

**Studien zur Erkennung und Biogenese von Chitin
mit Hilfe des *Streptomyces olivaceoviridis*
chitinbindenden Proteins CHB1**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

des Fachbereiches Biologie/Chemie
der Universität Osnabrück

vorgelegt von
Krzysztof Włodzimierz Siemieniewicz

Dezember 2004

Dekan:
1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Jürgen Heinisch
Prof. Dr. Hildgund Schrepf
Prof. Dr. Jürgen Hofemeister

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIALIEN UND METHODEN	12
2.1. Chemikalien und Enzyme	12
2.2. Bakterienstämme	14
2.3. Plasmide	15
2.4. Oligonukleotide	16
2.5. Nährmedien	17
2.6. Mikrobiologische Methoden	21
2.6.1. Kulturbedingungen und Stammhaltung von <i>E. coli</i>	21
2.6.2. Kulturbedingungen und Stammhaltung von Streptomycceten	21
2.6.3. Kulturbedingungen von Pilzen	22
2.7. Biochemische Methoden	22
2.7.1. Gewinnung der Proteine aus <i>E. coli</i> Periplasma	22
2.7.2. Gewinnung der Proteine aus <i>E. coli</i> Rohextrakten	23
2.7.3. Gewinnung eines Proteins aus <i>S. lividans</i> Kulturüberstand	23
2.7.4. Gewinnung eines Proteins aus Chitin- und <i>S. lividans</i> Rückstand	23
2.7.5. Reinigung von His-tag-Fusionsproteinen über Ni-NTA-Agarose	23
2.7.6. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	24
2.7.7. Ionenaustauschchromatographie	24
2.7.8. Gelfiltration	25
2.7.9. Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.7.10. <i>In vitro</i> Synthese der Chitinfasern	25
2.7.11. Test auf Bindung der Proteine an Kohlenhydratsubstrate	25
2.8. Elektrophoretische Techniken	26
2.8.1. Agarosegelelektrophorese	26
2.8.2. SDS- und native Polyacrylamidgelelektrophorese	26
2.8.3. Proteintransfer auf Membranen	26
2.9. Immunologische Nachweismethoden	27
2.9.1. Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (<i>Western Blot</i>)	27
2.9.2. Test auf Chitinsynthase-Aktivität	27
2.10. Molekulargenetische Methoden	27
2.10.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.10.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomycceten (alkalische Lyse)	28
2.10.3. Extraktion von DNA-Elementen aus Agarose-Gelen	28
2.10.4. Enzymatische <i>in vitro</i> Reaktionen von DNA	28
2.10.5. Transformation von <i>E. coli</i>	30
2.10.6. Transformation von Streptomycceten	30

2.11. Mikroskopische Methoden	30
2.11.1. Vorbereitung der Präparate für TEM-Analyse	30
2.11.2. Präparation von CHB1-Gold-Konjugaten	31
2.11.3. Immunologischer Nachweis von CHB1	31
2.11.4. Elektronenmikroskopie	31
2.11.5. Fluoreszenzmikroskopie	32
3. ERGEBNISSE	33
3.1. Gewinnung des CHB1 aus <i>E. coli</i>	33
3.2. Herstellung der verkürzten Formen des CHB1-Proteins	35
3.2.1. Klonierung der <i>chb1</i> -Mutantengene in <i>E. coli</i>	36
3.2.2. Gewinnung und Aufreinigung CHB1-Mutantenproteine	38
3.3. Interaktion der CHB1-Mutantenproteine mit Chitin	40
3.4. Untersuchung der Aggregation des CHB1-Proteins	41
3.5. Klonierung des <i>chb1</i>-Gens in Streptomyceten	45
3.6. Expressionsversuche des <i>chb1</i>-Gens in Streptomyceten	46
3.7. Gewinnung des CHB1 aus <i>S. lividans</i> Kulturfiltrat	47
3.8. CHB1 als Hilfsmittel für Chitinerkennung	48
3.8.1. <i>chb1</i> -Expression in Co-Kulturen von Streptomyceten und Pilzen	48
3.8.2. Untersuchungen zur Chitin-Biogenese in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
3.8.3. Etablierung eines Tests für Chitinsynthase-Aktivität	59
3.9. Untersuchung der Glykosylierung des CHB1-Proteins	60
4. DISKUSSION	62
5. ZUSAMMENFASSUNG	73
6. LITERATURVERZEICHNIS	75
Anhang	88

APS	Ammoniumpersulphat
bidest H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
Min.	Minute(n)
M _r	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
Ni-NTA	<i>nickel nitrotriacetic acid</i> , Nickel Nitriloessigsäure
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , n-Dodecylsulfat-Natrium-Salz (SDS)
Sec.	Sekunde(n)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	n-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

1. EINLEITUNG

Streptomyceten sind Gram-positive, aerobe Bodenbakterien, deren morphogenetische Entwicklung durch wachsende apikale Substrathyphen, die Mycelverbände bilden, gekennzeichnet ist. Unter Nährstoffmangel entstehen Lufthyphen, in denen Sporen als Dauerformen differenziert werden.

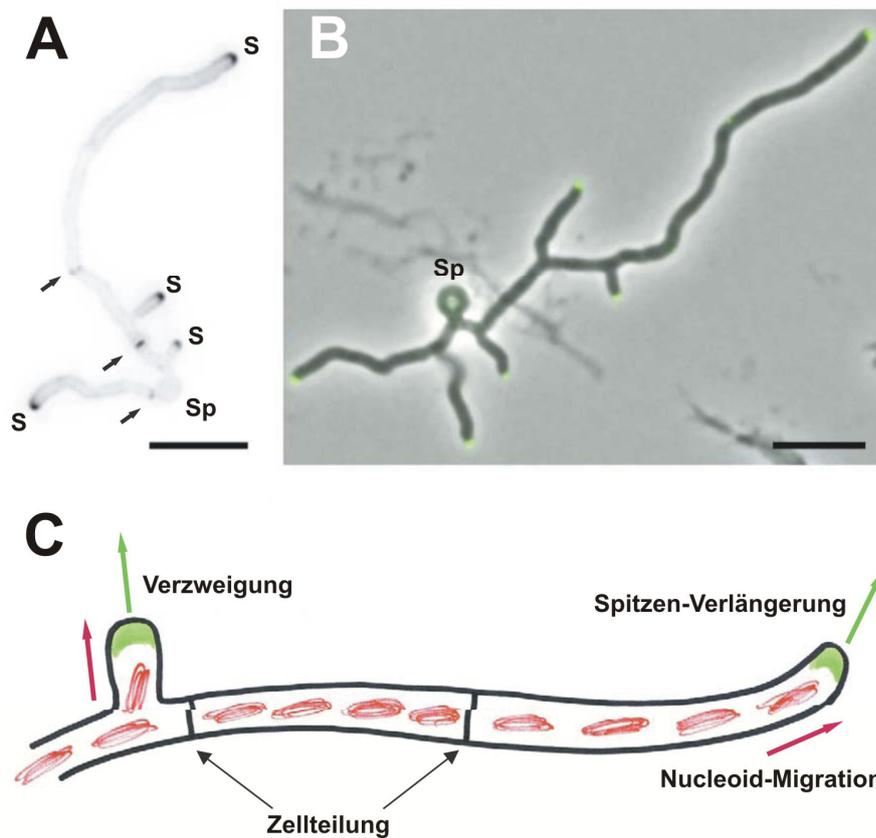


Abb. 1.1 Apikales Wachstum der Streptomyceten.

(A) Nachweis des Peptidoglycaneinbaus im Mycel von *Streptomyces coelicolor* mithilfe von fluoreszenzmarkiertem Vankomycin. (B) Lokalisierung des für die Verlängerung der Spitzen essentiellen DivIVASC-EGFP-Proteins (grün) in naszierendem Mycel. (C) Vereinfachte Darstellung des polarisierten Mycelienwachstums – Erläuterung im Text; (s) Mycelspitzen, (Sp) Ursprungsspore; Maßstab, 5 μm [Flardh, 2003; verändert].

Das etwa 8 Mb große, lineare Chromosom besteht in 71-76 % aus G/C-Regionen [Kieser *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1993; Leblond *et al.*, 1993; Redenbach *et al.*, 1996]. Streptomyceten enthalten auch viele lineare Plasmide. Die DNA-Replikation wird in zentral vorliegender *oriC*-Region initiiert und erfolgt bidirektional [Vöggtli *et al.*, 1994; Musialowski *et al.*, 1994]. An den linearen Enden sind TP-Proteine (*terminal proteins*) gebunden, die für die Replikation der Endbereiche verantwortlich sind [Bao und Cohen, 2001; Yang *et al.*, 2002]. Hierbei spielt das 80 kDa Tap-Protein (*telomer-associated protein*) eine essenzielle Rolle, indem es an spezifische Sequenzen in 3'-Überhängen bindet und für den Kontakt zwischen TP und dem Telomersende sorgt [Bao und Cohen, 2003].

Nach wiederholter Replikation sind die Kopien der chromosomalen DNA innerhalb der überwiegend nicht septierten Hyphen gleichmäßig verteilt. Dieses Phänomen wurde zwar bisher nicht ausreichend untersucht, offensichtlich findet hier jedoch, ähnlich wie bei Fadenpilzen, eine Migration statt (Abb. 1.1 C) [Xiang und Morris, 1999; Flardh, 2003].

Im Gegensatz zu anderen Prokaryoten, findet die Zellwandsynthese nur an den Spitzen der Streptomyceten-Hyphen statt. Durch Septenbildung verlieren die subapikalen Regionen des Mycels ihre Wachstumsfähigkeit solange, bis eine neue Verzweigung gebildet werden kann (Abb. 1.1 C). Je weiter von den Mycelspitzen entfernt, umso robuster wird das Zellwandmaterial, welches mit der Zeit seine Flexibilität verliert. So wird die Verlängerung des Spitzenbereiches hauptsächlich durch Turgorkräfte angetrieben [Prosser und Tough, 1991; Miguélez *et al.*, 1992; Koch, 1995; Goriely und Tabor, 2003; Flardh, 2003]. Die molekularen Mechanismen dieses Prozesses sind noch unklar.



Abb. 1.2 Der Beginn der Sporulation von *S. coelicolor*.
Querschnitt durch eine Luftmycel-Hyphe [Flardh, 2003].

Innerhalb der Lufthyphen erfolgt eine häufige Septenbildung. Diese führt zu Kompartimenten, die meistens eine Kopie der chromosomalen DNA enthalten und zu Sporen differenziert werden.

Für die korrekte Verteilung der chromosomalen DNA sind die ParA und ParB Proteine verantwortlich. In der *oriC*-Region wurden zahlreiche *parS*-Stellen gefunden, die von dem ParB-Protein spezifisch erkannt und gebunden werden [Kim *et al.*, 2000; Yang und Losick, 2001; Jakimowicz *et al.*, 2002].

Wie bei anderen Bakterien, sind auch bei Streptomycceten an der Septenbildung Fts-Proteine beteiligt. FtsZ, ein Tubulin-Homolog, assembliert in Form eines Z-Ringes, der die Stelle für die zukünftige Septenbildung markiert. Mehrere Membranproteine (FtsQ, FtsL, DivIC, FtsW, FtsI) verknüpfen den Z-Ring mit dem Peptidoglycan des neu entstehenden Septums. Allerdings sind die Proteine, die für die Steuerung der FtsZ-Assemblierung verantwortlich sind, bisher unbekannt. Weder FtsA, noch ZipA von *E. coli* oder ZapA und EzrA von *B. subtilis* konnten bei Streptomycceten nachgewiesen werden [Gueiros-Filho und Losick, 2002; Errington *et al.*, 2003].

Dank der hervorragenden Anpassung an das Habitat stellen sie, mit einem Anteil von mehr als 50 %, die größte Gruppe der im Boden lebenden Mikroorganismen dar. So lassen sich aus einem Gramm Erde bis zu 10^8 Streptomycceten isolieren [Alexander, 1977; Leblond *et al.*, 1993].

Mit ihrem großen Repertoire von Sekundärmetaboliten haben Streptomycceten eine sehr hohe wirtschaftliche und medizinische Bedeutung. Hierbei sind unter anderem Herbizide, Fungizide, Insektizide, Zytostatika, Enzym-Inhibitoren und insbesondere Antibiotika zu erwähnen [Okami und Hotta, 1988]. Sie liefern über 60 % aller bekannten antibiotisch wirkenden Substanzen.

Da Streptomycceten über vielfältige extrazelluläre Enzyme verfügen, sind sie in der Lage, verschiedene Naturstoffe abzubauen, die sonst nur schwer zugänglich sind. Hinzu gehören: Proteine, Nukleinsäuren, Lipide, Cellulose, Stärke, Xylan und Chitin. Für Streptomycceten stellt das Chitin, aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung (Acetylaminogruppe an C-2-Position), nicht nur eine Kohlen-, sondern auch eine wichtige Stickstoff-Quelle dar [Kutzner, 1981; Peczyńska-Czoch und Mordarski, 1988]. Daher kommen *Streptomycces*-Spezies

bevorzugt in chitinhaltigen Ökosystemen vor, wo sie nicht nur für den Abbau der organischen Makromoleküle sorgen, sondern auch, durch Bekämpfung von chitinhaltigen Pathogenen, ihre Rolle in den Biokontroll-Prozessen ausüben.

Chitin ist nach Cellulose das zweithäufigste natürliche Polymer in der Biosphäre. Da jährlich etwa $2,3 \times 10^{13}$ kg Chitin umgesetzt werden [Muzzarelli, 1999], hauptsächlich ($2,3 \times 10^{12}$ kg) in marinen Ökosystemen [Jeuniaux und Voss-Foucart, 1991] ist es von großer industriellen Bedeutung. Sowohl Chitin als auch sein deacetyliertes Derivat Chitosan (Abb. 1.3) finden viele Anwendungsgebiete. Sie werden unter anderem in der Landwirtschaft, Pharma-, Lebensmittel-, Zellulosepapierindustrie sowie in der Biotechnologie, Forschung und im Umweltschutz eingesetzt.

Das Polysaccharid besteht aus β -1,4-glycosidisch verknüpften *N*-Acetylglucosamin-Untereinheiten (NAG). Die Länge der Ketten von Chitin verschiedener Organismen variiert; so wurden Stränge aus etwa 100 Einheiten bei Hefen [Kang *et al.*, 1984] und bis zu 8.000 Einheiten bei einigen Krabbenspezies gefunden [Hackman und Goldberg, 1974]. Sie kann sich auch innerhalb eines Organismus unterscheiden, da sie unter anderem von dem Entwicklungsstadium abhängig ist.

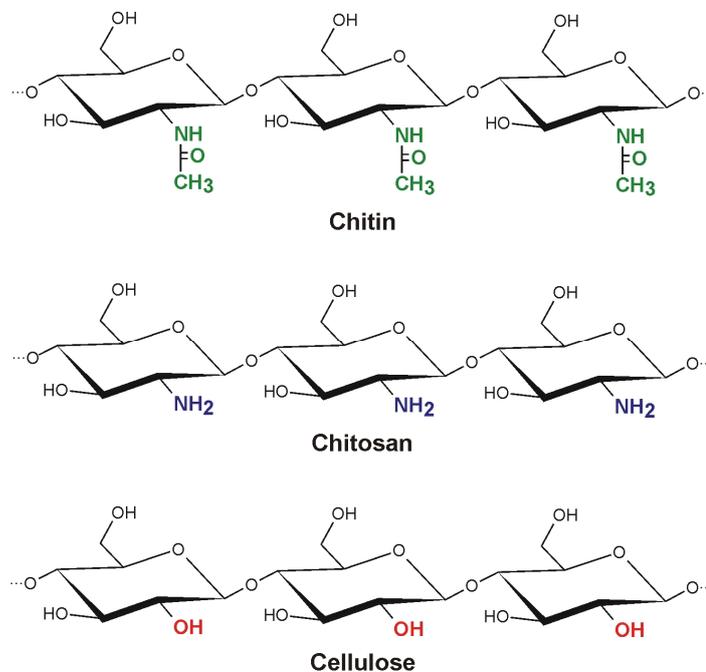


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Strukturen von Chitin, Chitosan und Cellulose.

Chitin kann als ein Cellulose-Derivat betrachtet werden (Substituierung der C-2-Hydroxygruppe durch eine Acetaminogruppe, siehe Abb. 1.3). Ähnlich wie bei Cellulose, sind Polymerketten in Form der so genannten Microfibrillen assoziiert [Gooday, 1979]. Die Carbonyl- und Aminogruppen der Stränge sind durch zahlreiche intermolekulare Wasserstoffbrücken sowie Van-der-Waals-Kräfte verbunden, apolare Bereiche dagegen sind nach außen exponiert [Minke und Blackwell, 1978]. Darüber hinaus sind Microfibrillen in einer helicoidalen Gestaltung assoziiert [Bouligand, 1965]. Der so erhaltene Aufbau des Chitins resultiert in einer kristallinen Form, wodurch die schlechte Löslichkeit dieses Polysaccharides in Wasser und vielen anderen Lösungsmitteln zu erklären ist.

Je nach Art der Assoziation der linearen Makromoleküle, unterscheidet man kristallographisch zwei dominante polymorphe Formen des Chitins (Abb. 1.4). Das antiparallele Arrangement [Carlstrom, 1957] in dem häufiger vorkommenden α -Chitin [Muzzarelli, 1977] führt zu einer kompakten Struktur, die über erhebliche Festigkeit verfügt und selbst in verdünnten anorganischen Säuren sowie in den meisten organischen Lösungsmitteln nicht zu solubilisieren ist. Das α -Chitin wird von Protozoen und Arthropoden als Gerüstsubstanz synthetisiert. Es ist auch bei einigen Mollusken, Coelenteraten und Nematoden zu finden. Zahllose Pilze enthalten α -Chitin als Strukturkomponente der Zellwände (Abb. 1.5).

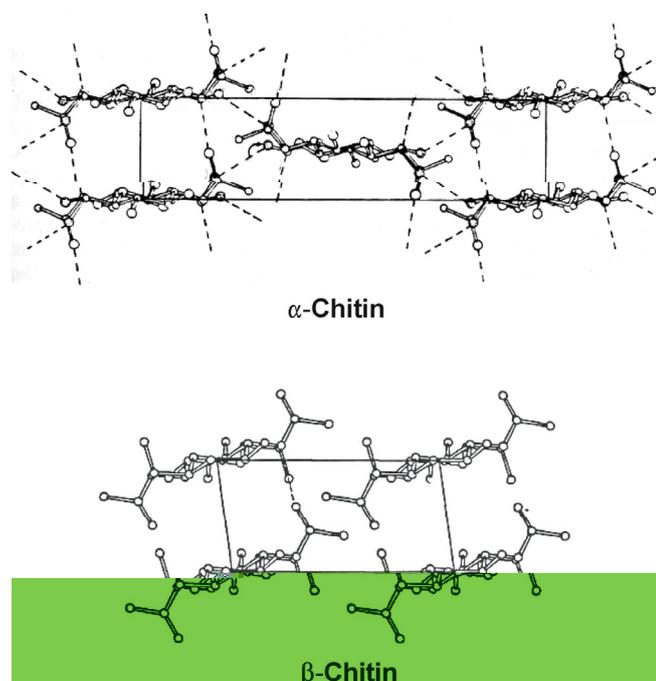


Abb. 1.4 Kristallstrukturen des α - und β -Chitins.
[Blackwell, 1969; verändert]

Das β -Chitin entsteht infolge der parallelen Anlagerung der Polymerstränge [Blackwell *et al.*, 1967]. Da die so entstehende Struktur weniger kompakt ist (Abb. 1.4), können sich Wassermolekülen zwischen die Polymerketten drängen [Muzzarelli, 1977], sodass kristallines Hydrat gebildet wird [Dweltz, 1961; Dweltz und Anand, 1961; Blackwell, 1969]. Allerdings wird β -Chitin aufgrund der geringeren Stabilität vor allem von marinen Organismen synthetisiert. Beide Formen des Chitins wurden lediglich bei einem Tintenfisch der Gattung *Loligo* gefunden. Sie können aufgrund verschiedener physikalischer Eigenschaften unterschiedliche Aufgaben erfüllen, sind jedoch weniger spezifisch für bestimmte Taxa [Muzzarelli, 1977].

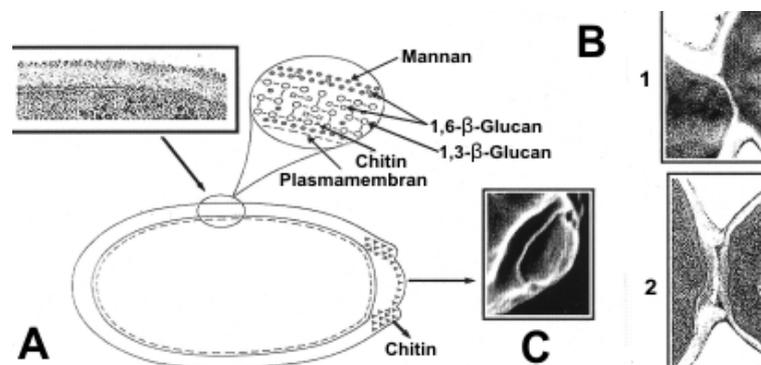


Abb. 1.5 (A) Model des Zellwandaufbaus der Hefe; (B) Elektronenmikroskopie (Dünnschnitt) des primären Septums (1) und Septumbereiches vor der Zelltrennung (2); (C) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Knospennarbe.
[Cid *et al.*, 1995]

Natürlich vorkommendes α -Chitin ist häufig mit Proteinen und anorganischen Komponenten, wie Calciumcarbonat, Eisen und Silizium, assoziiert. In Zellwänden von Pilzen (Abb. 1.5) ist es mit β -Glucanen vernetzt [Sietsma und Wessels, 1979; Molano *et al.*, 1980; Surarit *et al.*, 1988]. Hochkristallines und reines Chitin wurde nur bei einigen Diatomeen-Arten gefunden [Falk *et al.*, 1966; Blackwell *et al.*, 1967].

Bisher wurde die Chitinsynthese nur bei Pilzen genauer untersucht. Sie besitzen mehrere Chitinsynthasen, die voraussichtlich in verschiedenen Entwicklungsstadien benötigt werden [Ruiz-Herrera und San Blas, 2003]. Normalerweise kommen diese Enzyme in Form inaktiver Proenzyme (Zymogene) vor und sind mit spezifischen Microvesikeln (40-70 nm im Durchmesser) assoziiert, die als Chitosomen bezeichnet wurden [Bracker *et al.*, 1976]. Entsprechend der aktuellen Modelle ist die Substratbindedomäne der Chitinsynthasen in Richtung des Zytoplasmas exponiert und bindet UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-NAG). Schließlich befinden sich die Chitinketten auf der Außenseite der Zellmembran [van der Valk

und Wessels, 1973; Duran *et al.*, 1975; Cabib *et al.*, 1983], wo spontane Kristallisation der Ketten stattfindet [Davis und Bartnicki-Garcia, 1984; Vermeulen und Wessels, 1986]. Simultan erfolgen auch Modifikationen des Chitins, z.B. Deacetylierung zu Chitosan, Assoziierung mit anderen Polysacchariden und Proteinen [Vermeulen und Wessels, 1986].

Bei Zygomyceten wurde beobachtet, dass während autolytischer Prozesse zunächst Deacetylierung und erst dann die Hydrolyse des resultierenden Chitosans durch Chitosanasen erfolgt [Davis und Eveleigh, 1984]. Bekanntlich können auch einige Prokaryoten Chitosan mittels spezieller Chitosanasen abbauen [Pelletier und Sygusch, 1990; Neugebauer *et al.*, 1991].

Der direkte Abbau, indem Chitin durch Endo- und Exochitinasen zu Chitooligomeren, Chitobiose und NAG gespalten wird, kommt jedoch deutlich häufiger vor. So sind die chitinolytischen Bakterien in der Lage, Chitin als Kohlenstoff-Quelle zu verwenden. Unter anderem gehören hierzu die Vertreter der Gattungen *Aeromonas* [Chen *et al.*, 1991], *Bacillus* [Watanabe *et al.*, 1990], *Cellulomonas* [Reguera und Leschine, 2003] *Cellvibrio* [Wynne und Pemberton, 1986], *Clostridium* [Pelletier und Sygusch, 1990], *Cytophaga* [Sundarraj und Bhat, 1972], *Flavobacterium* [Takegawa *et al.*, 1991], *Nocardia* [Usui *et al.*, 1987] *Pseudomonas* [Roberts und Selitrennikoff, 1988], *Serratia* [Monreal und Reese, 1969; Jones *et al.*, 1986; Fuchs *et al.*, 1986; Joshi *et al.*, 1988], *Saccharopolyspora* [Hara *et al.*, 1989], *Vibrio* [Wortman *et al.*, 1986], und *Streptomyces* [Beyer und Diekmann, 1985; Robbins *et al.*, 1988; Miyashita *et al.*, 1991; Romaguera *et al.*, 1992; Blaak *et al.*, 1993; Blaak und Schrempf, 1995; Saito *et al.*, 1999].

In Pilzen sorgen Chitinsynthesen zusammen mit Chitinasen für das Gleichgewicht zwischen dem Aufbau bzw. Abbau der Zellwand in Rahmen morphogenetischer Prozesse [Bartnicki-Garcia, 1973; Barrett-Bee und Hamilton, 1984; Rast *et al.*, 1991]. Chitinasen können auch bei vielen weiteren biologischen Prozessen eine Rolle spielen. Bei Pflanzen konnte eine Erhöhung der Chitinasen-Aktivität durch Pilzinfektion beobachtet werden [Schlumbaum *et al.*, 1986]. Die Insekten, deren peritrophe Membran im Intestinaltrakt zum Teil aus Chitin besteht, können dagegen von chitinolytischen Bakterien (*Serratia marcescens*) [Flyg *et al.*, 1980] Protozoen und Nematoden angegriffen werden [Hodge *et al.*, 1996]. Bestimmte *S.-marcescens*-Stämme interagieren mit der Zuckerrübenwurzelmade in einer Symbiose, indem deren Chitinasen-Aktivität beim Schlüpfen der Imago hilft (Iverson *et al.*, 1984).

Auch Viren können in ihrem Genom Chitinase-kodierende Gene enthalten, z.B. *Autographa-californica*-Virus, ein Baculovirus, der Lepidopteren infiziert [Hawtin *et al.*, 1995].

Mehrere Chitinase-kodierende Gene wurden ebenfalls bei Säugetieren gefunden [Hollak *et al.*, 1994; Morrison und Leder, 1994; Sendai *et al.*, 1995]. Bei Meerschweinchen führt eine Infektion mit *Aspergillus fumigatus* zur Erhöhung der Chitinasen-Aktivität im Blut [Overdijk *et al.*, 1996]. Menschliche saure Chitinase im Magen [Zhu *et al.*, 2004; Couzin, 2004] und die von aktivierten Makrophagen sekretierte Chitotriosidase stellen aller Wahrscheinlichkeit nach ein Teil des Abwehrsystems dar [Hollak, *et al.*, 1994; Boot *et al.*, 1995].

Die von Bakterien synthetisierten extrazellulären Hydrolasen bestehen in der Regel aus mindestens zwei Domänen. Die Domänen für Katalyse und Substratbindung der Cellulasen, gelten als am besten untersucht. Die letzteren vermitteln eine enge Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat, wodurch die Katalyse effizienter erfolgen kann [Gilkes *et al.*, 1991]. Dieser modulare Aufbau ist auch für die Chitinasen charakteristisch (Abb. 1.6). Anhand der Aminosäuresequenzen der katalytischen Regionen, wurden Chitinasen in zwei Glycosylhydrolasen-Familien 18 und 19 eingeteilt [Henrissat, 1991]. Die genauer untersuchte

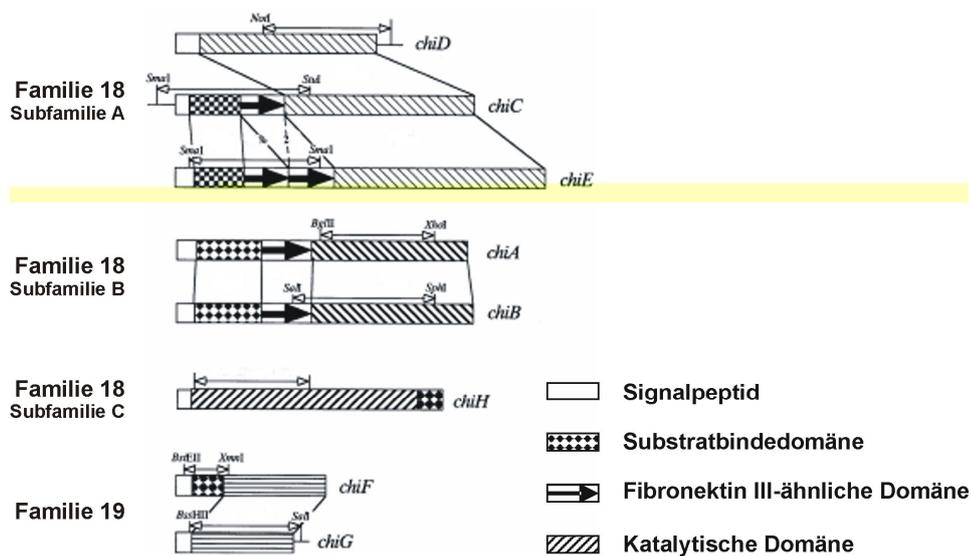


Abb. 1.6 Chitinasen-Gene aus *S. coelicolor* A3(2) und der modulare Aufbau deren abgeleiteten Produkten.
[Saito *et al.*, 2000; verändert]

Familie 18 umfasst neben vielen Chitinasen aus *Prokaryota* auch solche aus Pilzen, Tieren und einigen Pflanzen [Ohno *et al.*, 1996]. Blaak *et al.* (1993) haben gezeigt, dass eine

59-kDa-Exochitinase von *Streptomyces olivaceoviridis* (*exo-ChiO1*) aus N-terminaler, Fibronektin Typ III-ähnlicher sowie katalytischer Domäne besteht. Es konnte demonstriert werden, dass die N-terminale Region der *exo-ChiO1*-Chitinase den Kontakt zwischen dem kristallinen Substrat und der katalytischen Domäne fördert und dadurch die chitinolytische Aktivität unterstützt. Die Hydrolyse von kolloidalem Chitin sowie niedermolekularen Chitooligomeren erfolgt dagegen unabhängig vom Vorhandensein des N-terminalen Bereichs, der somit als Chitinbindedomäne identifiziert werden konnte [Blaak und Schrempf, 1995; Vionis *et al.*, 1996].

Fast alle *Streptomyces*-Arten sind chitinolytisch, dem ungeachtet wurden nur wenige Chitinasen aus Streptomyceten isoliert und charakterisiert. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass sie in ihrer Vielfalt über verschiedene chitinolytische Aktivitäten verfügen, und demzufolge das Chitin-Polymer zu Oligomeren, Chitobiose und/oder NAG hydrolysieren [Beyer und Diekmann, 1985; Robbins *et al.*, 1988; Blaak *et al.*, 1993; Blaak und Schrempf, 1995; Saito *et al.*, 1999]. Chitinasen aus *Streptomyces* gehören zu den Familien 18 und 19 der Glycosylhydrolasen [Henrissat, 1991; Henrissat und Bairoch, 1993]. Sie unterscheiden sich unter anderem im katalytischen Mechanismus: Während Chitinasen der Familie 18 die ursprüngliche anomere Konfiguration behalten, wird sie von denen der Familie 19 invertiert [Armand *et al.*, 1994; Iseli *et al.*, 1996; Robertus und Monzingo, 1999]. Die Transkription der Chitinasen-Gene der Familie 18 wird in Gegenwart von Chitin oder Chitooligomeren induziert und durch Zugabe von Glukose unterdrückt [Delic *et al.*, 1992; Miyashita und Fujii, 1993; Fujii und Miyashita, 1993; Saito *et al.*, 2000; Miyashita *et al.*, 2000]. Die Tatsache, dass Chitinasen der Familie 19 normalerweise nur bei höheren Pflanzen vorkommen, betont die besondere Stellung der Streptomyceten unter den Mikroorganismen [Ohno *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999].

Während des Wachstums mit Chitin als einziger Kohlenstoff-Quelle sekretieren Streptomyceten, neben den Chitinasen, kleine Proteine (18-19 kDa), die keinerlei enzymatische Aktivitäten besitzen, jedoch in der Lage sind, verschiedene Formen des kristallinen Chitins zu erkennen und mit hoher Affinität an sie zu binden. Sie wurden demzufolge als Chitinbindepoteine (*chitin-binding proteins*, CHBs) bezeichnet. Diese unterscheiden sich voneinander bezüglich der Bindespezifität. CHB1 von *Streptomyces olivaceoviridis* (18,7 kDa) wurde bis jetzt am besten untersucht. Es interagiert spezifisch mit hochkristallinem α -Chitin [Schnellmann *et al.*, 1994; Zeltins und Schrempf, 1997; Chu *et al.*,

2001], nicht jedoch mit β -Chitin oder Chitosan. Das Protein besteht aus zwei globulären Domänen, die zusammen eine verlängerte Kugel mit einem kleinen Höcker darstellen [Svergun *et al.*, 2000]. Das Vorhandensein bestimmter Tryptophan-Reste [Zeltins und Schrepf, 1997] sowie SS-Brücken [Svergun *et al.*, 2000] ist für die chitinbindende Konformation des CHB1 essentiell. Ähnlich wie das CHB1, bindet CHB2 von *Streptomyces reticuli* an α -Chitin-haltige Substraten und nicht an β -Chitin oder Cellulose [Kolbe *et al.*, 1998]. Ein weiteres CHB1-Homolog, CHB3 von *Streptomyces coelicolor* [Saito *et al.*, 2001], erkennt Chitin und Chitosan. Da sie keine gemeinsamen Motive mit Chitinbindedomänen der bekannten Chitinasen haben, konnten sie als eine neue Proteinklasse eingestuft werden.

Homologe der Chitinbindeproteine aus Streptomyceten konnten auch bei anderen chitinolytischen Bakterien nachgewiesen werden. So wurden ChbB von *Bacillus amyloliquefaciens* [Chu *et al.*, 2001] und CBP21 von *Serratia marcescens* [Suzuki *et al.*, 1998] charakterisiert, die vorzugsweise an β -Chitin binden. Die N-terminale Region der LasD-Protease von *Pseudomonas aeruginosa* zeigt auch eine gewisse Ähnlichkeit zu Streptomyceten Chitinbindeproteinen [Folders *et al.*, 2000].

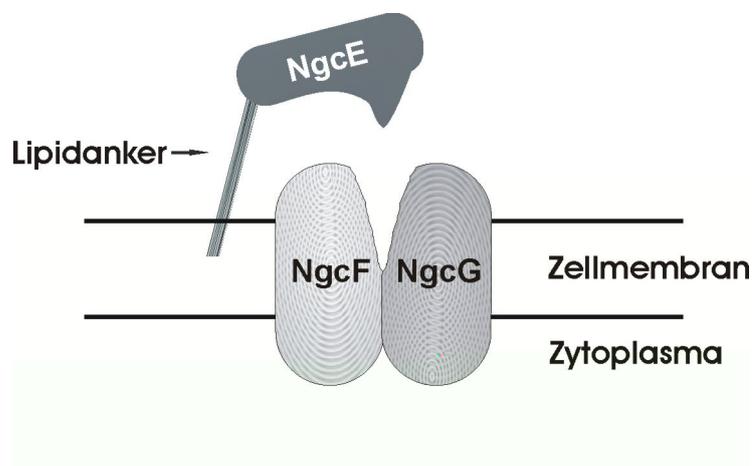


Abb. 1.7 Schematische Darstellung des ABC-Transporters für NAG und Chitobiose.

Der Komplex besteht aus zwei Permeasen (NgcF und NgcG) mit jeweils sechs Transmembrandomänen und einem Substratbindeprotein NgcE, das durch ein Lipid mit der Membran verankert ist.

Die Aufnahme der niedermolekularen Produkte des Chitinabbaus erfolgt in Streptomyceten mithilfe spezifischer Transportsysteme. *S. olivaceoviridis* verfügt über ein PTS-System, welches die Aufnahme von NAG vermittelt [Wang *et al.*, 2002]. Außerdem besitzt der Stamm das Ngc-System, den ersten beschriebenen ABC-Transporter, welcher für die spezifische

Aufnahme von NAG und Chitobiose verantwortlich ist [Xiao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Saito und Schrempf, 2004].

Wie bisherige Untersuchungen zeigen, haben Streptomycceten zur Verwendung von Chitin als Nährstoff ein komplexes System entwickelt. Die Chitinbindeproteine dienen zur Erkennung und Anhaftung an chitinhaltige Organismen. Von den danach synthetisierten Chitinasen werden die hochmolekularen Chitinpolymere zu Chitooligomeren, Chitobiose und NAG abgebaut. Diese können anschließend mithilfe der spezifischen Transportsysteme aufgenommen werden. Darüber hinaus produzieren Streptomycceten auch verschiedene Inhibitoren (z.B. Allosamidin, Streptozotocin), die Chitinabbau bzw. die Aufnahme der Produkte bei anderen chitinolytischen Organismen verhindern. Dadurch wird die eigene ökologische Nische verteidigt. In Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der Wechselwirkung von Chitinbindeproteinen mit Chitin sowie deren biologische Bedeutung tiefer untersucht werden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Enzyme

Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

DEAE-Sepharose, Phenylsepharose, Superdex 75, ResourceS

ARK Scientific GmbH, Darmstadt

Oligonukleotide

Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Rotiphorese Gel30

Difco Laboratories, Detroit, USA

Agar, Aminosäuren aus Casein (*Casaminoacids*), Hefeextrakt, Trypton, Pepton

Eurogentec Deutschland GmbH, Köln

DNA-Größenstandard SmartLadder

Gibco/BRL Ltd. Eggenstein

T4-Ligase, Restriktionsenzyme, *Taq*-Polymerase

Henselwerk GmbH, Magstadt

Sojamehl

ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA

Goldcluster (ø 5 nm und 10 nm), Goldmarkiertes Protein A (5 nm)

Millipore Corp., Bedford, USA

Ultrafiltrationsmembranen und -einheiten, Filtereinheiten

New England Biolabs GmbH, Frankfurt/M.

Restriktionsenzyme, Protein-Größenstandard 8S

Pall Europe Ltd., Portsmouth, Großbritannien

FluoroTrans[®]-Membran für Proteintransfer

Qiagen, Hilden

Taq PCR Core Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, III/IV- und RSP-Oligonukleotide, Ni-NTA-Agarose, Ni-NTA Magnetic Agarose Beads

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

N-Glykosidase F*

Schleicher & Schuell, Dassel

Faltenfilter, Papierfilter, Membranfilter, Filtereinheiten

Serva, Feinbiochemika GmbH & Co., Heidelberg

Agarose, Ammoniumpersulfat, Aminosäuren, Coomassie Brilliant Blue R-250, Coomassie Brilliant Blue G-250, Bromphenolblau, n-Dodecylsulfat-Natrium-Salz (SDS), Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)

Squibb, E. R. & Sons, Princeton, USA

Thiostrepton

Whatman International Ltd., Maidstone, Großbritannien

Glasfaser-Mikrofilter

Plano GmbH, Wetzlar

Trägernetzchen (Grids) für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich (Steinheim), F. Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze) und Serva (Heidelberg) bezogen.

2.2. Bakterienstämme

Organismus	Merkmale	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>relA1</i> , λ ⁻ , <i>supE44</i> , <i>deoR</i> , <i>pho</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	U169 <i>nal</i> ^s , <i>str</i> ^s , <i>rif</i> ^s , <i>thi</i> ⁻ , <i>lac</i> ⁻ , <i>ara</i> ⁺ , <i>gal</i> ⁺ , <i>mtl</i> ⁻ , F ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , <i>uvr</i> ⁺ , <i>lon</i> ⁺ , ϕ 80dlacZ Δ M15 pREP4 (<i>kan</i> ^r , <i>lacI</i> ^l)	Fa. Qiagen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> ⁺ , <i>dcm</i> ⁺ (DE3)	Fa. Novagen
<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	WT	Beyer und Diekmann, 1985
<i>S. olivaceoviridis</i> Δ <i>chb1</i>	<i>chb1::tsr</i> ^r	AGM
<i>Streptomyces lividans</i> 66	WT	Lomovskaya <i>et al.</i> , 1972
<i>S. lividans</i> 66 [pWKD30]	pWKD30 (<i>tsr</i> ^r)	Zou <i>et al.</i> , 1999
<i>S. lividans</i> 66 [pCHBG]	pCHBG (<i>tsr</i> ^r)	AGM

2.3. Plasmide

Plasmid	Größe	Beschreibung	Referenz
Vektorplasmide			
pQE70	3,4 kb	<i>amp^r</i>	Fa. Qiagen
pET-21a(+)	5,4 kb	<i>amp^r</i>	Fa. Novagen
pUC18	2,7 kb	<i>amp^r, β-gal</i>	Yannish-Perron <i>et al.</i> , 1985
pREP4	3,7 kb	<i>kan^r</i>	Fa. Qiagen
pWHM3be	7,1 kb	<i>Streptomyces/E. coli</i> Vektor, <i>amp^r, tsr^r, β-gal</i>	Vara <i>et al.</i> , 1989
Rekombinante Plasmide			
pBA1	4,2 kb	<i>amp^r</i> <i>amp^r, tsr^r, 4,6 kb DNA-Fragment aus S.</i>	Grüber, 2001
pUDK30	7,2 kb	<i>reticuli</i> (<i>furS</i> -Promotor-Region, deletiertes <i>furS</i> -Gen und <i>cpeB</i> -Gen) ligiert mit pUC18	Zou <i>et al.</i> , 1999
pWFChbH	8,4 kb	<i>amp^r, tsr^r, pWHM3-Derivat, enthält furS-</i> Promotor-Region, deletiertes <i>furS</i> -Gen und das <i>chb1</i> -Gen fusioniert mit 6 His-Codons	diese Arbeit
pUFChbH	4 kb	<i>amp^r, pUKD30-Derivat, enthält furS-</i> Promotor-Region, deletiertes <i>furS</i> -Gen und das <i>chb1</i> -Gen fusioniert mit 6 His-Codons	diese Arbeit

2.4. Oligonukleotide

Oligo	Sequenz 5' 3'
dCfor	GTG CCA GCA TGC ACG GCT ACA CCG ATC
dCrev	CGC TGG GAT CCG TAG GGC ACC GTC AGG AAC
dN21for	GAC GGC CAT ATG TGC TCC GCA GGC AAC
dN22for	CGG ACG CCA TGG TCT GCT CCG CAG GCA
dN21/22rev	AGA TCT CTC GAG GAA GGT GAC GTC GGA
pQE III/IV	CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG
RSP	GTT CTG AGG TCA TTA CTG G
Chbsal	CAC AGT CGA CAT TAA AGA GGA G
chb1Nn	GAC CAA GTT GTA CGC AGC CGC G
chb1C	AAG GTG ACG TCG GAG CAG GCG TAG

2.5. Nährmedien

Alle Angaben beziehen sich auf 1 l Endvolumen, Ausnahmen sind besonders gekennzeichnet.

Luria-Bertani-Medium

zur Anzucht von *E. coli* [Sambrook *et al.*, 1989]

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Agar (für festes Medium)	14 g

pH 7,5

SOC-Medium

zur Transformation von *E. coli* [Sambrook *et al.*, 1989]

SOB-Medium:

Trypton	20,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,18 g

ad 100 ml mit bidest H₂O, pH 7,5; autoklavieren, anschließend erfolgt die Zugabe von:

2 M MgCl ₂	1 ml
2 M Glukose	1 ml

Vollmedium nach Jasenka Pigac

zur Anzucht von Streptomyceten in Flüssigkulturen

Saccharose	100 g
Tryptic Soy Broth	20 g
Hefeextrakt	5 g

ad 980 ml mit bidest H₂O, nach dem Autoklavieren Zugabe von:

2,5 M MgCl ₂ × 6 H ₂ O	20 ml
--	-------

R-S-Medium

zur Anzucht von Streptomycceten und deren Stammhaltung [Hopwood et al., 1985]

K ₂ SO ₄	0,25 g
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	10,12 g
Glukose	10,00 g
Casamino acids	0,10 g
Hefeextrakt	5,00 g
Tris-base	3,03 g
Agar (für festes Medium)	14,00 g

pH 7,6

nach dem Autoklavieren Zugabe von:

Spurenelementlösung	2,0 ml/l
0,5 % KH ₂ PO ₄	1,0 ml/l
5 M CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,4 ml/l

Spurenelementlösung*, 10-fach

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ × 10 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	10 mg

ad 100 ml mit bidest H₂O; sterilfiltrieren [Hopwood und Wright, 1978]**R+S-Medium**

zur Regeneration von Streptomyccetenprotoplasten [Hopwood und Wright, 1978]

Zusammensetzung wie R-S mit:

103 g/l Saccharose
5,78 g/l TES statt Tris-base

Sojamehl-Mannit Medium

zur Stammhaltung von Streptomycceten [Hopwood und Wright, 1978]

Sojamehl	20 g
Mannit	10 g
Agar	14 g
pH 7,2	

RSM-Medium

zur Stammhaltung von Streptomycceten

R-S- und Sojamehl-Mannit-Medium in einem Verhältnis von 3:1 (v/v) für die Platten.

Minimalmedium (MM)

zur Anzucht von Streptomycceten

KH ₂ PO ₄	1,5 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g

pH 7,2

nach dem Autoklavieren Zugabe von:

1× Spurenelementlösung*	2 ml/l
10 % MgSO ₄	1 ml/l
10 % CaCl ₂	1 ml/l
2 M NH ₄ Cl	10 ml/l
50 % Glukose	20 ml/l

Minimalmedium-M40

Produktionsmedium für Streptomycceten

KH ₂ PO ₄	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5 g
Asparagin	1,5 g
Agar (für festes Medium)	14,0 g

pH 7,2

nach dem Autoklavieren Zugabe von:

10 % NaCl	1,0 ml
10 % CaCl ₂	1,0 ml
5 % MgSO ₄	10,0 ml
Spurenelementlösung**	1,0 ml
80 % Glycerin	12,5 ml

Spurenelementlösung für M40-Medium, 10-fach**

H ₃ BO ₃	50 mg
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	40 mg
KJ	10 mg
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	20 mg
MnSO ₄ × H ₂ O	40 mg
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	40 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	20 mg

ad 100 ml mit bidest H₂O; sterilfiltrieren

Hefe-Melz-Medium

zur Anzucht von Pilzen

Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
Glukose	4 g
Agar (für festes Medium)	14 g

pH 6,0

2.6. Mikrobiologische Methoden

2.6.1. Kulturbedingungen und Stammhaltung von *E. coli*

Die *E. coli* DH5 α und M15 Stämme wurden über Nacht bei 37 °C auf LB-Agarplatten angezogen. In Flüssigmedium wurden die Zellen zunächst als Vorkultur gezüchtet (UN, bei 37 °C und 120 Upm), danach ca. 30-fach verdünnt (bis zu einem OD₆₀₀-Wert von ca. 0,05) und unter gleichen Bedingungen kultiviert bis einen OD₆₀₀-Wert von 0,6 erreicht wurde (etwa 4-5 Std.).

Da die Platten bei 4 °C nur für einige Wochen aufgehoben werden können, wurden die Bakterien zur langfristigen Lagerung bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 angezogen und in 50 % Glycerin bei -20 °C aufbewahrt.

Stämme, die Plasmide enthielten, wurden in Gegenwart von entsprechenden Antibiotika in vorgeschriebenen Mengen kultiviert.

2.6.2. Kulturbedingungen und Stammhaltung von Streptomyceten

Die Anzucht von Streptomyceten in Flüssigkultur erfolgte zunächst in geringen Volumina und als Standkultur durch Zugabe von Sporen zu entsprechendem Medium im Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Je nach Keimrate dauerte das Wachstum über Nacht bis zu einen Tag bei 30 °C. Anschließend, nach etwa 15-facher Verdünnung, wurden die Kulturen ca. 24 Std. bei 30 °C und 120 Upm geschüttelt.

Zur Stammhaltung wurden R-S-, Sojamehl-Mannit- oder RSM-Agarplatten mit Sporen bzw. Mycelien beimpft, bis zur Sporulation bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Für eine längerfristige Lagerung wurden Sporen aus Agarplatten geerntet, von Mycelienresten befreit, in 50 % Glycerin gelöst und bei -70 °C aufbewahrt.

Bei Stämmen, die Plasmidderivate von pWHM3be enthielten, wurde dem Medium 25 μ g/ml Thiostrepton zugesetzt.

2.6.3. Kulturbedingungen von Pilzen

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Pilze wurden auf Hefe-Malz-Medium kultiviert. Die Anzucht erfolgte in geringen Volumina und als Standkultur durch Zugabe von Sporen zu Medium im Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Das Wachstum dauerte ein bis zwei Tage bei 30 °C.

Zur Stammhaltung wurden Hefe-Malz-Agarplatten mit Sporen bis zur Sporulation bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Für eine längerfristige Lagerung wurden Sporen aus Agarplatten geerntet, in 50 % Glycerin gelöst und bei -70 °C aufbewahrt.

Für Co-Kultivierung wurden ein- bis zweitägige Pilz- und Streptomyceten-Mycelien verwendet. Nach zweimaligem Waschen wurden die Kulturen in ergänztem M40-Medium suspendiert und zusammengemischt. Weitere Inkubation erfolgte als Standkultur bei 30 °C. Für Fluoreszenzmikroskopie-Experimente wurden die Co-Kulturen mit dem *S.-lividans*-66-[pCHBG]-Stamm im Dunkeln inkubiert.

2.7. Biochemische Methoden

2.7.1. Gewinnung der Proteine aus *E. coli* Periplasma

Hierfür wurde die modifizierte Methode des osmotischen Schocks [The QIAexpressionist™, Qiagen, 2000] angewandt. Die Zellen wurden für 10 Min. bei 8.000 g und 4 °C abzentrifugiert und in 20 % (w/v) Saccharose in 30 mM Tris/HCl pH 7,0 resuspendiert (40 ml für 1 g Nassgewicht). Dazu wurde 500 mM EDTA pH 7,0 tropfenweise zugegeben, bis eine Endkonzentration von 1 mM erreicht wurde. Der Ansatz wurde auf Eis gestellt und 5-10 Min. leicht geschüttelt. Nach 20 Min. Zentrifugation bei 8.000 g und 4 °C wurden die Zellen im gleichen Volumen von eiskaltem 5 mM MgSO₄ resuspendiert und für weitere 10 Min. auf Eis geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension erneut für 20 Min. bei 8.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Alternativ erfolgte das Diafiltration-Verfahren durch eine Polyethersulfon-Membran (MWCO 5.000) in geeigneter Rührzelle (Millipore). So erhaltene Proteinsuspensionen wurden weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

2.7.2. Gewinnung der Proteine aus *E. coli* Rohextrakten

Die Zellen wurden für 10 Min. bei 8.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag in HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 60 mM KCl, pH 7,0) aufgenommen (5 ml pro 1 g Nassgewicht) und durch Ultraschall (Branson Sonifier B12, 75W) im Eisbad aufgeschlossen (5× 10 Sec. mit jeweils 10 Sec. Pause). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 Min., 8.000 g, 4 °C) niedergeschlagen und die Proteine aus dem Überstand weiter gereinigt.

2.7.3. Gewinnung eines Proteins aus *S. lividans* Kulturüberstand

Die im Vollmedium angezogene Kultur wurde steril abzentrifugiert (8.000 g, 30 °C für 10 Min.), mehrmals mit Minimalmedium ohne Zusätze gewaschen und anschließend in supplementiertem Minimalmedium aufgenommen. Hierbei erfolgte eine zweifache Ankonzentrierung der Mycelien. Die weitere Inkubation dauerte ca. 4,5 Std. bei 30 °C und 140 Upm. Danach wurde der Kulturüberstand über Falten- und Zelluloseacetatfilter (\varnothing 0,45 μ m) von den Mycelien abgetrennt, mit Ammoniumsulfat bis zu einer 90 %-Sättigung (0,59 g/ml) versetzt und für mindestens 2 Std. bei 4 °C unter ständigem Rühren inkubiert. Die gefällten Proteine wurden 30 Min. bei 8.000 g zentrifugiert und in entsprechendem Puffer aufgenommen (Anreicherung 150:1). Alternativ erfolgte eine Ultrafiltration durch Polyethersulfon-Membran (siehe fol.:1).

Elutionsbedingungen, wurde 0,5 ml 20 mM Natrium-Phosphatpuffer mit steigender Imidazolkonzentration (50-700 mM) auf die Säule gegeben. Das Vorhandensein des zu reinigenden Proteins in den Eluatn wurde immunologisch getestet: das CHB1-Protein wurde bei einer Imidazolkonzentration von 400 mM eluiert, während dessen Deletionsmutanten mit 600 mM Imidazol ausgewaschen werden konnten.

Um bei der Aufreinigung der CHB1-Deletionsmutanten die Aggregierungsprozesse zu verhindern, wurde sämtlichen Puffern 8 M Harnstoff zugesetzt.

2.7.6. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die HIC [Romaguera *et al.*, 1992; modifiziert] trennt die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität auf. Die Phenylgruppen der hier verwendeten Phenylsepharose (Amersham Biosciences) bilden eine hydrophobe Matrix. Bei hoher Salzkonzentration exponieren die Proteine ihre hydrophoben Regionen, wodurch die Bindung an das Säulenmaterial verstärkt wird. Wird die Salzkonzentration gesenkt, werden die Proteine eluiert.

Vor dem Auftragen der Proteinproben auf die mit 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 20 mM Tris/HCl äquilibrierte HIC-Säule (HR 5/5, Pharmacia), wurden die Proben mit 3,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 im Verhältnis 5:2 versetzt und durch einen Zellulosenitratfilter (\varnothing 0,2 μm) filtriert. Die Elution erfolgte mittels eines linearen Salzgradienten (1,5-0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Gradientenvolumen 12 ml), wobei das Eluat in Fraktionen von je 0,5 ml aufgefangen wurde.

2.7.7. Ionenaustauschchromatographie

Zur Anionenaustauschchromatographie [Romaguera *et al.*, 1992; modifiziert] wurde DEAE-Sepharose Fast Flow Gelmaterial (Amersham Biosciences) eingesetzt. Nach Beladung der mit 20 mM Tris/HCl pH 7,0 äquilibrierten Säule (HR 5/5, Pharmacia) mit ebenso vorbereiteter Proteinlösung erfolgte die Elution mit linearen Salzgradienten (0-1 M NaCl, Gradientenvolumen 12 ml). Das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen. Bei Bedarf wurde auch der Durchlauf gesammelt.

Die ResourceS-Säule (Kationaustauscher, Amersham Biosciences) wurde in den letzten Reinigungsschritten von CHB1 und ChbB His-tag-Fusionsproteinen eingesetzt.

Die Proteinproben wurden mit 20 mM Zitronensäure auf pH 5,2 eingestellt und auf die mit 20 mM Citrat/Phosphatpuffer pH 5,2 äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bei der DEAE-Säule.

2.7.8. Gelfiltration

Gelchromatographie erfolgte unter Verwendung einer Superdex-75-Säule (HR 10/30, Pharmacia). Nach Äquilibrierung der Säule (0,1 M NaCl in 20 mM Tris/HCl pH 7,0) wurden maximal 500 µl Proteinprobe aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,3 ml/Min. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt.

2.7.9. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry *et al.* (1951) bzw. Bradford (1976). Anhand der Eichkurven, die mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA; 0 bis 100 µg) jeweils im gleichen Puffer erstellt wurden, konnte die Proteinkonzentration errechnet werden.

2.7.10. *In vitro* Synthese der Chitinfasern

Chitinfasern wurden *in vitro* mit Chitosomen des Pilzes *Saccharomyces cerevisiae* nach der Methode von H. Schrempf (persönliche Mitteilung) hergestellt. Die Chitosomen-Suspension wurde von M. Kayla zur Verfügung gestellt. Der Reaktionsansatz enthielt 80 mM *N*-Acetylglucosamin (NAG), 4 mM UDP-NAG, 3 mM MgCl₂ in Chs-Puffer (50 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5). Die Inkubation erfolgte 30 Min. bis über Nacht bei 30 °C.

2.7.11. Test auf Bindung der Proteine an Kohlenhydratsubstrate

1 µg Protein wurden mit 1 mg Substrat (verschiedene Chitinformen, Chitosan oder Cellulose) in 100 µl PBS-Puffer (s. 2.9.1.) gemischt und 90 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Überstände wurden durch Zentrifugieren von Substraten getrennt und die Niederschläge zweimal mit 1 M NaCl in PBS gewaschen, um die ungebundene oder locker assoziierte Proteine zu entfernen. Anschließend wurden alle Fraktionen auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anhand der Proteinmengen (Gel-Pro-express™, Media Cybernetics, Inc.) konnte die relative Bindeaffinität bestimmt werden.

2.8. Elektrophoretische Techniken

2.8.1. Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) in horizontalen Elektrophorese-Kammern (PEQLAB, EasyCast System) aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TBE (0,89 M Borsäure, 25 mM Na₂EDTA in 0,89 M Tris/HCl pH 8,0). Die DNA-Proben wurden 1:0,25 mit Ladepuffer (70 % Saccharose, 0,25 % Bromphenolblau, 0,1 M Na₂EDTA, pH 7,5) versetzt und bei 5 V/cm Gelenlänge aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA mit Ethidiumbromid-Lösung (4 µg/ml) bzw. SYBR-green (1: 100.000) in TBE pH 7 angefärbt, durch UV-Licht (302 nm) visualisiert und fotografiert.

2.8.2. SDS- und native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende Protein-Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli (1970). Die Proteine wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch 5 Min. kochen denaturiert. Die Trennung erfolgte in 12,5 % Polyacrylamidgelen (12,5 % Acrylamid, 0,33 % Bisacrylamid, 125 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,03 % APS, 0,01 % TEMED) bei einer Stromstärke von 25 mA. Bei nativer Polyacrylamidgelelektrophorese fehlte in allen verwendeten Puffern SDS. Als Probenpuffer wurde 30 % Glycerin verwendet.

Proteinhaltige Banden wurden entweder mit 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure gefärbt (10-20 Min.) oder durch eine Silberfärbung nach Merril *et al.* (1984) visualisiert.

2.8.3. Proteintransfer auf Membranen

Die Übertragung der Proteine aus Polyacrylamidgelen auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (FluoroTrans[®]-Membrane, Fa. Pall Europe Ltd., Portsmouth, England) erfolgte in einer Transferkammer der Firma CTI, Idstein, durch *semidry electroblotting* nach der von Towbin *et al.* (1979) beschriebenen und von Burnette (1981) modifizierten Methode. Die Membran wurde zunächst durch Schwenken in Methanol (10 Sec.) aktiviert und anschließend, zusammen mit dem Gel, 5 Min. in Transferpuffer (0,1 M CAPS/NaOH pH 11,

10 % Methanol) äquilibriert. Die Transferzeit betrug 60 Min. bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Membranfläche.

2.9. Immunologische Nachweismethoden

2.9.1. Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen (*Western Blot*)

Die proteintragende Membran wurde für 60 Min. in 5 % Magermilch bzw. 3 % BSA in PBS (*phosphate-buffered saline*; ca. 140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7,3) gesättigt. Nach 90 Min. Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt 1:10.000 in PBS) und dreifachem Waschen für je 10 Min. mit PBS wurde der sekundäre, mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper (1:10.000 in PBS) für 45 Min. dazugegeben. Die Farbreaktion erfolgte nach West *et al.* (1990). Die alkalische Phosphatase hydrolysiert das Substrat Naphtol-AS-E-Phosphat. Das freigesetzte Naphtol reagiert dabei mit einem Diazoniumsalz (Fast Violett Blue) zu einem rötlichen Azofarbstoff. Die Reaktion wird mit Wasser gestoppt.

2.9.2. Test auf Chitinsynthase-Aktivität

Nach der Isolierung von Chitosomen wurden die entsprechenden Fraktionen auf Chitinsynthase-Aktivität überprüft. Der Test erfolgte nach der modifizierten Methode von Lucero *et al.* (2002). Anstatt Beschichtung der ELISA-Platten mit WGA, wurde das Chitin aus den Reaktionsansätzen an das immobilisierte CHB1-Protein gebunden.

2.10. Molekulargenetische Methoden

2.10.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

5 ml LB-Medium, das die zur Selektion notwendigen Antibiotika enthielt, wurde mit einer *E.-coli*-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden 10 Min. bei 10.000 Upm zentrifugiert (Tischzentrifuge) und die Plasmid-DNA von den erhaltenen Zellen mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorschriften des Herstellers isoliert. Die Elution der Plasmide erfolgte in 30 bzw. 50 µl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA pH 8,0).

2.10.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus Streptomyceten (alkalysche Lyse)

5 ml LB-Medium, das die zur Selektion notwendigen Antibiotika enthielt, wurden nach Animpfen über Nacht als Standkultur und weitere 24 Std. als Schüttelkultur bei 30 °C inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden 10 Min. bei 10.000 Upm zentrifugiert (Tischzentrifuge) und der Niederschlag anschließend zweimal mit 10,3 % Saccharose in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gewaschen. Das Mycel wurde in 500 µl einer 4 mg/ml Lysozym enthaltenden Saccharoselösung resuspendiert und bis zum Beginn der Protoplastierung (ca. 30 Min.) bei 37 °C inkubiert. Nach Mischen mit 350 µl alkalischem SDS (2 % SDS in 0,3 M NaOH) erfolgte die Zugabe von 150 µl saurem Phenol/Chloroform. Der nach Zentrifugation gewonnene Überstand wurde mit 80 µl 3 M Natriumacetat und 700 µl Isopropanol gefällt (10 Min. Inkubierung bei Raumtemperatur, 15 Min. Zentrifugation) und nach zweifachem Waschen mit 70 % Ethanol in 50 µl TE-Puffer gelöst.

2.10.3. Extraktion von DNA-Elementen aus Agarose-Gelen

Die Extraktion der DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorschriften des Herstellers.

2.10.4. Enzymatische *in vitro* Reaktionen von DNA

2.10.4.1. Restriktionen von DNA

Chromosomale sowie Plasmid-DNA wurden in den Reaktionspuffern der jeweiligen Enzyme nach Angaben des Herstellers gespalten. Die eingesetzte Enzymmenge betrug 1 U/µg DNA. Sollte die DNA mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten werden, die nicht in einem gemeinsamen Puffer aktiv sind, wurde die DNA nach der ersten Restriktion gefällt und in dem für das zweite Enzym geeigneten Puffer aufgenommen. Die Reaktion erfolgte in den meisten Fällen über Nacht. Bei der partiellen *SalI*-Restriktion wurden Proben nach 1, 5, 10 und 20 Min. genommen.

2.10.4.2. Klenow-Behandlung

Zur Herstellung von glatten Enden (*blunt ends*) wurde die gereinigte DNA nach der Restriktion 5 Min. und nach dNTP-Zugabe nochmals eine Minute bei 37 °C mit der Klenow-Polymerase (1U) inkubiert. Vor einer weiteren Restriktion wurde die DNA über QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

2.10.4.3. DNA-Ligation

Vektor und Fragmente wurden im Verhältnis 1:10 gemischt und mit der T4-Ligase (1U) im T4-Ligasepuffer (250 mM Tris/HCl pH 7,6; 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % PEG 8.000) ligiert. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16 °C. Da die hohe Ionenstärke sowie PEG die Transformationseffizienz verringern, wurden die Ansätze über eine Butanolfällung aufgereinigt. Nach Inaktivierung der T4-DNA-Ligase durch 10 Min. Inkubation des Reaktionsansatzes bei 65 °C, wurde dieser mit sterilem bidest H₂O auf 50 µl aufgefüllt, 500 µl n-Butanol zugegeben und der Ansatz kräftig gemischt. Nach Zentrifugation bei 14.000 Upm (Tischzentrifuge) für 10 Min. wurde der Rückstand getrocknet, in 10 µl bidest H₂O aufgenommen, und konnte dann direkt zur Transformation eingesetzt werden.

2.10.4.4. Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurde nach Innis *et al.* (1990) in einem Trio-Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Es wurden 30 Zyklen durchlaufen, dabei erfolgte das Schmelzen der DNA bei 96 °C (zuerst 2 Min. und vor jeweiligem Zyklus für 45 Sec.) und die Synthese bei 72 °C für 1 Min. Die Temperatur des Anlagerns (*annealing*) der Oligonukleotide wurde nach Berücksichtigung deren Schmelztemperaturen empirisch bestimmt. In einem 50-µl-Reaktionsvolumen mit der *Taq*-Polymerase (2U) wurde 0,1-100 ng Matrizen-DNA, je 50 pmol/µl Primer, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,1-100 ng Template-DNA und 1× PCR-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 µg/ml Gelatine) eingesetzt.

Für rasche Überprüfung der Transformanten wurde die Methode der Kolonie-PCR nach Li (2001) angewandt.

2.10.4.5. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der Reaktionsansätze erfolgte mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden), nach Angaben des Herstellers.

2.10.4.6. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte mit der Methode des enzymatischen Kettenabbruchs nach Sanger *et al.* (1977). Die Reaktion wurde mit AmpliTaq™ DNA Polymerase FS (geliefert mit ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt, nach Vorschriften

des Herstellers. Der Gellauf erfolgte in der Arbeitsgruppe Spezielle Botanik (U. Coja), die Auswertung der erhaltenen Sequenzen mit dem Computerprogramm Chromas 1.56 (Technelysium Pty Ltd., Australien).

2.10.5. Transformation von *E. coli*

Die Vorbereitung der kompetenten *E.-coli*-Zellen sowie deren Transformation erfolgte nach der Elektrotransformationsmethode der Fa. Invitrogen (DH5 α - und M15[pREP4]-Stämme). Im Falle von *E.-coli*-BL43-Stamm wurde die Calciumchlorid-Methode [Sambrook *et al.*, 1989] angewandt.

2.10.6. Transformation von Streptomyceten

Zur Gewinnung von Protoplasten wurden Streptomyceten in Vollmedium angezogen. Die Herstellung von Protoplasten sowie anschließende Transformation erfolgte nach beschriebenen Methoden [Hopwood *et al.*, 1985].

2.11. Mikroskopische Methoden

2.11.1. Vorbereitung der Präparaten für TEM-Analyse

Die Trägernetzchen (Grids) wurden von der Fa. Plano bezogen. Für alle konventionellen Präparationen kamen Kupfer-Trägernetzchen der Typen G 300 zum Einsatz. Für alle Immunogoldmarkierungen wurden mit Kohle beschichtete Nickelgrids (Ni-G 300) verwendet. Alle benötigten Lösungen wurden durch 0,2 μ m Filter filtriert.

Direkt vorm Gebrauch wurden die Grids 1 Min. mit 10 mg/ml Bacitracin behandelt, um aseptische Bedingungen zu sichern und die Adhäsion der Proben zu verbessern. Danach wurden pro Grid 6-10 μ l Probe aufgetragen. Nach 30 Min. wurde die Lösung mit einem Stück Whatman-Papier vorsichtig abgesaugt und der auf der Gridoberfläche geformte Proben-Film durch 1 Min. Behandlung mit 100 mM Cacodylatpuffer pH 7,1 fixiert. Anschließend erfolgte Kontrastierung mit 2,5 % Uranylacetat.

2.11.2. Präparation von CHB1-Gold-Konjugaten

Die Goldpartikel werden von dem zu koppelnden Protein bei einem pH- um den pI-Wert des Proteins adsorbiert. Die Voroptimierungsparameter der Markierungsbedingungen für CHB1 basierten auf Vorschriften der Fa. British BioCell und wurden bereits im Labor etabliert. Zuerst wurde der pH der Goldclustersuspension mit 100 mM K_2CO_3 auf 8,6 eingestellt (gleich dem pI-Wert von CHB1). Nach der Übernächtdialyse gegen 2 mM Borax (pH 8,6 mit HCl/NaOH eingestellt) wurde die Proteinlösung (0,1 mg/ml) 1 Std. bei 100.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Von dem Überstand wurden 110 µl bzw. 160 µl entsprechend zu 3 ml vorbereiteten 5 nm- und 10 nm-Goldclustersuspensionen tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde dabei schnell gemischt, 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, und mit 300 µl 10 % BSA pH 8,6 versetzt. Nach 10 Min. Schütteln wurden die großen Aggregate durch 2 Min. Zentrifugieren bei 4 °C entfernt, und anschließend der Überstand 1 Std. bei 25.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Um das überschüssige, unmarkierte Protein zu entfernen, wurde der Niederschlag mit 1 % BSA in 0,1 % NaN_3 , 100 mM Tris/HCl pH 8,2 gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 50 µl desselben Puffers suspendiert. Die Auswertung der Kopplungseffizienz erfolgte mittels TEM-Elektronenmikroskopie.

2.11.3. Immunologischer Nachweis von CHB1

Die Grids wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 1 Std. mit 2 % BSA in PBS inkubiert. Danach erfolgte eine Übernacht Inkubation bei 4 °C mit *anti*-CHB1-Antikörpern aus Kaninchen, die 1:100 in PBS mit 2 % BSA verdünnt worden waren. Nach sechsmaligem Waschen mit 2 % BSA in PBS, wurden die Grids in 1:100 verdünnten goldmarkierten Antikörperlösung (10 nm Partikelgröße) getunkt, die spezifisch gegen IgG-Immunglobulin aus Kaninchen waren. Nach 4 Std. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die überflüssigen, nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, die Grids mit 2,5 % Uranylacetat kontrastiert und an der Luft getrocknet.

2.11.4. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Zeiss EM 109 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Es wurde mit nominellen Vergrößerungen zwischen 3.000 und 250.000 gearbeitet. Die exakten Faktoren wurden anhand einer Tabelle des Herstellers unter Berücksichtigung

der fotografischen Vergrößerung berechnet. Alle fotografischen Aufnahmen wurden mit 35 mm-Kleinbild-Film (Agfa) gemacht. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit Agfa Rodinal Einmalentwickler gemäß Anleitung des Herstellers.

2.11.5. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fusion eines *GFP*-Gens (*green fluorescence protein*, GFP [Chalfie *et al.*, 1994]) mit dem *chb1*-Gen sollte Studien zur Untersuchung der Expression des *chb1*-Gens während der Co-Kultivierung mit *Mucor rouxii* ermöglichen. Der mit pCHB1GFP-Plasmid transformierte *S.-lividans*-66-Stamm wurde vom Labor zur Verfügung gestellt. Die mikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit einem Zeiss Axiowert 10 Mikroskop, wobei für alle Fluoreszenz-Aufnahmen ein FITC-Filter eingesetzt wurde (F41-001; EX: 480/40; DM: 505; BA: 535/50). Zur Untersuchung der Strukturen im Hellfeld wurde der differentielle Interferenz-Phasenkontrast genutzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Gewinnung des CHB1 aus *E. coli*

Das *chb1*-Gen, fusioniert mit 6 Histidin-Codons, wurde bereits kloniert und lag als Plasmid pBA1 in dem *E. coli*-M15[pREP4]-Stamm vor. Folgend wurde das CHB1-Protein aus *E. coli* gewonnen [Grüber, 2001]. Aufgrund geringer Ausbeute bestand jedoch die Notwendigkeit weiterer Optimierungen.

Für die Anzucht des Stammes wurde LB-Medium verwendet. Verschiedene Inkubationstemperaturen (30 und 37 °C), IPTG-Konzentrationen (0,5, 1 und 2 mM) sowie Zeiten nach der Induktion (60, 90 und 120 Min.) wurden getestet.

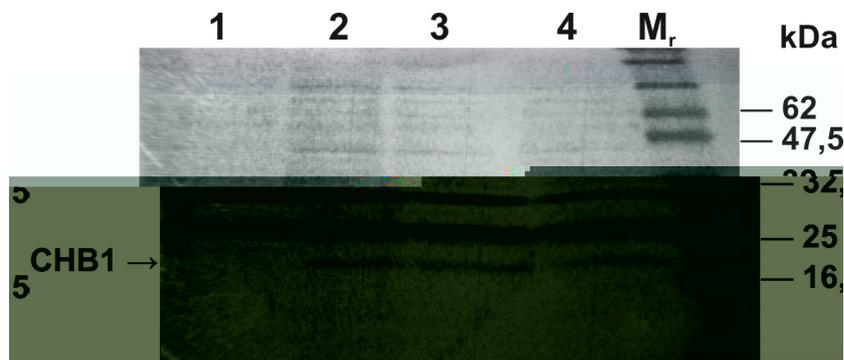


Abb. 3.1 Optimierung der IPTG-Konzentration.

E. coli M15[pREP4] pBA1 wurde mit verschiedenen IPTG-Mengen induziert; nach 90 Min. wurden die Zellen abzentrifugiert und Proteinisolierung mittels osmotischen Schocks durchgeführt. Anschließend wurden Proben auf einem 12,5 % SDS-Gel aufgetrennt. Spuren (1)-(4) erhalten Proteine, die nach der Induktion mit entsprechend 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM IPTG isoliert wurden; (M_r) Molekulargewichtstandart.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurde das Wachstum bei 37 °C durchgeführt. Sobald die Zellen in der frühen logarithmischen Phase vorlagen (OD₆₀₀ 0,6), erfolgte die Induktion

(1 mM IPTG) und Inkubation bei 30 °C für weitere 90 Min. Anschließend wurden aus den Zellen die periplasmatisch lokalisierten Proteine nach der Methode des osmotischen Schocks freigesetzt (wie unter 2.7.1. beschrieben).

Als erster Reinigungsschritt wurde Ni-Affinitätschromatographie angewandt. Die Proteinlösung wurde an Ni-NTA-Agarose gebunden und mit steigenden Konzentrationen von Imidazol ausgewaschen. Die größte Protein-Menge konnte mit bis zu 400 mM Imidazol eluiert werden (Abb. 3.2).

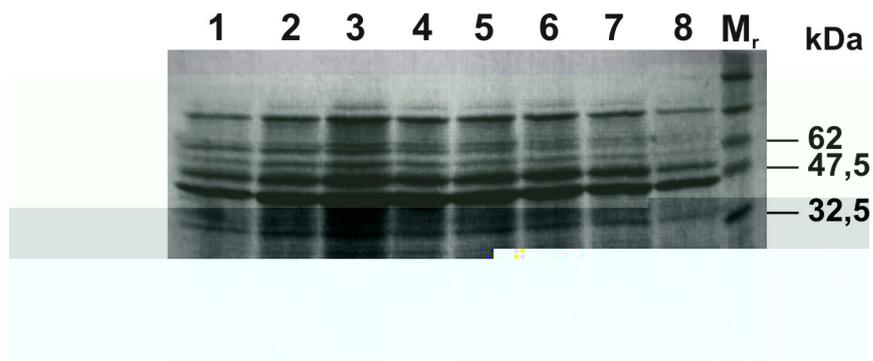


Abb. 3.2 Aufreinigung des CHB1-Proteins mittels Affinitätschromatographie.

Die Proteinlösung wurde bei 4 °C mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach 1 Std. wurde die Matrix in eine Säule gepackt. Um die unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen, wurde zunächst das Waschen mit Phosphatpuffer pH 7,0 ohne Imidazol durchgeführt und demzufolge mit 50 mM Imidazol (2× 2 ml, Spuren 1 und 2). Anschließend wurden die Proteine mehrfach mit je 2 ml 400 mM Imidazol eluiert (Spuren 3-8). 20 µl von der jeweiligen Fraktion wurde auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel getrennt.

CHB1-erhaltende Fraktionen wurden anschließend mittels Ionenaustauschchromatographie getrennt. Hierfür wurde eine kationenaustauschende ResourceS-Säule verwendet. Durch das Waschen mit steigenden NaCl-Konzentrationen wurden die Proteine eluiert, wobei das CHB1-Protein mit 400-500 mM NaCl freigesetzt wurde. So gereinigtes CHB1 zeigte eine hohe Homogenität (Abb. 3.3). Die Ausbeute betrug etwa 0,6-0,7 mg aus 6 l Kultur.

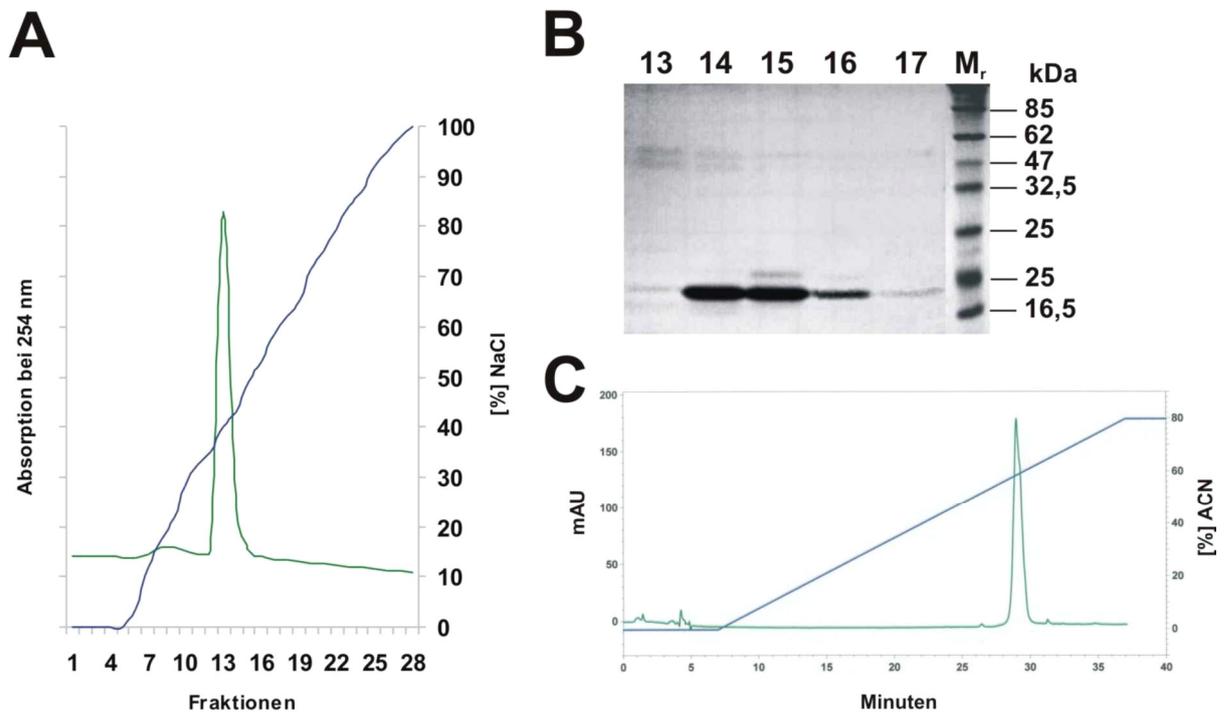


Abb. 3.3 Aufreinigung des CHB1-Proteins mittels Ionenaustauschchromatographie.

CHB1-haltige Fraktionen wurden 50-fach mit Auftragspuffer (20 mM Phosphat/Citratpuffer pH 5,2) verdünnt und auf eine ResourceS-Säule aufgetragen. Elution erfolgte mit steigender NaCl-Konzentration, dabei wurde CHB1 bei 400-500 mM NaCl ausgewaschen (A). Auftrennung der Fraktionen auf einem 12,5 % SDS-Gel zeigte sehr hohe Homogenität des CHB1-Proteins (B), die durch eine Umkehrphase-HPLC-Analyse bestätigt werden konnte (C).

3.2. Herstellung der verkürzten Formen des CHB1-Proteins

Tryptophan-Reste (W) spielen eine wichtige Rolle in Wechselwirkung zwischen Proteinen und Kohlenhydraten [Quiocho, 1986; Spurlino *et al.*, 1992]. Studien mit CHB1-Mutanten haben gezeigt, dass W57 essentiell für die Wechselwirkung mit Chitin ist. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass CHB1 nur in einer bestimmten Konformation, die von Disulfidbrücken-Bildung stabilisiert wird, Bindekapazität besitzt [Svergun *et al.*, 2000].

Um die Bedeutung der verschiedenen CHB1-Domänen für die Wechselwirkung mit Chitin vertiefend untersuchen zu können, wurden CHB1-Deletionsmutanten hergestellt, deren N- bzw. C-Terminus verkürzt wurde.

3.2.1. Klonierung der *chb1*-Mutantengene in *E. coli*

Mittels PCR wurde, durch Zugabe von speziell entwickelten Oligonukleotiden (dCfor und dCrev) und pBA1 [Grüber, 2001] als Matrize, ein Abschnitt des *chb1*-Gens (400 bp) generiert, der einer C-terminal verkürzten Mutante entsprach (CHB1 Δ C) und die notwendigen *SphI*- bzw. *BamHI*-Schnittstellen trug. Das PCR-Produkt (*SphI*-*BamHI*-Fragment) wurde mit pQE70-Vektor ligiert und anschließend in den *E.-coli*-Stamm M15[pREP4] transformiert. Wie durch DNA-Sequenzanalyse gezeigt wurde, enthielten die Plasmide die korrekte DNA

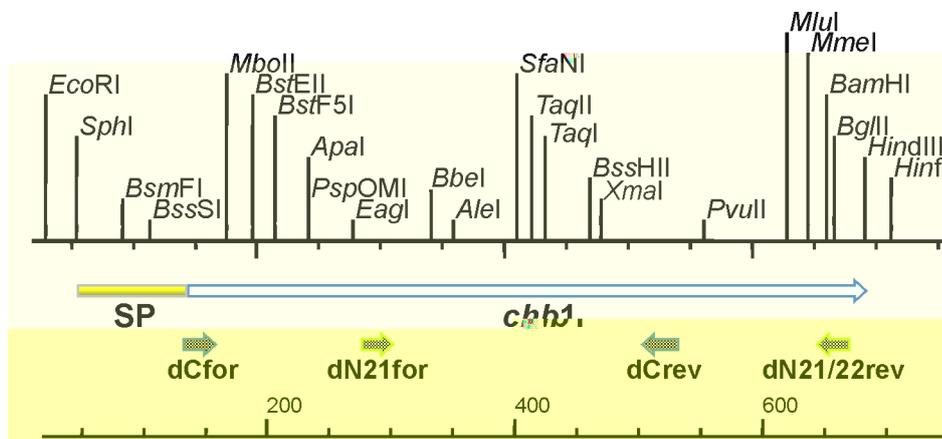


Abb. 3.4 Mutagenese des *chb1*-Gens.

Positionierung der Oligonucleotide, die für die Klonierung der C- bzw. N-terminalen Deletionsmutanten verwendet wurden; (SP) Signalpeptidkodierende DNA-Sequenz.

Für die Klonierung des *chb1Δ5'*-Gens wurde der pET-21a(+)-Vektor ausgewählt. Die Verwendung von synthetisierten Oligonukleotiden (dN21for und dN21/22rev) führte zur Synthese des gewünschten DNA-Fragmentes (396 bp) mit eingebauten notwendigen *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstellen. Das Produkt der Ligation wurde in einen *E.-coli*-BL43-Stamm transformiert und anschließend durch eine Restriktionsanalyse verifiziert.

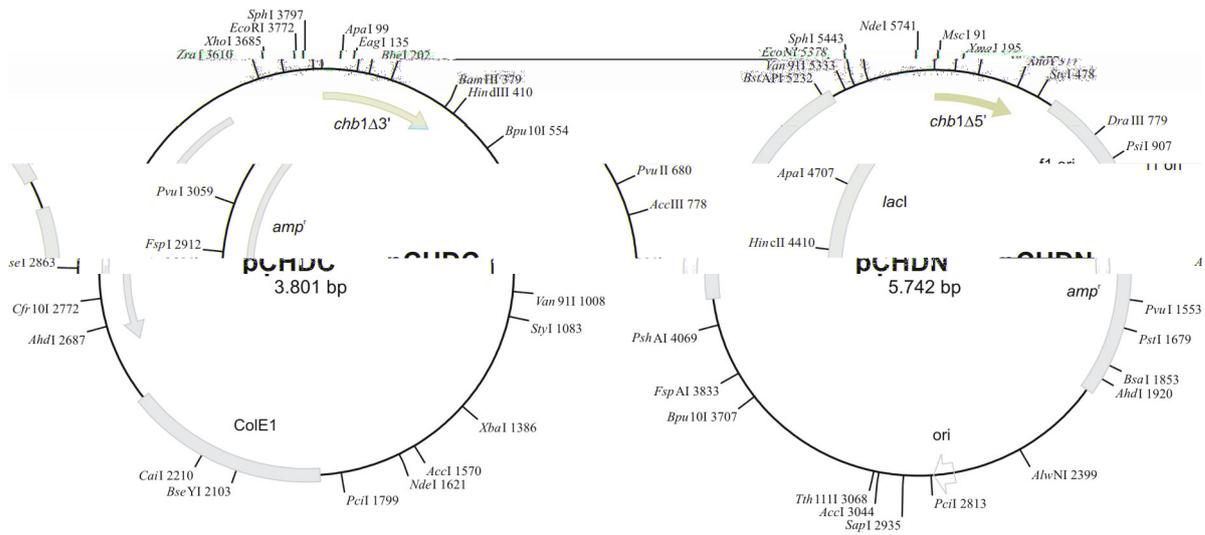


Abb. 3.5 Genkarten der Hybrid-Plasmide.

chb1Δ5'- und *chb1Δ3'*-enthaltende Hybrid-Plasmide wurden als pCHDN bzw. pCHDC bezeichnet.

3.2.2. Gewinnung und Aufreinigung der CHB1-Mutantenproteine

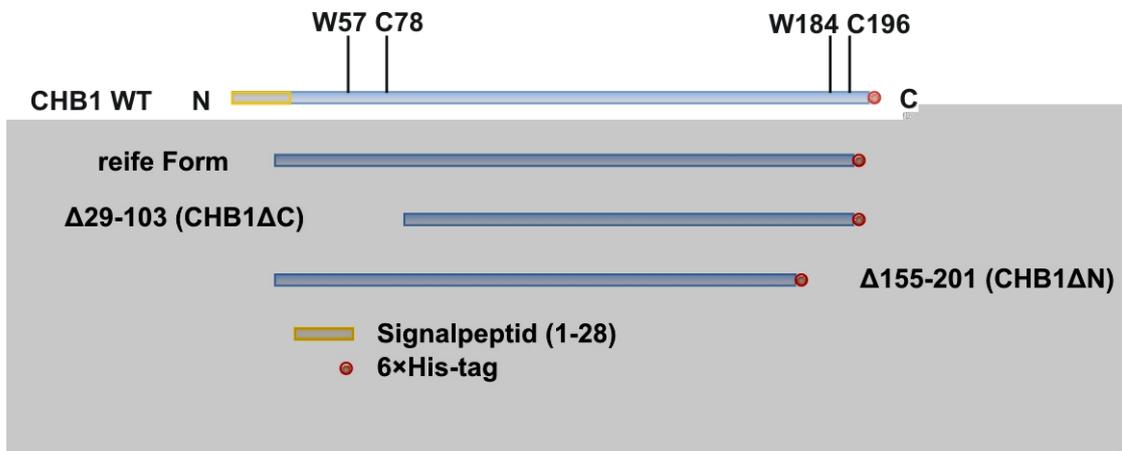


Abb. 3.6 Zusammenstellung der abgeleiteten Fusionsproteine.

Die N- und C-terminal verkürzte Mutantenproteine wurden als CHB1 Δ N bzw. CHB1 Δ C bezeichnet.

Die Anzucht der Stämme wurde wie bei dem Wildtyp-CHB1 durchgeführt. Nach dem Ernten, wurden die Proteine aus dem Zytoplasma durch Ultraschallbehandlung gewonnen. Die Auftrennung der Überstand- und Rückstandsportionen mittels SDS-PAGE zeigte, dass ein beachtlicher Teil des jeweiligen Mutantenproteins im Niederschlag vorlag (Abb. 3.7). Dies wies darauf hin, dass es sich im Falle von CHB1-Mutanten um schwer lösliche Proteine handelt, obwohl mittels Lichtmikroskopie keine Zellen gefunden werden konnten, die eindeutig Einschlusskörperchen aufwiesen. Um einen möglichst großen löslichen Anteil der Mutantenproteine zu erhalten, wurde versucht, die Stämme unter Bedingungen zu züchten, die das Metabolismus-Tempo verlangsamen. Jedoch selbst durch die Kultivierung bei 16 °C und einer Zugabe von geringen Mengen des Induktors (0,1 mM IPTG), konnte die Ausbeute der löslichen Mutantenproteine nicht erhöht werden. Aus dem Grunde wurden die Proteine durch Solubilisierung mit 8 M Harnstoff aus den unlöslichen Rückständen gewonnen. Durch die Bildung ihrer großen Hydratationshülle, zerstören chaotrope Agenzien die geordnete Struktur des Wassers und erhöhen die Löslichkeit unpolarer Substanzen. Das partielle Aufbrechen der Wasserstoffbrückenstruktur wässriger Lösungsmittel führt zu einer verstärkten Entfaltung hydrophober Bereiche von Proteinen. Die hydrophoben Wechselwirkungen werden aufgehoben, wodurch die Proteine die Konformation des statistischen *random coil* annehmen und aus den Aggregaten freigesetzt werden. Um deren nativen Zustand wiederherzustellen, müssen die chaotropen Agenzien aus der Lösung entfernt werden.

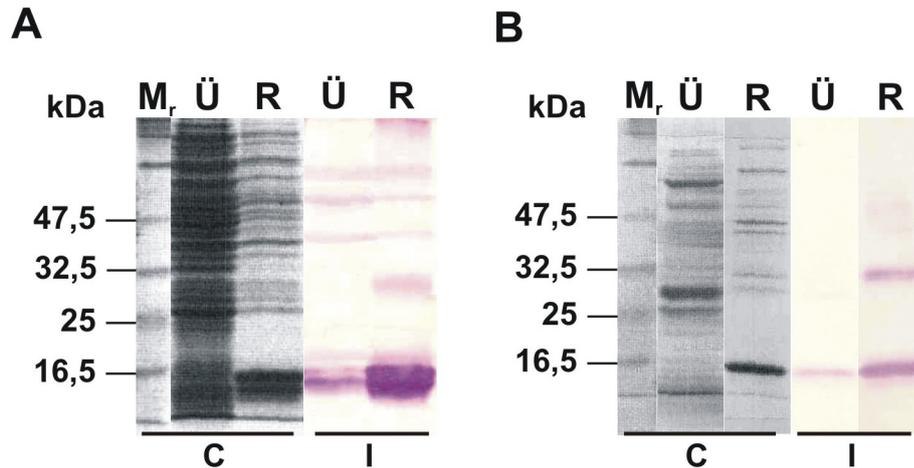


Abb. 3.7 Nachweis der Aggregatbildung bei den Mutantenproteinen.

Proben von löslichen Überständen (Ü) und unlöslichen Rückständen (R) wurden aus pCHDN- (A) sowie pCHDC-Transformanten (B) gewonnen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue angefärbt (C) bzw. auf eine PVDF-Membran übertragen und immunologisch visualisiert (I); (M) Molekulargewichtstandard.

Während der Dialyse von CHB1-Mutantenproteinen konnte bei sinkender Harnstoff-Konzentration eine deutliche Zunahme sowohl von Dimeren als auch höher organisierten Formen und unlöslichen Aggregaten beobachtet werden (Abb. 3.8). Unter diesen Umständen erfolgte die weitere Aufreinigung dieser Proteine in Gegenwart von 8 M Harnstoff.

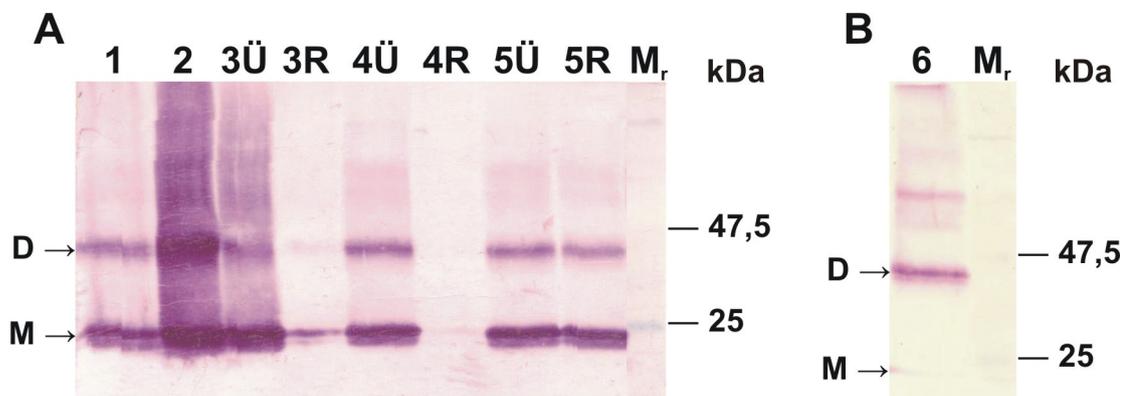


Abb. 3.8 Aggregatbildung von CHB1 Mutantenproteinen.

Die 8 M Harnstofflösungen, die CHB1 Δ N (A) und CHB1 Δ C (B) enthielten, wurden gegen eine Reihe von Puffern mit sinkender Harnstoff-Konzentration dialysiert; nach Auftrennung der Portionen auf einem SDS-Gel wurden die Mutanten mittels *Western Blot* analysiert. Spuren: (1) 6 M, (2) 4 M, (3) 2 M, (4) 1 M, (5) und (6) 0 M Harnstoff; (Ü) Überstand, (R) Rückstand, (M) Monomer, (D) Dimer, (M_r) Molekulargewichtstandard.

Da die chaotropen Reagenzien die Komplexbildung von Metall-Ionen nicht beeinflussen, wurden die beiden Mutantenproteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe 2.7.5.). Die Affinitätsreinigung der rekombinanten Fusionsproteine wird mit Ni-Chelaten

durchgeführt, die an eine Trägermatrix gebunden sind. Als besonders wirksam hat sich dabei Nitrilotriacetsäure (*nitrilotriacetic acid*, NTA) erwiesen. Wie auf der Abb. 3.9 dargestellt, konnte damit eine distinkte Homogenität (ca. 95 % auf einem SDS-Gel) der Proteine erreicht werden.

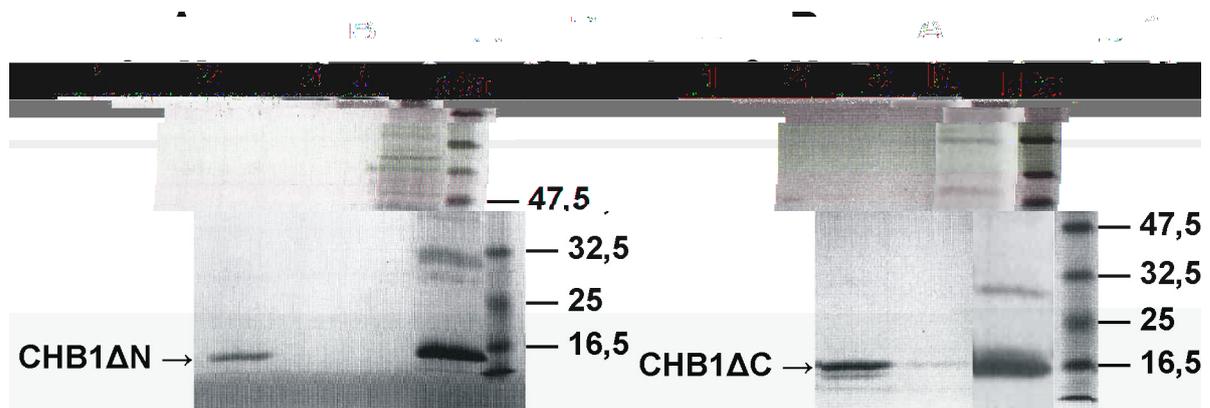


Abb. 3.9 Aufreinigung der Mutantenproteine unter denaturierenden Bedingungen.
(A) CHB1 Δ N, (B) CHB1 Δ C, (1) und (2) Fraktionen eluiert mit 600 mM Imidazol, (3) Säulenmaterial-Probe nach der Elution.

Hierbei ist es allerdings wichtig zu erwähnen, dass es nicht gelungen ist, die Proteine aus dem Säulenmaterial vollständig abzulösen. Selbst nach dem Waschen mit hohen Imidazol Konzentrationen (> 600 mM) blieben relativ große Protein-Mengen fest an der Matrix gebunden (Abb. 3.9, Spur 3), was in Folge zur reduzierten Ausbeute führte.

3.3. Interaktion der CHB1-Mutantenproteine mit Chitin

Wie bereits nachgewiesen, spielen sowohl der W57-Rest als auch die Disulfidbrücke zwischen C78 und C196 eine essenzielle Rolle für die Erhaltung der bindenden Konformation von CHB1 [Zeltins und Schrempf, 1997; Svergun *et al.*, 2000]. Der CHB1 Δ C-Mutante fehlte der C196-Rest, die CHB1 Δ N-Mutante besaß kein W57 und C78 mehr. Es war also von besonderem Interesse zu untersuchen, ob diese Mutanten tatsächlich keinerlei Affinität zu α -Chitin aufweisen. Die Bindetests wurden wie unter 2.9.2. beschrieben durchgeführt. Die relative Bindeaffinität wurde anhand der SDS-Gele als Quotient der an Chitin gebundener Protein-Menge und der Referenz-Proteinmenge bestimmt, wobei dieses Verhältnis bei CHB1-Wildtyp als 100 % gesetzt wurde.

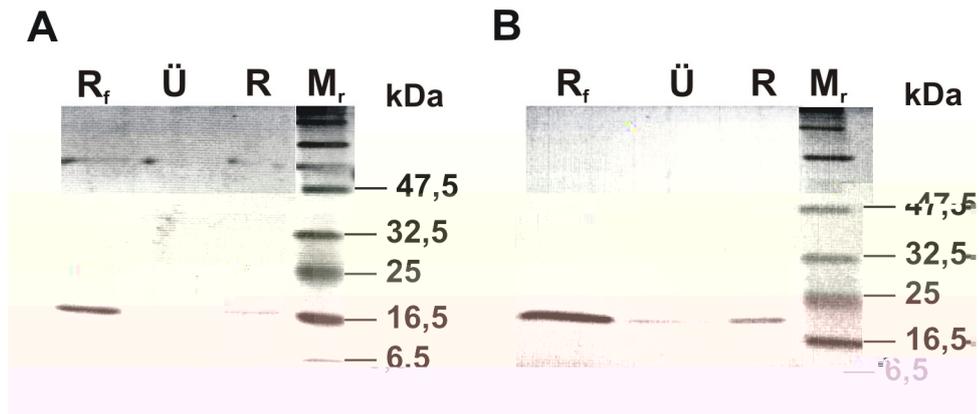


Abb. 3.10 Untersuchung der Interaktion von CHB1 Mutantenproteinen mit α -Chitin.

Die CHB1 Δ N (A) und CHB1 Δ C (B) Mutantenproteine wurden 60 Min. bei Raumtemperatur mit α -Chitin inkubiert. Danach wurden die Überstände (Ü) und die Rückstände (R) auf 12,5 % SDS-Gel aufgetragen, die Rückstände wurden zuvor zweimal mit 0,5 M NaCl in 20 mM Tris/HCl pH 7,0 gewaschen; die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt; die gleiche Menge an entsprechendem Protein diente als Referenz (R_f).

Dabei konnte wider die Erwartungen gezeigt werden, dass beide Mutantenproteine in der Lage sind, an α -Chitin zu binden. Die relative Bindeaffinität betrug 40 % des Wildtyp-CHB1-Wertes für CHB1 Δ N und 60 % für CHB1 Δ C.

3.4. Untersuchung der Aggregation des CHB1-Proteins

In Rahmen dieser Arbeit wurde es ursprünglich geplant, Kristallisationsstudien an CHB1 durchzuführen. Zu diesem Zweck sind sehr hohe Protein-Konzentrationen (ca. 10 mg/ml) erforderlich. Mittels Säulenchromatographie und durch Ammoniumsulfat-Fällung, sowie Diafiltration konnte lediglich die Konzentration von ca. 0,75 mg/ml erreicht werden. Bei dem Einsatz von verschiedenen Säulen wurde kein CHB1 in dem Durchlauf nachgewiesen. Jedoch unter Standardbedingungen nur ein Teil des Proteins eluiert werden konnte.

Nach Vorbehandlung mit bis zu 4 % SDS, 50 mM DTT bzw. 2-Mercaptoethanol und Erhitzen auf 100 °C für 5 Min. war eine Auftrennung der Aggregate auf einem nativen Polyacrylamidgel nicht möglich. Erst nach der Behandlung mit chaotropen Agenzien wurden distinkte Banden beobachtet, die unterschiedliche Mobilitäten aufwiesen (Abb. 3.11, Spur 4).

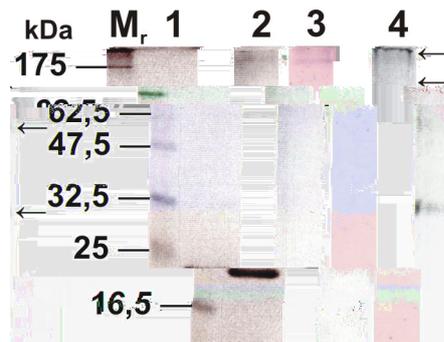


Abb. 3.11 CHB1-Protein assembliert zu höher organisierten Strukturen.

2,8 µg CHB1-Protein aufgetrennt auf einem denaturierenden (1) und nativen (2)-(4) Polyacrylamidgel; (3) immunologischer Nachweis von (2); (4) 2,8 µg CHB1 behandelt mit 1 M GuHCl; (M_r) Molekulargewichtsmarker.

Dank weiterer Untersuchungen konnte eine direkte Abhängigkeit zwischen Solubilisierung der CHB1-Aggregate und Konzentration der chaotropen Substanzen demonstriert werden. Behandlung mit 1 M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) oder 4 M Harnstoff resultierte in einer geringen Solubilisierung der CHB1-Aggregate, die erst mittels immunologischen Nachweises

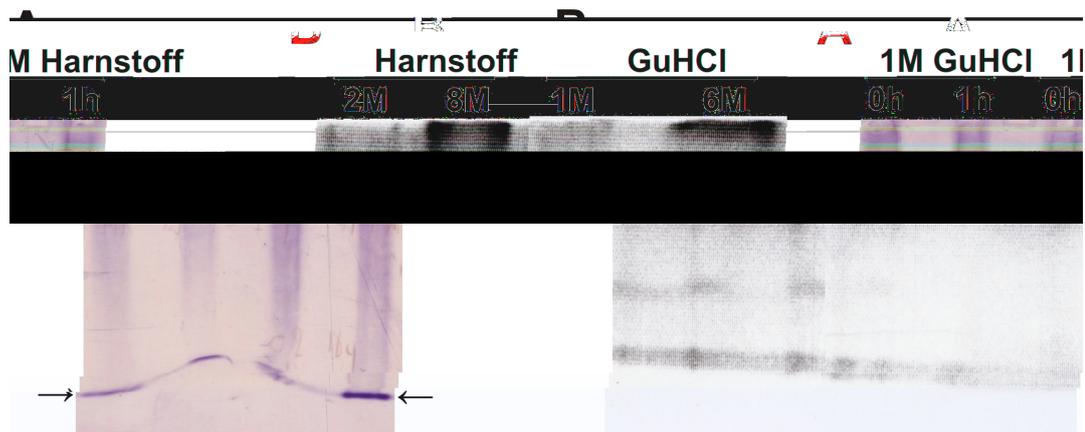


Abb. 3.12 Untersuchung der Solubilisierung der CHB1-Aggregate.

CHB1-Protein wurde nach der Behandlung mit chaotropen Agenzien auf 5 % (A) bzw. 12,5 % nativem Polyacrylamidgel aufgetrennt; anschließend erfolgte *Western Blot* (A) bzw. Silbernitratfärbung (B).

festgestellt werden konnte (Abb. 3.12, Spur 1 und 3). Eine 60-minütige Vorinkubation der Proben in dem jeweiligen Agens verstärkte die Wirkung von 4 M Harnstoff, nicht jedoch von 1 M GuHCl (Abb. 3.12 A). Erst nach Zugabe von hochkonzentriertem Harnstoff (8 M) oder GuHCl (6 M) entstanden Formen, die auf nativem, silbergefärbtem Polyacrylamidgel als eine Schar der proteinhaltigen Banden erschienen (Abb. 3.12 B).

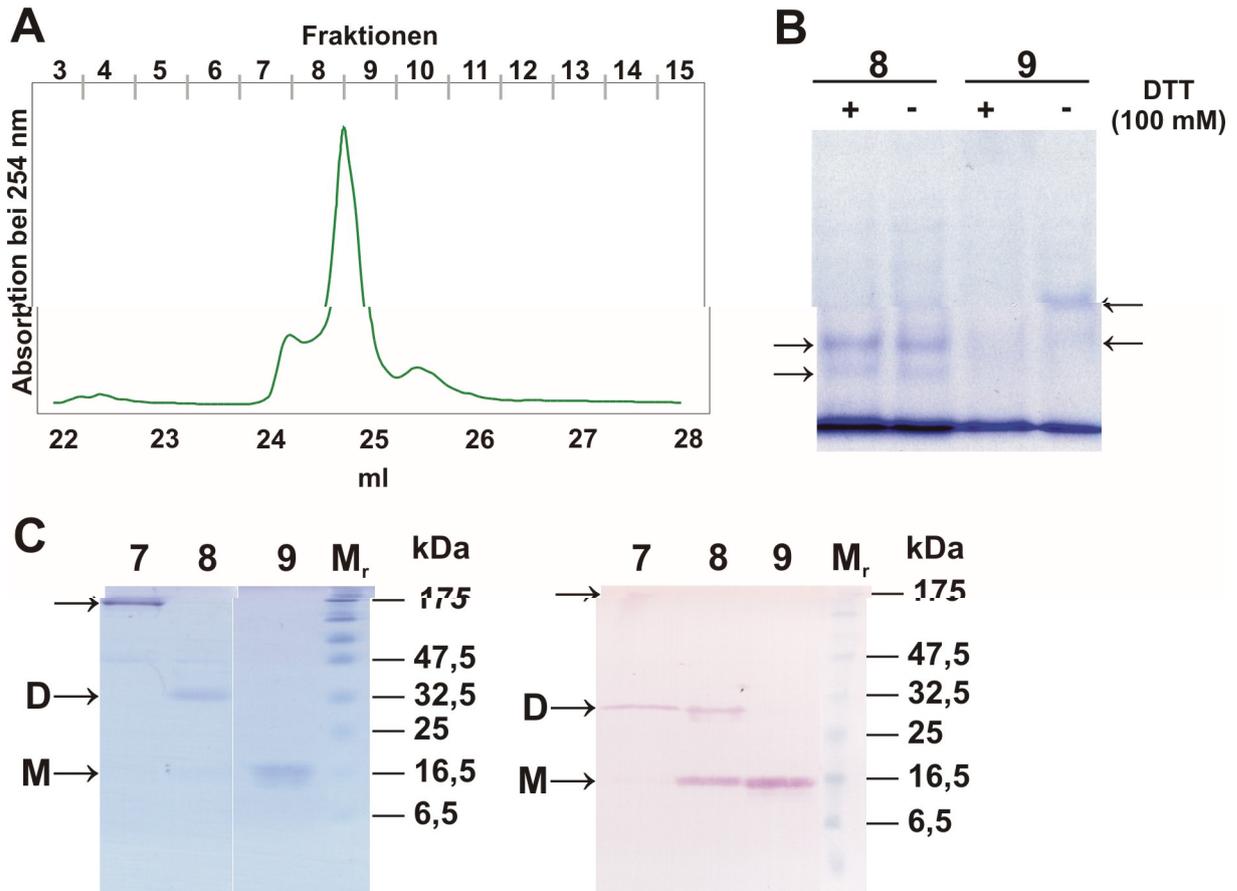


Abb. 3.13 Isolierung und Untersuchung der Polymer-Formen von CHB1.

(A) Gelfiltration von CHB1 auf einer Superdex 75-Säule; (B) CHB1-haltige Fraktionen behandelt mit 100 mM DTT und aufgetrennt auf einem 12,5 % nativen Polyacrylamidgel; (C) SDS-PAGE der Fraktionen: Coomassie-Färbung (links), *Western Blot* (rechts); (M) Molekulargewichtsmarker.

Mittels Gelfiltration wurden verschiedene Aggregationszustände von CHB1 isoliert (Abb. 3.13 A), die durch Zugabe von 100 mM Dithiothreitol (DTT) partiell deassembliert werden konnten (Abb. 3.13 B). Nach 5 Min. Inkubation der Proben in 2 % SDS und 2-Mercaptoethanol bei 100 °C wurden mittels SDS-PAGE proteinhaltige Banden nachgewiesen, die neben dem Monomer auch dem Dimer und Multimer entsprachen.

Die Assemblierungseigenschaften des Proteins wurden auch mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestätigt. CHB1 bildet hochorganisierte Netzwerke, die in ihrer relativ homogenen Struktur kompakte und lockere Bereiche aufweisen (Abb. 3.14). Dabei können Aggregate verschiedener Größe identifiziert werden. Die Identität dieser Strukturen wurde durch den Einsatz von goldmarkiertem CHB1 sowie goldmarkierten Antikörper gegen *anti*-CHB1-Immunglobulin positiv verifiziert. Wie auf der Abb. 3.14 A und B dargestellt, werden von den beiden Proteine Strukturen geformt, die sehr hohe Ähnlichkeit zeigen.

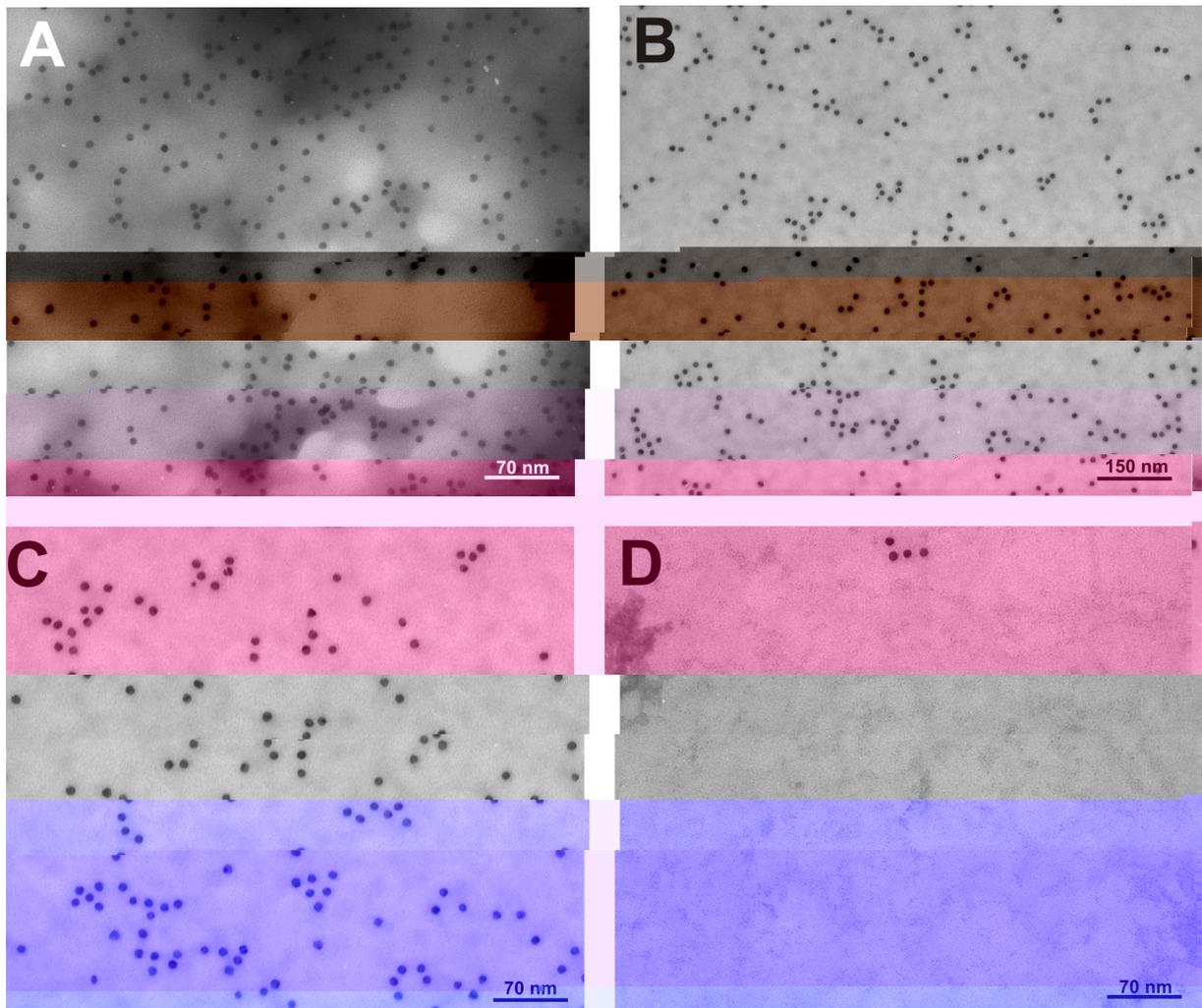


Abb. 3.14 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Aggregatbildung von CHB1.

TEM-Aufnahme von goldmarkiertem CHB1 (A); immunologischer Nachweis von CHB1 mittels goldmarkierter Antikörper gegen *anti*-CHB1-Immunglobulin (B) und (C); negative Kontrolle (D).

Die oben beschriebenen Versuche wurden mit dem Einsatz von einem Referenzprotein wiederholt. Es handelte sich dabei um ein CHB1-Homolog aus *Bacillus amyloliquefaciens*. Die Klonierung des *chbB*-Gens in *E. coli* und Charakterisierung des entsprechenden Proteins wurde bereits durchgeführt und veröffentlicht [Chu *et al.*, 2001]. Das mit *anti*-CHB1-Antikörpern kreuzreagierende ChbB-Protein vermag neben dem Substrat α -Chitin auch an β -Chitin und Chitosan zu binden. Die Isolierung und Aufreinigung des ChbB-Proteins erfolgte nach Chu *et al.* (2001).

Die durchgeführten Untersuchungen ermittelten, dass ChbB und CHB1 ein sehr ähnliches Verhalten bezüglich der Aggregation aufweisen (Daten nicht gezeigt). Im Gegenteil zu CHB1, enthält das ChbB-Protein keine Cystein-Reste und kann somit an der Bildung von

Disulfidbrücken nicht beteiligt sein. Offensichtlich sind an der Bildung von Aggregaten andere Mechanismen involviert.

3.5. Klonierung des *chb1*-Gens in Streptomyceten

Die heterologe Expression eines Gens kann zu einer nicht ordnungsgemäßen Proteinsynthese führen. So werden beispielsweise die Protein-Faltung oder posttranslationelle Modifizierungen und in Folge die Eigenschaften des so erhaltenen Proteins möglicherweise beeinflusst. Darüber hinaus kann ein fremdes, in sehr großen Mengen synthetisiertes Protein eine toxische Wirkung auf den Wirtstamm ausüben. Um sich zu schützen, lagern die Zellen das überflüssige Protein in Form so genannter Einschlusskörperchen ab. Solche Proteinaggregate können zwar mithilfe chaotroper Agenzien gelöst werden, dadurch wird jedoch die native dreidimensionale Struktur des Proteins zerstört. Um das CHB1-Protein in nativer Form erforschen zu können, wurden die entsprechenden Gene in dem Streptomyceten-Wirtstamm (*S. lividans*) kloniert.

Die Expression des *chb1*-Gens in *S. olivaceoviridis* erfolgt ausschließlich in Anwesenheit von Chitin und nicht in Gegenwart von löslichen C-Quellen (wie z.B. Glukose, *N*-Acetylglucosamin oder Glycerin). Es wurde bereits gezeigt, dass die Promoter-Region des *furS*-Gens (kodiert das Regulator-Protein FurS) sehr stark ist, und eine *in frame* Deletion eines *furS*-Teiles führt zur erhöhter Synthese des CpeB-Proteins, das auf demselben Operon vorliegt [Zou *et al.*, 1999]. Für die Steuerung der Expression sollte deshalb die Promoter-Region des *chb1*-Gens durch diejenige des *furS*-Gens aus *S. reticuli* ersetzt werden.

Das gesamte *chb1*-Gen, inklusive Signalsequenz sowie fusionierte 6×Histidin-Codons (für ein C-terminales His-tag), war bereits auf pBA1 vorhanden [Grüber, 2001] Mittels PCR wurde ein entsprechendes Fragment des Plasmids (722 bp) synthetisiert. Hierfür wurden Chbsal (fügt eine notwendige *SalI*-Schnittstelle vor dem Start-Codon ein) und RSP (*reverse sequencing primer*) Oligonukleotide angewandt. Nach der Ligation des *SalI*-*HindIII*-Fragmentes mit dem linearisierten pUKD30-Plasmid wurde das pUFChbH-Plasmid (4 kb) erhalten und in den *E.-coli*-DH5 α -Stamm transformiert. Die Transformanten wurden mithilfe der Kolonie-PCR mit *chb1*Nn und *chb1*C Oligonukleotiden (siehe Kapitel 2.10.4.4.) überprüft. Nach einer DNA-Restriktions- und Sequenzanalyse konnten die korrekten Klone identifiziert werden.

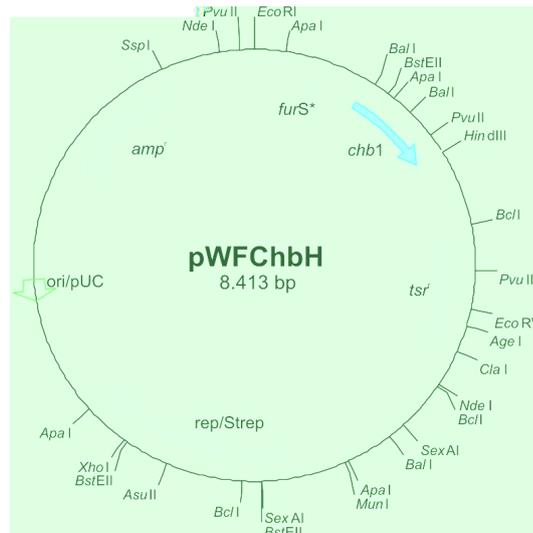


Abb. 3.15 Genkarte der *chb1*-tragenden bifunktionellen Hybrid-Plasmides pWFChbH.

pUWFChbH kann als pUC18-Derivat nur in *E. coli*, jedoch nicht in Streptomycceten replizieren. Aus diesem Grunde wurde das *EcoRI-HindIII*-Fragment (1,4 kb, *chb1* mit unvollständigem *furS*-Gen und dazugehöriger Promoter-Region) ausgeschnitten und mit dem bifunktionellen (*E. coli*/Streptomycceten) pWHM3be-Plasmid fusioniert. Das Produkt der Ligation (pWFChbH, 8,4 kb) konnte nach der Transformation in dem *E.-coli*-DH5 α -Stamm anhand charakteristischer Merkmale (Ampicilin-Resistenz, β -Galactosidase-Aktivität), sowie mittels Kolonie-PCR identifiziert werden. Die Restriktions- und DNA-Sequenzanalysen wiesen keine Fehler auf, und das Plasmid wurde anschließend in dem *Streptomyccetes-lividans*-Stamm retransformiert. Die Klone wurden bezüglich der Thiostreptonresistenz vorselektiert, und deren Plasmid-DNA mithilfe Kolonie-PCR sowie Restriktionsanalyse auf Fehler geprüft. Zusätzlich wurde die Proteinsynthese immunologisch getestet.

3.6. Expressionsversuche des *chb1*-Gens in Streptomycceten

Das *chb1*-Gen wurde mit dazugehöriger Signalsequenz kloniert, sodass CHB1 sekretiert werden kann. Nach einer sorgfältigen Durchführung der Optimierungsexperimente wurden solche Bedingungen gewählt, welche die höchste Ausbeute versprachen. Dabei wurden das Inokulum, Auswahl der Medien, C- und N-Quellenkonzentration sowie Inkubationsbedingungen berücksichtigt. Streptomycceten sind extrem empfindlich für jede Art von

Mikroklimaänderungen, daher wurde versucht, jeweils die gleichen Bedingungen zu wählen (inklusive Kulturvolumina, Inkubationszeiten, Temperatur, Schüttelgeschwindigkeit, usw.).

Dadurch, dass Vollmedium viele Peptide verschiedener Länge aus dem Hefeextrakt enthält, werden von dem Wirtstamm zusätzlich zahlreiche Proteasen sekretiert, die bei der Reinigung des gewünschten Proteins abgetrennt werden müssen. Es zeigte sich heraus, dass in Minimalmedium (ergänzt mit 1 % Aminosäuren aus Kasein bzw. 1 % Hefeextrakt) die Keimfähigkeit der Sporen deutlich geringer ist. Folglich wurden die Mycelien in Vollmedium vorgezchtet und anschließend in das ergänzte Minimalmedium (C- und N-Quellen) transferiert.

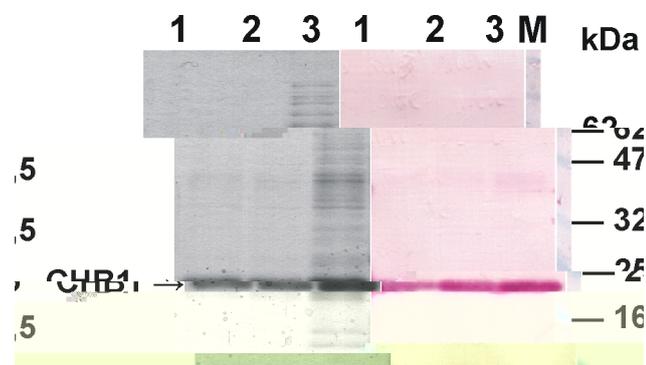


Abb. 3.16 Optimierung der Kultivierungsdauer für CHB1 Produktion

S. lividans 66 pWFChbH wurde 24 Std. als Standkultur inkubiert und nach 15-facher Verdünnung UN geschüttelt; anschließend Sekretion ins MM-Medium: (1) 1 Std., (2) 2 Std., (3) 3 Std., (M) Molekulargewichtmarker, links: Coomassie gefärbt 12,5 % SDS-Gel, rechts: immunologischer Nachweis von CHB1 mit *anti*-CHB1 Antikörper

3.7. Gewinnung von CHB1 aus *S. lividans* Kulturfiltrat

Die Kulturfiltrate wurden, wie unter 2.7.7. beschrieben gewonnen. Bei Ammoniumsulfat-Fällungen waren hohe Verluste an CHB1 zu beobachten. Da das CHB1-Protein unter verschiedenen pH-Bedingungen an das DEAE-Säulenmaterial nicht bindet wurde dieses genutzt, um die CHB1-Lösung von dem Teil der Fremdproteine zu befreien. Mittels HIC-Chromatographie wurde die Lösung weiter gereinigt und angereicht. CHB1-haltige Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration in Centrikon YA-3 angereicht. Dabei wurden etwa 40 % Verluste festgestellt. Anschließend wurde die konzentrierte Protein-Lösung mittels Gelfiltration auf einer Superdex-75-Säule getrennt. So gereinigtes Protein zeigte auf einem 12,5 % SDS-Gel eine deutliche Homogenität.

3.8. CHB1 als Hilfsmittel für Chitinerkennung

3.8.1. *chb1*-Expression in Co-Kulturen von Streptomyceten und Pilzen

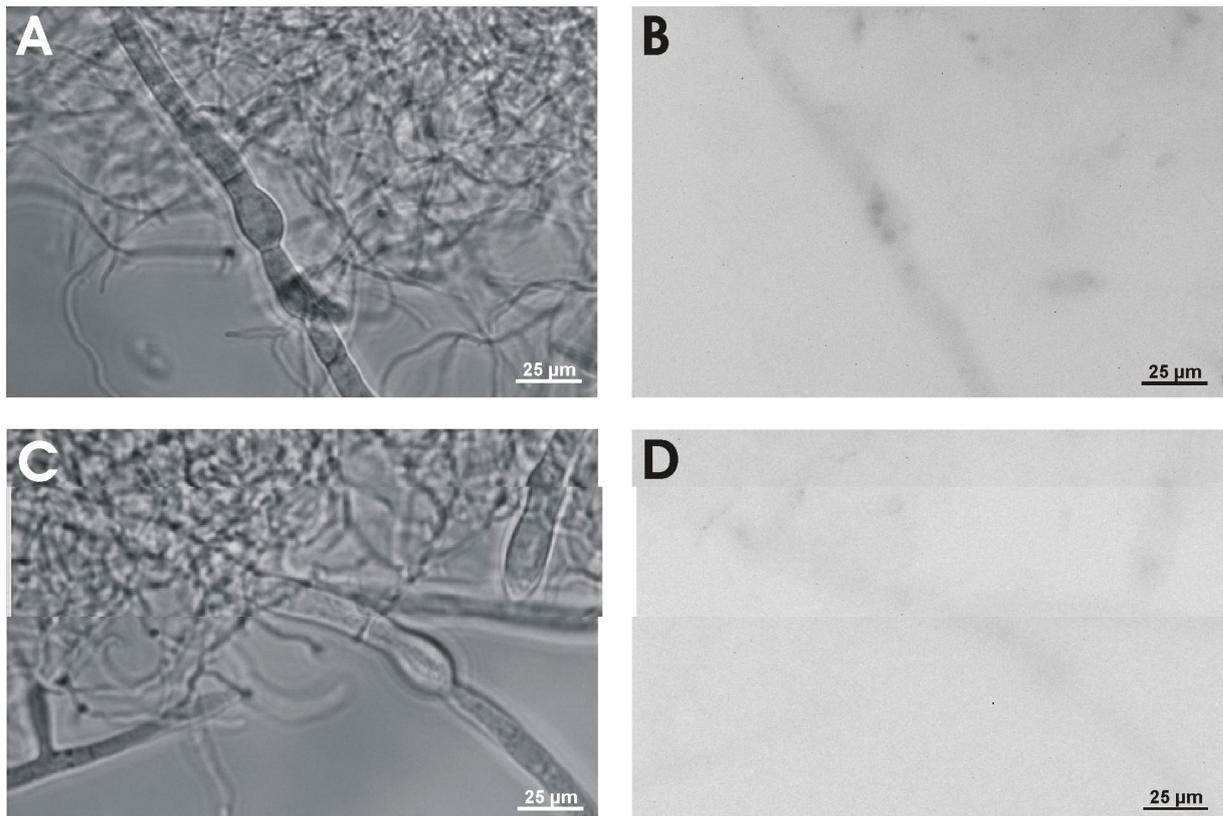


Abb. 3.17 Untersuchung der Expression des *chb1*-Gens.

Co-Kulturen von *Streptomyces lividans* pCHBG und *Mucor rouxii* wurden vorbereitet, wie unter 2.6.3. beschrieben. Die Aufnahmen erfolgten nach 24 Std. Inkubation im Hellfeld- (A) bzw. nach Exposition unter UV-Licht (B); *M. rouxii* und *S. lividans* pWHM3 Co-Kultur wurde als negative Kontrolle verwendet: Hellfeld- (C) und Fluoreszenzaufnahme (D).

Die Studien zur Bedeutung von Chitinbindeproteinen für die Chitin-Erkennung wurden während Wachstums der Streptomyceten in einer Co-Kultur mit *Mucor rouxii* durchgeführt. Der angewandte *Streptomyces-lividans*-66-Stamm trug auf dem pCHBG-Plasmid eine Kopie des *chb1*-Gens, das mit einem *GFP*-Reportergen fusioniert worden war. Der Kontakt zu den chitinhaltigen Pilz-Hyphen resultierte in der Synthese des ChbG-Fusionsproteins. Das Vorhandensein des Translationproduktes konnte über den Fluoreszenzeffekt eindeutig nachgewiesen werden.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde eine Anlagerung des ChbG-Fusionsproteins auf Pilz-Hyphen gezeigt. Die Verteilung des Proteins erfolgt ungleichmäßig. Die stärksten Signale wurden von Hyphen registriert, die in einen unmittelbaren Kontakt mit den Streptomyceten kommen. An manchen Stellen war ein fluoreszierender Saum direkt auf der Oberfläche der Streptomyceten-Hyphen zu erkennen.

3.8.2. Untersuchungen zur Chitin-Biogenese in *Saccharomyces cerevisiae*

Das CHB1-Protein wurde als Hilfsmittel zur Verfolgung von Chitin-Biogenese in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Dieser Hefe-Stamm verfügt über drei Chitinsynthese-Aktivitäten (CSI, CSII und CSIII), die verschiedene Aufgaben erfüllen und unterschiedlich reguliert sind. CSIII ist für die Synthese eines Chitin-Rings an der Stelle einer beginnenden Knospung, die Chitin-Bildung während der sexuellen Vermehrung und der Ascosporen-Produktion und nicht zuletzt die Synthese des in der Zellwand verteilten Chitins zuständig. Zu den Aufgaben von *CHS2*-Genprodukt (Chs2p) gehört die Synthese des primären Septums zwischen Mutter- und Tochterzelle bei der Knospung. Chs1p dient als Reparaturenzym [Sburlati und Cabib, 1986; Silverman, 1987; Shaw *et al.*, 1991; Cabib *et al.*, 2001].

Über 90 % der *in vitro* messbarer Chitinsynthese-Aktivität ist auf die CSI zurückzuführen. Für Untersuchungen in Rahmen dieser Arbeit wurde eine Disruptions-Mutante eingesetzt, welcher die CSIII-Aktivität fehlt. Da sich verschiedene Chitinsynthese-Aktivitäten bezüglich Co-Faktoren und pH-Optima unterscheiden [Sburlati und Cabib, 1986; Orlean, 1987; Choi und Cabib, 1994] wurden solche Reaktionsbedingungen gewählt, die nur CSI-Aktivität erlauben.

Wie auf der Abb. 3.18 (links) dargestellt, sind die frisch isolierten Vesikel-artige Strukturen, deren Durchmesser von ca. 70 bis 100, sporadisch 150 nm variiert, kugelförmig und vorwiegend vereinzelt. Gelegentlich sind 2-3 miteinander verbundene Vesikeln zu sehen. Nach der Zugabe von UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-NAG) erscheint zwischen den Vesikeln ein filigranes Netzwerk, welches auf die Synthese von NAG-Ketten hindeutet (Abb. 3.18, rechts). Berücksichtigt man die Breite einer einzelnen NAG-Kette (ca. 0,5 nm), so kann man berechnen, dass sich in einer sichtbaren Polymer-Faser etwa 5 bis 30 Ketten angelagert haben. Parallel zu dieser Beobachtung kann eine Zunahme des Durchmessers der Vesikel (bis zu ca. 180-200 nm) festgestellt werden. Sie bilden jetzt häufiger Aggregate, welche mit einer fasrigen Struktur miteinander verbunden sind. Der Durchmesser der Vesikel

in den Aggregaten variiert um Faktor 2 (Abb. 3.18 B und D, mit Pfeil gekennzeichnet). Einzelne Vesikel sind jedoch weiterhin zu sehen. Nach einer längerfristigen Reaktion werden die meisten Vesikel in Fibrillen verschleiert und in Form einer Kette bzw. eines Konglomerates miteinander verbunden (Abb. 3.19). Das Fibrillennetzwerk ist wesentlich deutlicher zu erkennen. Selten sind faserförmige Strukturen zwischen in unmittelbarer Nähe liegenden Vesikel (Abb. 3.19, Abb. 3.20 A und B), und als freiliegende Anordnungen zu finden (Abb. 3.20 C-F). Einzelne Vesikel sind nun eher selten sichtbar, allerdings liefern sie eine wichtige Information über die Mengen an Polymer, dass von einem Vesikel hergestellt werden kann (Abb. 3.20 C und D).

In Kontroll-Ansätzen ohne UDP-NAG-Zugabe bzw. mit direkt nach der Isolierung analysierten Vesikel, konnten die Faser nur gelegentlich gesehen werden. Deren dominanter Teil wird daher Substrat-abhängig hergestellt. Die Tatsache, dass in Gegenwart von Chitinsynthese-Inhibitoren diese Reaktion nicht erfolgt [frühere Kontrollstudien in der AGM] deutet darauf hin, dass es sich um Chitin-Polymer handelt. Um diesen Schluss zusätzlich zu testen, wurde den Chitinsynthese-Ansätzen eine 59-kDa-Chitinase aus *S. olivaceoviridis* zugefügt, die dafür bekannt ist, dass sie mit dem Chitin besonders gut assoziiert. Dadurch wurde zunächst das zwischen den eingebetteten Vesikeln liegende Netzwerk abgebaut, sodass sie als enthüllte Vesikel erscheinen (Abb. 3.21 A-D). Nach längerer Inkubation wirken die Vesikel kollabiert (Abb. 3.21 E-F). Aufgrund dieser Beobachtung konnte erhärtet werden, dass die Vesikel den Chitosomen entsprechen, die CSI-Aktivität enthalten.

Für Untersuchungen bezüglich der Wechselwirkung zwischen CHB1 und Chitin wurden durch die Chitosomen synthetisierte Chitin-Netzwerke mit CHB1 versetzt. Nach der Zugabe des Proteins erscheinen sie stärker prononciert und aufgequollen, was infolge der Anlagerung des Proteins auf den Chitinhaltigen Strukturen geschieht (Abb. 3.22 und 3.23 A-D). Schon zu Beginn der Synthese erscheinen die Chitin-Fibrillen nicht so fein verteilt zu sein, wie ohne CHB1 (s. Abb. 3.18-3.20). In Form von Fasern formen sie mit CHB1 eine Gel-ähnliche Matrix. Das Protein wirkt wie ein Klebstoff, mit dem sowohl die einzelnen Fasern als auch die Chitosomen umgewickelt und kompakter zusammengehalten werden. An manchen Stellen erscheint das Polymer, als ob es aus den Vesikeln herausgespritzt wäre (Abb. 3.23 E und 3.24 A und B; mit Pfeil gekennzeichnet). Manchmal sieht man eng zusammengebundene Vesikel, die wie Chitosomen-Hüllen oder wie Weintrauben (Abb. 3.23 F, 3.24 E und F) aussehen.

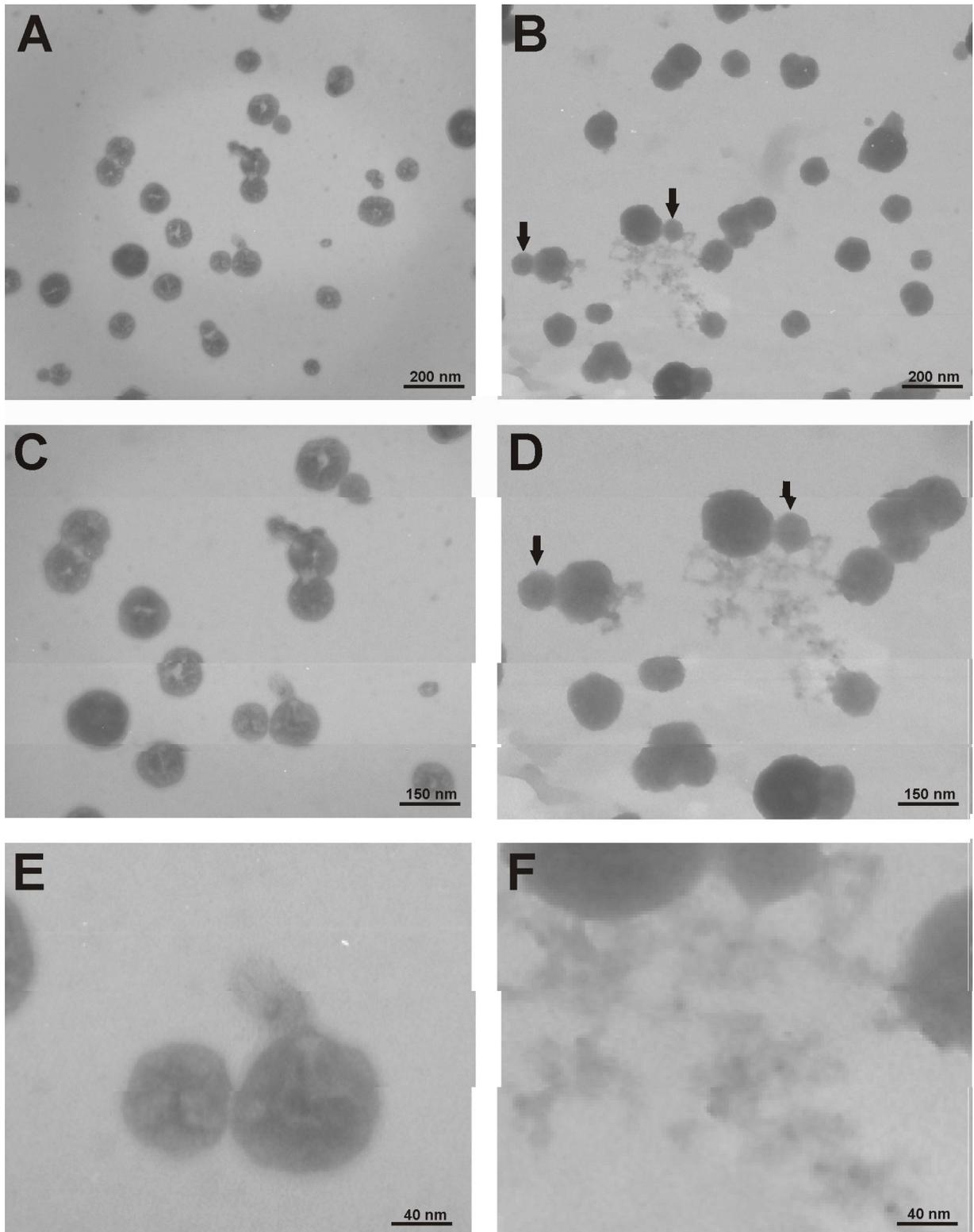


Abb. 3.18 TEM-Aufnahmen von isolierten Chitosomen nach 1 Std. Inkubation ohne (links) bzw. mit (rechts) UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-NAG); die charakteristische Assoziierung wurde mit Pfeil gekennzeichnet.

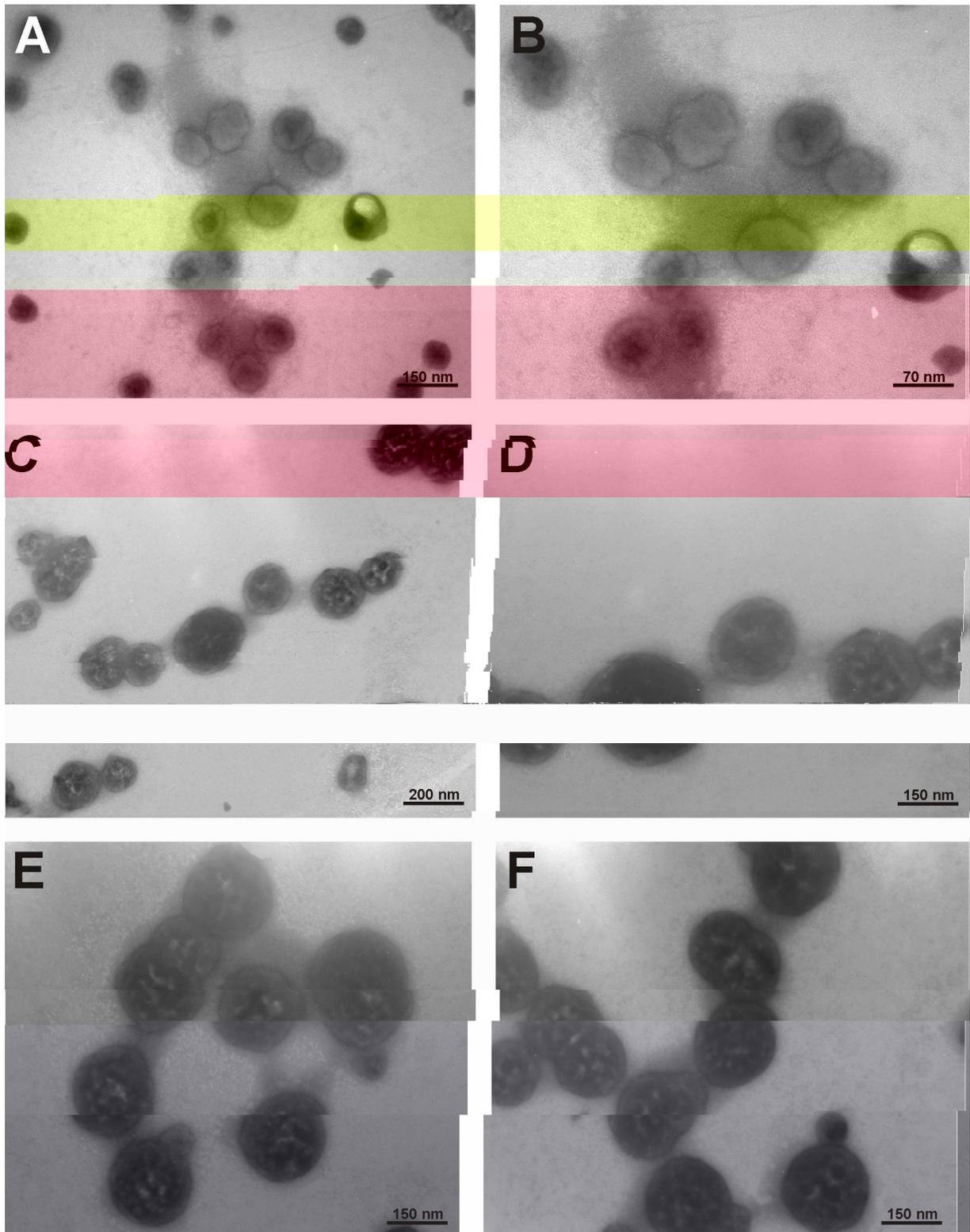


Abb. 3.19 TEM-Aufnahmen von Chitosomen nach 16 Std. Inkubation mit UDP-NAG.

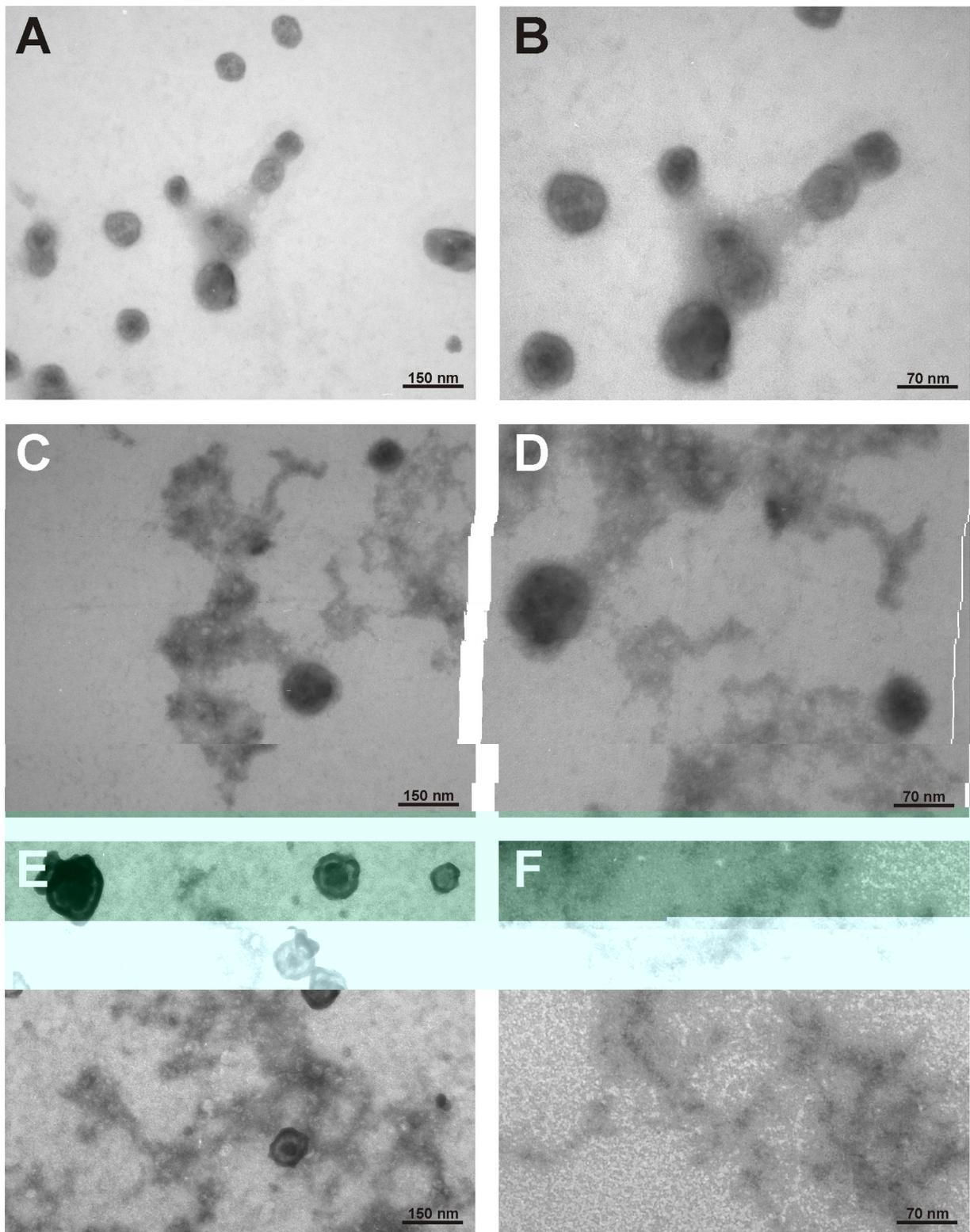


Abb. 3.20 TEM-Aufnahmen von Chitosomen nach 16 Std. Inkubation mit UDP-NAG.

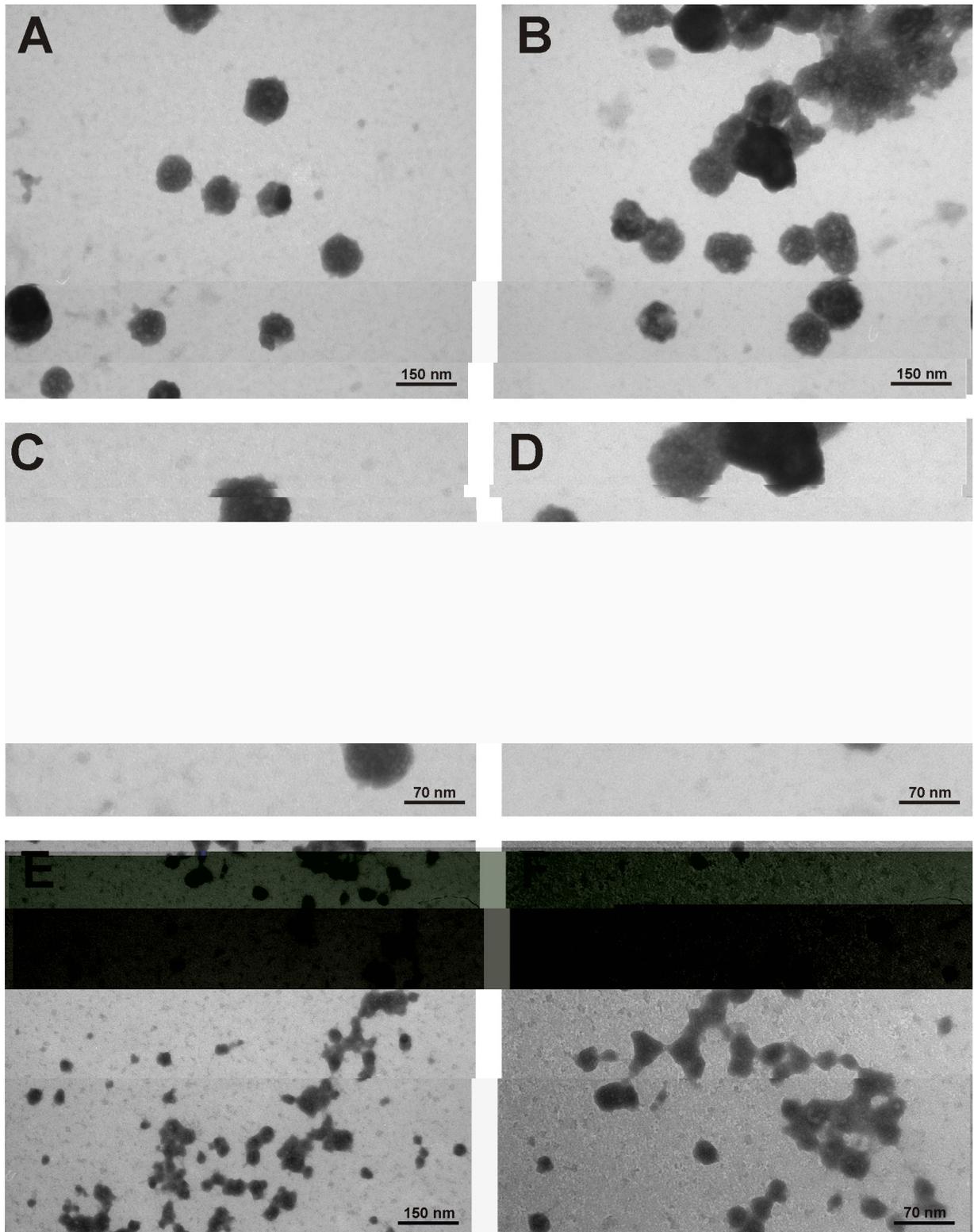


Abb. 3.21 Nach 16 Std. Inkubation mit UDP-NAG wurden die Chitosomen der Behandlung mit 59-kDa-Chitinase aus *S. olivaceoviridis* für 3 Std. (A bis D) bzw. 16 Std. (E und F) unterzogen; TEM-Aufnahmen.

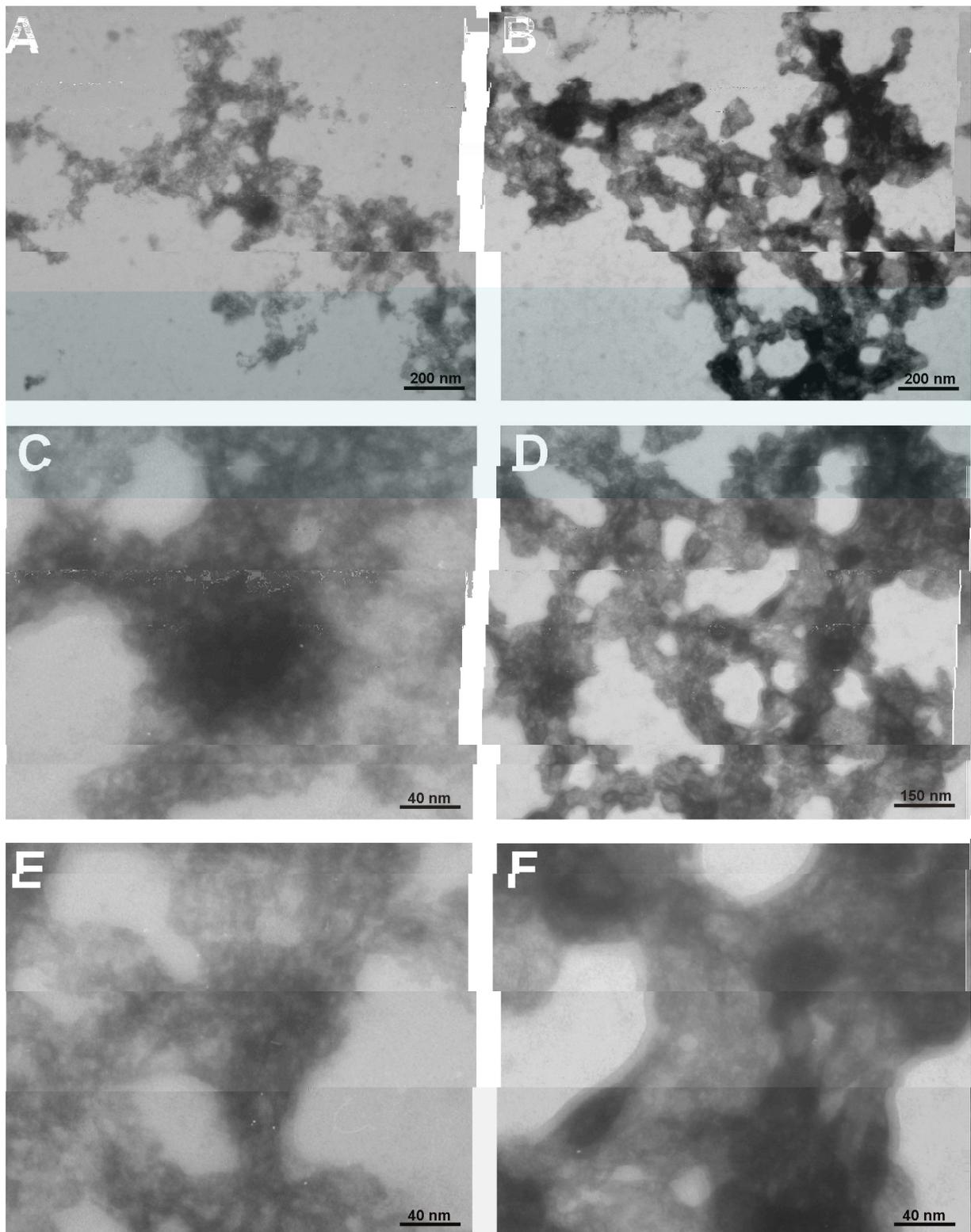


Abb. 3.22 TEM-Aufnahmen von Chitosomen, die nach 5-stündiger Inkubation mit UDP-NAG, für 1 Std. mit CHB1 versetzt wurden.

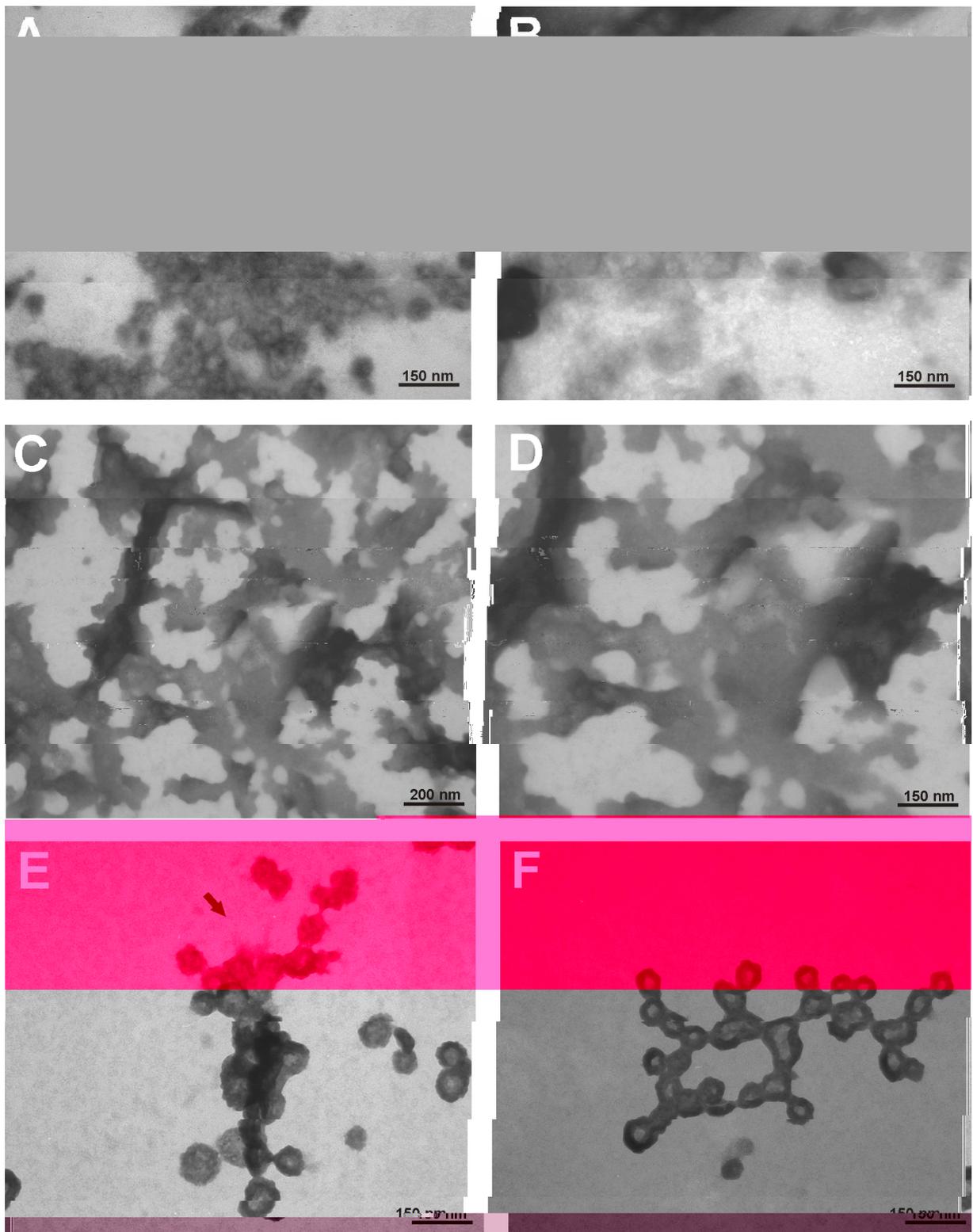


Abb. 3.23 TEM-Aufnahmen von Chitosomen: nach 5-stündiger Inkubation mit UDP-NAG, erfolgte 16-stündige Behandlung mit CHB1.

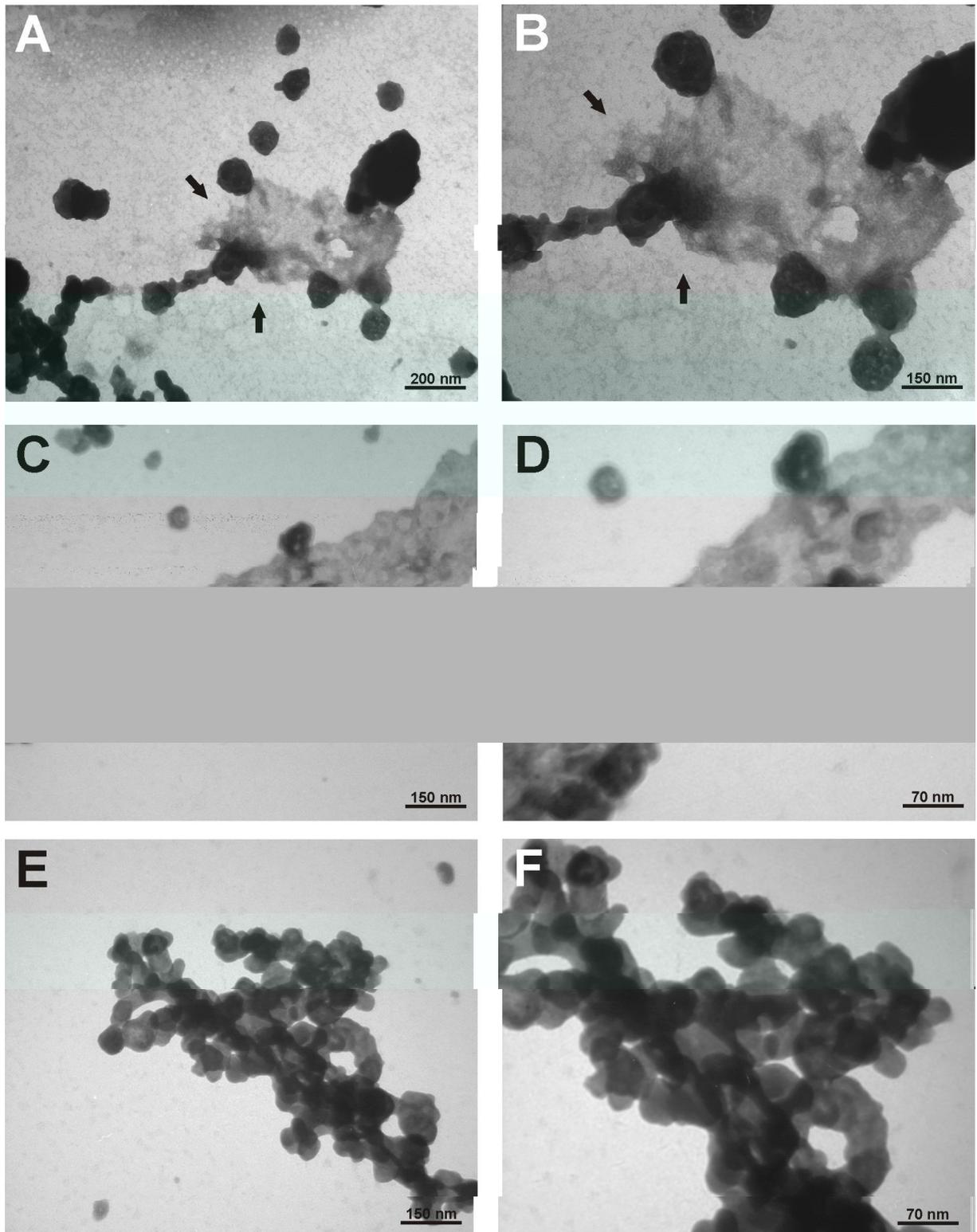


Abb. 3.24 TEM-Aufnahmen von Chitosomen: nach 5-stündiger Inkubation mit UDP-NAG, erfolgte 16-stündige Behandlung mit CHB1.

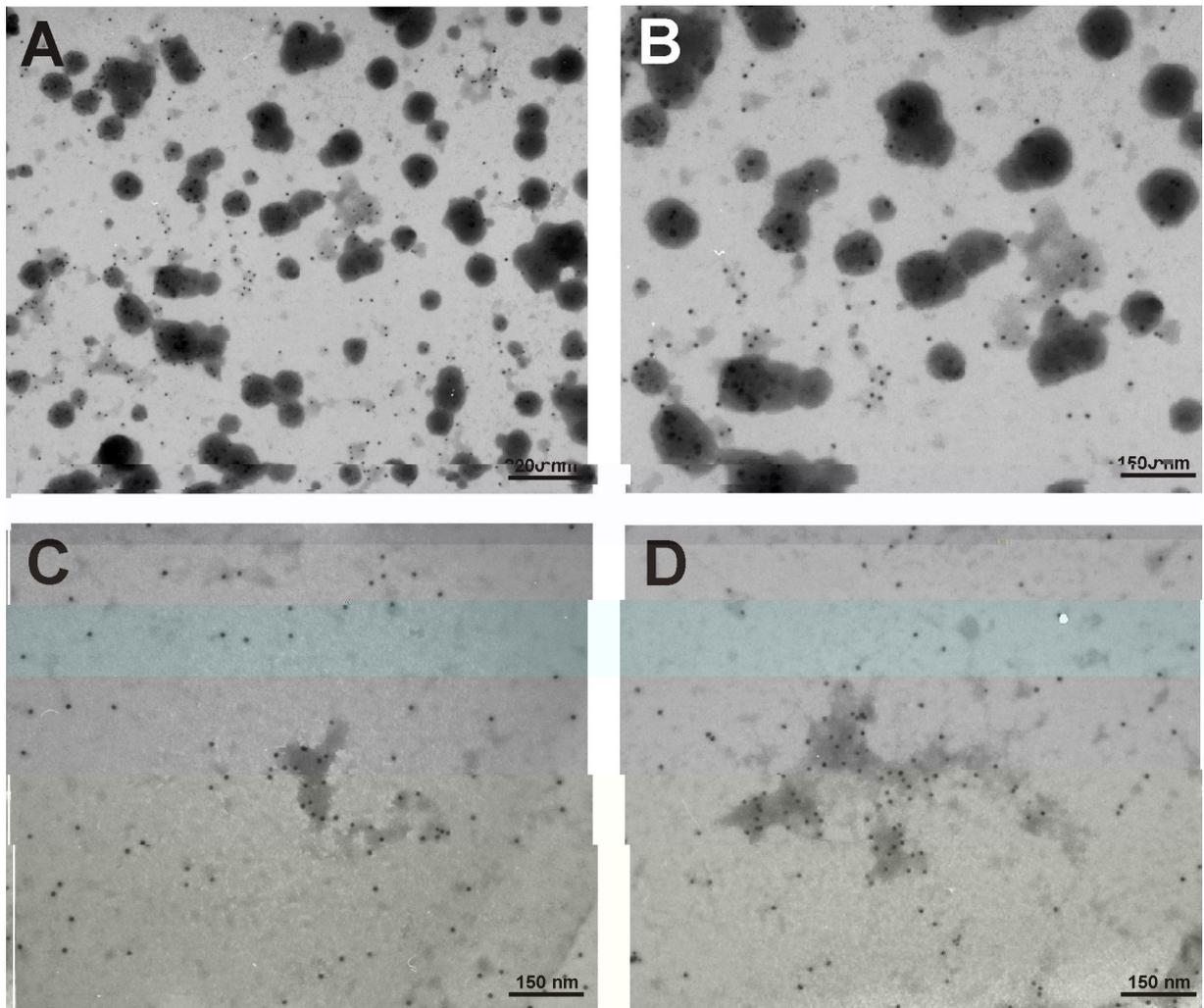


Abb. 3.25 Nachweis von Chitin mit goldmarkiertem CHB1-Protein.

Nach einer 16-stündiger Inkubation der Chitosomen ohne (A und B) bzw. mit Substrat (C und D) erfolgte Zugabe von CHB1-Protein, das mit Goldpartikeln (10 nm) gekoppelt war.

Die Spezifität der Wechselwirkung zwischen CHB1 und naszierendem Chitin wurde mit CHB1, das mit 10 nm Goldpartikeln markiert wurde, getestet. Wie auf der Abb. 3.25 dargestellt, sind die meisten CHB1-Gold-Konjugate mit Chitosomen bzw. Chitin assoziiert. An dieser Stelle ist allerdings zu beachten, dass verhältnismäßig geringe Mengen an Goldpartikeln gebunden werden. Dies könnte bedeuten, dass zu dem Zeitpunkt lineare NAG-Ketten noch einen geringen Assoziierungsgrad aufweisen. Ein kleiner Teil der CHB1-Gold-Konjugate liegt im Hintergrund vor. Entweder handelt es sich um freie, ungebundene Moleküle, oder um solche, die mit sehr kurzen Chitin-Fasern assoziiert sind. Dennoch zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass zwischen CHB1 und naszierendem Chitin zu einer Wechselwirkung kommt. Aufgrund sehr hoher Spezifität der Bindung zwischen CHB1 und

α -Chitin lässt sich ableiten, dass schon in kurzer Zeit nach der Synthese zumindest ein Anteil des Polymers in der kristallinen Struktur vorliegt.

3.8.3. Etablierung eines Tests für Chitinsynthase-Aktivität

Durch den Einsatz von CHB1 wurde ein nichtradioaktiver Test für Chitinsynthase-Aktivität etabliert. Er basiert auf einer von Lucero *et al.* (2002) entwickelten Methode, indem die *in vitro* synthetisierten Chitinfaser an eine WGA-beschichtete (*wheat germ agglutinin*) Oberfläche gebunden und anschließend mithilfe von WGA-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase spektrophotometrisch detektiert werden. Durch die Anwendung von immobilisiertem CHB1-Protein konnte die Spezifität des Tests eindeutig verbessert werden. Im Gegensatz zu WGA, das drei hintereinander liegende NAG-Reste unterscheidet [Peters und Latka, 1986], erkennt CHB1 hochspezifisch α -Form des kristallinen Chitinpolymers und bindet daran mit einer hohen Affinität [Schnellman *et al.*, 1994].

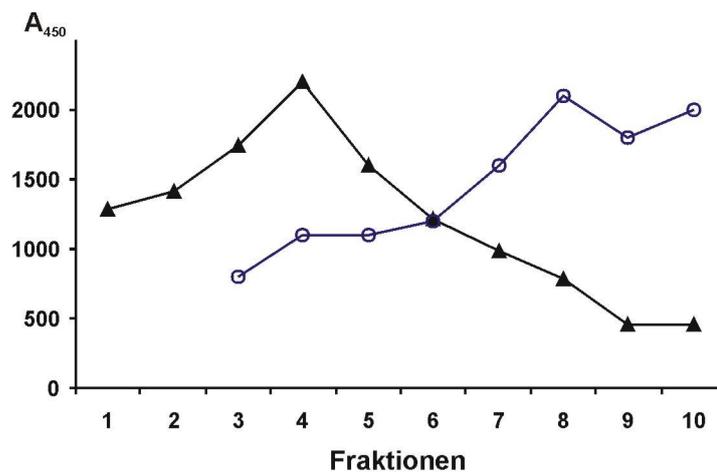


Abb. 3.26 Vergleich von Chitinsynthase-Aktivitäts-Messung nach Peters und Latka (-▲-) und des neu etablierten Tests (-○-).

Im Vergleich zu dem Test nach Peters und Latka, ist die stärkste Aktivität weiter in Richtung hochmolekularer Assemblierungen verschoben (Abb. 3.26). Die Anwendung des Tests ermöglicht schnelle Identifizierung von Fraktionen, die intakte Chitosomen enthalten.

3.9. Untersuchung der Glykosylierung des CHB1-Proteins

Eine Computervorhersage (NetNGlyc 1.0 bzw. NetOGlyc 3.1 Software, www.cbs.dtu.dk) zeigte einen hohen Potential für die *N*- bzw. *O*-Glykosylierung mehreren N- und T-Resten (Abb. 3.27) im CHB1-Protein. Innerhalb des Proteins gibt es drei NXS/T-Motive: 82NTS, 109NYT, 146NLT. Zwei davon können potenziell *N*-glykosyliert werden (Abb. 3.27).

Position	Potenzial	Wahrscheinlichkeit
<i>N</i>-Glykosylierung		
46 NGM	0,777	+++
51 NCG	0,644	++
54 NIQ	0,730	++
82 NTS	0,547	+ (NXS/T)
109 NYT	0,684	++ (NXS/T)
135 NQD	0,503	+
<i>O</i>-Glykosylierung		
83T	0,589	+
93T	0,591	+
105T	0,504	+
163T	0,558	+
200T	0,502	+
Schwellwert 0,5		

MRTRTKLYAAAVGLATTGVLVLSSGGASGHGYTDLPVSRQKMCQNGMVTNCGNIQWEPQS 60
 VEGPKGFPSGGPADGRICSA~~NTS~~SFAQLDSP~~RT~~PSGGAWPTTRV~~TT~~GGQ~~NYT~~FRWQFTAMH 120
 ATTFKYYVTKPGW~~NQ~~DRALTRADLNLT~~PF~~FLTV~~PP~~YGGQR~~PPQ~~TL~~SH~~SGQL~~PS~~GLSGHHVV 180
 LAVWTVHDTGNAFYACSDV~~TF~~ 201

Abb. 3.27 Abgeleitete Glykosylierungsstellen in CHB1.

■ – *N*-Glykosylierung, ■ – *O*-Glykosylierung, ■ – Prolinreste, NXT/S-Motive wurden in blauen Boxen dargestellt; ↓ – Signalpeptidaseschnittstelle;

Um zu testen, ob die oben genannten N-Reste tatsächlich mit Zuckerketten verknüpft sind, wurde das CHB1-Protein zunächst einer Behandlung mit der *N*-Glykosidase F* unterzogen. Zu diesem Zweck wurde das aus *S. lividans* gewonnene Protein eingesetzt, um mögliche

unspezifische Modifizierungen des Proteins während der Synthese in *E. coli* auszuschließen. *N*-Glykosidase F* spaltet Glykanketten, die an Asparaginsäure durch zwei NAG-Reste gebunden sind.

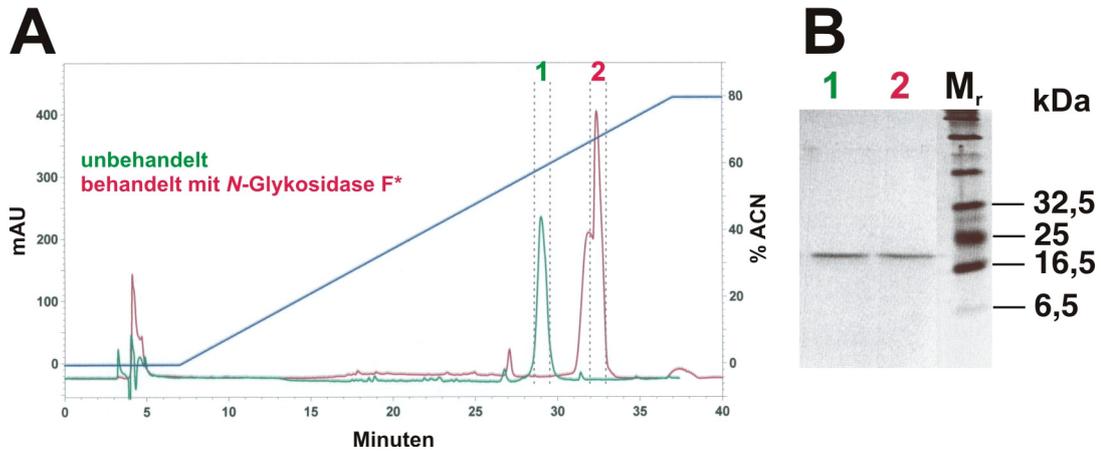


Abb. 3.28 Analyse der hydrophoben Eigenschaften (HPLC, C4-Umkehrphase-Säule, A) sowie der Größe des CHB1-Proteins (SDS-PAGE, B) nach der Behandlung mit *N*-Glykosidase F*; (M_r) Molekulargewichtsmarker.

Eine Umkehrphase-HPLC-Analyse zeigte eine distinkte Verschiebung des CHB1-haltenden Peaks (Veränderung der Elutionsbedingungen) und ermittelte dadurch eine Veränderung der hydrophoben Eigenschaften des Proteins (Abb. 3.28). Diese ist in der ersten Linie auf die Spaltung von hydrophilen Kohlenhydrat-Resten zurückzuführen. Die Auftrennung der CHB1-haltenden Fraktionen auf einem 12,5 % SDS-Gel zeigte jedoch keine erkennbaren Größenunterschieden. Dieses weist auf die relativ kleine Länge der mit dem CHB1-Protein verknüpften Zucker-Ketten hin.

4. DISKUSSION

Die herkömmliche Wahrnehmung der Mikroorganismen als einzellige Lebensformen hat

Antibiotika ist die Beseitigung vieler Pathogene äußerst schwierig. Neben den bekannten Lungen-Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa*, wurde kürzlich die Bildung von Biofilmen auf Gallensteinen durch *Salmonella sp.* als Ursache für das Auftreten von chronischen Salmonellen-Dauerausscheidern postuliert [Prouty *et al.*, 2002].

Über die molekulare Struktur sowie die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ist bisher nur wenig bekannt. Sie ist außerordentlich komplex und hängt von zahlreichen Faktoren ab; unter anderem von den am Aufbau des Biofilms beteiligten Bakterienarten, der besiedelten Oberfläche sowie der Reihenfolge der Besiedelung durch die Bakterien [Sutherland, 1999]. Im Allgemeinen besteht sie aber fast immer aus verzweigt-kettigen Exopolysacchariden mit atypischen Glykosidverbindungen sowie Proteinen und anorganischen Verbindungen [Sutherland, 2001]. Auch speziell für die Matrix synthetisierte und extrazellulär abgelagerte DNA-Moleküle spielen offensichtlich für den Aufbau des Biofilms eine wichtige Rolle [Whitchurch *et al.*, 2002].

Durch die Bildung von Biofilmen sichern sich Bakterien einen gewissen Schutz gegen verschiedene Stress-Faktoren (z.B. Scherkräfte, Austrocknung, UV-Strahlung, pH-Sprünge, osmotischer Schock oder Antibiotika) [Freeman und Lock, 1995; Mayer *et al.*, 1999; Liu und Tay, 2001; Hall-Stoodley und Stoodley, 2002]. Das Netzwerk von wasserführenden Kanälen garantiert den Zellen einen konstanten Nahrung- und Metabolitenaustausch, wodurch ein bedeutender Beitrag für die Erhaltung der Homöostase geleistet wird [DeBeer *et al.*, 1994a-b; Stoodley *et al.*, 1994; Costerton *et al.*, 1995; DeBeer *et al.*, 1996; Hinsä *et al.*, 2003]. In Biofilmen finden sich eng benachbarte Bereiche mit unterschiedlichem elektrochemischen Potenzial, Sauerstoffspannung oder pH-Wert; infolge werden in dieser hochorganisierten Assemblierung unterschiedlich lokalisierte Zellen differenten Signalen exponiert [Costerton *et al.*, 1994; DeBeer *et al.*, 1994; Costerton *et al.*, 1999b]. Eine rechtzeitige Reaktion auf derartige Botschaften, die simultan aus mehreren Bereichen des Biofilms ankommen, erfordert eine exzellente interzelluläre Kommunikation. Tatsächlich, wie durch *in situ* Untersuchungen ermittelt werden konnte, funktionieren die einzelnen Bakterien in diesen komplexen Assemblierungen kooperativ und koordiniert. In den komplexen Informationsaustausch werden niedermolekulare Substanzen, so genannte Autoregulatoren involviert, die zu verschiedenen chemischen Klassen gehören (z.B. Butyrolactone, Homoserin-Lactone, modifizierte Peptid-Pheromone) [Recio *et al.*, 2004].

Die Biofilm-Bildung von *Pseudomonas aeruginosa* zählt zu den am besten untersuchten. Obwohl mehrere Genprodukte charakterisiert wurden, die in die Anfangsanheftung der Zellen an das Substrat involviert sind, bleibt bisher wenig über den molekularen Hintergrund von Biofilm-Reifungsprozessen bekannt [Davey und O'Toole, 2000; O'Toole, 2003; Hinsä *et al.*, 2003]. Bakterien in Biofilmen besitzen gegenüber Mikroorganismen in planktonischer Lebensform einige Vorteile, wie zum Beispiel eine hohe Resistenz gegen antimikrobielle Faktoren. Dentale Biofilme sind außerdem, auf Grund einer speziellen Verankerung mit Hilfe von unlöslichen extrazellulären Polysacchariden, nur sehr schwer von der Zahnoberfläche abzulösen [Costerton *et al.*, 1999a; Davey und O'Toole, 2000].

Auch für Bodenbakterien hat die Biofilm-Bildung gewisse Vorteile. Diese Art des Wachstums scheint eine ideale Strategie zu sein, um die strengen Bedingungen, wie z.B. Wassermangel, durchzuhalten. Am Beispiel von *Bacillus subtilis* wurde suggeriert, dass die extrazelluläre Matrix der in Biofilmen lebenden Bakterien effektiv Wasserverluste hemmt [Hamon und Lazazzera, 2001].

Eine komplexe Differenzierung sowie kollektive Verhaltensweise zeigen Actinomyceten, die, aufgrund ihrer Pilz-ähnlichen Entwicklungszyklen, unter den Prokaryoten besonders hervorzuheben sind. Im frühen Stadium wachsen Hyphen vegetativ im Substrat, verzweigen sich stark und bilden somit ein Mycelgeflecht aus. Im weiteren Alterungsprozess initiieren die vegetativen Hyphen, in Antwort auf Nahrungs-Mangel, die morphologische Differenzierung, die auf der Oberfläche der Kolonie Luftmycelien entstehen lässt, in denen Sporen ausgebildet werden. Über den molekularen Hintergrund dieser Prozesse ist bisher nur wenig bekannt.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, synthetisieren Streptomyceten ein großes Repertoire an Sekundärmetaboliten sowie extrazellulären Enzymen, wodurch sie in ihren ökologischen Nischen standhalten können. Streptomyceten sind in der Lage, verschiedene, für andere Organismen eher schwer zugängliche, Naturstoffe, wie z.B. Proteine, Nukleinsäuren, Lipide, Cellulose, Stärke, Xylan oder Chitin abzubauen. Chitin hat für sie jedoch eine besondere Bedeutung. Aufgrund der chemischen Zusammensetzung stellt es nämlich eine wichtige Kohlen- und Stickstoff-Quelle dar [Kutzner, 1981; Peczynska-Czoch und Mordarski, 1988]. Auf der Basis von Wasserstoffbrücken zwischen den Amid- und Carbonylgruppen der *N*-Acetylglucosamin-Ketten, können Chitinmoleküle zwei dominante polymorphe Formen bilden. Das antiparallele Arrangement [Carlstrom, 1957] in häufiger vorkommendem α -Chitin [Muzzarelli, 1977] führt zu einer kompakten, rigiden Struktur, während infolge der parallelen

Anlagerung der Polymerstränge die weniger kompakte Struktur des β -Chitins entsteht [Blackwell *et al.*, 1967]. Natürlich vorkommendes α -Chitin ist häufig mit Proteinen und anorganischen Komponenten, wie Calciumcarbonat, Eisen und Silizium assoziiert. In Zellwänden von Pilzen ist es mit β -Glucanen vernetzt [Sietsma und Wessels, 1979; Molano *et al.*, 1980; Surarit *et al.*, 1988]. Daher ergeben sich unterschiedliche Präferenzen für diverse chitinreiche Habitate, wo verschiedene Formen des Polysaccharids durch den Einsatz von vielfältigen Chitinasen [Beyer und Diekmann, 1985; Robbins *et al.*, 1988; Blaak *et al.*, 1993; Blaak und Schrempf, 1995; Saito *et al.*, 1999] effektiv genutzt werden können. Während des Wachstums auf Chitin und unter mangelnden löslichen C-Quellen werden bei verschiedenen Streptomycceten-Arten neben Chitinasen kleine Proteine sekretiert, die zwar keinerlei enzymatische Aktivitäten aufweisen, aber spezifisch verschiedene kristalline Chitin-Formen erkennen und mit einer hohen Affinität an sie binden [Schnellmann *et al.*, 1994; Kolbe *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2001]. Die in unserer Arbeitsgruppe neu identifizierten Chitinbindeproteine (CHBs) aus Streptomycceten weisen keine gemeinsamen Motive mit den Chitinbindedomänen der bekannten Chitinasen auf und konnten als eine neue Proteinklasse eingestuft werden. Basierend auf diesen Arbeiten, konnten Homologe der CHBs auch in anderen chitinolytischen Bakterien gefunden werden: ChbB von *Bacillus amyloliquefaciens* [Chu *et al.*, 2001] und CBP21 von *Serratia marcescens* [Suzuki *et al.*, 1998]. Interessanterweise zeigt auch die N-terminale Region der LasD-Protease von *Pseudomonas aeruginosa* eine gewisse Ähnlichkeit zu Streptomycceten Chitinbindeproteinen [Folders *et al.*, 2000].

Für eine *in situ* Lokalisierung des CHB1-Proteins in einer Co-Kultur von Streptomycceten und *Mucor rouxii* wurde ein *Streptomyces-lividans*-Stamm hergestellt, welcher das *chbG*-Fusionsgen (aus *chb1* und *GFP*) unter Kontrolle von dem Promoter des *chb1*-Gens auf einem Plasmid trug. Durch den Kontakt zwischen chitinhaltigen Pilz-Hyphen und Streptomycceten kam es Transkription des Fusionsgens. Die Präsenz und Lokalisierung des Translationproduktes wurde dank der fluoreszierenden Eigenschaften der GFP-Reporterprotein-Komponente verfolgt. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Emissions-Spektren der eigenen Fluoreszenz der Pilz-Hyphen und der Emission des GFP-Proteins ($\lambda_{\max} = 510 \text{ nm}$) teilweise überlappen, war die Aussagekraft der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zum Teil reduziert. Dennoch konnte eine Anlagerung des ChbG-Fusionsproteins auf chitinhaltigen Pilz-Hyphen demonstriert werden. Die Verteilung des Proteins auf den Pilz-Hyphen erfolgte ungleichmäßig, was als Konsequenz der natürlichen Positionierung von Chitin betrachtet werden kann [Fischer, 1996]. Pilz-Hyphen, die in einen unmittelbaren

Kontakt mit Streptomycceten-Hyphen kamen, zeigten eine verstärkte Fluoreszenz. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der früheren Studien bezüglich des CHB2-Proteins von *Streptomyces reticuli* überein. Mithilfe FITC-markierter *anti*-CHB1-Antikörper demonstrierten Kolbe *et al.* (1998) die Beschichtung von Krabben-Muscheln oder *Aspergillus proliferans* Hyphen mit CHB2-Protein, wenn sie als einzige C-Quelle einer *S.-reticuli*-Kultur zugegeben werden. Somit kann die Aussage, dass CHBs einen engen Kontakt der Streptomycceten mit chitinhaltigen Substraten vermitteln [Kolbe *et al.*, 1998], bestätigt werden. Darüber hinaus, wird eine Hypothese gestellt, dass CHB-Proteine durch ihre Kleber-ähnliche Verhaltensweise einen bedeutenden Beitrag zur Biofilm-Bildung leisten. Daher kann dieses als neues Subprinzip der Biofilm-Entwicklung definiert werden. An der Stelle ist es notwendig zu erwähnen, dass nach einer prolongierten Inkubation der Streptomycceten mit Pilzen mittels fluoreszenzmarkiertem *anti*-CHB1-Antikörper eine Struktur beobachtet wurde, welche auf höher organisierte CHB1-Assemblierung schließen lässt (Daten nicht gezeigt). An manchen Stellen war ein fluoreszierender Saum direkt auf der Oberfläche der Streptomycceten-Hyphen zu erkennen. Die Aufklärung dessen Natur bleibt ein interessantes Thema für weitere Untersuchungen.

Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von chitinbindenden Proteinen werden Bereiche auffällig, die eine deutliche Konservierung zeigen. Unter anderem sind die Tryptophan-Reste (W) innerhalb der chitinbindenden Proteine aus Streptomycceten stark konserviert. Wie bereits bekannt, basieren die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Polysacchariden auf Wasserstoffbrücken und hydrophoben Interaktionen. Während die apolaren Aminosäuren an den Wasserstoffbindungen mit den Hydroxylgruppen der Zuckerreste beteiligt sind, sorgen die aromatischen Aminosäuren für den direkten Kontakt mit den Pyranose-Ringen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um die hydrophoben Tryptophan- (W) und Tyrosin-Reste (Y) [Quiocho, 1986; Spurlino *et al.*, 1992].

Die Studien mit Mutanten-Proteinen, deren einzelne W-Reste durch Leucin (L) ausgetauscht worden waren, zeigten eine besondere Bedeutung des W57-Restes für die Bindung an α -Chitin. Die [L57]CHB1-Mutante verfügte nur über 12 % der ursprünglichen Affinität des Wildtyp-CHB1 gegenüber α -Chitin. Auch [L134]CHB1 und [L184]CHB1 zeigten eine deutlich reduzierte Bindeaffinität (22 % bzw. 28 %). Dagegen war sie bei [L99]CHB1 und [L114]CHB1 nur um entsprechend 8 % und 12 % geringer. Zusätzlich wurde mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie gezeigt, dass der Austausch des W134 und W184,

jedoch nicht W57, gewisse Änderungen der Protein-Topologie verursacht [Zeltins und Schrempf, 1997].

Die Erhaltung einer spezifischen Konformation, die für die chitinbindenden Eigenschaften des Proteins notwendig ist, wird von den in CHB1 vorkommenden Disulfidbrücken unterstützt. Unter reduzierenden Bedingungen geht die Affinität des CHB1 gegenüber α -Chitin vollständig verloren. Durch den Austausch der jeweiligen Cystein-Reste (C) durch Alanin (A) wurde demonstriert, dass sowohl [A52]CHB1 als auch [A78]CHB1 keinerlei Bindung an α -Chitin aufweisen. Bei den Mutanten [A44]CHB1 und [A196]CHB1 beträgt die Bindeaffinität nur noch 27,6 % bzw. 12,2 % des ursprünglichen Werts des Wildtyp-Proteins [Zeltins und Schrempf, 1997]. Dank Röntgenkleinwinkelstreuung konnten diese Abweichungen der CHB1-Eigenschaften mit Änderungen der Sekundärstruktur assoziiert werden [Svergun *et al.*, 2000]. Die räumliche Struktur eines CHB1-Homologes aus *Bacillus amyloliquefaciens* (ChbB) wird, aufgrund fehlender C-Reste, von SS-Brücken nicht unterstützt. Trotzdem kann das ChbB an Chitin binden, allerdings mit einer eingeschränkten Spezifität. Neben dem β -Chitin erkennt ChbB ebenfalls α -Chitin und zeigt eine schwache Affinität gegenüber β -Glukanen und kristalliner Cellulose.

Die strukturellen Untersuchungen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung präsentierten mit einer Auflösung von bis zu 2,7 Å, dass CHB1 aus zwei globulären Domänen besteht, die zusammen eine verlängerte Kugel (3,5×4 nm) mit einem kleinen Höcker (1,4×2 nm) darstellen [Svergun *et al.*, 2000]. Da ein hochaufgelöstes Abbild der räumlichen CHB1-Struktur, aufgrund der nicht ausreichenden Qualität von CHB1-Kristalle nicht gewonnen werden konnte, sollten weitere Untersuchungen mittels Kernresonanz-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) an doppelmarkiertem CHB1 (^{15}N , ^{13}C) in Rahmen dieser Arbeit vorgenommen werden. Mit NMR-Spektroskopie lassen sich räumliche Strukturen nativer Proteine in wässrigen Lösungen untersuchen, allerdings erfordert die Analyse eine hohe Proteinkonzentration (ca. 10 mg/ml). Durch den Einsatz von verschiedenen Einengungsmethoden (Säulenchromatographie, Ammoniumsulfat-Fällung und Diafiltration) konnte lediglich eine geringere Konzentration erreicht werden (maximal 0,7 mg/ml), was für eine NMR-Analyse nicht ausreichend war. Wie sich herausstellte, weist das CHB1-Protein eine sehr starke Tendenz zu Aggregatbildung auf.

Die biochemischen Untersuchungen lassen schließen, dass intermolekulare Disulfidbrücken eine eher unwesentliche Rolle bei der Aggregation von CHB1 spielen. Der erfolgreiche

Versuch, die CHB1-Aggregate durch Behandlung mit chaotropen Agenzien in löslicher Form zu bekommen, deutete auf die starken hydrophoben Wechselwirkungen als Ursache der CHB1-Aggregation hin. Aus der direkten Abhängigkeit zwischen Solubilisierungsgrad der Aggregate und Konzentration der chaotropen Salze kann abgeleitet werden, dass in diese Interaktion verschiedene Protein-Domänen involviert werden, die unterschiedliche hydrophobe Eigenschaften aufweisen. Dieses ließ vermuten, dass die Aggregatbildung bei CHB1 primär durch die starken hydrophoben Wechselwirkungen getrieben wird. Diese Hypothese wurde durch den Einsatz von ChbB aus *Bacillus amyloliquefaciens* geprüft. Da dieses Protein keine C-Reste besitzt, kann es an der Bildung von inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken nicht beteiligt sein. Die durchgeführten Versuche ermittelten ein sehr ähnliches Verhaltensmuster der beiden Proteine bezüglich der Aggregation (Daten nicht gezeigt). Auch TEM-Analysen der Aggregate deuteten auf Ähnlichkeiten hin. Daraus lässt sich ableiten, dass SS-Verbindungen bei der Aggregation in der Tat eine eher unwesentliche Rolle spielen.

Für die vertiefenden Untersuchungen bezüglich der Bedeutung der verschiedenen CHB1-Domänen für die Wechselwirkung mit α -Chitin wurden CHB1-Mutanten hergestellt, deren N- bzw. C-terminale Bereiche verkürzt wurden. Die Mutantenproteine zeigten, im Vergleich zum Wildtyp-CHB1, eine verstärkte Neigung zur Aggregation. Die Bindestudien ergaben, dass die relative Bindeaffinität des CHB1 Δ N-Mutantenproteins, im Vergleich zu Wildtyp-CHB1, um 60 % geringer ist. Bei der CHB1 Δ C-Mutante nahm die Affinität um 40 % ab. Dieser deutliche Verlust hängt sicherlich damit zusammen, dass den beiden Mutanten einige für die Interaktion mit Chitin wichtige Aminosäurenreste fehlen. Die im Vergleich zu CHB1 Δ N um 20 % höhere Affinität von CHB1 Δ C kann durch das Vorhandensein des für die Interaktion besonders wichtigen W57-Restes begründet werden. Des Weiteren ist aufgrund der fehlenden C78- bzw. C196-Reste der Aufbau von entsprechender SS-Brücke in keinem der beiden Mutantenproteine möglich.

Aufgrund seiner Affinität gegenüber α -Chitin, wurde CHB1 als Hilfsmittel zur Verfolgung von Chitin-Biogenese in *Saccharomyces cerevisiae* angesetzt. Der Stamm verfügt insgesamt über drei Chitinsynthase-Aktivitäten [Sburlati und Cabib, 1986]. Es wurde mit einer Disruptions-Mutante gearbeitet, welcher die CSIII-Aktivität fehlt. Außerdem, durch spezielle Puffer-Bedingungen, war nur CSI-Aktivität möglich. Dank Vorstudien in unserer

Arbeitsgruppe konnte CSI-Aktivität mit Chitosomen assoziiert werden. Über 90 % der *in vitro* messbaren Chitinsynthese-Aktivität ist auf die von CSI zurückzuführen.

Wie elektronenmikroskopische Studien zeigen, haben die Chitosomen einen Durchmesser von ca. 70 bis 100, sporadisch 150 nm. Sie sind kugelförmig und vorwiegend vereinzelt, nur gelegentlich sind 2-3 miteinander verbunden. Nach der Zugabe von Substrat (UDP-*N*-Acetylglucosamin) erscheint zwischen den Vesikeln ein filigranes Netzwerk, welches auf die Synthese von NAG-Ketten hindeutet. Außerdem kann eine Zunahme des Durchmessers der Vesikel (bis zu ca. 180-200 nm) festgestellt werden, aus denen häufig Fibrillen freigesetzt wurden (Abb. 3.23 E und 3.24 A und B). Es kann geschlussfolgert werden, dass neu synthetisierte Chitin-Ketten zunächst in Innerem der Chitosomen gelagert werden. Die Chitosomen bilden häufig Aggregate, die mit den faserigen Strukturen miteinander verbunden sind. Nach einer längeren Reaktionsdauer werden die meisten Vesikel in Fibrillen verschleiert und in Form einer Kette bzw. eines Konglomerates miteinander verbunden. Das Fibrillennetzwerk ist wesentlich deutlicher zu erkennen. Einzelne Vesikel sind nun eher selten zu finden.

Da eine Zugabe von CHB1 zur Anlagerung des Proteins auf den neu geformten Netzwerken führt, kann zusätzlich bestätigt werden, dass es sich dabei um Chitin fibrillen handelt. Sie erscheinen stärker prononciert und aufgequollen. Schon zu Beginn der Synthese sind sie nicht so fein verteilt, wie ohne CHB1-Zugabe. In Form von dicken Fasern bilden sie mit CHB1 eine Gel-ähnliche Matrix. Das Protein wirkt wie ein Klebstoff, mit dem sowohl die einzelnen Fasern als auch die Chitosomen umwickelt und kompakter zusammengehalten werden. Anhand der theoretischen Breite einer einzelnen *N*-Acetylglucosamin-Kette konnte berechnet werden, dass die sichtbaren Polymer-Fasern nur aus 5 bis 30 Ketten bestehen. Trotzdem werden sie von CHB1 erkannt, woraus sich ableiten lässt, dass zumindest ein wesentlicher Teil der NAG-Ketten bereits in den frühen Phasen der Assoziation in α -Konfiguration vorliegt.

Der Nachweis von Chitinsynthase-Aktivität basiert bei der herkömmlichen Methoden auf dem Einsatz vom Weizenkeim-Agglutinin (*wheat germ agglutinin*, WGA), das drei hintereinander liegende NAG-Reste unterscheidet [Peters und Latka, 1986; Lucero *et al.*, 2002]. Des Weiteren kann WGA jedoch an Polysaccharid-Ketten der Glykoproteine binden, die auch NAG enthalten [Schmidt *et al.*, 2003; Szymanski *et al.*, 2003; Edge, 2003]. Alternativ kann die Radioaktivität der eingebauten [^{14}C]-*N*-Acetylglucosamin gemessen werden. Diese

Methoden weisen jedoch relativ niedrige Spezifität auf, da sie sowohl das kristalline Chitin als auch kurze bzw. nicht assoziierte NAG-Ketten erkennen. Das CHB1-Protein erkennt dagegen hochspezifisch die α -Form des kristallinen Chitinpolymers und bindet daran mit einer hohen Affinität [Schnellmann *et al.*, 1994]. Durch Anwendung von CHB1 wurde ein Verfahren entwickelt, das eine schnelle Identifizierung von Proben ermöglicht, die bei der Zugabe von Substrat eine Synthese von hochmolekularem Chitin durchführen. Dieses spricht dafür, dass die endgültige Assoziation der *N*-Acetylglucosamin-Ketten in einer Chitin-Faser das Vorhandensein von unbeschädigten Chitosomen voraussetzt.

Die Tatsache, dass CHB1 auf SDS-Gelen als breite, diffuse Bande erschien, die unterschiedlich stark mit spezifischen *anti*-CHB1-Antikörper reagierte, deutete darauf hin, dass es sich um ein Glykoprotein handeln könnte. Protein-Glykosylierung gehört zu den kürzlich entdeckten Fähigkeiten der Prokaryoten. Vor allem die S-layer-Oberfläche-Proteine, Flagelline und Polysaccharid-abbauende Enzyme werden von der Glykosylierung betroffen [Lechner und Sumper, 1987; Moens und Vanderleyden, 1997; Benz und Schmidt, 2002; Schmidt *et al.*, 2003; Szymanski *et al.*, 2003]. Dabei wurden viele verschiedene Strukturen beobachtet, von denen jedoch wenig analysiert wurde [Moens und Vanderleyden, 1997]. Die Komposition der glykosylierten Proteine innerhalb der bakteriellen Cellulosomen erwies sich als sehr komplex.

Trotz vieler Besonderheiten, die offensichtlich auf den unterschiedlichen Zellaufbau zurückzuführen sind, wurden auch Ähnlichkeiten mit den eukaryotischen Glykoproteinen festgestellt. So sind die Polysaccharid-Ketten immer über den Amidstickstoff vom Asn-Rest (*N*-Glykosylierung) bzw. über die Hydroxylgruppe von S-, T- oder seltener Y-Rest (*O*-Glykosylierung) mit dem Protein verknüpft. Bei Eukaryoten ist der glykosylierte N-Rest ein Teil des Konsensmotivs: N*XS/T (X = nicht P) [Lechner und Sumper, 1987]. Diese Sequenz wurde auch bei *Halobacterium halobium* [Lechner und Wieland, 1989] und *Methanothermus fervidus* [Brockl *et al.*, 1991] beschrieben. Die *O*-Glykosylierung findet sich bei Eukaryoten vorwiegend an Ser/Thr-Resten in Prolin-reichen Domänen [Herscovics und Orlean, 1993]. Dieses wurde auch bei Prokaryoten, z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium thermocellum* oder *Bacteroides cellulosolvens*, nachgewiesen [Moens und Vanderleyden, 1997]. Außerdem, werden bei anderen Prokaryoten distinkte Konsensmotive vermutet: NS*/T* in *Chryseobacterium meningosepticum* [Plummer, *et al.*, 1995] und VY* in *Thermoanaerobacter kivui* [Peters *et al.*, 1992].

In Eukaryonten erfüllen Glykoproteine verschiedene Funktionen, wie beispielsweise Unterstützung der Konformation und Stabilität von Proteinen, Protein-Assemblierung, Schutz vor Proteasen, inter- und intrazelluläre Erkennungsprozesse und Zell-Adhäsion. Ähnliche Aufgaben werden auch prokaryotischen Glykoproteinen zugewiesen, obwohl die experimentellen Beweise oftmals ungenügend waren [Moens und Vanderleyden, 1997]. In Bezug auf mögliche CHB1-Glykosylierung scheinen die Untersuchungen der Glycanasen aus *C. fimi* besonders interessant, da sie, im Vergleich zu den nicht glykosylierten Formen, eine erhöhte Affinität gegenüber Cellulose zeigten [Langsford *et al.*, 1987; Ong *et al.*, 1994].

Eine Computervorhersage zeigte in CHB1 ein hohes Potential für die *N*- bzw. *O*-Glykosylierung von mehreren *N*- und *T*-Resten. Außerdem gibt es innerhalb des Proteins drei NXS/T-Motive: 82NTS, 109NYT, 146NLT, davon zeigen zwei ersten einen hohen *N*-Glykosylierungs-Potenzial. Eine Unterscheidung zwischen *N*- und *O*-Glykosylierung ist durch die Behandlung des zu untersuchenden Proteins mit spezifischen Endoglykosidasen, z.B. *N*-Glycosidase F*, möglich. [Sandercock *et al.*, 1994]. Die HPLC- und SDS-PAGE-Analysen lassen vermuten, dass in CHB1 ein oder mehrere Asn-Reste vorhanden sind, die über NAG mit kurzen Zucker-Ketten verknüpft sind. Im S-Layer von *Bacillus stearothermophilus* wurden Proteine gefunden, welche über Asparaginyll-Rhamnose mit Oligosacchariden gebunden sind [Messner und Sleytr, 1988]. Die Frage, ob es solche Verbindungen auch in CHB1 gibt, bleibt offen. Vertiefende Untersuchungen bezüglich der Glykosylierung wurden aufgrund Materialmangel nicht durchgeführt.

Neben chitinbindenden Proteinen wurde in unserer Arbeitsgruppe das Oberflächenprotein AbpS (Avicel-Binde Protein von *Streptomyces reticuli*) identifiziert, welches der Cellulose-Erkennung dient [Walter *et al.*, 1998]. Ein AbpS-Homolog wurde auch von *S. coelicolor* abgeleitet. Darüber hinaus konnte anhand der *S. coelicolor*-Genomsequenz ein weiteres Protein abgeleitet werden, welches als CbpC (Carbohydrat-Binde Protein aus *S. coelicolor*) bezeichnet wurde [Luttermann, 2002]. Anhand der Aminosäuresequenz weist CbpC die größte Verwandtschaft zu dem sekretierten CbpD-Protein auf [Park und Galloway, 1995; Folders *et al.*, 2000], welches wiederum, aufgrund der Verwandtschaft zu den CHBs aus Streptomyceten, als chitinbindendes Protein charakterisiert wurde.

Streptomyces tendae Tü901 sekretiert ein kleines (9,8 kDa) AFP1-Protein das an Krabben-Chitin, Chitosan und die Zellwand von *Paecilomyces variotii* bindet. Obwohl seine geringere Spezifität der von CHB3 ähnelt, lassen sich keine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeiten mit

chitinbindenden Proteinen aus Streptomyceten finden. Somit stellt sich die Frage, ob die Affinität gegenüber Chitin nicht eine sekundäre Eigenschaft des Proteins darstellt. Vermutlich konnte das Hauptsubstrat bisher gar nicht identifiziert werden. Wie CHBs besitzt auch AFP1 keine enzymatische Aktivität. Dennoch, im Gegensatz zu allen bis jetzt bekannten bakteriellen Chitin-Bindeproteinen, weist es eine antifungale Wirkung auf [Bormann *et al.*, 1999].

CHB1 ist ein Prototyp einer von unserer Gruppe erstmals identifizierten Proteinfamilie. Interessanterweise zeigen unsere Analysen, dass sich in der ständig steigenden Anzahl von genomischen Sequenzen Homologe in vielen Bakterien finden lassen. Hinzu gehören: verschiedene *Bacillaceae* (*B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. cereus*), *Burkholderia* sp., *Chromobacterium violaceum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Thermobifida fusca*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia* sp. (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) und andere. Ihre beeindrucksvolle Vielfalt lässt vermuten, dass die CHB-Homologe eine hohe Bedeutung für viele Bakterien haben. In Zukunft wäre es interessant, deren Eigenschaften mit den von CHB1 zu vergleichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Streptomyceten, mit ihrem großen Repertoire von extrazellulären Enzymen, sind in der Lage verschiedene, schwer zugängliche Naturstoffe abzubauen. Darunter ist Chitin besonders hervorzuheben, da es aufgrund der chemischen Zusammensetzung, nicht nur eine Kohlen-, sondern auch eine wichtige Stickstoff-Quelle darstellt. Neben den vielfältigen Chitinasen wird dem chitinolytischen System von Streptomyceten eine neue Klasse von Proteinen zugewiesen, die keinerlei enzymatischen Aktivitäten aufweisen aber spezifisch verschiedene Formen des kristallinen Chitins sowie Chitosan erkennen und mit unterschiedlichen Affinitäten an sie binden. Am Beispiel des chitinbindenden Proteins (CHB1) wurden vertiefende Studien durchgeführt.

Das CHB1-Protein (18,7 kDa) zeigt eine starke Tendenz zu Aggregatbildung. Die biochemischen Untersuchungen lassen schließen, dass intermolekulare Disulfidbrücken dabei eine eher unwesentliche Rolle spielen und deuten auf hydrophobe Wechselwirkungen als Ursache der CHB1-Aggregation hin. Vergleichsstudien mit CHB1-Deletionsmutanten demonstrierten, dass die Aggregation durch N- und C-terminale Domänen nicht beeinflusst wird. Die Bindestudien zeigten die Wichtigkeit der beiden Domänen für die Chitinerkennung, die N-terminale Domäne scheint jedoch eine deutlich größere Bedeutung als die C-terminale zu haben.

Eine Computervorhersage zeigte in CHB1 ein hohes Potential für die N- bzw. O-Glykosylierung von mehreren N- und T-Resten, darunter auch eines NXS/T-Glykosylierungs-Motivs. Vorläufige weitere Studien lassen eine Verknüpfung des Proteins mit kurzen Oligosacchariden vermuten.

Fluoreszenzmikroskopische *in situ* Untersuchungen der Co-Kulturen von Streptomyceten und *Mucor rouxii* ermittelten eine enge Interaktion von CHB1 und chitinhaltigen Pilz-Hyphen.

Es wird abgeleitet, dass CHB-Proteine eine Rolle in der Biofilm-Bildung spielen, was als neues Subprinzip der Biofilm-Entwicklung definiert werden kann.

Durch Anwendung von CHB1 wurde ein neuer Test für Chitinsynthase-Aktivität entwickelt. Gegenüber den herkömmlichen Verfahren, die auf dem Einsatz von Weizenkeim-Agglutinin (WGA) oder der Messung von [¹⁴C]-NAG-Einbaus basieren, weist die neue Methode eine hohe Spezifität für hoch assoziierte Chitin-Assemblierungen. Daher ermöglicht sie eine schnelle Identifizierung von Chitinsynthase-Proben, die bei der Zugabe von Substrat (UDP-N-Acetylglucosamin) eine Synthese von hochmolekularem Chitin durchführen.

CHB1 wurde, aufgrund seiner hohen Affinität gegenüber α -Chitin, als Hilfsmittel in Studien zur Chitin-Biogenese in *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass sich Chitin-Fasern sichtbar machen lassen, die mittels eines hochorganisierten Komplexes (Chitosom mit Chitinsynthase I-Aktivität) *in vitro* hergestellt werden konnten. Elektronenmikroskopische Analysen weisen darauf hin, dass die NAG-Ketten zunächst im Inneren der Chitosomen gelagert und erst später freigesetzt werden. Die sichtbaren Fibrillen bzw. Faser setzen sich aus wenigen (etwa 5 bis 30) NAG-Ketten zusammen. Da die Zugabe von CHB1 zur Anlagerung des Proteins auf den neu geformten Netzwerken führt lässt sich erstmals ableiten, dass die NAG-Ketten bereits in der frühen Phasen der Assoziation in α -Konfiguration vorliegen.

CHB1 ist ein Prototyp einer von unserer Gruppe erstmals identifizierten Proteinfamilie. Aus genomischen Sequenzen einer großen Vielzahl von Bakterien, lassen sich homologe Proteine ableiten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die CHB1-Homologen eine hohe Bedeutung für viele Bakterien haben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alexander, M. Introduction to Soil Microbiology; John Wiley & Sons: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, **1977**; 36-51.

Armand, S.; Tomita, H.; Heyraud, A.; Gey, C.; Watanabe, T.; Henrissat, B. Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalyzed by chitinases A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12. *FEBS Lett.* **1994**, *343*, 177-180.

Bao, K.; Cohen, S. N. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 1518-1527.

Bao, K.; Cohen, S. N. Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 774-785.

Barrett-Bee, K.; Hamilton, M. The detection and analysis of chitinase activity from the yeast form of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **1984**, *130 (Pt 7)*, 1857-1861.

Bartnicki-Garcia, S. Fundamental Aspects of Hyphal Morphogenesis. In *Microbial Differentiation*; Ashworth, J. M., Smith, J. E., Eds.; Cambridge University Press: London, **1973**.

Benz, I.; Schmidt, M. A. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **2002**, *45*, 267-276.

Beyer, M.; Diekmann, H. The chitinase system of *Streptomyces* sp. ATCC 11238 and its significance for fungal cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *23*, 140-146.

Blaak, H.; Schnellmann, J.; Walter, S.; Henrissat, B.; Schrempf, H. Characteristics of an exochitinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 659-669.

Blaak, H.; Schrempf, H. Binding and substrate specificities of a *Streptomyces olivaceoviridis* chitinase in comparison with its proteolytically processed form. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *229*, 132-139.

Blackwell, J.; Parker, K. D.; Rudall, K. M. Chitin fibres of diatoms *Thalassio fluviatilis* and *Cyclotella cryptica*. *J. Mol. Biol.* **1967**, *28*, 383-385.

- Blackwell, J.** Structure of β -chitin or parallel chain systems of poly- β -(1->4)-N-acetyl-D-glucosamine. *Biopolymers* **1969**, 7, 281-289.
- Boot, R. G.; Renkema, G. H.; Strijland, A.; van Zonneveld, A. J.; Aerts, J. M.** Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 26252-26256.
- Bormann, C.; Baier, D.; Horr, I.; Raps, C.; Berger, J.; Jung, G.; Schwarz, H.** Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tu901 that interferes with growth polarity. *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 7421-7429.
- Bouligand, Y.** [On a twisted fibrillar arrangement common to several biologic structures]. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **1965**, 261, 4864-4867.
- Bracker, C. E.; Ruiz-Herrera, J.; Bartnicki-Garcia, S.** Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 4570-4574.
- Bradford, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- Brockl, G.; Behr, M.; Fabry, S.; Hensel, R.; Kaudewitz, H.; Biendl, E.; Konig, H.** Analysis and nucleotide sequence of the genes encoding the surface-layer glycoproteins of the hyperthermophilic methanogens *Methanothermus fervidus* and *Methanothermus sociabilis*. *Eur. J. Biochem.* **1991**, 199, 147-152.
- Burnette, W. N.** "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodifi

- Cid, V. J.; Duran, A.; del Rey, F.; Snyder, M. P.; Nombela, C.; Sanchez, M.** Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 345-386.
- Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; DeBeer, D.; Caldwell, D.; Korber, D.; James, G.** Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 2137-2142.
- Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M.** Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol* **1995**, *49*, 711-745.
- Costerton, J. W.; Cook, G.; Lamont, R.** The Community Architecture of Biofilms: Dynamic Structures and Mechanisms. In *Dental Plaque Revisited - Oral Biofilms in Health and Disease*; Newman, H. N., Wilson, M., Eds.; Bionline, University College London: London, **1999**.
- Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318-1322.
- Couzin, J.** Immunology. Unexpectedly, ancient molecule tied to asthma. *Science* **2004**, *304*, 1577.
- Davey, M. E.; O'Toole, G. A.** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol. Rev.* **2000**, *64*, 847-867.
- Davis, B.; Eveleigh, D. E.** Chitosanases: Occurrence, Production and Immobilization. In *Chitin, Chitosan, and Related Enzymes*; Zikakis, J. P., Ed.; Academic Press: London, **1984**.
- Davis, L. L.; Bartnicki-Garcia, S.** The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* **1984**, *130 (Pt 8)*, 2095-2102.
- DeBeer, D.; Stoodley, P.; Lewandowski, Z.** Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng* **1994**, *44*, 636-641.
- DeBeer, D.; Stoodley, P.; Roe, F.; Lewandowski, Z.** Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* **1994**, *43*, 1131-1138.
- DeBeer, D.; Stoodley, P.; Lewandowski, Z.** Liquid flow and mass transport in heterogeneous biofilms. *Water Res* **1996**, *30*, 2761-2765.
- Delic, I.; Robbins, P.; Westpheling, J.** Direct repeat sequences are implicated in the regulation of two *Streptomyces* chitinase promoters that are subject to carbon catabolite control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1992**, *89*, 1885-1889.
- Donlan, R. M.; Costerton, J. W.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol Rev.* **2002**, *15*, 167-193.
- Duran, A.; Bowers, B.; Cabib, E.** Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1975**, *72*, 3952-3955.
- Dweltz, N. E.; Anand, N.** Nature of the amino sugar in β -chitin. *Biochim. Biophys. Acta* **1961**, *50*, 357.

- Dweltz, N. E.** The structure of β -chitin. *Biochim. Biophys. Acta* **1961**, *51*, 283-294.
- Edge, A. S.** Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem. J.* **2003**, *376*, 339-350.
- Errington, J.; Daniel, R. A.; Scheffers, D. J.** Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 52-65, table.
- Falk, M.; Smith, D. G.; McLachlan, J.; McInnes, A. G.** Studies on chitin (b-(1->4)-linked 2 acetamino-deoxy-D-glucan) fibres of diatom *Thalassoria fluviatilis husted.* *Can. J. Chem.* **1966**, *22*, 2269.
- Fischer, S.** Untersuchungen zur Funktion eines neuen chitinbinden Proteins aus Streptomyceten. Diplomarbeit. Universität Osnabrück, **1996**.
- Flardh, K.** Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 564-571.
- Flyg, C.; Kenne, K.; Boman, H. G.** Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J. Gen. Microbiol.* **1980**, *120*, 173-181.
- Folders, J.; Tommassen, J.; Van Loon, L. C.; Bitter, W.** Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 1257-1263.
- Freeman, C.; Lock, M. A.** The biofilm polysaccharid matrix: a buffer against changing organic substrate supply? *Limnol Oceanograph* **1995**, *40*, 273.
- Fuchs, R. L.; McPherson, S. A.; Drahos, D. J.** Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 504-509.
- Fujii, T.; Miyashita, K.** Multiple domain structure in a chitinase gene (chiC) of *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **1993**, *139* (Pt 4), 677-686.
- Gilkes, N. R.; Henrissat, B.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C., Jr.; Warren, R. A. J.** Domains in microbial b-1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 303-315.
- Gooday, G. W.** A Survey of Polysaccharases Production: a Search for Phylogenic Implications. In *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases*; Berkely, R. C. W., Gooday, G. W., Ellwood, D. C., Eds.; Academic Press: London, **1979**.
- Goriely, A.; Tabor, M.** Biomechanical models of hyphal growth in actinomycetes. *J. Theor. Biol.* **2003**, *222*, 211-218.
- Grüber, A.** Biochemische und strukturelle Charakterisierung des chitinbindenden Proteins (CHB1). Dissertation. Universität Osnabrück, **2001**.
- Gueiros-Filho, F. J.; Losick, R.** A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2544-2556.

- Hackman, R. H.; Goldberg, M.** Light scattering and infrared spectrophotometric studies of chitin and chitin-derivatives. *Carbohydr. Res.* **1974**, *38*, 35-45.
- Hall-Stoodley, L.; Stoodley, P.** Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol* **2002**, *13*, 228-233.
- Hamon, M. A.; Lazazzera, B. A.** The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **2001**, *42*, 1199-1209.
- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol Biol.* **1983**, *166*, 557-580.
- Hara, S.; Yamamura, Y.; Fujii, Y.; Mega, T.; Ikenada, T.** Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.* **1989**, *105*, 484-489.
- Hawtin, R. E.; Arnold, K.; Ayres, M. D.; Zanotto, P. M.; Howard, S. C.; Gooday, G. W.; Chappell, L. H.; Kitts, P. A.; King, L. A.; Possee, R. D.** Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **1995**, *212*, 673-685.
- Henrissat, B.** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarity. *Biochem. J.* **1991**, *280*, 309-316.
- Henrissat, B.; Bairoch, A.** New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **1993**, *293*, 781-788.
- Herscovics, A.; Orlean, P.** Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.* **1993**, *7*, 540-550.
- Hinsa, S. M.; Espinosa-Urgel, M.; Ramos, J. L.; O'Toole, G. A.** Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology* **2003**, *49*, 905-918.
- Hodge, A.; Gooday, G. W.; Alexander, I. J.** Inhibition of chitinolytic activities from tree species and associated fungi. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 77-84.
- Hollak, C. E.; van Weely, S.; van Oers, M. H.; Aerts, J. M.** Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J. Clin. Invest* **1994**, *93*, 1288-1292.
- Hopwood, D. A.; Wright, H. M.** Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Gen. Genet.* **1978**, *162*, 307-317.
- Hopwood, D. A.; Bibb, M. J.; Chater, K. F.; Kieser, T.; Bruton, C. J.; Kieser, H. M.; Lydiate, D. J.; Smith, C. P.; Ward, J. M.; Schrempf, H.** Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual; John Innes Foundation: Norwich, **1985**.
- Innis, M. A.; Gelfand, D. H.** Optimization of PCRs. In *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*; Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., Eds.; Academic Press: London - San Diego, **1990**.

- Iseli, B.; Armand, S.; Boller, T.; Neuhaus, J. M.; Henrissat, B.** Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett.* **1996**, *382*, 186-188.
- Jakimowicz, D.; Chater, K.; Zakrzewska-Czerwinska, J.** The ParB protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) recognizes a cluster of *parS* sequences within the origin-proximal region of the linear chromosome. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 1365-1377.
- Jeuniaux, C.; Voss-Foucart, M. F.** Chitin biomass and production in the marine environment. *Biochem. Syst. Ecol.* **1991**, *19*, 401-411.
- Jones, J. D. G.; Grady, K. L.; Suslow, T. V.; Bedbrook, J. R.** Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO J.* **1986**, *5*, 467-473.
- Joshi, S.; Kozlowski, M.; Selvaraj, G.; Iyer, V. N.; Davies, R. W.** Cloning of the genes of the chitin utilization regulon of *Serratia liquefaciens*. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 2984-2988.
- Kang, M. S.; Elango, N.; Mattia, E.; Au-Young, J.; Robbins, P. W.; Cabib, E.** Isolation of a chitinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 14966-14972.
- Kieser, H. M.; Kieser, T.; Hopwood, D. A.** A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 5496-5507.
- Kim, H. J.; Calcutt, M. J.; Schmidt, F. J.; Chater, K. F.** Partitioning of the linear chromosome during sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves an *oriC*-linked *parAB* locus. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 1313-1320.
- Koch, A. L.** Apical Growth of Streptomycetes and Fungi. In *Bacterial Growth and Form*; Chapman & Hall: New York, **1995**.
- Kolbe, S.; Fischer, S.; Becirevic, A.; Hinz, P.; Schrempf, H.** The *Streptomyces reticuli* α -chitin-binding protein CHB2 and its gene. *Microbiology* **1998**, *144*, 1291-1297.
- Kutzner, H. J.** The Family *Streptomycetaceae*. In *The Prokaryotes: a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*; Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A., Schlegel, H., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, **1981**.
- Laemmli, U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- Langsford, M. L.; Gilkes, N. R.; Singh, B.; Moser, B.; Miller, R. C., Jr.; Warren, R. A.; Kilburn, D. G.** Glycosylation of bacterial cellulases prevents proteolytic cleavage between functional domains. *FEBS Lett.* **1987**, *225*, 163-167.
- Leblond, P.; Redenbach, M.; Cullum, J.** Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 3422-3429.
- Lechner, J.; Sumper, M.** The primary structure of a procaryotic glycoprotein. Cloning and sequencing of the cell surface glycoprotein gene of halobacteria. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9724-9729.

- Lechner, J.; Wieland, F.** Structure and biosynthesis of prokaryotic glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, *58*, 173-194.
- Li, H.** Molecular cloning and characterisation of two chitinase genes from *Streptomyces olivaceoviridis* ATCC 11238. Dissertation. Universität Hannover, **2001**.
- Lin, Y. S.; Kieser, H. M.; Hopwood, D. A.; Chen, C. W.** The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* **1993**, *10*, 923-933.
- Liu, Y.; Tay, J. H.** Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 337-342.
- Lomovskaya, N. D.; Mkrtumian, N. M.; Gostimskaya, N. L.; Danilenka, V. N.** Characterisation of the temperent actinophage C31 isolated from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Virology* **1972**, *9*, 258-262.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
- Lucero, H. A.; Kuranda, M. J.; Bulik, D. A.** A nonradioactive, high throughput assay for chitin synthase activity. *Anal. Biochem.* **2002**, *305*, 97-105.
- Luttermann, C.** Vergleichende Studien an zwei homologen Zellwand-verankerten Avicel-Bindeproteinen von Streptomyceten. Diplomarbeit. Universität Osnabrück, **2002**.
- Mayer, C.; Moritz, R.; Kirschner, C.; Borchard, W.; Maibaum, R.; Wingender, J.; Flemming, H. C.** The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *26*, 3-16.
- Merril, C. R.; Goldman, D.; van Keuren, M. L.** Gel protein stains: Silver stain. *Methods Enzymol.* **1984**, *104*, 441-447.
- Messner, P.; Sleytr, U. B.** Asparaginyl-rhamnose: a novel type of protein-carbohydrate linkage in a eubacterial surface-layer glycoprotein. *FEBS Lett.* **1988**, *228*, 317-320.
- Miguélez, E. M.; Martín, C.; Manzanal, M. B.; Hardisson, C.** Growth and morphogenesis in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *100*, 351-360.
- Minke, R.; Blackwell, J.** The structure of α -chitin. *J. Mol. Biol.* **1978**, *120*, 167-181.
- Miyashita, K.; Fujii, T.; Sawada, Y.** Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* **1991**, *137*, 2065-2072.
- Miyashita, K.; Fujii, T.** Nucleotide sequence and analysis of a gene (chiA) for a chitinase from *Streptomyces lividans* 66. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 1691-1698.
- Miyashita, K.; Fujii, T.; Saito, A.** Induction and repression of a *Streptomyces lividans* chitinase gene promoter in response to various carbon sources. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 39-43.
- Moens, S.; Vanderleyden, J.** Glycoproteins in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **1997**, *168*, 169-175.

- Molano, J.; Bowers, B.; Cabib, E.** Distribution of chitin in the yeast cell wall: An ultrastructural and chemical study. *J. Cell Biol.* **1980**, *85*, 199-212.
- Monreal, J.; Reese, E. T.** The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* **1969**, *15*, 689-696.
- Morrison, B. W.; Leder, P.** *neu* and *ras* initiate murine mammary tumors that share genetic markers generally absent in *c-myc* and *int-2*-initiated tumors. *Oncogene* **1994**, *9*, 3417-3426.
- Musialowski, M. S.; Flett, F.; Scott, G. B.; Hobbs, G.; Smith, C. P.; Oliver, S. G.** Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 5123-5125.
- Muzzarelli, R. A.** Chitin; Pergamon Press: Oxford, **1977**.
- Muzzarelli, R. A.** Native, industrial and fossil chitins. *EXS* **1999**, *87*, 1-6.
- Neugebauer, E.; Gamache, B.; Déry, C. V.; Brzezinski, R.** Chitinolytic properties of *Streptomyces lividans*. *Arch. Microbiol.* **1991**, *156*, 192-197.
- O'Toole, G. A.** To build a biofilm. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 2687-2689.
- Ohno, T.; Armand, S.; Hata, T.; Nikaidou, N.; Henrissat, B.; Mitsutomi, M.; Watanabe, T.** A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5065-5070.
- Okami, Y.; Hotta, K.** Search and Discovery of New Antibiotics. In *Actinomycetes in Biotechnology*; Goodfellow, M., Williams, S. T., Mordarski, M., Eds.; Academic Press: London, **1988**.
- Ong, E.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C., Jr.; Warren, R. A.** *Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a beta-1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 999-1008.
- Orlean, P.** Two chitin synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5732-5739.
- Overdijk, B.; Van Steijn, G. J.; Odds, F. C.** Chitinase levels in guinea pig blood are increased after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology* **1996**, *6*, 627-634.
- Park, S.; Galloway, D. R.** Purification and characterization of LasD: a second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **1995**, *16*, 263-270.
- Peczynska-Czoch, W.; Mordarski, M.** Actinomycete Enzymes. In *Actinomycetes in Biotechnology*; Goodfellow, M., Williams, S. T., Mordarski, M., Eds.; Academic Press: London, **1988**; Chapter 6.
- Pelletier, I.; Sygusch, J.** Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* P1. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 844-848.

Peters, J.; Rudolf, S.; Oschkinat, H.; Mengele, R.; Sumper, M.; Kellermann, J.; Lottspeich, F.; Baumeister, W. Evidence for tyrosine-linked glycosaminoglycan in a bacterial surface protein. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1992**, *373*, 171-176.

Peters, W.; Latka, I. Electron microscopic localization of chitin using colloidal gold labelled with wheat germ agglutinin. *Histochemistry* **1986**, *84*, 155-160.

Plummer, T. H.; Tarentino, A. L.; Hauer, C. R. Novel, specific O-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. Asp-Ser and Asp-Thr-Thr consensus sites. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 13192-13196.

Prosser, J. I.; Tough, A. J. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Crit Rev. Biotechnol.* **1991**, *10*, 253-274.

Prouty, A. M.; Schwesinger, W. H.; Gunn, J. S. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 2640-2649.

Quijocho, F. A. Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 287-315.

Rast, D. M.; Horsch, M.; Furter, R.; Gooday, G. W. A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function. *J. Gen. Microbiol.* **1991**, *137* (Pt 12), 2797-2810.

Recio, E.; Colinas, A.; Rumbero, A.; Aparicio, J. F.; Martin, J. F. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarinic acid production in *Streptomyces natalensis*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 41586-41593.

Redenbach, M.; Kieser, H. M.; Denapaite, D.; Eichner, A.; Cullum, J.; Kinashi, H.; Hopwood, D. A. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 MB *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **1996**, *21*, 77-96.

Reguera, G.; Leschine, S. B. Biochemical and genetic characterization of ChiA, the major enzyme component for the solubilization of chitin by *Cellulomonas uda*. *Arch. Microbiol.* **2003**, *180*, 434-443.

Robbins, P. W.; Albright, C.; Benfield, B. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 443-447.

Roberts, W. K.; Selitrennikoff, C. P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* **1988**, *134*, 169-176.

Robertus, J. D.; Monzingo, A. F. The structure and action of chitinases. *EXS* **1999**, *87*, 125-135.

Romaguera, A.; Menge, U.; Breves, R.; Diekmann, H. Chitinases of *Streptomyces olivaceoviridis* and significance of processing for multiplicity. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 3450-3454.

Ruiz-Herrera, J.; San Blas, G. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* **2003**, *3*, 77-91.

- Saito, A.; Fujii, T.; Miyashita, K.** Chitinase system in *Streptomyces*. *Actinomycetologica* **1999**, *13*, 1-10.
- Saito, A.; Ishizaka, M.; Francisco, P. B., Jr.; Fujii, T.; Miyashita, K.** Transcriptional co-regulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Microbiology* **2000**, *146* (Pt 11), 2937-2946.
- Saito, A.; Miyashita, K.; Biukovic, G.; Schrempf, H.** Characteristics of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) extracellular protein targeting chitin and chitosan. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1268-1273.
- Saito, A.; Schrempf, H.** Mutational analysis of the binding affinity and transport activity for *N*-acetylglucosamine of the novel ABC transporter Ngc in the chitin-degrader *Streptomyces olivaceoviridis*. *Mol. Genet. Genomics* **2004**, *271*, 545-553.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, **1989**.
- Sandercock, L. E.; MacLeod, A. M.; Ong, E.; Warren, R. A.** Non-S-layer glycoproteins in eubacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **1994**, *118*, 1-7.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 5463-5467.
- Sburlati, A.; Cabib, E.** Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15147-15152.
- Schlumbaum, A.; Mauch, F.; Vögeli, U.; Boller, T.** Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **1986**, *324*, 365-367.
- Schmidt, M. A.; Riley, L. W.; Benz, I.** Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* **2003**, *11*, 554-561.
- Schnellmann, J.; Zeltins, A.; Blaak, H.; Schrempf, H.** The novel lectin-like protein CHB1 is encoded by a chitin-inducible *Streptomyces olivaceoviridis* gene and binds specifically to crystalline α -chitin of fungi and other organisms. *Mol. Microbiol.* **1994**, *13*, 807-819.
- Sendai, Y.; Komiya, H.; Suzuki, K.; Onuma, T.; Kikuchi, M.; Hoshi, H.; Araki, Y.** Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol. Reprod.* **1995**, *53*, 285-294.
- Shaw, J. A.; Mol, P. C.; Bowers, B.; Silverman, S. J.; Valdivieso, M. H.; Duran, A.; Cabib, E.** The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 111-123.
- Sietsma, J. H.; Wessels, J. G. H.** Evidence of covalent linkages between chitin and β -glucan in a fungal wall. *J. Gen. Microbiol.* **1979**, *114*, 99-108.
- Silverman, S. J.** Current methods for *Saccharomyces cerevisiae*. I. Growth. *Anal. Biochem.* **1987**, *164*, 271-277.

Spurlino, J. C.; Rodseth, L. E.; Quioco, F. A. Atomic interactions in protein-carbohydrate complexes. Tryptophan residues in the periplasmic maltodextrin receptor for active transport and chemotaxis. *J. Mol Biol.* **1992**, *226*, 15-22.

Stoodley, P.; DeBeer, D.; Lewandowski, Z. Liquid Flow in Biofilm Systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2711-2716.

Sundarraaj, N.; Bhat, J. V. Breakdown of chitin by *Cytophaga johnsonii*. *Arch. Mikrobiol.* **1972**, *85*, 159-167.

Surarit, R.; Gopal, P. K.; Shephaerd, M. G. Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **1988**, *134*, 1723-1730.

Sutherland, I. W. Biofilm Matrix Polymers - Role in Adhesion. In *Dental Plaque Revisited - Oral Biofilms in Health and Disease* ; Newman, H. N., Wilson, M., Eds.; Bionline, University College London: London, **1999**.

Sutherland, I. W. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **2001**, *9*, 222-227.

Suzuki, K.; Suzuki, M.; Taiyoji, M.; Nikaidou, N.; Watanabe, T. Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of *Serratia marcescens* 2170. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 128-135.

Svergun, D. I.; Becirevic, A.; Schrempp, H.; Koch, M. H. J.; Grüber, G. Solution structure and conformational changes of the *Streptomyces* chitin-binding protein (CHB1). *Biochemistry* **2000**, *39*, 10677-10683.

Szymanski, C. M.; Logan, S. M.; Linton, D.; Wren, B. W. Campylobacter--a tale of two protein glycosylation systems. *Trends Microbiol* **2003**, *11*, 233-238.

Takegawa, K.; Mikami, B.; Iwahara, S.; Morita, Y.; Yamamoto, K.; Tochikura, T.

Tj010011 Tc 151C01p85 2810d(acysugareporbaticedofety-dur(Cghyo)rcisylomds(Cdm(ay)S)T)M1101110010007T672

Vermeulen, C. A.; Wessels, J. G. Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation. Evidence for a transient non-crystalline state of chitin. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *158*, 411-415.

Vionis, A.; Niemeyer, F.; Karagouni, A. D.; Schrempf, H. Production and processing of a 59 kDa exochitinase during growth of

- Yang, C. C.; Huang, C. H.; Li, C. Y.; Tsay, Y. G.; Lee, S. C.; Chen, C. W.** The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 297-305.
- Yang, M. C.; Losick, R.** Cytological evidence for association of the ends of the linear chromosome in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 5180-5186.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J.** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **1985**, *33*, 103-119.
- Zeltins, A.; Schrempf, H.** Specific interaction of the *Streptomyces* chitin-binding protein CHB1 with α -chitin: the role of individual tryptophan residues. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 557-564.
- Zhu, Z.; Zheng, T.; Homer, R. J.; Kim, Y. K.; Chen, N. Y.; Cohn, L.; Hamid, Q.; Elias, J. A.** Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* **2004**, *304*, 1678-1682.
- Zou, P.; Borovok, I.; Ortiz de Orue, L. D.; Muller, D.; Schrempf, H.** The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiology* **1999**, *145* (Pt 3), 549-559.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmitteln als die angegebenen verwendet habe.

Ich versichere, dass ich weder an der Universität Osnabrück noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rainer W. Nienow". The signature is written over a solid black rectangular background.

Osnabrück, den 19.12.2004

Ich danke Frau Prof. H. Schrempf für die Überlassung des interessanten Themas, für die Betreuung und die Korrekturen.

Herrn Prof. Dr. J. Hofemeister danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe der Angewandten Genetik der Mikroorganismen bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima.

Nicht zuletzt geht mein herzlicher Dank an alle andere Personen, die mich in irgend einer Weise unterstützt haben.

Ich gehöre zu denen, die glauben, dass Wissenschaft wunderschön sei. Ein Wissenschaftler in seinem Labor ist nicht nur ein Techniker: Er ist auch ein Kind, das die natürlichen Phänomenen erlebt, die ihn wie ein Märchen beeindruckten.

(Jestem z tych, którzy wierzą, iż nauka jest czymś bardzo pięknym. Naukowiec w laboratorium nie jest tylko technikiem. Jest jak dziecko, które doświadczając naturalnych zjawisk zachwyca się nimi jak bajką.)

Maria Skłodowska-Curie (1867 – 1934)