelloberfläche bindet, was zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung und einer Phosphorylierung von ERK1/2 (Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase) führt.

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Induktion antimikrobieller Peptide durch Flagellin in *ex vivo* Experimenten auf Hautpräparationen analysiert werden. Die Inkubation von Flagellin auf der Hautoberfläche führte in immunhistochemischen Untersuchungen des Hautgewebes zu keiner Induktion von Psoriasin (s. Abb. 19 B), welches *in vitro* in Keratinozyten durch Flagellin induziert wird (Abtin et al., 2008). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass das PAM aufgrund der mechanischen Barriere der Haut nicht in tiefere Hautschichten eindringen kann. Es ist folglich anzunehmen, dass eine Barrierestörung nötig ist, um eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass *P. aeruginosa* Infektionen der Haut überwiegend mit einer Barrierestörung einhergehen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Psoriasin nach Zerstörung der Barrierefunktion erhöht ist (Gläser et al., 2008). Interessanterweise führte eine Koinkubation des Flagellins mit Rhamnolipiden zu einer Induktion von Psoriasin in suprabasalen Keratinozyten der Epidermis (s. Abb. 19 D). Das Rhamnolipid könnte demzufolge eine essentielle Bedeutung bei der Barrierestörung besitzen. Eine ähnliche Funktion des „Biosurfactants“ wurde bereits für Infektionen in der Lunge beschrieben. Rhamnolipide fungieren in diesem Entzündungsprozess zusätzlich als Virulenzfaktor, der es *P. aeruginosa* erlaubt, ins Lungengewebe einzudringen (Zulianello et al., 2006). Dort konnte gezeigt werden, dass der initiale Schritt einer Infiltration von *P. aeruginosa* durch Rhamnolipide vermittelte Unterbrechung dieser Barriere erfolgt. Nur Bakterien, die Rhamnolipide sekretierten, könnten in das respiratorische Epithel eindringen, während andere Stämme, die alle anderen Quorum-Sensing abhängigen Faktoren bildeten, dies nicht vermochten (Zulianello et al., 2006).

4.6 *P. aeruginosa* und die epitheliale Abwehr – ein Modell

Basierend auf den Kenntnissen und Ergebnissen kann man spekulieren, welche Mechanismen dazu führen, dass *P. aeruginosa* trotz seines ubiquitären Vorkommens nur selten menschliche Haut kolonisiert und zu einer Infektion führt. Nach Kontakt mit

der Haut versuchen die Bakterien zu adhären und Mikrokolonien zu bilden. Sie produzieren und sezernieren Rhamnolipide, um ihre Migrationsfähigkeit zu erhöhen und die zahlreich vorliegenden hydrophoben Substrate wie Lipide zu verwerten. Durch das Abscheren der Oberflächenstrukturen wird die Zelloberfläche der Bakterien hydrophob, so dass diese eine höhere Affinität zur hydrophoben Haut besitzen. Zu den abgescherten Komponenten gehört auch das Flagellin, das das *Stratum corneum* nicht durchdringen kann. Die Flagellin-Moleküle können zum einen durch die Rhamnolipid-vermittelte Auflösung der Zellverbindungen und der damit einhergehenden Barrierestörung durch das *Stratum corneum* in die Epidermis gelangen, zum anderen könnten die Rhamnolipide als Vehikel fungieren, indem sie das Flagellin in Mizellen einschließen und in die Epidermis einschleusen. Das Flagellin induziert in den lebenden Keratinozyten die Expression von antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen. Diese werden nach außen gegeben und töten die Bakterien wirkungsvoll ab.

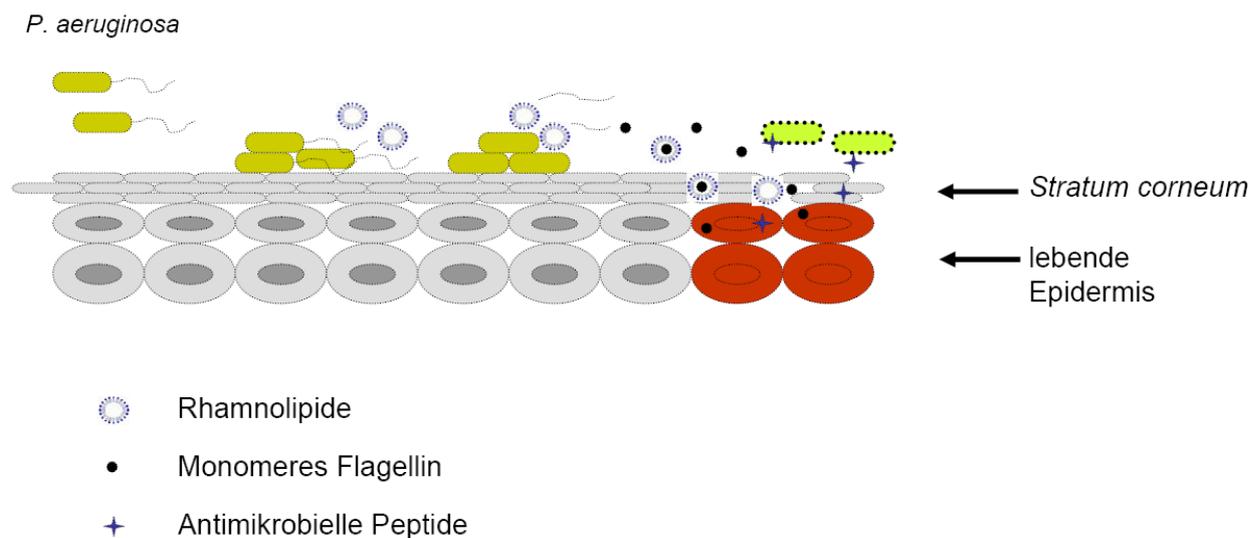


Abb. 35: Hypothetisches Modell zur Abwehr von *P. aeruginosa* in der Haut. *P. aeruginosa* (grün) adhärert an das *Stratum corneum* und bildet Mikrokolonien aus. Die Bakterien produzieren Rhamnolipide, um lipidreiche Substrate der Haut zu verwerten und seine Oberfläche hydrophober zu gestalten. Die Rhamnolipide scheren das Flagellin von der Bakterienmembran und verursachen zugleich eine Störung der Barriere der Haut. Alternativ transportieren die Rhamnolipide das Flagellin in Mizellen durch das *Stratum corneum* in die lebende Epidermis und regt die Keratinozyten zu einer Induktion von antimikrobiellen Peptiden (z.B. Psoriasin oder hBD-2) an (rote Zellen). Diese werden nach außen abgegeben und töten *P. aeruginosa* (hellgrün) ab.

4.7 Ausblick

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass das von *P. aeruginosa* produzierte „Biosurfactant“ Rhamnolipid in Konzentrationen oberhalb der CMC Flagellin von der äußeren Membran abschert und dass dieses Flagellin primär für die Immunreaktivität des Bakterienüberstandes verantwortlich ist. In weiteren Untersuchungen sollten Wachstumsexperimente durchgeführt werden, die einen detaillierten Zusammenhang von Rhamnolipidsynthese und der Freisetzung von Flagellin ins Kulturmedium herstellen.

Die *ex vivo* Untersuchungen zur Induktion von Psoriasin nach Koinkubation mit Rhamnolipiden und Flagellin geben Aufschlüsse über mögliche Interaktionen zwischen *P. aeruginosa* und der Haut. Von großem Interesse ist die Verwendung von Detergenzien im Alltag z.B. in der Hygiene. In weiterführenden Experimenten müssten diesbezüglich noch weitere Detergenzien getestet werden sowie die Frage geklärt werden, ob durch die Koinkubation von Flagellin und Rhamnolipiden *ex vivo* eine Entzündungsreaktion, z.B. in Form einer Induktion proinflammatorischer Zytokine, ausgelöst wird. Durch eine Kolo-kalisation von Flagellin und Psoriasin könnte der direkte Zusammenhang der Induktion belegt werden und Rhamnolipid als Faktor beschrieben werden, der die Infiltration von PAMs wie Flagellin in tieferes Hautgewebe fördert.

Die Virulenz von Flagellin als Hauptkomponente einer Entzündungsreaktion ist von großer Bedeutung und sollte in weiteren Studien analysiert werden. Zu diesem Zweck sollten Wachstumsbedingungen optimiert und etabliert werden, unter denen der Bakterienüberstand trotz vorhandenen Flagellins eine geringere Virulenz aufweist. In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls nach potentiellen Inhibitoren gesucht und analysiert werden. Die Bedeutung der Glykosylierung des Flagellins sollte mit Hilfe von Mutanten untersucht werden, in denen die beteiligten Gene deletiert sind. Ein weiteres Ziel sollte es sein, den genauen Effekt dieser Zuckerstrukturen bei der Bindung an die Rezeptoren der Epithelzelle zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

P. aeruginosa produziert eine Vielfalt von Virulenzfaktoren, die zur Pathogenese von verschiedenen *P. aeruginosa*-Infektionen beitragen. Die Expression und Freisetzung von AMPs und Zytokinen wird in verschiedenen Epithelzellen durch Stimulation mit Bakterien und Kulturüberständen induziert. Die Sezernierung eines bakteriellen, induzierenden Faktors in das Kulturmedium ist abhängig von den Kultivierungsmethoden und erfolgt meist während der stationären Phase. *P. aeruginosa* produziert in dieser Wachstumsphase sekundäre Metabolite, die einen Beitrag dazu leisten könnten. Ein bedeutender Faktor ist das Rhamnolipid, welches die äußere Membran Gram-negativer Bakterien moduliert, indem es LPS-Moleküle und Proteine entfernt. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Rhamnolipiden auf die Bakterienmembran und auf die induzierende Aktivität des Kulturüberstandes zu untersuchen. Des Weiteren wurde der induzierende Faktor identifiziert.

Stimulationsexperimente in Keratinozyten zeigten, dass Kulturüberstände Rhamnolipid-behandelter Bakterien im Vergleich zu unbehandelten Bakterien eine erhöhte Induktion von IL-8 und hBD-2 bewirkten. Voraussetzung für diesen Effekt war die Zugabe von Rhamnolipiden in Konzentrationen oberhalb der CMC zu Bakterienkulturen, die sich in der logarithmischen oder frühen stationären Phase befanden. Durch Inhibition des Bakterienwachstums konnte die Neusynthese eines induzierenden Faktors infolge der Zugabe von Rhamnolipid ausgeschlossen werden. Daraus resultiert, dass sich der induzierende Faktor per se auf der Bakterienoberfläche befand und vom Rhamnolipid abgeschert wurde. Diese Eigenschaft beruht nicht auf einer spezifischen Eigenschaft des Rhamnolipids, sondern auf seine Funktion als Detergenz. Entsprechende Untersuchungen mit anderen Detergenzien führten zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Verwendung von Flagellin-defizienten Mutanten, in denen keine Aktivitätsteigerung des Überstandes in Anwesenheit von Rhamnolipiden erfolgte, deutete darauf hin, dass es sich bei dem abgescherten, induzierenden Faktor um Flagellin handelte. Der Nachweis des Flagellins in den Überständen konnte mittels Western-Blot-Analyse und durch Massenspektrometrie erbracht werden.

Die Aufreinigung des Flagellins erfolgte mit Hilfe von Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Das Flagellin ist ein potenter Virulenzfaktor, der

sowohl IL-8 als auch hBD-2 über TLR5-Erkennung in Keratinozyten induziert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem Flagellin aus planktonischen, nährstofflimitierenden *P. aeruginosa* Kulturen nachgewiesen werden, welches eine verminderte induzierende Aktivität aufwies. In weiteren Studien müsste geklärt werden, ob das Flagellin per se eine geringere Induktion aufwies oder ob ein Inhibitor dafür verantwortlich ist.

In *ex vivo* Untersuchungen konnte eine wichtige Interaktion von Rhamnolipiden und Flagellin bei der Flagellin-induzierten angeborenen Immunantwort beobachtet werden. Diese zeigten, dass Flagellin nur bei einer Koinkubation mit Rhamnolipiden die Synthese antimikrobieller Peptide in der lebenden Epidermis induzierte. Dies lässt vermuten, dass Rhamnolipide nötig waren, um das Flagellin durch die hydrophobe Barriere der Haut durchzuschleusen. Rhamnolipide könnten zum einen als Vehikel dienen, indem sie Flagellin-Moleküle in Mizellen einschließen und durch das *Stratum corneum* transportieren, zum anderen könnten sie die Barriere so weit schädigen, dass die Flagellin-Monomere bis in die lebende Epidermis eindringen können.

6 Summary

P. aeruginosa produces a variety of virulence factors contributing to the pathogenesis of serious infections. Expression and secretion of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines is induced in several epithelial cells by stimulation with bacteria or culture supernatants. The here reported release of the hBD-2 and IL-8-inducing activity into bacterial supernatant depends on cultivation during stationary growth phase.

P. aeruginosa expresses secondary metabolites during the onset of stationary phase which can contribute to the release of a pathogen-associated molecule. Rhamnolipids are prominent molecules that are known to modulate the outer membrane of gram-negative bacteria by removing LPS and surface proteins. Aim of this study was to investigate the influence of rhamnolipids to the bacterial outer membrane and to the inducing activity of bacterial supernatants. Furthermore, the bacterial mediator of this induction was identified and characterized.

Experiments in keratinocytes demonstrated an increased IL-8- and hBD-2-induction by supernatants of rhamnolipid-treated bacteria in contrast to supernatant of untreated bacteria. Precondition of this shedding effect was the addition of rhamnolipids in concentrations above the critical micelle concentration to a logarithmic growth culture. Synthesis of a novel inducing factor in response to added rhamnolipids was excluded by inhibition of bacterial growth. As a result the inducing factor was part of the bacterial outer membrane and was shed by rhamnolipids. This effect was not due to a specific property of rhamnolipid but to its function as detergent, since experiments with different detergents led to similar results. The use of flagellin-deficient mutants showed no effect of hBD-2 and IL-8-inducing activity of the supernatants when coincubated with rhamnolipids, indicating that flagellin was the shed inducing factor. Identification of flagellin in supernatants was achieved by western-blot analyses and mass spectrometry.

P. aeruginosa flagellin was purified by chromatographic separation. It is the major proinflammatory stimulus in bacterial supernatants and induces expression of antimicrobial peptides and cytokines in keratinocytes by TLR5. From planktonic, nutrient-limited *P. aeruginosa* cultures detected flagellin showed a reduced IL-8-inducing activity. In further investigations the reason for this reduced activity should be analyzed in detail.

Ex vivo experiments in skin preparations implicated an important function of rhamnolipids for the flagellin induced innate immune response, because flagellin was able to penetrate the skin barrier only when coincubated with rhamnolipids. This result indicates that rhamnolipids were necessary to transfer the flagellin through the hydrophobic lipid barrier of the skin either by transporting the PAM in micelles or by disrupting the barrier function.

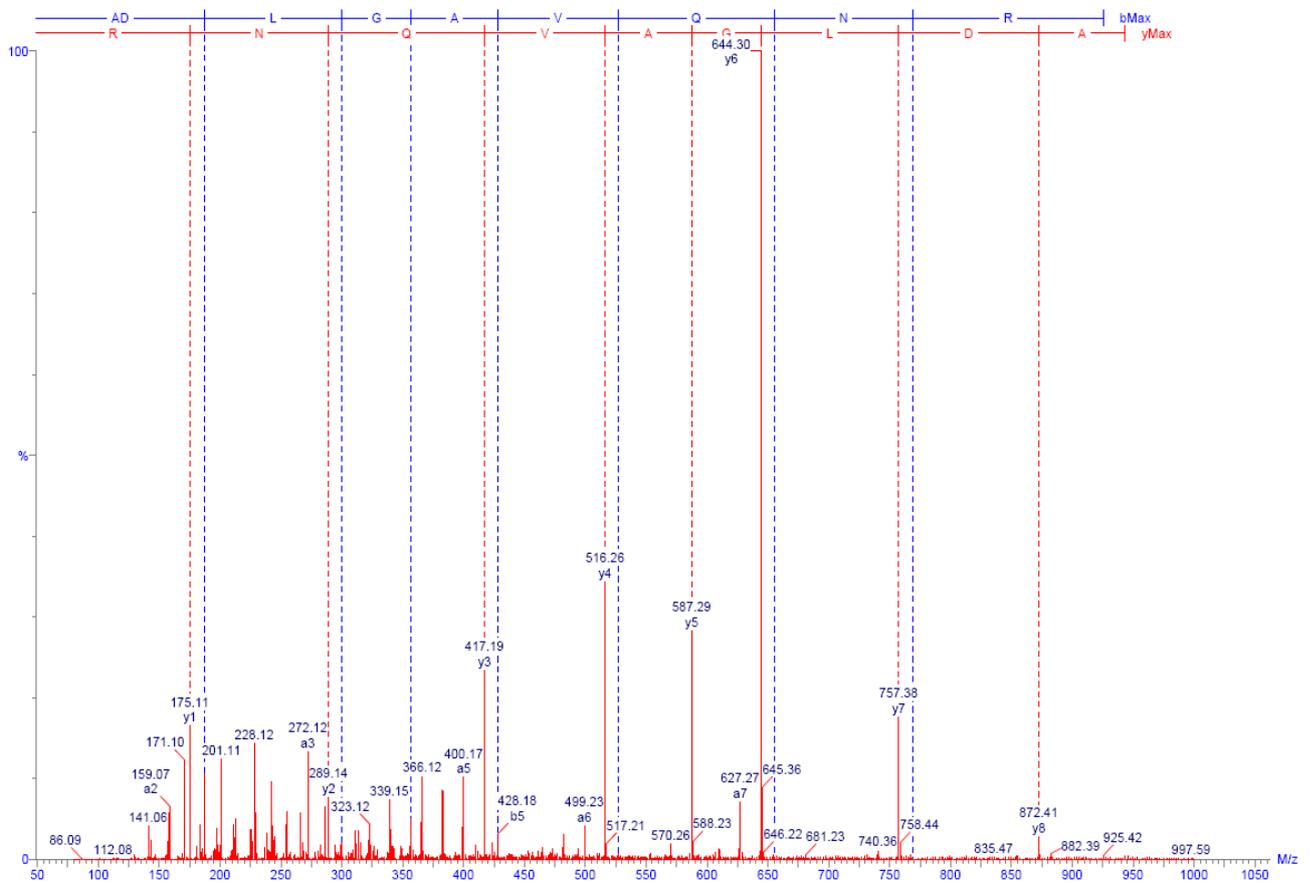
7 Anhang

Sequenzierung von Flagellin mit Hilfe von MS/MS-Untersuchungen (s. 3.2.1):

Beobachtete Masse: 942,39

Aminosäuresequenz: ADLGAVQNR

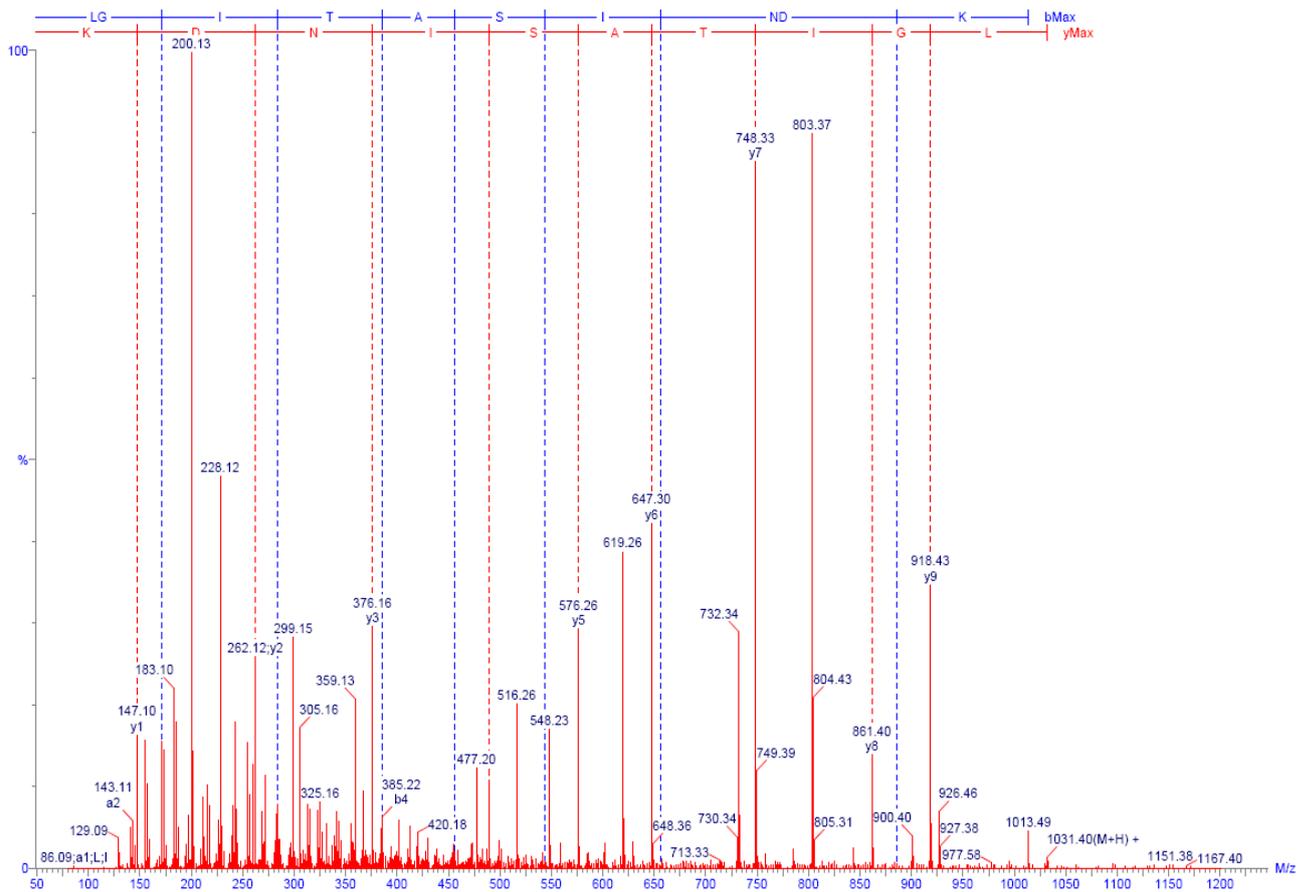
a	44.05	159.08	272.16	329.18	400.22	499.29	627.35	741.39	897.49
	---	0.01	0.04	0.02	0.05	0.06	0.07	0.10	---
b	72.04	187.07	300.16	357.18	428.21	527.28	655.34	769.38	925.49
	---	0.01	0.02	0.03	0.04	0.06	0.11	0.07	---
	Ala	Asp	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Asn	Arg
y	943.50	872.46	757.43	644.35	587.33	516.29	417.22	289.16	175.12
	---	0.05	0.06	0.05	0.04	0.03	0.03	0.02	0.01
z	926.47	855.43	740.40	627.32	570.30	499.26	400.19	272.13	158.09
	---	0.06	0.04	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01	0.01



Beobachtete Masse: 1030,47

Aminosäuresequenz: LGITASINDK

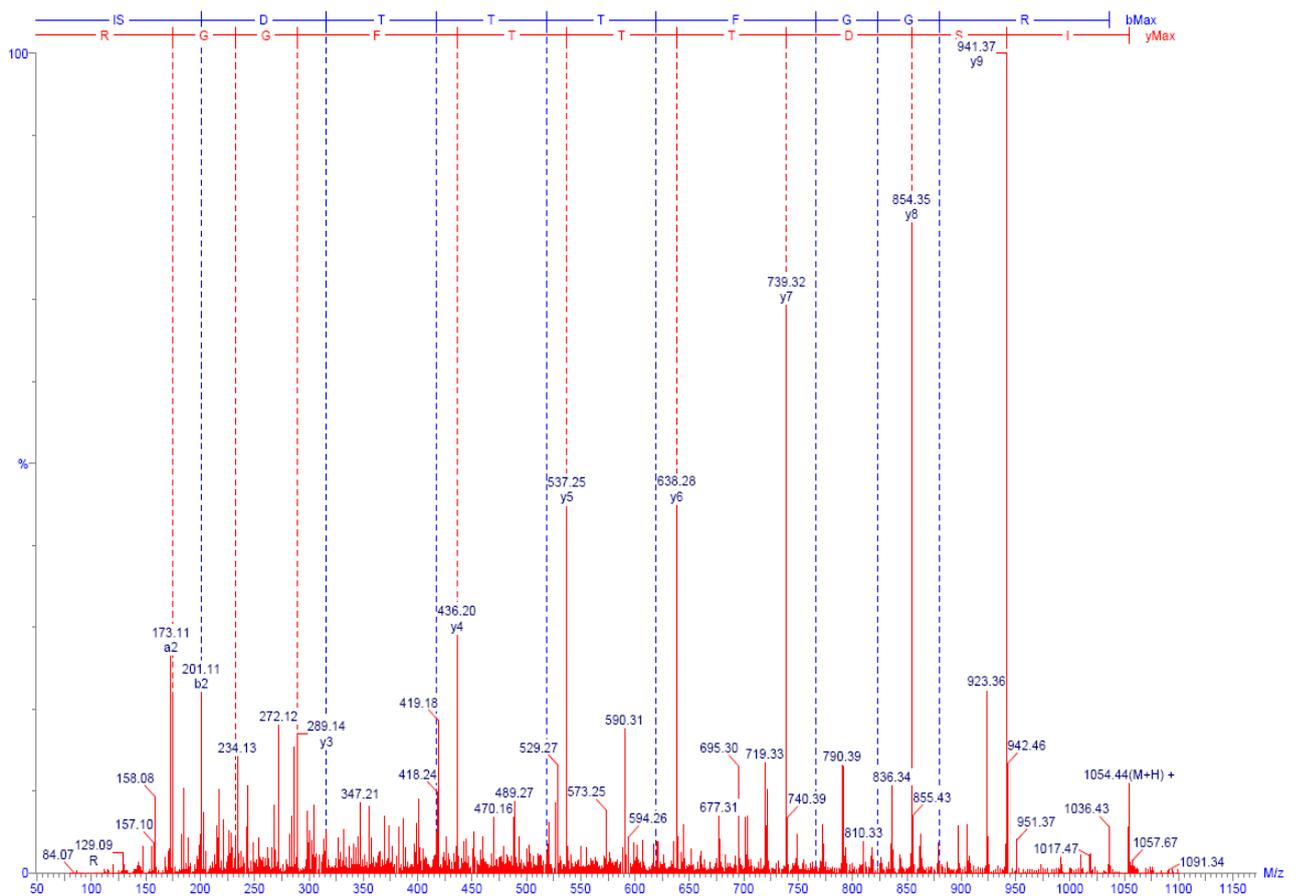
a	86.10	143.12	256.20	357.25	428.29	515.32	628.40	742.45	857.47	985.57
	0.01	0.01	0.05	0.13	0.12	0.12	0.18	0.12	-0.04	---
b	114.09	171.11	284.20	385.25	456.28	543.31	656.40	770.44	885.47	1013.56
	---	0.01	0.02	0.02	0.04	0.04	0.08	---	0.05	---
	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ser	Ile	Asn	Asp	Lys
y	1031.57	918.49	861.47	748.38	647.34	576.30	489.27	376.18	262.14	147.11
	---	0.06	0.06	0.06	0.04	0.03	0.04	0.03	0.02	0.01
z	1014.54	901.46	844.44	731.35	630.31	559.27	472.24	359.15	245.11	130.08
	---	-0.01	0.00	0.06	0.05	0.05	0.02	0.02	0.01	0.01



Beobachtete Masse: 1053,41

Aminosäuresequenz: ISDTTTFGGR

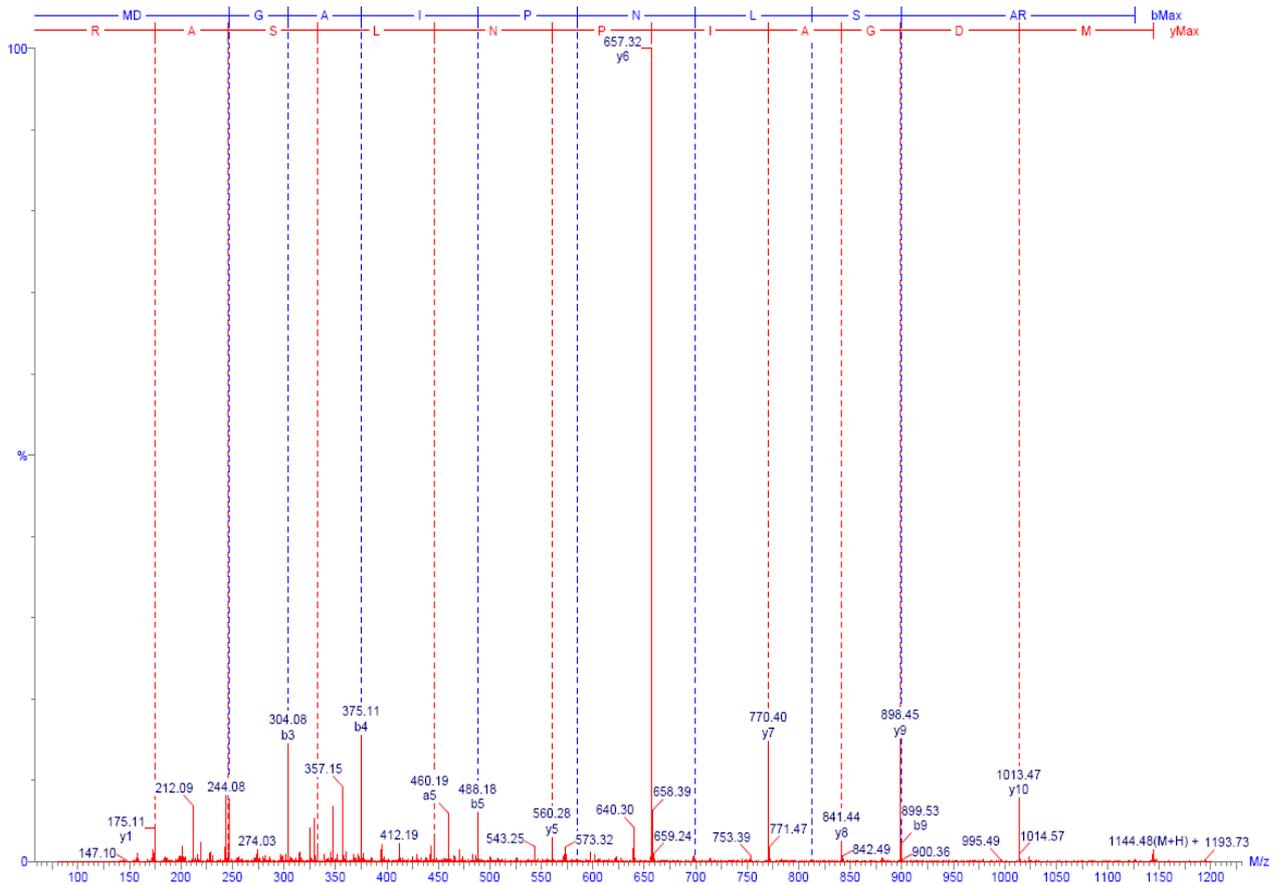
a	86.10 0.01	173.13 0.02	288.16 0.05	389.20 0.03	490.25 0.03	591.30 0.06	738.37 0.09	795.39 0.19	852.41 0.11	1008.51 ---
b	114.09 ---	201.12 0.01	316.15 0.03	417.20 0.04	518.25 0.02	619.29 0.06	766.36 0.07	823.38 0.07	880.41 0.09	1036.51 ---
	Ile	Ser	Asp	Thr	Thr	Thr	Phe	Gly	Gly	Arg
y	1054.52 ---	941.43 0.06	854.40 0.05	739.37 0.05	638.33 0.05	537.28 0.03	436.23 0.03	289.16 0.02	232.14 0.02	175.12 0.01
z	1037.49 ---	924.40 -0.03	837.37 0.08	722.34 0.08	621.30 0.05	520.25 0.03	419.20 0.02	272.13 0.01	215.11 0.01	158.09 0.01



Beobachtete Masse: 1143,47

Aminosäuresequenz: MDGAIPNLSAR

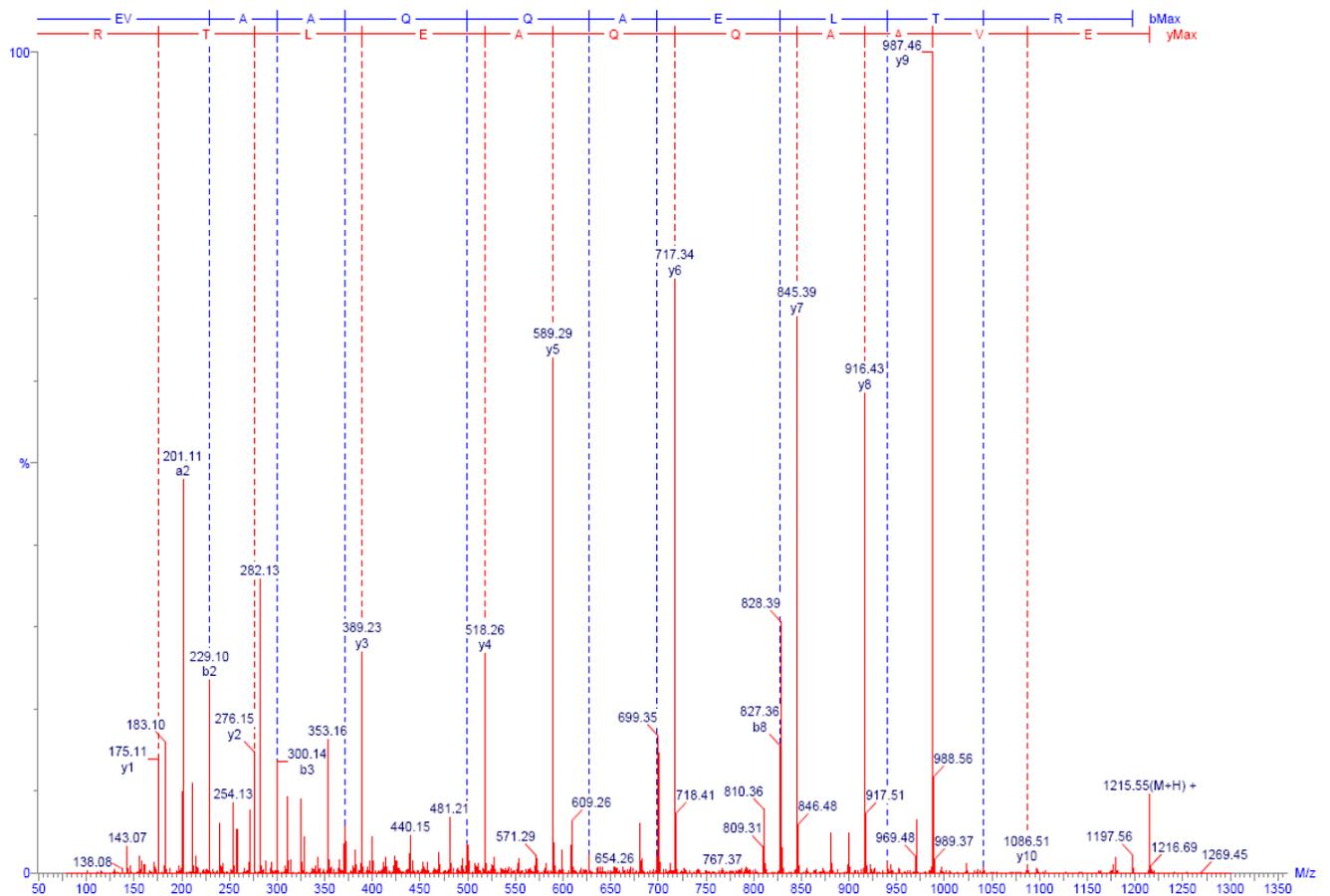
a	104.05	219.08	276.10	347.14	460.22	557.28	671.32	784.40	871.43	942.47	1098.57
	---	0.02	0.07	0.02	0.03	0.04	---	0.10	---	---	---
b	132.05	247.08	304.10	375.13	488.22	585.27	699.31	812.40	899.43	970.47	1126.57
	---	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.09	0.07	-0.10	---	---
	Met	Asp	Gly	Ala	Ile	Pro	Asn	Leu	Ser	Ala	Arg
y	1144.58	1013.54	898.51	841.49	770.45	657.37	560.32	446.27	333.19	246.16	175.12
	---	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01
z	1127.55	996.51	881.48	824.46	753.42	640.34	543.29	429.24	316.16	229.13	158.09
	---	0.08	0.09	---	0.03	0.04	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01



Beobachtete Masse: 1214,5

Aminosäuresequenz: EVAQQAELTR

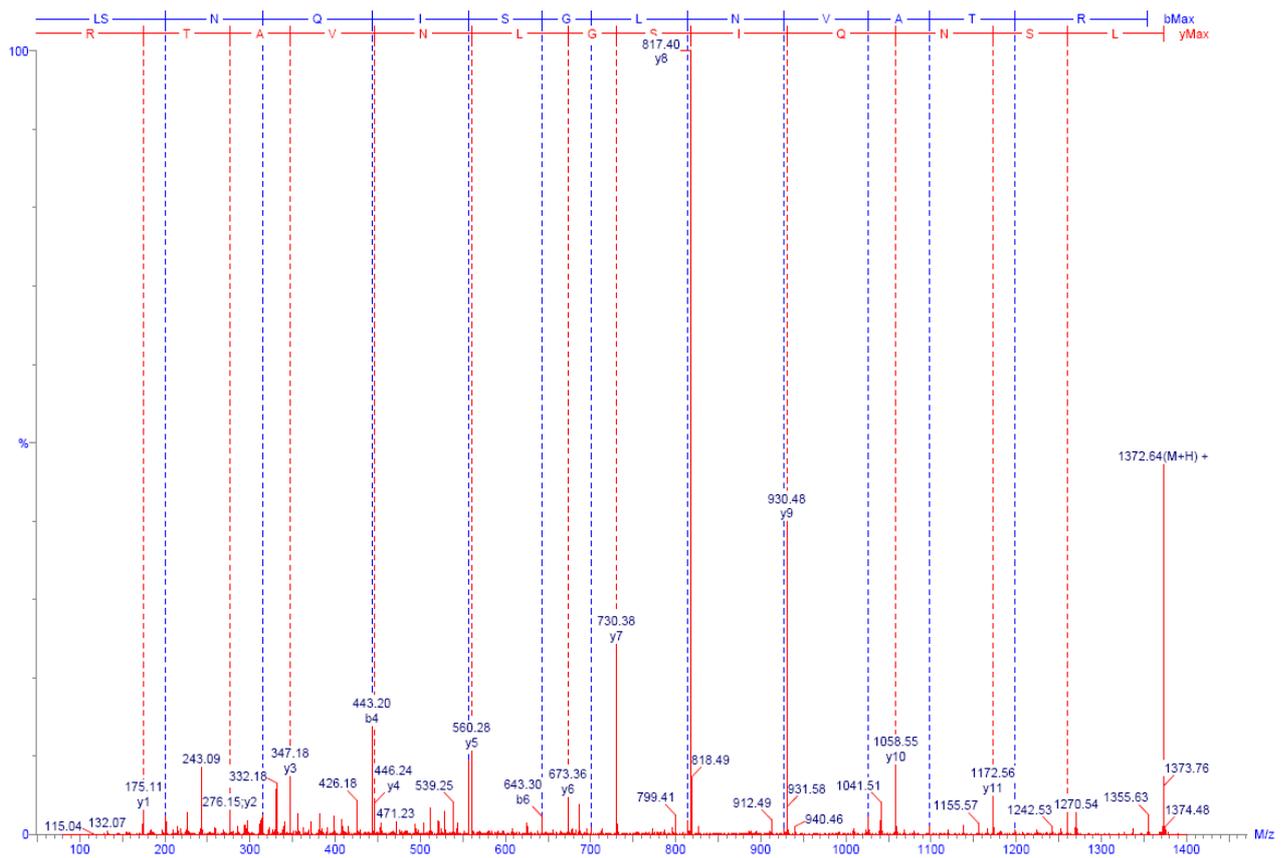
a	102.06	201.12	272.16	343.20	471.26	599.32	670.35	799.40	912.48	1013.53	1169.63
	---	0.01	0.05	0.03	0.04	0.08	0.04	-0.00	---	0.20	---
b	130.05	229.12	300.16	371.19	499.25	627.31	698.35	827.39	940.47	1041.52	1197.62
	---	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.06	0.03	0.06	0.09	---
	Glu	Val	Ala	Ala	Gln	Gln	Ala	Glu	Leu	Thr	Arg
y	1215.63	1086.59	987.52	916.49	845.45	717.39	589.33	518.29	389.25	276.17	175.12
	---	0.08	0.06	0.06	0.05	0.05	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01
z	1198.60	1069.56	970.49	899.46	828.42	700.36	572.30	501.26	372.22	259.14	158.09
	---	0.06	0.06	0.06	0.03	0.05	0.03	0.04	0.02	0.01	0.01



Beobachtete Masse: 1371,62

Aminosäuresequenz: LSNQISGLNVATR

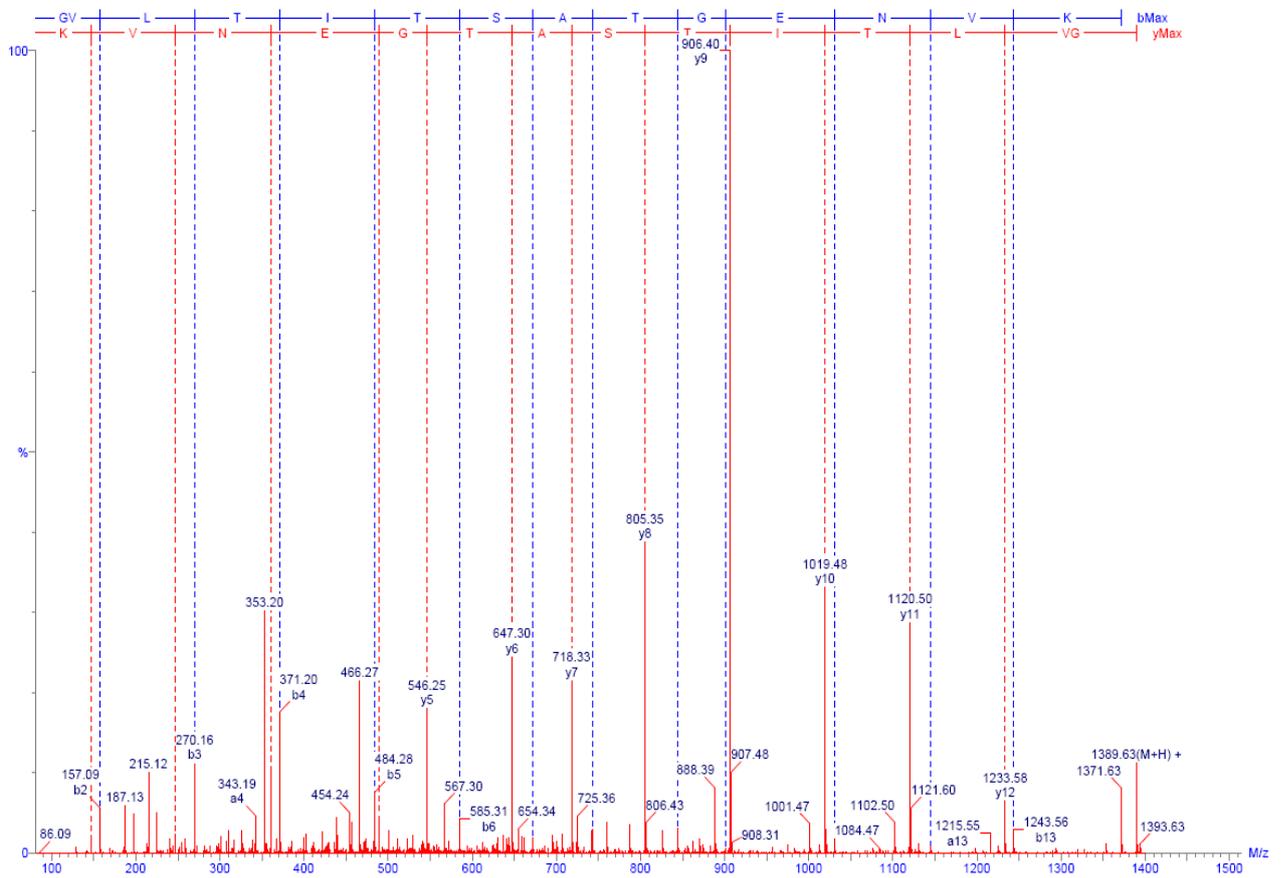
a	86.10	173.13	287.17	415.23	528.31	615.35	672.37	785.45	899.50	998.56	1069.60	1170.65	1326.75
b	114.09	201.12	315.17	443.23	556.31	643.34	700.36	813.45	927.49	1026.56	1097.60	1198.64	1354.74
	---	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.04	0.06	0.06	0.07	0.08	0.05	---
	Leu	Ser	Asn	Gln	Ile	Ser	Gly	Leu	Asn	Val	Ala	Thr	Arg
y	1372.75	1259.67	1172.64	1058.60	930.54	817.45	730.42	673.40	560.32	446.27	347.20	276.17	175.12
z	1355.72	1242.64	1155.61	1041.57	913.51	800.42	713.39	656.37	543.29	429.24	330.17	259.14	158.09
	---	0.11	0.04	0.06	0.08	0.05	0.04	0.03	0.04	0.03	0.05	0.01	0.01



Beobachtete Masse: 1388,61

Aminosäuresequenz: GVLTITSATGENVK

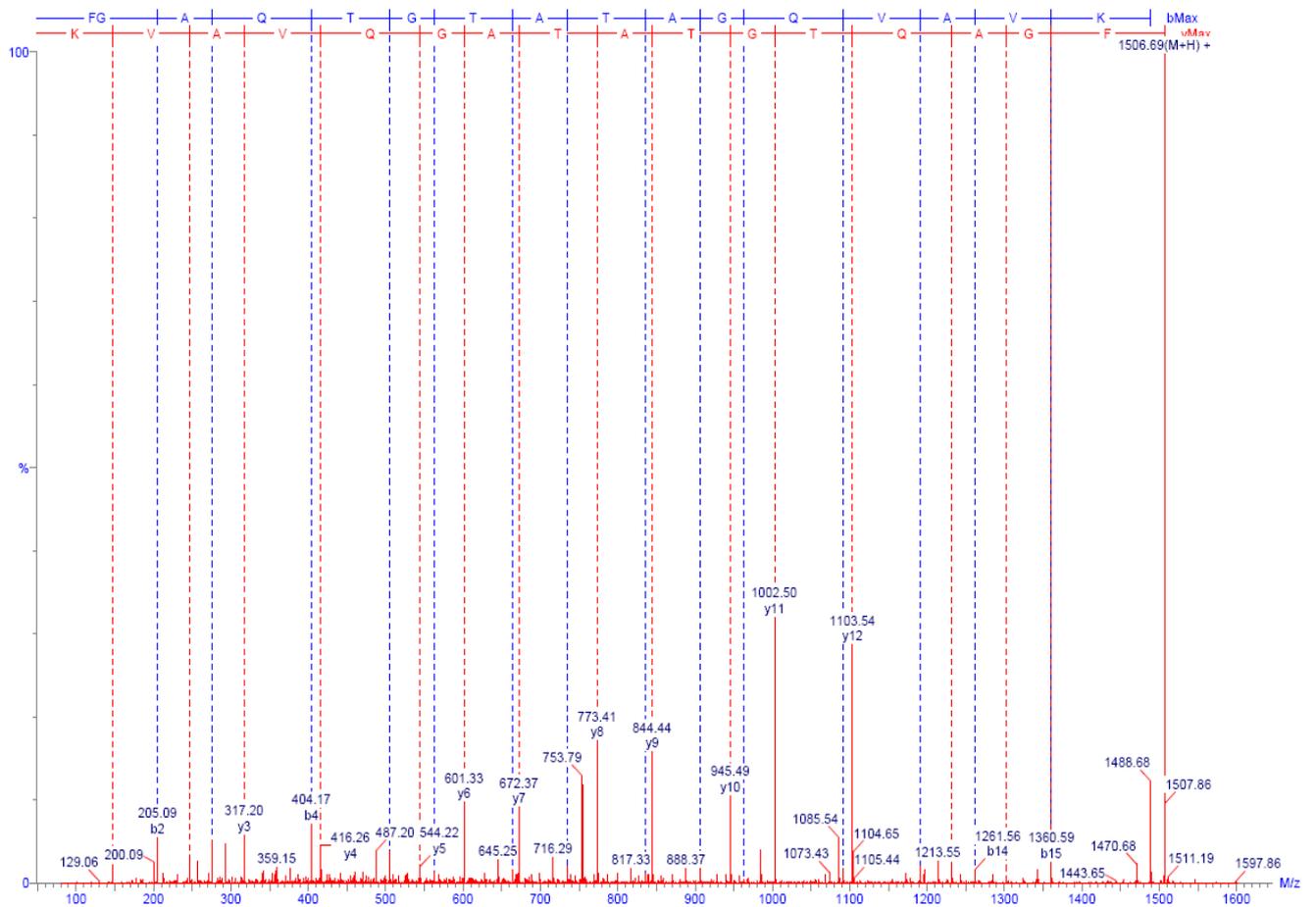
a	30.03	129.10	242.19	343.23	456.32	557.37	644.40	715.44	816.48	873.50	1002.55	1116.59	1215.66	1343.75
b	58.03	157.10	270.18	371.23	484.31	585.36	672.39	743.43	844.48	901.50	1030.54	1144.58	1243.65	1371.75
	---	0.01	0.02	0.05	0.04	0.05	0.20	0.15	0.06	0.10	-0.00	---	0.11	---
	---	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.04	0.07	0.08	0.06	0.08	0.10	0.09	---
	Gly	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Ser	Ala	Thr	Gly	Glu	Asn	Val	Lys
y	1389.76	1332.74	1233.67	1120.58	1019.54	906.45	805.41	718.37	647.34	546.29	489.27	360.22	246.18	147.11
z	1372.73	1315.71	1216.64	1103.55	1002.51	889.42	788.38	701.34	630.31	529.26	472.24	343.19	229.15	130.08
	---	---	-0.01	-0.03	-0.04	-0.04	-0.03	0.06	0.03	0.05	-0.01	0.01	---	0.01



Beobachtete Masse: 1505,64

Aminosäuresequenz: FGAQTGTATAGQVAVK

a	120.08	177.10	248.14	376.20	477.25	534.27	635.32	706.35	807.40	878.44	935.46	1063.52	1162.59	1233.62	1332.69	1460.79	
b	148.08	205.10	276.13	404.19	505.24	562.26	663.31	734.35	835.39	906.43	963.45	1091.51	1190.58	1261.62	1360.69	1488.78	
	---	0.01	0.02	0.02	0.03	0.06	0.06	0.05	---	0.04	---	---	0.08	---	---		
		Phe	Gly	Ala	Gln	Thr	Gly	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Gln	Val	Ala	Val	Lys
y	1506.79	1359.72	1302.70	1231.66	1103.61	1002.56	945.54	844.49	773.45	672.40	601.37	544.35	416.29	317.22	246.18	147.11	
z	1489.76	1342.69	1285.67	1214.63	1086.58	985.53	928.51	827.46	756.42	655.37	584.34	527.32	399.26	300.19	229.15	130.08	
	---	0.12	-0.02	0.03	0.13	0.09	0.12	0.12	0.23	0.09	0.04	0.12	0.11	---	0.03	0.01	



8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMP	antimikrobielle Proteine
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asp	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	American Type Culture Collection
B	Basen
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CMC	„critical micelle concentration“
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
et al.	et alii
FCS	„fetal calf serum“ = fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HaCaT	Human Adult Low Calcium Temperature Keratinocytes
hBD-2	Humanes β -Defensin-2
HCl	Salzsäure
HEK293	human embryonic kidney cells
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid

IL	Interleukin
M	Molar
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
mRNA	messenger RNA
mM	millimolar
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAM	Pathogen-assoziiertes Molekül
PBS	“phosphate buffered saline”
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RL	Rhamnolipid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase PCR
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth
Tween 20	Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat
Upm	Umdrehungen pro minute
V	Volt

9 Literaturverzeichnis

- Abtin, A., Eckhart, L., Mildner, M., Gruber, F., Schröder, J. M., Tschachler, E., 2008. Flagellin is the principal inducer of the antimicrobial peptide S100A7c (psoriasin) in human epidermal keratinocytes exposed to *Escherichia coli*. *FASEB J.* 22, 2168 - 2176.
- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I., Prince, A., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol* 30, 627 - 634.
- Akhtar, M., Watson, J. L., Nazli, A., McKay, D. M., 2003. Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *FASEB J* 17, 1319 - 1321.
- Al Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., Maier, R. M., 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3262 - 3268.
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* 59, 1114 - 1128.
- Allison, J. S., Dawson, M., Drake, D., Montie, T. C., 1985. Electrophoretic separation and molecular weight characterization of *Pseudomonas aeruginosa* H-antigen flagellins. *Infect. Immun.* 49, 770 - 774.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Bonneau, R., Strong, R. K., Aderem, A., 2007. A conserved surface on Toll-like receptor 5 recognizes bacterial flagellin. *J Exp. Med.* 204, 393 - 403.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K. D., Strobe, K. L., Barrett, S. L. R., Cookson, B. T., Logan, S. M., Aderem, A., 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9247 - 9252.
- Arora, S. K., Bangera, M., Lory, S., Ramphal, R., 2001. A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9342 - 9347.
- Arora, S. K., Neely, A. N., Blair, B., Lory, S., Ramphal, R., 2005. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect. Immun.* 73, 4395 - 4398.
- Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S., Ramphal, R., 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol.* 179, 5574 - 5581.
- Arora, S. K., Wolfgang, M. C., Lory, S., Ramphal, R., 2004. Sequence polymorphism in the glycosylation island and flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 186, 2115 - 2122.
- Auvray, F., Thomas, J., Fraser, G. M., Hughes, C., 2001. Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *Journal of Molecular Biology* 308, 221 - 229.
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C. B., Engel, J. N., Tolker-Nielsen, T., 2008. Roles of type IV pili,

- flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 10, 2331 - 2343.
- Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjeesingh, M., Riordan, J. R., 1992. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68, 809 - 818.
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., Manresa, A., 2004. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 1 - 8.
- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V., Jadeja, L., 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5, 279 - 313.
- Boles, B. R., Thoendel, M., Singh, P. K., 2005. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology* 57, 1210 - 1223.
- Boman, H. G., 2000. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol. Rev.* 173, 5 - 16.
- Boman, H. G., 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern. Med.* 254, 197 - 215.
- Bonfield, T. L., Panuska, J. R., Konstan, M. W., Hilliard, K. A., Hilliard, J. B., Ghnaim, H., Berger, M., 1995. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am. J Respir. Crit Care Med.* 152, 2111 - 2118.
- Borregaard, N., Theilgaard-Monch, K., Cowland, J. B., Stahle, M., Sorensen, O. E., 2005. Neutrophils and keratinocytes in innate immunity--cooperative actions to provide antimicrobial defense at the right time and place. *J Leukoc Biol* 77, 439 - 443.
- Brint, J. M. und Ohman, D. E., 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol.* 177, 7155 - 7163.
- Brogden, K. A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238 - 250.
- Bromley, S. K., Mempel, T. R., Luster, A. D., 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol.* 9, 970 - 980.
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q., O'Toole, G. A., 2005. Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187, 7351 - 7361.
- Cardoso, L. S., Araujo, M. I., Goes, A. M., Pacifico, L. G., Oliveira, R. R., Oliveira, S. C., 2007. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb. Cell Fact.* 6, 1 -
- Cianciotto, N. P., 2005. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* 13, 581 - 588.
- Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H. E., Hoiby, N., 2005. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2276 - 2282.

- Clifford, J. S., Ioannidis, M. A., Legge, R. L., 2007. Enhanced aqueous solubilization of tetrachloroethylene by a rhamnolipid biosurfactant. *J Colloid Interface Sci.* 305, 361 - 365.
- Cobb, L. M., Mychaleckyj, J. C., Wozniak, D. J., Lopez-Boado, Y. S., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin and Alginate Elicit Very Distinct Gene Expression Patterns in Airway Epithelial Cells: Implications for Cystic Fibrosis Disease. *J Immunol* 173, 5659 - 5670.
- Cogen, A. L., Nizet, V., Gallo, R. L., 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br. J Dermatol.* 158, 442 - 455.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711 - 745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318 - 1322.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M. C., Goodman, A. L., Arora, S. K., Jyot, J., Lory, S., Ramphal, R., 2003. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 50, 809 - 824.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., O'Toole, G. A., 2003. Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 185, 1027 - 1036.
- de Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M. C., Puchelle, E., 1996. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* 64, 1582 - 1588.
- De Kievit, T. R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B. H., 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1865 - 1873.
- Deziel, E., Lepine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A., Villemur, R., 1999. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. Biophys. Acta* 1440, 244 - 252.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., Villemur, R., 2000. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1485, 145 - 152.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., Villemur, R., 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005 - 2013.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., Bisailon, J., 1996. Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1908 - 1912.
- DiMango, E., Ratner, A. J., Bryan, R., Tabibi, S., Prince, A., 1998. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin. Invest* 101, 2598 - 2605.

- DiMango, E., Zar, H. J., Bryan, R., Prince, A., 1995. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J. Clin. Invest* 96, 2204 - 2210.
- Du, J. W., Zhang, F., Capo-Aponte, J. E., Tachado, S. D., Zhang, J., Yu, F. S., Sack, R. A., Koziel, H., Reinach, P. S., 2006. AsialoGM1-mediated IL-8 release by human corneal epithelial cells requires coexpression of TLR5. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4810 - 4818.
- Duan, K. und Surette, M. G., 2007. Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J. Bacteriol.* 189, 4827 - 4836.
- England, J. C. und Gober, J. W., 2001. Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 674 - 680.
- Ernst, R. K., Yi, E. C., Guo, L., Lim, K. B., Burns, J. L., Hackett, M., Miller, S. I., 1999. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286, 1561 - 1565.
- Espinosa-Urgel, M., 2003. Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J. Bacteriol.* 185, 699 - 700.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., Prince, A., 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* 66, 43 - 51.
- Franchi, L., Stoolman, J., Kanneganti, T. D., Verma, A., Ramphal, R., Nunez, G., 2007. Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur. J. Immunol.* 37, 3030 - 3039.
- Gallo, R. C., 1971. Reverse transcriptase, the DNA polymerase of oncogenic RNA viruses. *Nature* 234, 194 - 198.
- Gambello, M. J., Kaye, S., Iglewski, B. H., 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.* 61, 1180 - 1184.
- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 710 - 720.
- Garrett, E. S., Perlegas, D., Wozniak, D. J., 1999. Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *J. Bacteriol.* 181, 7401 - 7404.
- Gewirtz, A. T., Simon, P. O., Jr., Schmitt, C. K., Taylor, L. J., Hagedorn, C. H., O'Brien, A. D., Neish, A. S., Madara, J. L., 2001. *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J. Clin. Invest* 107, 99 - 109.
- Gilligan, P. H., 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 35 - 51.
- Giron, J. A., Torres, A. G., Freer, E., Kaper, J. B., 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 44, 361 - 379.
- Gläser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M., 2005. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection. *Nat. Immunol* 6, 57 - 64.

- Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Folster-Holst, R., Proksch, E., Schroder, J. M., Schwarz, T., 2008. The Antimicrobial Protein Psoriasin (S100A7) Is Upregulated in Atopic Dermatitis and after Experimental Skin Barrier Disruption. *J Invest Dermatol*
- Gould, I. M. und Wise, R., 1985. *Pseudomonas aeruginosa*: clinical manifestations and management. *Lancet* 2, 1224 - 1227.
- Govan, J. R. und Deretic, V., 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60, 539 - 574.
- Gröne, A., 2002. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 88, 1 - 12.
- Guerra-Santos, L., Kappeli, O., Fiechter, A., 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 301 - 305.
- Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante, M. R., Manresa, A., 2002. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol. Bioeng.* 81, 316 - 322.
- Hale, J. D. und Hancock, R. E., 2007. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 5, 951 - 959.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M., 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861 -
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., Schröder, J. M., 2001. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 276, 5707 - 5713.
- Harder, J., Gläser, R., Schröder, J. M., 2007. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J Endotoxin. Res.* 13, 317 - 338.
- Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., Schröder, J. M., 2000. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 714 - 721.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., Aderem, A., 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099 - 1103.
- Helvaci, S. S., Peker, S., Ozdemir, G., 2004. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 35, 225 - 233.
- Henry, R. L., Mellis, C. M., Petrovic, L., 1992. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 12, 158 - 161.
- Hentzer, M., Teitzel, G. M., Balzer, G. J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M., Parsek, M. R., 2001. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol.* 183, 5395 - 5401.
- Herman, D. C., Artiola, J. F., Miller, R. M., 1995. Removal of Cadmium, Lead, and Zinc From Soil by A Rhamnolipid Biosurfactant. *Environmental Science & Technology* 29, 2280 - 2285.

- Heukeshoven, J. und Dernick, R., 1988. Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in Phastsystem Development Unit .1. Staining of Sodium Dodecyl-Sulfate Gels. *Electrophoresis* 9, 28 - 32.
- Heyd, M., Kohnert, A., Tan, T. H., Nusser, M., Kirschhofer, F., Brenner-Weiss, G., Franzreb, M., Berensmeier, S., 2008. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1579 - 1590.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Jr., Ezekowitz, R. A., 1999. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* 284, 1313 - 1318.
- Holder, I. A., Neely, A. N., Frank, D. W., 2001. Type III secretion/intoxication system important in virulence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in burns. *Burns* 27, 129 - 130.
- Holloway, B. W. und Morgan, A. F., 1986. Genome organization in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 79 - 105.
- Hoyle, B. D. und Costerton, J. W., 1991. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* 37, 91 - 105.
- Janeway, C. A., Jr. und Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197 - 216.
- Kalir, S., McClure, J., Pabbaraju, K., Southward, C., Ronen, M., Leibler, S., Surette, M. G., Alon, U., 2001. Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science* 292, 2080 - 2083.
- Kantari, C., Pederzoli-Ribeil, M., Witko-Sarsat, V., 2008. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib. Microbiol.* 15, 118 - 146.
- Katsui, N., Tsuchido, T., Hiramatsu, R., Fujikawa, S., Takano, M., Shibasaki, I., 1982. Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 151, 1523 - 1531.
- Kawai, T. und Akira, S., 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 338 - 344.
- Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal Infect.* 36, 78 - 91.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aes-Jorgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 48, 1511 - 1524.
- Koch, A. K., Kappeli, O., Fiechter, A., Reiser, J., 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173, 4212 - 4219.
- Koch, C. und Hoiby, N., 1993. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341, 1065 - 1069.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C., Pechere, J. C., 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182, 5990 - 5996.

- Komoriya, K., Shibano, N., Higano, T., Azuma, N., Yamaguchi, S., Aizawa, S. I., 1999. Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 34, 767 - 779.
- Kownatzki, R., Tummler, B., Doring, G., 1987. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1, 1026 - 1027.
- Krisanaprakornkit, S., Kimball, J. R., Weinberg, A., Darveau, R. P., Bainbridge, B. W., Dale, B. A., 2000. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. *Infect. Immun.* 68, 2907 - 2915.
- Lang, S. und Wullbrandt, D., 1999. Rhamnose lipids--biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 22 - 32.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., Lazdunski, A., 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21, 1137 - 1146.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., Kong, F., 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol. Med.* 10, 599 - 606.
- Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M., Shapiro, L., 2000. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* 290, 2144 - 2148.
- Lebre, M. C., van der Aar, A. M., van Baarsen, L., van Capel, T. M., Schuitemaker, J. H., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C., 2007. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol.* 127, 331 - 341.
- Lebre, M. C., van der Aar, A. M. G., van Baarsen, L., van Capel, T. M. M., Schuitemaker, J. H. N., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C., 2006. Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol* 127, 331 - 341.
- Lee, M. T., Hung, W. C., Chen, F. Y., Huang, H. W., 2008. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 5087 - 5092.
- Lee, S. K., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S. I., Suerbaum, S., Josenhans, C., 2003. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect.* 5, 1345 - 1356.
- Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., Jeffers, A. K., 2005. The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- γ -Mediated Macrophage Killing. *J Immunol* 175, 7512 - 7518.
- Leitao, J. H. und Sa-Correia, I., 1995. Growth-phase-dependent alginate synthesis, activity of biosynthetic enzymes and transcription of alginate genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* 163, 217 - 222.
- Lequette, Y. und Greenberg, E. P., 2005. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol.* 187, 37 - 44.
- Lillehoj, E. P., Kim, B. T., Kim, K. C., 2002. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 282, L751 - L756.

- Liu, A. Y., Destoumieux, D., Wong, A. V., Park, C. H., Valore, E. V., Liu, L., Ganz, T., 2002. Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation. *J Invest Dermatol.* 118, 275 - 281.
- Liu, P. V., MATSUMOTO, H., KUSAMA, H., Bergant, T., 1983. Survey of Heat-Stable, Major Somatic Antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Syst Bacteriol* 33, 256 - 264.
- Macnab, R. M., 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 77 - 100.
- Macnab, R. M., 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1694, 207 - 217.
- Makinoshima, H., Aizawa, S., Hayashi, H., Miki, T., Nishimura, A., Ishihama, A., 2003. Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 185, 1338 - 1345.
- Massion, P. P., Inoue, H., Richman-Eisenstat, J., Grunberger, D., Jorens, P. G., Housset, B., Pittet, J. F., Wiener-Kronish, J. P., Nadel, J. A., 1994. Novel *Pseudomonas* product stimulates interleukin-8 production in airway epithelial cells in vitro. *J. Clin. Invest* 93, 26 - 32.
- Matsukawa, M. und Greenberg, E. P., 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 186, 4449 - 4456.
- May, T. B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Berry, A., Rothmel, R. K., ., 1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 191 - 206.
- McNamara, N., Gallup, M., Sucher, A., Maltseva, I., McKemy, D., Basbaum, C., 2006. AsialoGM1 and TLR5 cooperate in flagellin-induced nucleotide signaling to activate Erk1/2. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol* 34, 653 - 660.
- McNamara, N., Khong, A., McKemy, D., Caterina, M., Boyer, J., Julius, D., Basbaum, C., 2001. ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9086 - 9091.
- McSweegan, E. und Walker, R. I., 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect. Immun.* 53, 141 - 148.
- Medina, G., Juarez, K., Soberon-Chavez, G., 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB Operon Is Not Expressed during the Logarithmic Phase of Growth Even in the Presence of Its Activator RhIR and the Autoinducer N-Butyryl-Homoserine Lactone. *J. Bacteriol.* 185, 377 - 380.
- Miao, E. A., Andersen-Nissen, E., Warren, S. E., Aderem, A., 2007. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* 29, 275 - 288.
- Miao, E. A., Ernst, R. K., Dors, M., Mao, D. P., Aderem, A., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* activates caspase 1 through Ipaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 2562 - 2567.
- Miller, W. L., Matewish, M. J., McNally, D. J., Ishiyama, N., Anderson, E. M., Brewer, D., Brisson, J. R., Berghuis, A. M., Lam, J. S., 2008. Flagellin glycosylation in *Pseudomonas aeruginosa* PAK requires the O-antigen biosynthesis enzyme WbpO. *J Biol. Chem.* 283, 3507 - 3518.

- Mittal, R., Sharma, S., Chhibber, S., Harjai, K., 2008. Iron dictates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in urinary tract infections. *J Biomed. Sci.* 15, 731 - 741.
- Montie, T. C., Craven, R. C., Holder, I. A., 1982a. Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: isolation and characterization. *Infect. Immun.* 35, 281 - 288.
- Montie, T. C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R. C., Holder, I. A., 1982b. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect. Immun.* 38, 1296 - 1298.
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., Gibbs, B. F., 2001. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J Hazard. Mater.* 85, 111 - 125.
- Muzio, M., Natoli, G., Sacconi, S., Levrero, M., Mantovani, A., 1998. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp. Med.* 187, 2097 - 2101.
- Nikaido, H. und Vaara, M., 1985. Molecular-Basis of Bacterial Outer-Membrane Permeability. *Microbiological Reviews* 49, 1 - 32.
- Nitschke, M., Costa, S. G., Contiero, J., 2005. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.* 21, 1593 - 1600.
- Niyonsaba, F., Hirata, M., Ogawa, H., Nagaoka, I., 2003. Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy* 2, 224 - 231.
- Niyonsaba, F., Ogawa, H., Nagaoka, I., 2004. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 111, 273 - 281.
- Noordman, W. H. und Janssen, D. B., 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4502 - 4508.
- O'Toole, G. A. und Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30, 295 - 304.
- Ochoa-Repáraz, Sesma B., Álvarez M., Renedo M.J., Irache J.M., Gamazo M., 2004. Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella Enteritidis* against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Veterinary Research* 35, 291 - 298.
- Ochsner, U. A. und Reiser, J., 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 6424 - 6428.
- Ogushi, K., Wada, A., Niidome, T., Mori, N., Oishi, K., Nagatake, T., Takahashi, A., Asakura, H., Makino, S., Hojo, H., Nakahara, Y., Ohsaki, M., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Moss, J., Hirayama, T., 2001. *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol. Chem.* 276, 30521 - 30526.
- Ogushi, K., Wada, A., Niidome, T., Okuda, T., Llanes, R., Nakayama, M., Nishi, Y., Kurazono, H., Smith, K. D., Aderem, A., Moss, J., Hirayama, T., 2004. Gangliosides act as co-receptors for *Salmonella enteritidis* FliC and promote FliC induction of human beta-defensin-2 expression in Caco-2 cells. *J Biol Chem.* 279, 12213 - 12219.

- Ojeniyi, B., 1994. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. *APMIS Suppl* 46, 1 - 44.
- Olvera, C., Goldberg, J. B., Sanchez, R., Soberon-Chavez, G., 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 179, 85 - 90.
- Ozin, A. J., Claret, L., Auvray, F., Hughes, C., 2003. The FlhS chaperone selectively binds the disordered flagellin C-terminal D0 domain central to polymerisation. *FEMS Microbiology Letters* 219, 219 - 224.
- Pamp, S. J. und Tolker-Nielsen, T., 2007. Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189, 2531 - 2539.
- Pasare, C. und Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection* 6, 1382 - 1387.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P., 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 197 - 201.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P., 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1490 - 1494.
- Pedersen, S. S., Hoiby, N., Espersen, F., Koch, C., 1992. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax* 47, 6 - 13.
- Pedersen, S. S., Kharazmi, A., Espersen, F., Hoiby, N., 1990. *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response. *Infect. Immun.* 58, 3363 - 3368.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., Iglewski, B. H., 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 179, 3127 - 3132.
- Pivarcsi, A., Nagy, I., Koreck, A., Kis, K., Kenderessy-Szabo, A., Szell, M., Dobozy, A., Kemeny, L., 2005. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human [beta]-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes and Infection* 7, 1117 - 1127.
- Prakash, B., Veeregowda, B. M., Krishnappa, G., 2003. Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Current Science* 85, 1299 - 1307.
- Rahman, K. S., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., Banat, I. M., 2002. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnol. Prog.* 18, 1277 - 1281.
- Ramos, H. C., Rumbo, M., Sirard, J. C., 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 12, 509 - 517.
- Ramphal, R. und Arora, S. K., 2001. Recognition of mucin components by *Pseudomonas aeruginosa*. *Glycoconj. J* 18, 709 - 713.
- Ramphal, R., Arora, S. K., Ritchings, B. W., 1996. Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J Respir. Crit Care Med.* 154, S170 - S174.

- Rendell, N. B., Taylor, G. W., Somerville, M., Todd, H., Wilson, R., Cole, P. J., 1990. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1045, 189 - 193.
- Rochon, M. und Romling, U., 2006. Flagellin in combination with curli fimbriae elicits an immune response in the gastrointestinal epithelial cell line HT-29. *Microbes and Infection* 8, 2027 - 2033.
- Rolston, K. V. und Bodey, G. P., 1992. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cancer patients. *Cancer Invest* 10, 43 - 59.
- Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Namba, K., 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* 410, 331 - 337.
- Sanchez-Velazquez, L. D., Ponce de Leon, R. S., Rangel Frausto, M. S., 2006. The burden of nosocomial infection in the intensive care unit: Effects on organ failure, mortality and costs. A nested case-control study. *Arch. Med. Res.* 37, 370 - 375.
- Sandkvist, M., 2001. Type II secretion and pathogenesis. *Infect. Immun.* 69, 3523 - 3535.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 184, 1140 - 1154.
- Schägger, H., 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protocols* 1, 16 - 22.
- Schirm, M., Schoenhofen, I. C., Logan, S. M., Waldron, K. C., Thibault, P., 2005. Identification of unusual bacterial glycosylation by tandem mass spectrometry analyses of intact proteins. *Anal. Chem.* 77, 7774 - 7782.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T. A., Stange, E. F., Fellermann, K., 2007. Induction of Human β -Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infect. Immun.* 75, 2399 - 2407.
- Schröder, J. M., 1999. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* 57, 121 - 134.
- Schröder, J. M. und Harder, J., 2006. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 63, 469 - 486.
- Schröder, J. M. und Harder, J., 1999. Human beta-defensin-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 645 - 651.
- Schuster, A., Haarmann, A., Wahn, V., 1995. Cytokines in neutrophil-dominated airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 252 Suppl 1, S59 - S60.
- Schuster, M. und Greenberg, P. E., 2006. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 73 - 81.
- Scott, M. G., Vreugdenhil, A. C., Buurman, W. A., Hancock, R. E., Gold, M. R., 2000. Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J Immunol.* 164, 549 - 553.

- Seed, P. C., Passador, L., Iglewski, B. H., 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol.* 177, 654 - 659.
- Seelen, M. A., Roos, A., Daha, M. R., 2005. Role of complement in innate and autoimmunity. *J. Nephrol.* 18, 642 - 653.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F. L., 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16, 869 - 871.
- Shreve, G. S., Inguva, S., Gunnam, S., 1995. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Mar. Biol Biotechnol.* 4, 331 - 337.
- Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O., Welsh, M. J., Greenberg, E. P., 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407, 762 - 764.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L. R., Cookson, B. T., Aderem, A., 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4, 1247 - 1253.
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F., Deziel, E., 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 718 - 725.
- Sotirova, A., Spasova, D., Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., 2007. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research* In Press, Corrected Proof,
- Spangenberg, C., Heuer, T., Burger, C., Tummeler, B., 1996. Genetic diversity of flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* 396, 213 - 217.
- Spiers, A. J., Buckling, A., Rainey, P. B., 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146 (Pt 10), 2345 - 2350.
- Sticherling, M., Bornscheuer, E., Schroder, J. M., Christophers, E., 1991. Localization of Neutrophil-Activating Peptide-1 Interleukin-8-Immunoreactivity in Normal and Psoriatic Skin. *Journal of Investigative Dermatology* 96, 26 - 30.
- Sutherland, I. W., 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9, 222 - 227.
- Sutterwala, F. S., Mijares, L. A., Li, L., Ogura, Y., Kazmierczak, B. I., Flavell, R. A., 2007. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J Exp. Med.* 204, 3235 - 3245.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S., 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 335 - 376.
- Tallant, T., Deb, A., Kar, N., Lupica, J., de Veer, M. J., DiDonato, J. A., 2004. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC. Microbiol.* 4, 33 -

- Tart, A. H., Blanks, M. J., Wozniak, D. J., 2006. The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J Bacteriol.* 188, 6483 - 6489.
- Tart, A. H., Wolfgang, M. C., Wozniak, D. J., 2005. The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ. *J Bacteriol.* 187, 7955 - 7962.
- Toder, D. S., Gambello, M. J., Iglewski, B. H., 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol. Microbiol.* 5, 2003 - 2010.
- Tramper-Stranders, G. A., van der Ent, C. K., Wolfs, T. F., Kimpen, J. L., Fleer, A., Johansen, U., Johansen, H. K., Hoiby, N., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* diversity in distinct paediatric patient groups. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 935 - 941.
- Tremblay, J., Richardson, A. P., Lepine, F., Deziel, E., 2007. Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ. Microbiol.* 9, 2622 - 2630.
- Tsuchido, T., Katsui, N., Takeuchi, A., Takano, M., Shibasaki, I., 1985. Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 298 - 303.
- Uchi, H., Terao, H., Koga, T., Furue, M., 2000. Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol. Sci.* 24 Suppl 1, S29 - S38.
- Urum, K. und Pekdemir, T., 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57, 1139 - 1150.
- van Delden, C. und Iglewski, B. H., 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 551 - 560.
- Verma, A., Schirm, M., Arora, S. K., Thibault, P., Logan, S. M., Ramphal, R., 2006. Glycosylation of b-Type flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*: structural and genetic basis. *J Bacteriol.* 188, 4395 - 4403.
- Verma, A., Arora, S. K., Kuravi, S. K., Ramphal, R., 2005. Roles of Specific Amino Acids in the N Terminus of *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin and of Flagellin Glycosylation in the Innate Immune Response. *Infect. Immun.* 73, 8237 - 8246.
- Vincent, J. L., Bihari, D. J., Suter, P. M., Bruining, H. A., White, J., Nicolas-Chanoin, M. H., Wolff, M., Spencer, R. C., Hemmer, M., 1995. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 274, 639 - 644.
- Wagner, V. E. und Iglewski, B. H., 2008. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 35, 124 - 134.
- Wehkamp, K., Schwichtenberg, L., Schröder, J. M., Harder, J., 2006. *Pseudomonas aeruginosa*- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J Invest Dermatol.* 126, 121 - 127.
- West, A. P., Dancho, B. A., Mizel, S. B., 2005. Gangliosides inhibit flagellin signaling in the absence of an effect on flagellin binding to toll-like receptor 5. *J Biol Chem.* 280, 9482 - 9488.

- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L., Salmond, G. P. C., 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 365 - 404.
- Wolfgang, M. C., Jyot, J., Goodman, A. L., Ramphal, R., Lory, S., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6664 - 6668.
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J. O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., Parsek, M. R., 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PNAS* 100, 7907 - 7912.
- Yahr, T. L., Goranson, J., Frank, D. W., 1996. Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol. Microbiol.* 22, 991 - 1003.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., Oppenheim, J. J., 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286, 525 - 528.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., Namba, K., 2002. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res. Microbiol.* 153, 191 - 197.
- Zeng, H., Carlson, A. Q., Guo, Y., Yu, Y., Collier-Hyams, L. S., Madara, J. L., Gewirtz, A. T., Neish, A. S., 2003. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. *J Immunol.* 171, 3668 - 3674.
- Zhang, Y. und Miller, R. M., 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2101 - 2106.
- Zlotnik, A. und Yoshie, O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12, 121 - 127.
- Zulianello, L., Canard, C., Kohler, T., Caille, D., Lacroix, J. S., Meda, P., 2006. Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74, 3134 - 3147.
- Zumft, W. G., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 533 - 616.

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Schröder für die Bereitstellung des interessanten Themas. Sein großes Interesse und seine Diskussionsbereitschaft waren mir eine große Hilfe und führten zu vielen konstruktiven Ideen.

Frau Prof. Schmitz-Streit danke ich herzlich für ihr Interesse und die Betreuung dieser Arbeit.

Mein ganz großer Dank geht an Uli, meinem Mitstreiter bei der „Induktorsaga“, für die langen Diskussionen und neuen Ideen sowie für die geduldige Durchsicht meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Claudia, Jutta und Anke für Unterstützung bei der Durchführung von HPLC-Analysen sowie Ulf Meyer-Hoffert bei der Immunhistochemie. Joachim danke ich für die Hilfe bei den massenspektrometrischen Analysen und Auswertungen.

Ein ganz großer Dank geht auch an meine „Leidensgenossen“ Britta und Kerstin, die immer helfend zur Stelle waren und viel Humor in den Laboralltag gebracht haben.

Allgemein möchte ich mich bei allen anderen Kollegen des 6. Stocks bedanken, die immer für ein tolles Arbeitsklima gesorgt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Dani, die immer großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt hat und mich in jeder Situation mit Geduld und Verständnis unterstützt hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir die Möglichkeit zum Studium gegeben haben und mich immer unterstützt haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Manfred Czapp
Adresse: Knorrstraße 14a
Geburtstag: 18.08.1977
Geburtsort: Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Heinrich-von-Stephan-Schule in Kiel
1988-1997 Hebbelschule Kiel (Abitur)

Zivildienst

1997-1998 Katholische Studentengemeinde „Haus Michael“, Kiel

Weiterer Bildungsweg

1998-2004 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Aug. 2004 Biologie-Diplom (Mikrobiologie, Zellbiologie, Toxikologie)
Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie an der CAU (PD. Dr. Hausner) mit dem Thema: „Charakterisierung des archaellen Elongationskomplexes“
Okt. 2004- Jun. 2005 Studium der Informatik an der CAU zu Kiel
Seit Jun. 2005 Beginn der Doktorarbeit an der Hautklinik Kiel (Prof. J-M. Schröder; offizielle Betreuung durch Prof. Schmitz-Streit)
Thema: **Untersuchungen zur epithelialen Abwehr durch *Pseudomonas aeruginosa***

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir erwähnten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche haben nicht vorgelegen.

Teilpublikationen der vorliegenden Arbeit:

Gerstel, U., **Czapp, M.**, Bartels J. & Schröder, J-M: Rhamnolipid induced shedding of flagellin from *P. aeruginosa* provokes hBD-2 and IL-8 response in human keratinocytes. Manuskript in review (Cellular Microbiology).

Czapp, M., Schwichtenberg, L., Gerstel, U. and Schröder, J.: Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* secretes a novel IL-8 inducing pathogen-associated molecule. *Experimental Dermatology*, 16, 239

Gerstel,U., **Czapp, M.**, and Schröder, J.: The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum sensing system is involved in the induction in hBD-2 in human epithelial cells. *Experimental Dermatology*, 16, 239

Kiel, den

Manfred Czapp