

Physiologie, Sekretion und Biotechnologie
zweier Autotransporterproteine
aus *Pseudomonas* Spezies

Inauguraldissertation

zur

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Sabrina Schell

aus Hagen

Düsseldorf, 2009

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
Korreferent: Prof. Dr. Joachim F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2009

für Wolfi

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. K.-E. Jäger danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie. Darüber hinaus möchte ich mich für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Joachim F. Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Einen besonderen Dank richte ich an Frau Dr. Susanne Wilhelm und Herrn Dr. Frank Rosenau für die anregenden und lehrreichen Diskussionen und die engagierte und freundschaftliche Betreuung.

Bei Prof. Dr. Harald Kolmar, Dr. Stefan Becker und Stefanie Heil aus dem Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt bedanke ich mich für die konstruktive Kooperation.

Ebenfalls möchte ich mich für die Kooperation mit Dr. Sc. Ivana Lescic Asler aus dem Rudjer Boskovic Institut für Chemische und Biologische Kristallographie in Zagreb bedanken.

Herrn Prof. Dr. A. Skerra am Institut für Biologische Chemie der Technischen Universität München danke ich für die Übernahme der Kristallisation und gegebenenfalls der Röntgenstrukturanalyse zweier Varianten von EstP_N.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET, insbesondere den Kolleginnen und Kollegen aus den Laboren 206 und 306 danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit in den letzten vier Jahren. Mein Besonderer Dank gilt Stephanie Serci für die freundschaftliche Unterstützung während der gesamten Zeit.

Lena Rempel möchte ich für die freundschaftliche und tatkräftige Unterstützung über einen langen Zeitraum während meiner Promotion sehr danken.

Frau Vera Svensson danke ich für ihr Engagement und ihre Hilfe bei der Aufreinigung der Esterasen.

Bei Martin Diener bedanke ich mich für die Aufreinigung zweier Varianten von EstP_N im Rahmen einer Bachelor-Arbeit.

Sonja Tröschel danke ich für die anregenden Diskussionen und für die Korrektur des Manuskripts.

Einen herzlichen Dank gilt meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während der gesamten Studienzeit sowie im Laufe meiner Promotion.

Mein besonderer Dank gilt Wolfram für seine ständige Geduld, Unterstützung und vieles mehr, was mir stets Kraft gegeben hat.

DANKE!

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Promotion

Sabrina Schell, Stefanie Heil, Frank Rosenau, Susanne Wilhelm, Harald Kolmar and Karl-Erich Jaeger (2009).

The first autotransporter from a biosafety strain with exhibits lipolytic activity of an esterase and a phospholipase B. Manuskript in Vorbereitung.

Posterpräsentationen

Sabrina Schell, Susanne Wilhelm, Frank Rosenau and Karl-Erich Jaeger (2009).

Molecular interactions of passenger and transport domains demonstrated with autotransporter chimera *Pseudomonas aeruginosa* EstA and *Pseudomonas putida* EstP. *Pseudomonas* Konferenz vom 13. – 17. August 2009.

Frank Rosenau, Susanne Wilhelm, Sabrina Schell, Karl-Erich Jaeger (2007).

Rhamnolipid biosurfacts network: influence of lipolytic enzymes on the production of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. Abstraktbuch der European BioPerspectives, Köln, Seite 213.

Sabrina Schell, Aneta Gdynia, Frank Rosenau, Karl-Erich Jaeger and Susanne Wilhelm (2006).

The autotransporter esterase EstP from *Pseudomonas putida* cannot complement is homologue in *Pseudomonas aeruginosa*. Abstraktbuch der VAAM-Jahrestagung, Jena, Seite 199.

Sabrina Schell, Aneta Gdynia, Frank Rosenau, Karl-Erich Jaeger and Susanne Wilhelm (2005).

The autotransporter esterase EstP from *Pseudomonas putida* cannot complement is homologue in *Pseudomonas aeruginosa*. Abstraktbuch der *Pseudomonas* Konferenz, Marseille, France, Seite 202.

Vorträge

Sabrina Schell, Susanne Wilhelm, Frank Rosenau and Karl-Erich Jaeger (2009).

Molecular interactions of passenger and transport domains demonstrated with autotransporter chimera *Pseudomonas aeruginosa* EstA and *Pseudomonas putida* EstP. Einladung zur Präsentation auf der *Pseudomonas* Konferenz am 17. August 2009.

Sabrina Schell, Aneta Gdynia, Frank Rosenau, Karl-Erich Jaeger and Susanne Wilhelm (2005).

The autotransporter esterase EstP from *Pseudomonas putida* cannot complement is homologue in *Pseudomonas aeruginosa*. 5th EU-Meeting Nanofoldex, Morges (Lausanne).

Genbankeinträge

S. Schell, S. Wilhelm.

Untersuchungen zur physiologischen Funktion und Struktur-Funktionsbeziehung der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*.

GeneBank accession-no.: CAL34146

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	IV
ABKÜRZUNGEN	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Pseudomonas putida</i>	1
1.2 GDSL-Familie	4
1.3 Phospholipasen	5
1.4 Proteinsekretion in Gram-negativen Bakterien	7
1.5 Autotransporterproteine	9
1.6 Die Esterase EstA aus <i>P. aeruginosa</i>	14
1.7 Oberflächenpräsentation in Gram-negativen Bakterien: Autodisplay	16
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Chemikalien und Enzyme	19
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	19
2.3 Oligonukleotide	22
2.4 Nährmedien	23
2.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	24
2.6 Optische Dichte im Photometer	24
2.7 Isolierung von Nukleinsäuren	25
2.8 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentration	25
2.9 Reverse Transkription	25
2.10 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	25
2.11 <i>In vitro</i> -Rekombination von DNA	26
2.12 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	26
2.13 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	26
2.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.14.1 Standard-PCR	26
2.14.2 Ortsspezifische Mutagenese	27
2.14.3 <i>RealTime</i> -PCR (<i>RT</i> -PCR)	27
2.15 Sequenzierung von DNA	28
2.16 Konstruktion eines <i>estP</i> -defizienten Stammes von <i>P. putida</i> KT2440	28
2.17 Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten (GZE)	28
2.18 Herstellung von Sphäroblasten	29
2.19 Herstellung der Periplasma-, Cytoplasma- und Membranfraktion (Pedrotta and Witholt, 1999)	29
2.20 Membranfraktionierung	29
2.21 Löslichkeitsanalysen von Proteinen	29
2.22 Reinigung von <i>inclusion bodies</i> der Esterasen	29
2.23 <i>In vitro</i> -Faltung von Esterasen aus <i>inclusion bodies</i>	30
2.24 Reinigung der Esterase EstP _N	30
2.24.1 Affinitätschromatographie mit Hilfe von Ni ²⁺ -NTA-Säulen	30
2.24.2 Größenausschlusschromatographie (HPLC)	30
2.25 Bestimmungen von Proteinkonzentrationen	31
2.26 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)	31
2.27 Nicht-reduzierende/reduzierende zweidimensionale SDS-PAGE (Kadokura <i>et al.</i> , 2004)	31
2.28 Immunologischer Nachweis von Proteinen	32
2.29 Auftrennung von Lipopolysacchariden (LPS) mittels SDS-PAGE	32

2.30 Silberfärbung von LPS nach SDS-PAGE	32
2.31 Untersuchungen nach Fluoreszenzmarkierung	33
2.31.1 Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.31.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von markierten <i>E. coli</i> -Zellen	33
2.31.3 Spektralphotometrische Untersuchung von fluoreszenzmarkierten <i>E. coli</i> -Zellen.	33
2.32 Kultivierung von Biofilmen in Mikrotiterplatten	34
2.33 Quantitative Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie	34
2.34 Nachweis der Oberflächenadhäsion von <i>P. putida</i> an Maiskörnern	35
2.35 Enzymaktivitätstests	36
2.35.1 Esterolytische Aktivitätsbestimmungen	36
2.35.1.1 Spektralphotometrische Bestimmung von Esteraseaktivität (Wilhelm <i>et al.</i> , 1999).....	36
2.35.1.2 Bestimmung der Enantioselektivität lipolytischer Enzyme	37
2.35.1.3 Bestimmung der Esterasespezifität	37
2.35.1.4 Herstellung von Tributyrinagar	37
2.35.1.5 Zymogramm (Riedel <i>et al.</i> , 2003).....	38
2.35.2 Nachweis der Phospholipaseaktivität.....	38
2.35.3 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	38
2.36 Computerprogramme und Online-Datenbanken	39
3 ERGEBNISSE	40
3.1 Identifizierung einer α -Helix zwischen den funktionellen Domänen des Autotransporterproteins EstA aus <i>P. aeruginosa</i>	40
3.1.1 Bedeutung der α -Helix für das Autotransporterprotein EstA aus <i>P. aeruginosa</i>	41
3.1.2 Deletion der α -Helix in EstA unter der Kontrolle des T7-Promotors in <i>E. coli</i> DH5 α und <i>in vitro</i> -Untersuchungen von EstA Δ H.....	44
3.2 Untersuchungen des Cysteinpaares in der Passgierdomäne des Autotransporterproteins EstA aus <i>P. aeruginosa</i>	46
3.2.1 Das Dsb-System im Periplasma von <i>P. aeruginosa</i> hat keinen Einfluss auf die Sekretion und Aktivität von EstA	46
3.2.2 Substitutionen von Cystein durch Serin an Position 258 und 264 haben keinen Einfluss auf die Sekretion und Esteraseaktivität von EstA	48
3.2.3 <i>In vivo</i> -Untersuchungen potenzieller Disulfidbrücken der Esterase EstA in <i>P. aeruginosa</i>	52
3.2.4 Der Einfluss der Substitutionen C258S und C264S auf die <i>in vitro</i> -Faltung und Enzymaktivität von EstA	54
3.3 Die Esterase EstP aus <i>P. putida</i> KT2440 ist das erste charakterisierte Autotransporterprotein eines nicht-pathogenen Bakteriums	58
3.3.1 Die lipolytische Aktivität der Esterase EstP im homologen Wirt <i>P. putida</i> KT2440	58
3.3.2 Untersuchung der Transkription des Autotransporterproteins EstP in <i>P. putida</i> KT2440	60
3.3.3 EstP ist in der äußeren Membran von <i>P. putida</i> KT2440 lokalisiert	63
3.3.4 Lokalisation der Esterase EstP im heterologen Wirt <i>E. coli</i>	64
3.3.5 Die Esterase EstP ist auch eine Phospholipase B.....	67
3.3.6 Konstruktion eines <i>estP</i> -defizienten Stammes von <i>P. putida</i> KT2440	73
3.3.7 Der <i>estP</i> -defiziente Stamm KT0418 zeigt eine verminderte Esteraseaktivität	76
3.3.8 Untersuchungen des <i>estP</i> -negativen Phänotyps von <i>P. putida</i> KT0418	77
3.4 Generierung einer enantioselektiven Variante der Esterase EstP	80
3.4.1 Untersuchungen zur Enantioselektivität der Variante EstP W173R.....	81
3.4.2 Die Enantioselektivität der Variante EstP _N W173R.....	85

3.4.3 Optimierung der heterologen Überexpression und Reinigung von EstP _N und EstP _N W173R.....	88
3.4.4 Die Enantiopräferenz der Esterasevarianten EstP _{N-His6} W173R und EstP W173R...	93
3.5 Konstruktion, Expression und Charakterisierung der Chimäre aus den homologen Autotransporterproteinen EstA aus <i>P. aeruginosa</i> und EstP aus <i>P. putida</i>	96
3.5.1 Konstruktion der Chimäre EstA _N P _C und EstP _N A _C und Expression in <i>P. aeruginosa</i> und <i>P. putida</i>	98
3.5.2 Heterologe Expression der Chimäre in <i>E. coli</i>	101
3.5.3 Ein biotechnologisches Verfahren zur Oberflächenpräsentation in <i>E. coli</i>	104
3.5.4 Die Esterasen EstA, EstP und die Chimäre haben ein unterschiedliches Substratspektrum.....	110
4 DISKUSSION	114
4.1 Die α -Helix von EstA ist für das Autotransporterprotein essenziell.....	114
4.2. Die charakteristischen Cysteine haben keinen bedeutsamen Einfluss auf die Sekretion und Aktivität des Autotransporterproteins EstA in <i>P. aeruginosa</i>	117
4.3. Charakterisierung des ersten Autotransporterproteins aus einem avirulenten Stamm.	122
4.4 Die Substitution W173R führt zu einer Steigerung der Enantioselektivität von EstP ..	129
4.5 Die Chimäre aus EstA und EstP geben Hinweise auf Interaktionen zwischen der Passagier- und der Transporterdomäne von Autotransporterproteinen.....	135
5 ZUSAMMENFASSUNG	140
6 LITERATURVERZEICHNIS	144
7 ANHANG	158
LEBENS LAUF	162

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

ABBILDUNGEN

Abb. 1.1:	Klassifizierung der Phospholipasen in Abhängigkeit ihrer Enzymspezifität.	6
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der charakteristischen strukturellen Organisation und Sekretion von Autotransporterproteinen.	12
Abb. 1.3:	Kristallstruktur der Translokationsdomäne des NalP-Autotransporters aus <i>N. meningitidis</i>	14
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung des Autotransporterproteins EstA, konstruiert als Oberflächendisplay für heterologe Passagierproteine.	17
Abb. 2.1:	Hydrolyse eines Carbonsäure- <i>p</i> -Nitrophenylesters katalysiert durch eine Esterase.....	36
Abb. 3.1:	Strukturhomologiemodell der postulierten α -Helix und Transportdomäne von EstA aus <i>P. aeruginosa</i>	41
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategien zur Deletion der α -Helix des Autotransporterproteins EstA aus <i>P. aeruginosa</i>	43
Abb. 3.3:	SDS-PAGE-Analyse und Esteraseaktivität mittels Zymogramm nach Überexpression der Esterasen EstA und EstA Δ H unter der Kontrolle des T7-Promotors in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	45
Abb. 3.4:	Einfluss von Mutationen im Dsb-System auf die Esteraseaktivität und die Sekretion in verschiedenen <i>P. aeruginosa</i> -Stämmen.	47
Abb. 3.5:	Die Strukturformeln der Aminosäuren Cystein und Serin.	49
Abb. 3.6:	Bestimmung der esterolytischen Aktivität und immunologischer Nachweis der EstA-Varianten in der äußeren Membran von <i>P. aeruginosa</i> PASCHI.	50
Abb. 3.7:	Nachweis einer potenziellen Disulfidbrücke der Esterase EstA in <i>P. aeruginos</i> PASCHI mittels Zymogramm nach 2D-SDS-PAGE.	53
Abb. 3.8:	SDS-PAGE zur Analyse der Esterasen EstA, EstAC258S, EstAC264S und EstACDM nach der Überexpression unter der Kontrolle des T7-Promotors in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	55
Abb. 3.9:	Einfluss von Dithiothreitol (DTT) bei der <i>in vitro</i> -Faltung auf die spezifische Esteraseaktivität der Esterase EstA und den Varianten EstAC258S, EstAC264S und EstACDM.	56
Abb. 3.10:	Esteraseaktivität nach thermischer Inaktivierung von EstA und den Varianten EstAC258S, EstAC264S und EstACDM.	57
Abb. 3.11:	Die Esteraseaktivität von EstP in <i>P. putida</i> KT2440.....	59
Abb. 3.12:	Nachweis des Transkriptes von <i>estP</i> in <i>P. putida</i> KT2440.	61
Abb. 3.13:	Expression von <i>estP</i> in <i>P. putida</i> KT2440 in Abhängigkeit des Wachstums.	62
Abb. 3.14:	Immunologischer Nachweis von EstP zur Lokalisation in der äußeren Membran von <i>P. putida</i> KT2440.	64
Abb. 3.15:	Esteraseaktivität von EstP nach Expression im heterologen Wirt <i>E. coli</i> DH5 α	65
Abb. 3.16:	FACS-Analyse nach Fluoreszenzmarkierung der Passagierdomäne von EstP im heterologen Wirt <i>E. coli</i> DH5 α	66
Abb. 3.17:	Klassifizierung der Phospholipasen in Abhängigkeit ihrer Hydrolyseposition eines Phospholipids. .	67
Abb. 3.18:	Esteraseaktivität und Dünnschichtchromatographie zum Nachweis der Phospholipaseaktivität von EstP in der Membranfraktion von <i>P. putida</i> KT2440.	69
Abb. 3.19:	Photometrischer Aktivitätstest zum Nachweis der A2-Phospholipaseaktivität von EstP in der Membranfraktion von <i>P. putida</i> KT2440.	70
Abb. 3.20:	Dünnschichtchromatographie und photometrischer Aktivitätstest zum Nachweis der Phospholipaseaktivität von EstP.	71

Abb. 3.21: Schematische Darstellung der Konstruktion eines <i>estP</i> -defizienten Stammes von <i>P. putida</i> KT2440.....	73
Abb. 3.22: Nachweise der <i>estP</i> -defizienten Mutante KT0418 von <i>P. putida</i> KT2440.....	75
Abb. 3.23: Extrazelluläre Esteraseaktivität von <i>P. putida</i> KT2440 (WT) und KT0418 ($\Delta estP$).....	76
Abb. 3.24: Wachstumsverhalten von <i>P. putida</i> Wildtyp KT2440 im Vergleich zur Mutante KT0418 ($\Delta estP$)... ..	77
Abb. 3.25: Homologievergleich der katalytisch aktiven Domänen der Esterasen EstA aus <i>P. aeruginosa</i> und EstP aus <i>P. putida</i>	81
Abb. 3.26: (A) Strukturhomologiemodell der N-terminalen Domäne von EstA aus <i>P. aeruginosa</i> und (B) die Strukturformeln der Aminosäuren Arginin und Tryptophan.....	82
Abb. 3.27: Strukturformel und Molekulargewicht der verwendeten Ester der 2-Methyldekansäure.....	83
Abb. 3.28: Die spezifische Esteraseaktivität und der Verlauf der Hydrolysereaktion der Enantiomeren des <i>p</i> -Nitrophenylesters der 2-MDA von EstP und der Variante EstP W173R.....	85
Abb. 3.29: Bestimmung der Esteraseaktivität und der Verlauf der Hydrolysereaktion der Enantiomeren des <i>p</i> -Nitrophenylesters der 2-MDA von EstP _N und der Variante EstP _N W173R.....	87
Abb. 3.30: SDS-PAGE der heterologen Überexpression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) in Autoinduktionsmedium und Reinigung der <i>inclusion bodies</i> von EstP _N und EstP _N W173R.....	89
Abb. 3.31: Immunologischer Nachweis der Fusionsproteine EstP _{N-His6} und EstP _{N-His6} W173R nach heterologer Überexpression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	90
Abb. 3.32: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von EstP _{N-His6} durch eine immobilisierende Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) und Nu-PAGE [®] mit den gereinigten Endprodukten von EstP _{N-His6} und EstP _{N-His6} W173R.....	91
Abb. 3.33: HPLC-Chromatogramme der gereinigten Fusionsproteine EstP _{N-His6} und EstP _{N-His6} W173R.....	92
Abb. 3.34: Gaschromatographische Analyse nach lipolytischer Hydrolyse des 2-Methyldekansäure- <i>p</i> -Nitrophenolesters durch EstP _{N-His6} (A) und EstP _{N-His6} W173R (B) in Zitratpuffer [pH 5,2].....	94
Abb. 3.35: Schematische Darstellung der postulierten Organisation der Aminosäuren der Transportdomäne von EstA in der äußeren Membran von <i>P. aeruginosa</i>	97
Abb. 3.36: Schematische Darstellung der Konstruktion der Chimäre.....	99
Abb. 3.37: Extrazelluläre Esteraseaktivität der Wildtypproteine EstA und EstP sowie der Chimäre EstA _N P _C und EstP _N A _C nach Überexpression in <i>P. aeruginosa</i> PASCHI und <i>P. putida</i> KT0418.....	100
Abb. 3.38: Die extrazelluläre Esteraseaktivität von EstA, EstP und der Chimäre EstA _N P _C und EstP _N A _C nach heterologer Überexpression in <i>E. coli</i> DH5 α	101
Abb. 3.39: FACS-Analyse der Oberflächenpräsentation von EstA, EstP und der Chimäre EstA _N P _C und EstP _N A _C in <i>E. coli</i> DH5 α	103
Abb. 3.40: Schematische Darstellung einer Passagierdomäne eines Autotransporters mit E-Epitop-Fusion auf der Zelloberfläche von <i>E. coli</i>	105
Abb. 3.41: Bestimmung der Esteraseaktivität und immunologischer Nachweis der Fusionsproteine nach Überexpression in <i>E. coli</i> JM109.....	106
Abb. 3.42: Fluoreszenz- (oben) und phasenkontrastmikroskopische (unten) Aufnahmen identischer Ausschnitte von <i>E. coli</i> JM109 mit EstA, EstA _N P _C , EstP, EstP _N A _C und pEst100 (Kontrolle).....	109
Abb. 3.43: Quantitative Analyse der Oberflächenpräsentation von EstA, EstP, EstA _N P _C und EstP _N A _C in <i>E. coli</i> JM109.....	109
Abb. 3.44: SDS-PAGE-Analyse der <i>inclusion bodies</i> (A) und Proteinausbeute nach <i>in vitro</i> -Faltung (B) der Esterasen EstA und EstP sowie der Chimäre EstA _N P _C und EstP _N A _C	111
Abb. 3.45: Vergleich der Aktivitäten der Esterasen EstA, EstP, EstA _N P _C und EstP _N A _C nach <i>in vitro</i> -Faltung gegen <i>p</i> -Nitrophenolester mit unterschiedlichen Kettenlängen.....	112
Abb. 4.1: Esterolytische Reaktion unter nicht-kompetitiven Bedingungen.....	132
Abb. 7.1: Schematische Darstellung der Konstruktion eines <i>estP</i> -defizienten Stammes von <i>P. putida</i> KT2440.....	158

Abb. 7.2: Gaschromatigraphische Analyse nach Racematspaltung der 2-Methyldekansäure durch (A) EstP bzw. EstP W173R und (B) EstP_{N-His6} bzw. EstP_{N-His6} W173R in Phosphatpuffer [pH 7,2] 159

Abb. 7.3: Homologievergleich der Esterasen EstA aus *P. aeruginosa* PAO1 und EstP aus *P. putida* KT2440. 161

TABELLEN

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme 19

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Vektoren 20

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide 22

Tab. 2.4: Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika [$\mu\text{g/ml}$] 24

Tab. 2.5: Ablauf der RT-PCR 27

Tab. 2.6: Standards zur Kalibrierung der HPLC-Säule 31

Tab. 3.1: Übersicht der ausgewählten Stressfaktoren zur Analyse des Wachstumsverhalten von *P. putida* KT0418 (ΔestP) im Vergleich zum Wildtyp (WT) KT2440 78

Tab. 3.2: Zusammenstellung der untersuchten Phänotypen von *P. putida* KT0418 (ΔestP) im Vergleich zum Wildtyp (WT) 79

Tab. 3.3: Übersicht der ermittelten Enzymaktivitäten von EstP, EstPW173R, EstP_N und EstP_N W173R gegenüber *p*-NPC 86

Tab. 3.4: Zusammenfassung der ermittelten E_{app} - und E_{true} -Werte von EstP, EstP_{N-His6} und den Mutanten in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen 95

Tab. 3.5: Densitometrische Analyse der Signalintensitäten der immunologisch detektierten Proteine in *E. coli* JM109 107

Tab. 3.6: Bestimmung der Molekülezahl pro Zelle von EstA, EstP, EstA_NP_C und EstP_NA_C auf der Oberfläche von *E. coli* JM109 108

Tab. 3.7: Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) von EstA, EstP, EstA_NP_C und EstP_NA_C bei der Hydrolyse von *p*-Nitrophenol-Butyrat 112

Tab. 4.1: Kontingenz an Cysteinen mehrerer Autotransporterproteine 118

Tab. 7.1: Detaillierte Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung der E_{true} -Werte von EstP, EstP W173R, EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R 160

ABKÜRZUNGEN

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten. Aminosäuren wurden in dem gebräuchlichen Ein-Buchstabencode abgekürzt.

λ	Wellenlänge	IMAC	immobilisierte
Å	Angström		Metall-Affinitäts-
A	Ampere		Chromatographie
A. dest.	Aqua destillata	IPTG	Isopropyl- β -D-
AS	Aminosäure(n)		Thiogalactosid
Abb.	Abbildung	kb	Kilobasen
Ap	Ampicillin	LB	Luria-Bertani Broth
APS	Ammoniumpersulfat	LPS	Lipopolysaccharid
bp	Basenpaar(e)	2-MDA	2-Methyldekansäure
Cb	Carbenicillin	M	Molar
cDNA	komplementäre DNA	mA	Milliamper
Cm	Chloramphenicol	min	Minute(n)
C-Terminus	Carboxyterminus	ml	Milliliter
3D	dreidimensional	mM	Millimolar
Da	Dalton	N-Terminus	Aminoterminus
DMF	N,N-Dimethyl-formamid	O.D.	Optische Dichte
DMSO	Dimethylsulfoxid	ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-
DNA	Desoxyribonukleinsäure		Galactosid
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat	ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
Dsb	<i>disulfide bond formation</i>	p.a.	<i>pro analysi</i>
DTT	1,4-Dithio DL-threitol (Cleland Reagenz)	Pa	Pascal
E_{app}	apparente	PCR	Polymerase- Kettenreaktion
	Enantioselektivität	<i>p</i> -NP	<i>para</i> -Nitrophenol
E_R	Enantioselektivität gegenüber dem <i>R</i> -Enantiomer	<i>p</i> -NPB	<i>para</i> -Nitrophenyl- Butyrat
	wahre Enantioselektivität	<i>p</i> -NPC	<i>para</i> -Nitrophenyl- Caproat
EDTA	Ethylendinitrilo-tetraacetat	ppm	<i>parts per million</i>
EtBr	Ethidiumbromid	PVDF	Polyvenylidendi- fluorid
EtOH	Ethanol	RNA	Ribonukleinsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	RT	Raumtemperatur
g	gramm	<i>RT</i>	<i>RealTime</i>
GC	Gaschromatographie	s	Sekunde(n)
Gm	Gentamycin	SDS	Natriumdodecyl- sulfat
GZE	Gesamtzelleextrakt(e)	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
H	Helix	Tab.	Tabelle
h	Stunde(n)	Tet	Tetracyclin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	TCA	Trichloressigsäure
IB	<i>inclusion bodies</i>		

TE	Tris-EDTA	V	Volt
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyl- diamin	v/v	Volumen pro Volumen
T _m	Schmelztemperatur	W	Watt
Tris	Trishydroxymethyl- aminoethan	w/v	Gewicht pro Volumen
Tween	Polyoxyethylen- sorbitolmonolaurat	WT	Wildtyp
ü.N.	über Nacht	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro- 3-Indolyl-β-D- Galactopyranosid
U	Unit	μg	Mikrogramm
Upm	Umdrehung pro Minute	μl	Mikroliter
UV	Ultraviolett	z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Aspartat	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamat	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

1 EINLEITUNG

1.1 *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas putida*

Die heterogene Familie *Pseudomonaceae* umfasst Gram-negative, polar begeißelte, sich aktiv bewegende, stäbchenförmige Bakterien, die keine Sporen oder andere Dauerformen bilden (Palleroni, 1984; Palleroni and Moore, 2004). Der Name stammt von der Gattung *Pseudomonas*, die phylogenetisch zu der Abteilung der Proteobacteria zählt (Palleroni, 1993). Diese Bakterien werden auch oft als Pseudomonaden bezeichnet. Vertreter dieser zu den γ -Proteobacteria gehörenden Klasse sind ubiquitär verbreitet und leben als Saprophyten aerob und chemoorganotroph in Böden, Gewässern oder in Assoziationen mit Pflanzen, Tieren oder Menschen (Palleroni, 1986). Anhand der Fähigkeit von *P. aeruginosa*, *P. putida* und *P. fluoreszens* das wasserlösliche gelb-grüne oder gelb-braune Pigment Pyoverdin zu produzieren, werden diese Spezies zur Gruppe der fluoreszierenden Pseudomonaden klassifiziert. Zusätzlich synthetisiert *P. aeruginosa* den blau-grünen Farbstoff Pyocyanin und kann bei Temperaturen bis 42 °C wachsen.

Die Mitglieder der Gattung *Pseudomonas* haben besonders bei ökologischen und biotechnologischen Prozessen eine wichtige Bedeutung, da sie wegen ihrer genetischen, metabolischen und physiologischen Diversität an vielen ökologischen Prozessen beteiligt sind. Sie sind bei Mineralisierungsprozessen involviert, indem sie eine Vielzahl natürlicher und xenobiotischer, organischer Substanzen metabolisieren (Reineke, 1998; Timmis and Pieper, 1999; Timmis, 2002). Obwohl einige Pseudomonaden pflanzenpathogen sind, tragen viele Arten auch zum Schutz der Pflanzen bei, indem sie innerhalb der Rhizosphäre andere Mikroorganismen verdrängen. Des Weiteren fördern einige, wie z.B. *P. putida*, auch das Pflanzenwachstum durch die Assoziation mit arbuskulären Mykorrhizapilzen (Artursson *et al.*, 2006; Liao, 1989; Palleroni, 1986). Außerdem sind Pseudomonaden resistent gegen spezielle Abwehrstoffe der Pflanzen und zeichnen sich darüber hinaus oft durch eine Toleranz oder sogar Resistenz gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmitteln, Detergenzien, Schwermetallen und organischen Lösungsmitteln aus.

Die Fähigkeit, heterozyklische oder aliphatische Kohlenwasserstoffe zu metabolisieren und die Resistenz gegenüber Schadstoffen beruht meistens auf plasmid- und transposonkodierten Eigenschaften (Williams and Murray, 1974). Viele Stämme von *P. putida* besitzen ebenso zahlreiche chromosomal kodierte Abbauewege, die der Verwertung natürlich vorkommender organischer Substanzen dienen.

Einige Pseudomonaden sind fakultative opportunistische Krankheitserreger für Pflanzen, Tiere oder Menschen, wie z.B. *P. aeruginosa*, während andere avirulente Spezies, insbesondere *P. putida*, sich als idealer Modellorganismus für eine heterologe Genexpression und zur Entwicklung biotechnologischer Anwendungen anbieten (Cases and de Lorenzo, 1998; Gilbert *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 1987).

Da weder pflanzen- noch tierpathogene Stämme von *P. putida* bekannt sind, besteht ein beachtliches Interesse, diesen Stamm in unterschiedlichen Bereichen biotechnologischer Anwendungen einzusetzen: zur biotechnologischen Dekontaminierung (Dejonghe *et al.*, 2001), Qualitätskontrolle fossiler Brennstoffe, z.B. Entschwefelung (Galan *et al.*, 2000), als Biokatalysator für die Produktion von Feinchemikalien (Schmid *et al.*, 2001), Produktion von Biokunststoffen (Olivera *et al.*, 2001) und als Wachstumsförderer von Pflanzen sowie zur Schädlingsbekämpfung (Walsh *et al.*, 2001).

P. putida KT2440 (Bagdasarian *et al.*, 1981; Regenhardt *et al.*, 2002; Timmis, 2002) entstand spontan durch Plasmidverlust aus dem Toluol-abbauenden Stamm *P. putida* mt-2 (Nakazawa, 2002; Williams and Murray, 1974), der ursprünglich als *Pseudomonas arvilla* mt-2 klassifiziert wurde (Kojima *et al.*, 1967). Neben einigen anderen Parentalstämmen gehört *P. putida* KT2440 zu den am besten charakterisierten Stämmen seiner Art und fällt seit 1981 unter die biologische Sicherheitsmaßnahme B1 nach der Genetik-Sicherheitsverordnung (GenTSV). Außerdem wurde er als erstes Gram-negatives Bodenbakterium vom US National Institute of Health (NIH) als EK1 Sicherheitsklonierungssystem eingestuft (Federal-Register, 1982). Seitdem wird der Stamm bevorzugt für genetische und physiologische Studien bei Gram-negativen Bakterien eingesetzt (Ramos *et al.*, 1987). Die Sequenzierung des Genoms von *P. putida* KT2440 (Nelson *et al.*, 2002) wird durch die biotechnologische Relevanz begründet und ermöglicht es, anhand der genetischen Grundlagen die Anpassungsfähigkeit und metabolische Vielfalt zu erklären. Zusätzlich ist es möglich, das Genom mit denen ähnlicher Stämme zu vergleichen, wie das von *P. aeruginosa* PAO1, das im Jahr 2000 komplett sequenziert wurde (Stover *et al.*, 2000). Dadurch kann das generelle Verständnis der Beziehungen der Mikroorganismen untereinander und zu ihrer Umwelt erweitert werden. Das 6,18 Mbp Genom von *P. putida* KT2440 mit einem GC-Gehalt von 61,6 % weist eine Homologie von 85 % gegenüber den offenen Leserahmen des Genoms von *P. aeruginosa* PAO1 auf (Nelson *et al.*, 2002; Stover *et al.*, 2000), obwohl sich dieser Stamm durch eine hohe Pathogenität bei Tieren, Menschen (Palleroni, 1984) sowie Pflanzen (Gross and Cody, 1985) auszeichnet. Die Genomanalyse bestätigte die Avirulenz von *P. putida* KT2440, da keine Gene für Virulenzfaktoren, die in *P. aeruginosa* präsent sind, identifiziert werden

konnten. Dazu gehören Exotoxin A, Elastase, Phospholipase C sowie der Typ-III-Sekretionsweg und das Operon, das für die Rhamnolipidproduktion verantwortlich ist (Dos Santos *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2002). Hingegen zeichnet sich das Genom von *P. putida* KT2440 im Vergleich zu dem von *P. aeruginosa* PAO1 durch eine größere Zahl an Typ-I-Sekretionssystemen, den ABC-Transportern, aus. Durch Genomanalysen konnten in *P. putida* KT2440 vier potenzielle Typ-V-Sekretions-mechanismen der Autotransporter identifiziert werden, während das Genom von *P. aeruginosa* PAO1 nur drei dieser Familie besitzt. Von ihnen wurde lediglich die Esterase EstA beschrieben, die an der Virulenz von *P. aeruginosa* beteiligt ist (Wilhelm *et al.*, 1999; Wilhelm *et al.*, 2007).

Genetische Gemeinsamkeiten von *P. putida* KT2440 mit pathogenen Pseudomonaden sind homologe Gene, die für Adhäsionsproteine, Typ-IV Pili und stressregulierte Proteine kodieren sowie für die Kolonisierung von Oberflächen und der Rhizosphäre essenziell sind (Dos Santos *et al.*, 2004; Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde ein *Two-partner*-Sekretionssystem von *P. putida* KT2440 beschrieben, das bei der Besiedelung von Pflanzenwurzeln eine Rolle spielt (Molina *et al.*, 2006).

P. putida unterscheidet sich von *P. aeruginosa* durch die Fähigkeit, Wurzeln von Pflanzen kolonisieren zu können (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000), während *P. aeruginosa* einen fakultativ opportunistischen humanpathogenen Krankheitserreger repräsentiert. *P. putida* besiedelt Böden, Gewässer und kolonisiert Oberflächen lebender Organismen, wie z.B. Wurzeln von Gerste, Mais, Kartoffeln und Tomaten, und ist zudem gut an die Rhizosphäre angepasst (de Weger *et al.*, 1989; Molina *et al.*, 1998).

Die Zellen von *P. aeruginosa* initiieren durch die drei unterschiedlichen Bewegungstypen *Twitching*, Schwimmen und Schwärmen eine flächendeckende Ausbreitung mit anschließender Biofilmbildung (O'Toole and Kolter, 1998). Hingegen kann sich *P. putida* nur durch die Schwimmbewegung fortbewegen (Gjermansen *et al.*, 2005), während die anderen Bewegungstypen unter standardisierten Bedingungen bisher nicht beobachtet werden konnten (Matilla *et al.*, 2007).

Folglich zeichnen sich die beiden Stämme zwar durch unterschiedliche, aber teilweise überlappende Lebensweisen aus.

P. aeruginosa ist ebenso von bedeutendem biologischem sowie chemischem Interesse. Zum einen sind die Interaktionen der Proteine, die an der Virulenz beteiligt sind, von großem Interesse (Jaeger *et al.*, 1991; Jaeger *et al.*, 1992; König *et al.*, 1996), gleichermaßen bieten die sekretierten lipolytischen Enzyme ein hohes biotechnologisches Potenzial als Katalysatoren (Jaeger and Reetz, 1998, 2000).

1.2 GDSL-Familie

Lipolytische Enzyme gehören zur Familie der Hydrolasen, da sie charakteristisch die Hydrolyse von Carboxyesterbindungen reversibel unter Wasserverbrauch in ihre Komponenten Carbonsäure und Ester katalysieren. Sie sind bei Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen weit verbreitet. Hydrolytische Enzyme sind wichtige Biokatalysatoren, denen zunehmend Bedeutung in der organischen Synthese zugesprochen wird. Das biotechnologische Interesse beruht darauf, dass hydrolytische Enzyme sich durch ein breites Substratspektrum auszeichnen, meist sehr stabil in organischen Lösungsmitteln sind und gute bis exzellente Stereoselektivität in der Racematspaltung vorweisen. Ein industrieller Vorteil dieser Enzyme basiert auf der Unabhängigkeit von Kofaktoren (Bornscheuer, 2002b). Darüber hinaus dienen sie zur Herstellung nahezu enantiomerenreiner Verbindungen, die für die pharmazeutische Industrie von größtem Interesse sind.

Anhand ihrer Substratspezifität werden lipolytische Enzyme u.a. in Esterasen (EC3.1.1.1) und Lipasen (EC3.1.1.3) unterteilt. Lipasen hydrolysieren langkettige ($\geq C 10$), wasserlösliche Triacylglyceride als auch die Substrate der Esterasen mit kurzkettigen ($\leq C10$), wasserlöslichen Fettsäureestern (Arpigny and Jaeger, 1999; Jaeger *et al.*, 1994).

Esterasen und Lipasen zeichnen sich durch das charakteristische konservierte G-X-S-X-G-Konsensusmotiv aus, wobei ein im Pentapeptid zentriertes nukleophiles Serin zusammen mit der sauren Aminosäure Aspartat und Histidin eine katalytische Triade bildet (Jaeger *et al.*, 1992). Die GDSL-Hydrolasen, ursprünglich als GDSLs bekannt, unterscheiden sich durch die Zusammensetzung des Motivs, bestehend aus Glycerin, Aspartat, Serin und Leucin. Im Gegensatz zu anderen lipolytischen Enzymen, bei denen das Serin enthaltende Motiv viel zentraler im Protein lokalisiert ist, befindet sich das GDSL-Motiv sehr viel N-terminaler im Enzym. Anhand der aufgeklärten dreidimensionalen Struktur einer Esterase aus *Streptomyces scabies*, die ein Mitglied der GDSL-Familie darstellt, wurden Unterschiede bei der α/β -Tertiärstruktur (Wei *et al.*, 1995) im Vergleich zu den α/β -Hydrolasen festgestellt (Ollis *et al.*, 1992). Dieser resultiert durch die Lokalisation des katalytisch aktiven Serins auf einem sogenannten nukleohilen Ellenbogen im Pentapeptid. Darüber hinaus wird das aktive Zentrum aus einer katalytischen Diade gebildet (Arpigny and Jaeger, 1999).

Die GDSL-Familie zeichnet sich durch fünf konservierte Regionen (Block I – V) aus, die vorerst als SGNH-Hydrolasen mit vier konservierten Bereichen (Block I - III, V) klassifiziert wurden. Die konservierten Aminosäurereste Serin, Glycerin, Aspartat und Histidin, lokalisiert in je einem der Blöcke, spielen eine Schlüsselrolle bei der katalytischen Enzymaktivität

(Akoh *et al.*, 2004). Das aktive Zentrum der GDSL-Hydrolasen soll flexibel arrangiert sein und durch Konformationsveränderungen des Enzyms ein breites Substratspektrum ermöglichen (Huang *et al.*, 2001).

Mitglieder der GDSL-Familie sind in zahlreichen Bakterien zu finden und interessanterweise auch in höheren Pflanzenarten vertreten (Molgaard *et al.*, 2000). In Bakterien wurden beispielsweise eine Esterase aus *P. aeruginosa* (Wilhelm *et al.*, 1999), drei Phospholipasen A aus *Legionella pneumophila* (Banerji *et al.*, 2008) und eine Phospholipase B aus *Moraxella catarrhalis* (Timpe *et al.*, 2003) identifiziert.

1.3 Phospholipasen

Phospholipaseaktivität wurde sowohl bei pathogenen Bakterien (Farn *et al.*, 2001) als auch pathogenen Pilzen (Ghannoum, 2000) oder Parasiten (Cassaing *et al.*, 2000) nachgewiesen. Phospholipasen sind weit verbreitete Enzyme, die hauptsächlich als Virulenzfaktoren dieser Mikroorganismen charakterisiert wurden und die verschiedenen Funktionen der Zelle übernehmen, wie z.B. die Erhaltung von Membranen, zelluläre Umsätze und Erzeugung von entzündungshemmenden Immunantworten. Bakterielle Phospholipasen sind potenzielle Virulenzfaktoren, da sie die Wirtsmembran destabilisieren oder sogar lysieren können und durch Freisetzung sekundärer Botenstoffe in die Signaltransduktionswege eingreifen (Ghannoum, 2000; Schmiel and Miller, 1999).

Phospholipasen sind Esterasen, die Esterbindungen ihrer natürlichen Substrate, der Phospholipiden, spalten. Diese wiederum sind zusammen mit Glykolipiden und Proteinen die Hauptbestandteile der prokaryotischen und eukaryotischen Membranen. Folglich sind sie wichtige Enzyme für den Lipidmetabolismus (Banerji *et al.*, 2008). Phospholipide leiten sich entweder vom Glycerin, einem Drei-Kohlenstoff-Alkohol, oder von dem komplexeren Alkohol Sphingosin ab. Phospholipide, die sich von Glycerin ableiten, heißen Phosphoglyceride und bestehen aus einem Glycerol-Rückgrat, zwei Fettsäureketten und einem phosphorylierten Alkohol. Die Phosphosphingoside sind aus einem Sphingosin-Rückgrat, an das eine Fettsäure sowie ein phosphorylierter Alkohol gebunden sind, aufgebaut.

Die Phospholipasen werden in Abhängigkeit ihrer bevorzugten Spaltposition eines Phospholipidmoleküls in unterschiedliche Gruppen klassifiziert (Gruppe A-D). Phospholipasen A spalten langkettige Fettsäuren aus dem Phospholipidmolekül und werden wiederum anhand zweier unterschiedlicher Angriffspunkte unterschieden. Die Phospholipase A1 (EC 3.1.1.32) spaltet das Phospholipid an Position *sn*-1, während die Phospholipase A2

(EC 3.1.1.4) entsprechend Position *sn*-2 angreift. Außerdem gibt es noch Lysophospholipasen (LPL) (EC 3.1.1.5), die die Fettsäure an Position *sn*-1 eines Lysophospholipids hydrolysieren. Phospholipasen, die Phospholipide sowohl an Position *sn*-1 als auch an *sn*-2 hydrolysieren, werden als Phospholipasen B bezeichnet. Zudem besitzen Phospholipasen B oft die Aktivität einer Lysophospholipase durch die Fähigkeit, die Hydrolyse von Lysophospholipiden zu katalysieren (Ghannoum, 2000). Die Enzym Commission der internationalen Union der Biochemie benutzte die Bezeichnung der Phospholipase B als ein Synonym für Lysophospholipasen (Bosch, 1982).

Hingegen hydrolysieren Phospholipasen C (EC 3.1.4.3) innerhalb der Phosphodiesterbindung am Phospholipid-Rückgrat, und Phospholipasen D (EC 3.1.4.4) greifen die zweite Phosphodiesterbindung des Phospholipids an. Sie werden als Phosphodiesterasen bezeichnet (Sitkiewicz *et al.*, 2007).

P. aeruginosa besitzt drei Phospholipasen C, wovon die nicht hämolytische Plc-N Phosphatidylcholin und Sphingomyelin und die homologe, hämolytische Plc-H Phosphatidylcholin hydrolysiert (Ostroff *et al.*, 1990; Songer, 1997).

Die dritte, ebenfalls hämolytische Phospholipase C gehört der Klasse, die sich mit einer Spezifität für Phosphocholin auszeichnet, an (Stonehouse *et al.*, 2002).

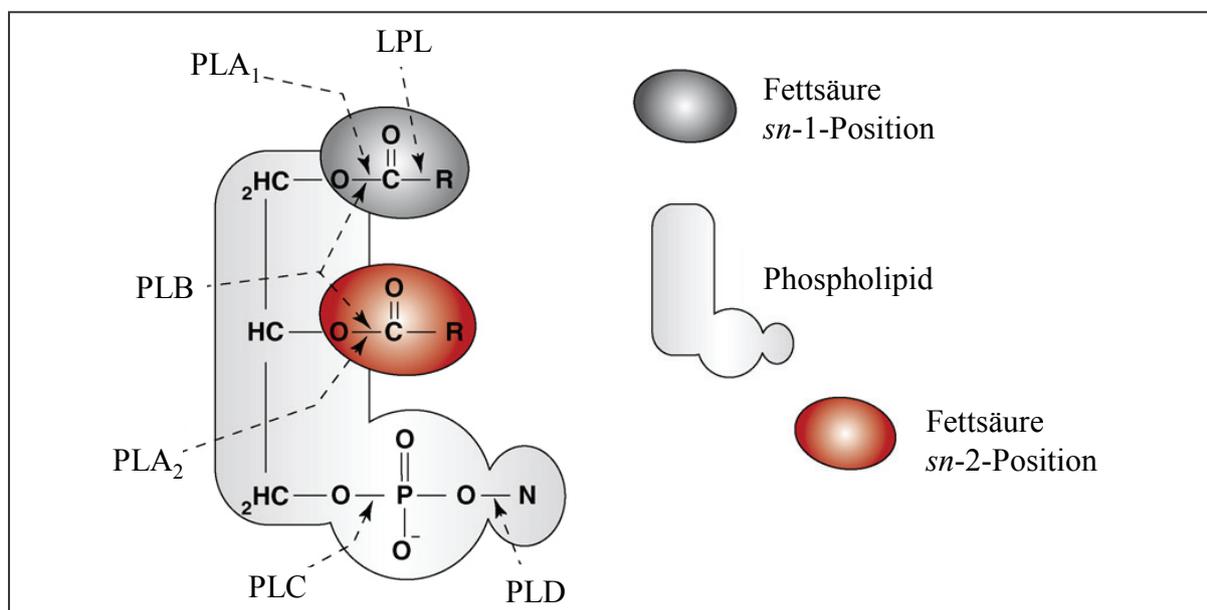


Abb. 1.1: Klassifizierung der Phospholipasen in Abhängigkeit ihrer Enzymspezifität an einem Phospholipid. Erläuterungen im Text (modifiziert nach Sitkiewicz *et al.*, 2007).

1.4 Proteinsekretion in Gram-negativen Bakterien

Bei der Sekretion extrazellulärer Proteine bei Gram-negativen Bakterien müssen im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien, Archaea und Eukaryonten, zwei Membranen, die Cytoplasmamembran und die äußere Membran, überwunden werden. Es gibt unterschiedliche Mechanismen für den Transport über die bakteriellen Membranen. Diese werden in Ein-Schritt- und Zwei-Schritt-Mechanismen als auch in Sec-abhängige sowie Sec-unabhängige Sekretionswege unterteilt (Filloux *et al.*, 1998; Koster *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003).

Bei dem Ein-Schritt-Sekretionsmechanismus Typ-I, der auch als ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) bekannt ist, wird das zu sekretierende Protein Sec-unabhängig und unter Verbrauch von ATP vom Cytoplasma direkt durch eine Pore an die Zelloberfläche transportiert (Henderson *et al.*, 2004). Die bisher bekannten Proteine aus *P. aeruginosa*, die mit dem Typ-I-Sekretionsmechanismus sekretiert werden, sind das Häm-bindende Protein HasA (Létoffé *et al.*, 1998; Stover *et al.*, 2000) sowie die alkalische Phosphatase (Duong *et al.*, 1992). Im Genom von *P. putida* konnten 15 % mehr Membrantransportsysteme als in *P. aeruginosa* identifiziert werden. Den ABC-Transporten von *P. putida* wird die größte Bedeutung zugesprochen, die zu einem großen Anteil bei dem Metabolismus von Aminosäuren involviert sind.

Das Typ-III-Sekretionssystem ist ein weiterer Ein-Schritt-Transportmechanismus, bei dem der Transport vom Kontakt eines N-terminalen Erkennungssignals des Zielproteins mit der Wirtszelle abhängig ist (Hauser *et al.*, 1998; Hauser *et al.*, 2002; Warren and Young, 2005). Es erfolgt eine Unterteilung der Typ-III-Sekretion in Flagellen und pathogenitätsbezogene Sekretionssysteme (Nguyen *et al.*, 2000). Bei dem Flagellen-System werden die Untereinheiten der Flagellen, die sogenannten Flagelline, exportiert. Hingegen erfolgt bei dem Sekretionsapparat, der bei der Pathogenität der jeweiligen Organismen eine Rolle spielt, eine direkte Initiierung der Zielproteine vom Cytoplasma in die eukaryotische Wirtszelle. Dieser komplexe Sekretionsapparat formt die dafür notwendige nadelähnliche Struktur, die die Fähigkeit besitzt, drei Membranen in einem Schritt zu durchqueren (Nguyen *et al.*, 2000). Die Proteine, die durch den Typ-III-Mechanismus direkt ins Cytoplasma der Wirtszelle injiziert werden, sind an der Virulenz der Bakterien beteiligt (Lee, 1997). Virulenzfaktoren aus *P. aeruginosa*, wie die Exoenzyme S, T, U und Y, benutzen dieses Transportsystem, um direkt in die Wirtszelle zu gelangen (Yahr *et al.*, 1996; Yahr *et al.*, 1997; Yahr *et al.*, 1998). In *P. putida* konnte bislang kein homologes Sekretionssystem identifiziert werden, das die

Avirulenz dieses biologisch sicheren Bakteriums bestätigt (Dos Santos *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2002).

Bei den Zwei-Schritt-Sekretionsmechanismen erfolgt zuerst der Export über die Cytoplasmamembran ins Periplasma und anschließend der Transport über die äußere Membran ins extrazelluläre Milieu. Der Export des zu sekretierenden Proteins ereignet sich entweder ungefaltet über den Sec- oder gefaltet über den Tat-Signalweg (*twin-arginin-translocation*) ins Periplasma (Voulhoux *et al.*, 2001). Eine N-terminale Signalsequenz des Proteins, bestehend aus meist 20 - 25 Aminosäuren, leitet den Sec-abhängigen Transport aus dem Cytoplasma ein und wird danach im Periplasma von einer Signalpeptidase abgespaltet (Paetzel *et al.*, 1997). Hingegen wird der Transport der Proteine, die über den Tat-Weg sekretiert werden, durch ein doppeltes Arginin-Motiv innerhalb der Erkennungssequenz erzielt (Ochsner *et al.*, 2002). Bei diesem Mechanismus werden gefaltete Proteine komplexartig mit eventuell benötigten Kofaktoren über die Cytoplasmamembran exportiert.

Nachdem das über die innere Membran exportierte Protein im Periplasma in die native Konformation gefaltet wurde, erfolgt der zweite Schritt der Typ-II-Sekretion über die äußere Membran. Es konnten in *P. aeruginosa* bislang zwei dieser Systeme identifiziert werden, wobei es sich um den Xcp- und den homologen Hxc-Apparat handelt (Ma *et al.*, 2003). Die Faltung dieser Proteine erfolgt im Periplasma, wobei spezifische Faltungsmediatoren, wie inter- und intramolekulare Chaperone, eine korrekte Faltung des Enzyms vermitteln. Beispielsweise vermittelt die Lipase-spezifische Foldase LipH die Proteinfaltung der Lipase LipA aus *P. aeruginosa* (Jaeger *et al.*, 1994). Darüber hinaus werden durch das periplasmatische Dsb (*disulfide bond*)-System Disulfidbrücken gebildet, die entscheidend für eine richtige Faltung der Proteine sind (Missiakas and Raina, 1997; Pugsley, 1992).

Bei Proteinen, die nach dem Sec-abhängigen Transport vom Periplasma über den Typ-V-Sekretionsmechanismus ins extrazelluläre Milieu transportiert werden, handelt es sich um Autotransporterproteine (Va). Erstmals wurde dieser Transportmechanismus für die Immunglobulinprotease A1 (IgA1) aus *Neisseria gonorrhoeae* beschrieben (Pohlner *et al.*, 1987). Der *Two-partner*-Sekretionsapparat (TPS) (Vb) unterscheidet sich vom klassischen Autotransportersystem durch die strukturelle Trennung der N-terminalen Domäne (TpsA, Exoprotein) von der C-terminalen Domäne (TbsB, β -Domäne). Beide Domänen sind jeweils mit einer Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran ausgestattet. Für den Transport über die äußere Membran muss eine Interaktion zwischen beiden Domänen erfolgen, obwohl es noch keine Anzeichen für eine derartige Erkennungssequenz gibt (Jacob-Dubuisson *et al.*, 2004). Obwohl hauptsächlich in pathogenen

Bakterien dieser Transportmechanismus beschrieben wurden, konnte in *P. putida* KT2440 der erste TPS-Sekretionsmechanismus in einem avirulenten Stamm identifiziert werden, der als Adhäsion fungiert und den Eisenabbau beeinflusst (Molina *et al.*, 2006).

Der Oca (*oligomeric coiled coils adhesin*)-Sekretionsmechanismus (Vc) oder auch Trimere Autotransporter wurde als eine Unterfamilie der oberflächenassoziierten oligomeren Autotransporter beschrieben. Das Adhäsion YadA aus *Yersinia pestis* gilt als sogenannter Prototyp dieser Familie (Roggenkamp *et al.*, 2003). Das Protein besitzt die charakteristische N-terminale Signalsequenz, die N-terminale Passagierdomäne sowie die C-terminale Transportdomäne. Im Gegensatz zu den konventionellen Autotransportern setzt sich die Transportdomäne aus einem Trimer, bestehend aus je vier β -Faltblättern, zusammen, die eine β -Pore aus 12 β -Faltblättern in der äußeren Membran bilden.

1.5 Autotransporterproteine

Autotransporter bilden die wichtigste Gruppe der sekretierten Proteine. Durch den Typ-V-Sekretionsmechanismus (Va) erfolgt der Membrantransport von Autotransporterproteinen in Gram-negativen Bakterien. Gemäß der Bezeichnung besitzt das Protein alle erforderlichen Komponenten, um seinen eigenen energieunabhängigen Membrantransport zu gewährleisten. Die Proteine dieser Familie zeichnen sich alle durch eine charakteristische strukturelle Organisation aus, die in drei Hauptdomänen zu unterteilen ist. Eine N-terminale Signalsequenz aus 18 - 26 Aminosäuren initiiert den Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran ins Periplasma und wird anschließend proteolytisch abgespaltet. Die Passagierdomäne stellt den heterologen, funktionellen Teil mit diversen Eigenschaften dar. Sie kann unterschiedliche enzymatische Aktivitäten von Proteasen, Esterasen, Lipasen und Peptidasen besitzen oder Actin-abhängige Bakterienbewegungen vermitteln, als Adhäsion agieren, als Toxin oder Cytotoxin wirken, ein Immunmodulator sein oder die Maturation eines anderen Virulenzfaktors bewirken (Henderson and Nataro, 2001). Die C-terminale Domäne ist aufgrund ihrer Transportfunktion sehr homolog und besitzt die Charakteristika eines integralen Membranproteins, das eine β -Pore ausbildet (Barnard *et al.*, 2007; Dautin and Bernstein, 2007; Henderson *et al.*, 1998). Darüber hinaus bestätigte sich durch die Aufklärung der Kristallstruktur von NalP aus *Neisseria meningitidis* die Vermutung, dass sich N-terminal der Transportdomäne eine Linker-Region aus ca. 25 Aminosäuren befindet, die strukturell eine α -Helix ausbildet (Oomen *et al.*, 2004) und möglicherweise zur Stabilität der β -Pore beiträgt (Konieczny *et al.*, 2001). Es konnte bereits bestätigt werden, dass diese Linker-

Region bei dem Transportmechanismus vieler Autotransporter von großer Bedeutung ist (Maurer *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 1995; Velarde and Nataro, 2004). Es wurde zusätzlich auch eine sogenannte Autochaperondomäne C-terminal der Passagierdomäne beschrieben, die die Transporteffizienz durch Stabilisierung der Pore erhöht (Mogensen *et al.*, 2005) oder für die korrekte Faltung des Proteins auf der Zelloberfläche unverzichtbar ist (Oliver *et al.*, 2003; Velarde and Nataro, 2004). Ein kennzeichnendes Merkmal vieler Autotransporter sind wenige, meist zwei nahe beieinander liegende Cysteinreste, lokalisiert N-terminal der heterologen Passagierdomäne, deren genaue Bedeutung derzeit noch ungeklärt ist. Die physiologische Funktion des Cytotoxins VacA aus *Helicobacter pylori* ist von diesem konservierten Cysteinpaar zwar unabhängig, jedoch wird der Transport durch Modifikationen der Cysteinreste über die äußere Membran beeinträchtigt (Letley *et al.*, 2006).

Der Transportmechanismus der Autotransporter erfolgt in drei Schritten, die schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt sind. Die Signalsequenz leitet den Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran ein und wird danach im Periplasma proteolytisch abgespaltet. Dort verbleibt das Protein vermutlich ungefaltet und bildet ein Intermediat aus, das resistent gegen Proteasen sein muss (Ieva *et al.*, 2008; Skillman *et al.*, 2005), wobei entsprechende Schutzmechanismen unbekannt sind. Es gibt deutliche Anzeichen dafür, dass Autotransporter vorübergehend im Periplasma verbleiben (Brandon and Goldberg, 2001; Jose *et al.*, 1996; Rutherford *et al.*, 2006; Skillman *et al.*, 2005). Bei der Hämoglobin-Protease Hpb aus *Escherichia coli*, deren Kristallstruktur gelöst wurde, konnte durch Inserierung eines Cysteinpaares ein gehemmter Proteintransport nachgewiesen werden. Das DsbA-System kann im Periplasma die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen katalysieren. Dies unterstützt die Hypothese eines ungefalteten Transports über die äußere Membran (Jong *et al.*, 2007). Übereinstimmungen erbrachten Untersuchungen nach Insertion eines Cysteinpaares, deren gebildete Disulfidbrücke im Periplasma den Transport der Passagierdomäne des Adhäsins Pertactin, einem Autotransporter aus *Bordetella pertussis*, über die äußere Membran beeinträchtigte (Junker *et al.*, 2009). Zudem erscheint das Lumen der Kristallstruktur der β -Pore von NalP zu eng (1 - 2 nm) für eine gefaltete Enzymdomäne (Barnard *et al.*, 2007; Oomen *et al.*, 2004). Die Transportdomäne, bestehend aus 250 - 300 Aminosäuren, vermittelt die Translokation über die äußere Membran. Eine alternierende Anordnung von polaren und hydrophoben Aminosäuren wird stets durch ein Phenylalanin oder Tryptophan abgeschlossen und bildet durch Interaktionen mit dem hydrophoben Milieu spontan eine β -Pore in der äußeren Membran aus (Henderson *et al.*, 1998). Bei der

Membraninsertion bildet das erste und letzte der 10 - 14 antiparallelen β -Faltblätter, die jeweils aus 9 - 12 Aminosäuren bestehen, untereinander Wasserstoffbrücken aus, sodass eine ringförmige Konformation entsteht. Die alternierenden, hydrophoben Aminosäurereste sind zur Membranseite gerichtet, während die hydrophilen dem Inneren der wässrigen Pore zugewandt sind (Van Gelder *et al.*, 2002). Nach der Translokation der Passagierdomäne über die äußere Membran auf die Zelloberfläche wird diese autoproteolytisch von der Transportdomäne abgespaltet und in das extrazelluläre Milieu freigelassen, wie es bei der Protease IgA1 aus *Neisseria gonorrhoeae* zu beobachten ist (Pohlner *et al.*, 1987). Alternativ katalysiert die Abspaltung eine membranassoziierte Protease. Dieses Beispiel repräsentiert die Protease IcsP aus *Shigella flexeri*, die IcsA (VirG) proteolytisch spaltet und ins extrazelluläre Milieu entlässt (Brandon and Goldberg, 2001). Ebenfalls gibt es Beispiele, bei denen die Passagierdomäne mit der Transporterdomäne verankert bleibt und auf der Zelloberfläche exponiert wird, wie es z.B. bei der Esterase EstA aus *P. aeruginosa* auftritt (Wilhelm *et al.*, 1999).

Der genaue Transportmechanismus der Autotransporterproteine ist sehr komplex und noch nicht vollständig geklärt. Es gibt unterschiedliche Theorien, wie der Transport über die äußere Membran schnell und effizient ohne externe Energiezufuhr, wie z.B. ATP, erfolgt (Thanassi *et al.*, 2005). Beim klassischen *Hairpin*-Modell (Henderson *et al.*, 1998; Pohlner *et al.*, 1987) fädelt der N-terminale Teil der Passagierdomäne zuerst in die Pore ein, gefolgt vom restlichen Protein. Eine Alternative bietet das *Threading*-Modell, bei dem die Passagierdomäne N-terminal in die Pore eingeführt wird. Dieser Mechanismus erscheint jedoch unwahrscheinlich, da N-terminale Verkürzungen oder Modifikationen ebenso wie heterologe Passagierdomänen den Transport nicht beeinflussen. Dies widerlegt die Existenz einer Signalsequenz, die für die zielgerichtete Einfädung in die Pore notwendig wäre (Dautin and Bernstein, 2007; Maurer *et al.*, 1999; Szabady *et al.*, 2005). Bei beiden Theorien erreicht die Passagierdomäne ihre native Konformation extrazellulär, dennoch lässt das letztere Modell ein teilweise gefaltetes Protein zu (Oomen *et al.*, 2004). Eine dritte Möglichkeit erklärt das *Multimeric*-Modell. Dabei entsteht durch Bildung eines Oligomers aus mehreren Transporterdomänen eine große Pore, die den Transport gefalteter Proteinkonformationen erlauben würde (Veiga *et al.*, 1999, 2004). Allerdings besagen die biochemischen und strukturellen Anzeichen, dass die meisten Autotransporter Monomere sind (Oomen *et al.*, 2004). Auch die Kristallstruktur der C-terminalen Domäne des trimeren Autotransporters Hia aus *Haemophilus influenzae* zeigt, dass jede der drei Untereinheiten jeweils vier der 12 β -Faltblättern bildet, aus denen zusammen eine β -Pore resultiert (Meng *et al.*, 2006).

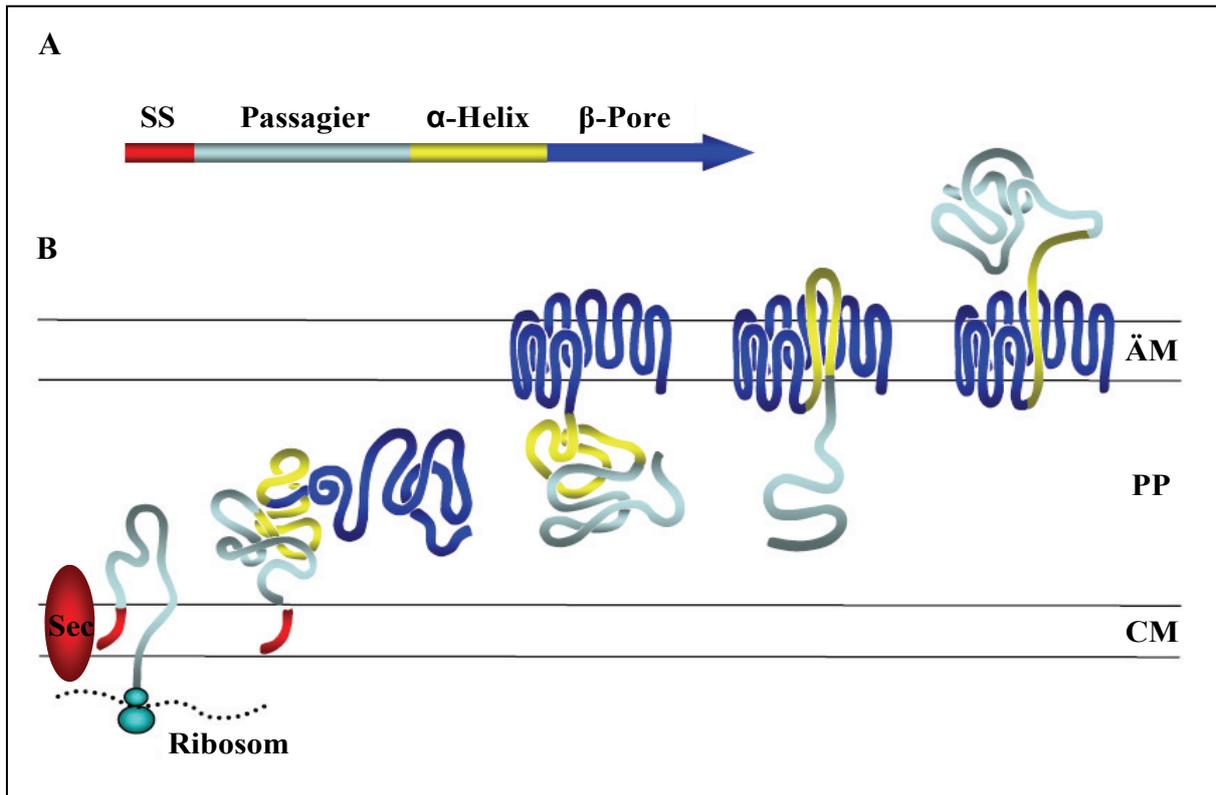


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der charakteristischen strukturellen Organisation und Sekretion von Autotransporterproteinen. (A) Autotransporterproteine bestehen aus einer Signalsequenz (SS), einer Passagierdomäne und einer Transportdomäne (β -Pore), die durch eine α -Helix miteinander verbunden sind. (B) Die Sekretion eines Autotransporters erfolgt durch eine Sec-anhängigen Translokation über die Cytoplasmamembran (CM) ins Periplasma (PP) und eine darauffolgende Porenbildung für den Transport der Passagierdomäne über die äußere Membran (ÄM) (Jose and Meyer, 2007).

Ein alternatives Modell postuliert eine Implikation des hochkonservierten bakteriellen Protein-Komplexes Omp85 in den Membrantransport (Tommassen, 2007). Omp85 ist ein weit verbreitetes Protein in Pro- und Eukaryoten, das für die Integration vieler äußerer Membranproteine verantwortlich ist (Voulhoux *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005), darunter auch das TPS-System (Voulhoux and Tommassen, 2004). Das Omp85-Protein spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle in der Biogenese der äußeren Membran (Kleinschmidt, 2003). Sequenzanalysen bakterieller Genome ergaben, dass Gene, die Proteine der Omp85-Familie kodieren, essenziell für die jeweiligen Organismen sind. Das Gen von Omp85 ist im Operon der Lipopolysaccharid-Biosynthese lokalisiert (Voulhoux *et al.*, 2003). Dabei ist Omp85 für die effektive Insertion von Lipiden (Genevrois *et al.*, 2003) und integralen Membranproteinen notwendig (Voulhoux *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnten in allen bekannten Genomen von Bakterien mit einer äußeren Membran Gene, die Homologien zu Omp85 besitzen, identifiziert werden (Gentle *et al.*, 2004; Voulhoux and Tommassen, 2004).

Darüber hinaus gehört die Transportkomponente (TpsB) des bakteriellen *Two-partner*-Sekretionsapparats, welcher den Transport eines getrennten Exoproteins koordiniert, zur Omp85-Familie (Gentle *et al.*, 2005; Jacob-Dubuisson *et al.*, 2001; Thanassi *et al.*, 2005).

Um den Transportmechanismus von Autotransporterproteinen eingehender erforschen zu können, werden meist Hybridproteine konstruiert, indem ein heterologes Proteins mit einem Autotransporter fusioniert wird (Maurer *et al.*, 1999; Skillman *et al.*, 2005; Veiga *et al.*, 2004; Velarde and Nataro, 2004). Heterologe Passagierproteine zeigten dabei bisher signifikante Unterschiede bezüglich der Transportfähigkeit. Die Passagierdomänen IcsA und EspP bilden im Periplasma Disulfidbrücken (Brandon and Goldberg, 2001; Skillman *et al.*, 2005). Eine Fusion des Cholera Toxins B (CtxB) mit den Passagierdomänen von EspP sowie der Protease IgA erzielte trotz Faltung und Disulfidbrückenbildung im Periplasma einen effizienten Transport über die äußere Membran (Skillman *et al.*, 2005; Veiga *et al.*, 2004). Da jedoch gefaltete Proteine die Translokation beeinträchtigen können, werden einige heterologe Domänen nicht erfolgreich transportiert. Die Passagierdomäne des Chimärs CtxB-IgA-Protease wird nur in Gegenwart reduzierender Agenzien über die äußere Membran transportiert (Klauser *et al.*, 1990). Ebenso verursacht die Insertion einer Mutation, die die Faltung des Maltose-bindenden Proteins (MBP) verlangsamt, eine Steigerung der Transporteffizienz bei der Fusion mit der Passagierdomäne von AIDA-I (Rutherford *et al.*, 2006). Letztlich verbleibt der Passagier des Chimärs MBP-EspP vollständig im Periplasma (Skillman *et al.*, 2005).

Das Ein-Komponenten-Modell des Sekretionsmechanismus der Autotransporterproteine wird durch die Aufklärung der Kristallstruktur der *in vitro* gefalteten β -Pore des Autotransporters NalP aus *N. meningitidis* gestützt (Oomen *et al.*, 2004) und ist wahrscheinlich aufgrund der Homologie weitgehend auf andere Strukturen von Transportdomänen dieser Familie übertragbar. Die Transportdomäne von NalP bildet aus 12 antiparallelen β -Faltblättern eine β -Pore mit einem Durchmesser von 10 x 12,5 Å. Es gibt deutliche Anzeichen dafür, dass die extrazellulären Schleifen flexibel sind, was ein generelles Merkmal von Autotransporterproteinen darstellt. Das Lumen der β -Pore, das sich durch einen hydrophoben Charakter auszeichnet, beinhaltet eine α -Helix, bestehend aus den postulierten 29 Aminosäuren. Diese α -Helix interagiert mit der Porenwand durch sieben Salzbrücken genauso wie durch 16 Wasserstoffbrückenbindungen und zahlreichen Van-der-Waals-Bindungen.

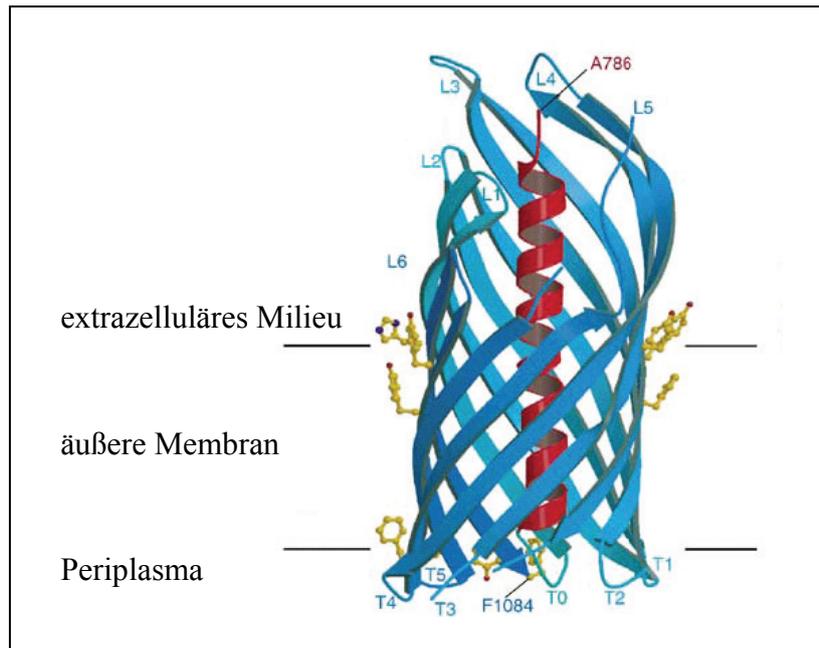


Abb. 1.3: Kristallstruktur der Translokationsdomäne des NalP-Autotransporters aus *N. meningitidis*. Die 12 antiparallelen β -Faltblätter sind blau dargestellt. Die hydrophoben Regionen sind der Membranseite zugewandt und werden teilweise von aromatischen Resten (gelb) flankiert. Die periplasmatische Seite ist durch kurze (T0-T5), die extrazelluläre Seite durch längere Schlaufen (L1-L6) gekennzeichnet. Die Pore wird durch eine α -Helix (rot), die N-terminal mit der Aminosäure an Position 786 (A786) beginnt, ausgefüllt und mit der β -Pore (T0) C-terminal verbunden (Oomen et al., 2004).

Durch die Kristallstruktur der Haemoglobin-Protease Hpb aus *E. coli* gelang es erstmals, eine Struktur der STATE-Familie und eine vollständige Passagierdomäne eines Autotransporterproteins aufzuklären (Otto *et al.*, 2005). Zudem sind bisher nur Strukturen von Teilen der Passagierdomänen von Autotransportern bekannt (Emsley *et al.*, 1996; Gangwer *et al.*, 2007).

1.6 Die Esterase EstA aus *P. aeruginosa*

Die Esterase EstA ist ein Mitglied der GDSL-Familie der lipolytischen Enzyme und ist das erste charakterisierte Autotransporterprotein aus *P. aeruginosa* (Wilhelm *et al.*, 1999). Das Präprotein besteht aus 646 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 69,5 kDa und wird von dem offenen Leserahmen PA5112 aus 1941 bp kodiert. Der charakteristische hohe GC-Gehalt von *P. aeruginosa* spiegelt sich auch in der Esterase EstA mit 66,9 % wider. Der Sec-abhängige Transport über die Cytoplasmamembran initiiert die 24 Aminosäuren lange Signalsequenz und wird daraufhin im Periplasma proteolytisch abgespaltet. Folglich resultiert ein Protein, bestehend aus 622 Aminosäuren, mit einer molekularen Masse von 66,8 kDa. Das Protein lässt sich anhand von Homologievergleichen in eine N-terminale Passagierdomäne und eine C-terminale Transportdomäne unterteilen. Die katalytische Triade wird aus dem

Ser¹⁴ des GDSL-Motivs zusammen mit Aspartat²⁸⁶ und Histidin²⁸⁹ gebildet. Das charakteristische Cysteinpaar vieler Autotransporterproteine findet sich in der katalytisch aktiven Domäne von EstA an Position 258 und 264 wieder.

Durch Sequenzanalysen mehrerer enantioselektiver Varianten von EstA, die eine erhöhte Präferenz gegenüber dem *R*-Enantiomer der 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenylester zeigten, konnte die Aminosäure W185 des nativen Enzyms identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich für die Enantioselektivität von EstA verantwortlich ist (Becker *et al.*, 2008).

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Transportdomäne von NalP aus *N. meningitidis* lässt aufgrund von Homologien für EstA ebenfalls 12 amphipathische β -Faltblätter vermuten, die für den Transport der Passagierdomäne in der äußeren Membran eine Pore bilden. Zudem wird eine α -Helix im Lumen der Membranpore postuliert. Im Gegensatz zu anderen Proteinen, die über den Typ-V-Sekretionsmechanismus befördert werden und ins extrazelluläre Milieu proteolytisch abgespaltet werden, verbleibt EstA auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa* exponiert. Die genaue *in vivo*-Funktion der Esterase EstA ist derzeit noch ungeklärt. Alle bisher beschriebenen Autotransporterproteine werden mit der Virulenz der Organismen assoziiert (Henderson and Nataro, 2001). Bei EstA handelt es sich wahrscheinlich auch um einen Virulenzfaktor. Ein *estA*-defizienter Stamm von *P. aeruginosa* synthetisiert kein Rhamnolipid mehr und hat die Fähigkeit verloren, sich durch die drei möglichen Bewegungsformen Schwimmen, Schwärmen und *Twitchen* fortzubewegen (Wilhelm *et al.*, 2007). Bekanntlich hängt die Bewegungsfähigkeit der Bakterienzellen mit der Rhamnolipidproduktion zusammen (Heurlier *et al.*, 2004). Der Mobilitätsverlust eines *estA*-defizienten Stammes resultiert in Veränderungen bei der Biofilmbildung. Nach der Adhäsion der Bakterienzellen kommt es nur zu einer Mikrokolonienbildung, sodass eine Oberflächendeckung ausbleibt (Wilhelm *et al.*, 2007). Ferner zeigte die Esterase EstA neben dem esterolytischen Charakter einer GDSL-Hydrolase noch Aktivität einer Phospholipase B (Gdynia, 2006).

In *P. putida*, einem avirulenten Bakterium, konnte ein offener Leserahmen in der *trpE-trpG*-Region mit Homologien zum Gen von EstA identifiziert werden (Essar *et al.*, 1990). Dementsprechend wurde anhand von Homologievergleichen im Genom von *P. putida* KT2440 die Esterase EstP identifiziert, die der offenen Leserahmen PP0418 kodiert. EstP besitzt eine Identität von 57 % und eine Ähnlichkeit von 67 % gegenüber der Esterase EstA aus *P. aeruginosa*. Anhand der charakteristischen Merkmale konnte EstP der Familie der GDSL-Hydrolasen und den Autotransporterproteinen zugeordnet werden (Schell, 2005).

1.7 Oberflächenpräsentation in Gram-negativen Bakterien: Autodisplay

Durch Oberflächendisplaysysteme ist es möglich, heterologe Peptide oder Proteine auf der bakteriellen Zelloberfläche zu präsentieren, indem die Membranproteine nach genetischer Fusion den Transport und die Exposition auf der Wirtszelle vermitteln. Seit der Entwicklung des ersten bakteriellen Oberflächendisplaysystems für heterologe Proteine Mitte der 80er Jahre (Freudl *et al.*, 1986) wurden zahlreiche Systeme entwickelt, deren biotechnologische und industrielle Anwendungsspektren sich immer mehr ausbreiten (Lee *et al.*, 2003; Wernerus and Stahl, 2004). Im Gegensatz zu Displaysystemen, die auf Phagen basieren, bringt die bakterielle Präsentation einige Vorteile mit sich. Die Bakterienzellen sind selbstreplikativ und benötigen somit keinen Wirt zur Vermehrung wie Phagen. Die Größe des heterologen Passagierproteins ist kein limitierender Faktor, und die Zellen sind groß genug, sodass sie durch optische Methoden wie Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie für das Hochdurchsatz-*Screening* untersucht werden können. Die freie Zugänglichkeit der präsentierten Enzyme an der Oberfläche für die entsprechenden Substrate liefert einen entscheidenden Vorteil, da ganze Zellen für Sekretions- und Aktivitätsstudien in einem definierten Medium eingesetzt werden können. Ferner leistet die Membran einen stabilisierenden Effekt und gewährleistet eher eine funktionelle, native Konformation der Enzyme als freie, eventuell sogar gefaltete Moleküle (Bessette *et al.*, 2005; Daugherty *et al.*, 2000; Davey and Kell, 1996; Jose and Zangen, 2005). In Gram-negativen Bakterien existieren derzeit unterschiedliche Strategien zur Oberflächenpräsentation für heterologe Proteine (Lee *et al.*, 2003), wovon das Displaysystem, basierend auf dem Transportmechanismus monomerer Autotransporterproteine, auch Autodisplay genannt, am besten etabliert ist.

Anfangs wurde nur das Displaysystem, das auf dem Autotransporter AIDA-I aus *E. coli* basiert, als Autodisplay bezeichnet (Jose and Meyer, 2007; Maurer *et al.*, 1997).

Die Effizienz der Oberflächenpräsentation durch Autodisplaysysteme unterscheidet sich bei diversen heterologen Proteinen signifikant (Becker *et al.*, 2005; Lattemann *et al.*, 2000), da die Funktion von mehreren Faktoren abhängig ist. Beispielsweise können Cysteine eines Proteins, die untereinander Disulfidbrücken bilden, den Transport über die äußere Membran behindern (Jose *et al.*, 1996; Klauser *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1995). Ferner kann eine periplasmatische Faltung vieler Proteine die Translokation durch Autotransporterdomänen beeinträchtigen (Jong *et al.*, 2007; Rutherford *et al.*, 2006). Folglich konnte Aprotinin, ein Protein, das schnell die native Konformation einnimmt und deren Struktur durch

Disulfidbrücken stabilisiert wird, erst in einem *dsbA*-negativen-Expressionssystem von dem Autotransporter AIDA über die äußere Membran transportiert werden (Jose *et al.*, 2005).

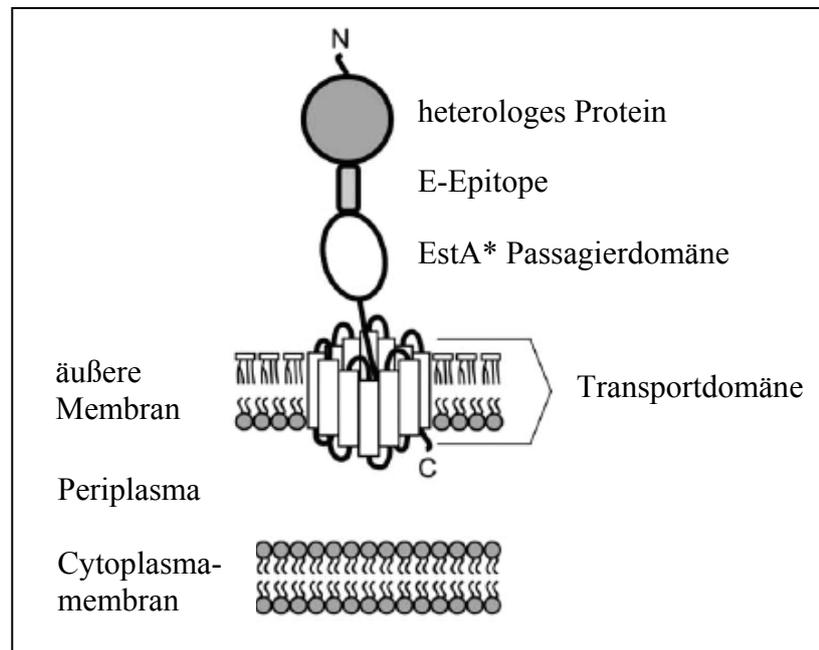


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Autotransporterproteins EstA, konstruiert als Oberflächen-display für heterologe Passagierproteine. EstA wurde durch einen Aminosäureaustausch inaktiviert (EstA* = S38A). Das Protein besitzt eine in der äußeren Membran verankerte Transportdomäne, die eine Pore für die Translokation der Passagierdomäne auf die Zelloberfläche bildet. Eine E-Epitop-Sequenz (GAPVPYPDPLEPR) wurde zwischen die extrazelluläre Domäne und das Passagierprotein inseriert (Becker *et al.*, 2005).

Für die Präsentation heterologer, lipolytischer Enzyme auf der Zelloberfläche von *E. coli* wurde ein Displaysystem entwickelt, das auf dem Transportmechanismus der inaktivierten Esterase EstA aus *P. aeruginosa* basiert. Durch die Signalsequenz der alkalischen Phosphatase (PhoA) wurde ein effizienter Export über die Cytoplasmamembran gewährleistet. Die Insertion eines E-Epitops zwischen der homologen Passagierdomäne und dem heterologen Protein erleichtert eine immunologische Oberflächendetektion (Becker *et al.*, 2005). Darauf aufbauend wurde ein neues Hochdurchsatz-Selektionsverfahren entwickelt, um neue enantioselektive, lipolytische Enzyme mit Hilfe der Durchflusszytometrie identifizieren und isolieren zu können. Die Selektion erfolgte durch eine Oberflächenmarkierung, die das Resultat einer Substrathydrolyse des präsentierten Enzyms war (Becker *et al.*, 2004). Durch Einsatz dieses Verfahrens konnten mehrere enantioselektivere Varianten der Esterase EstA aus *P. aeruginosa* selektiert werden, die eine erhöhte Präferenz gegenüber dem *R*-Enantiomer des Substrats 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenylester zeigten. Durch Sequenzanalysen konnten die Veränderungen der Enantioselektivitäten auf eine entscheidende Aminosäure zurückgeführt werden (Becker *et al.*, 2008).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Esterase EstA aus *P. aeruginosa* ist ein Autotransporterprotein, dessen katalytisch aktive Passagierdomäne nach dem Transport auf der Zelloberfläche exponiert bleibt. Eine α -Helix, die N-terminal an die Transportdomäne angrenzt und Einfluss auf den Membrantransport nimmt, konnte bereits bei einigen Autotransporterproteinen identifiziert werden (Velarde and Nataro, 2004). Anhand von Sequenzanalysen der Esterase EstA sollten ähnliche strukturelle Motive identifiziert werden und gegebenenfalls sollte der Einfluss einer putativen α -Helix auf den Transport und die Proteinkonformation untersucht werden.

Die Esterase EstA besitzt ein Cysteinpaar, das ein charakteristisches Merkmal vieler Autotransporterproteine darstellt. Die Bedeutung dieses Cysteinpaares, das möglicherweise eine Disulfidbrücke ausbildet, ist noch unbekannt. Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Cysteine hinsichtlich der Sekretion, Aktivität und *in vitro*-Faltung.

Die *in vivo*-Funktion der Esterase EstA ist derzeit noch ungeklärt. Da EstA bei der Rhamnolipidproduktion, Zellbeweglichkeit und folglich auch der Biofilmbildung involviert ist, besteht vermutlich ein Zusammenhang mit der Virulenz von *P. aeruginosa* (Wilhelm *et al.*, 2007). Im Genom des biologisch sicheren Stammes *P. putida* KT2440 konnte anhand von Homologievergleichen die Esterase EstP identifiziert werden. Folglich war es von besonderem Interesse, die Esterase EstP näher zu charakterisieren und die physiologische Funktion eines Autotransporterproteins in einem avirulenten Stamm zu untersuchen.

Da durch enzymatische Optimierung den Esterasen immer mehr biotechnologisches Interesse zugesprochen wird (Bornscheuer, 2002b), sollten Struktur-Funktion-Beziehungen von EstP hinsichtlich der Hydrolyse von enantiomeren Verbindungen untersucht werden. Im Fokus stand die Etablierung eines effizienten Expressions- und Reinigungsverfahrens, damit ausreichende Proteinmengen der katalytisch aktiven N-terminalen Domäne von EstP bis zur Homogenität gereinigt werden konnten, um Kristallisationsexperimente zu ermöglichen.

Die Autotransporterproteine EstA und EstP verbleiben auf der Zelloberfläche und werden nach dem Transport nicht proteolytisch abgespaltet. Bislang gibt es keine Strukturdaten, womit mögliche molekulare Interaktionen zwischen der Passagier- und der Transportdomäne erklärt werden könnten. In dieser Arbeit sollten Chimäre zwischen beiden Autotransporterproteinen konstruiert und analysiert werden, um experimentelle Hinweise auf mögliche Struktur-Funktions-Beziehungen zu erzielen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden in p.A.-Qualität bei folgenden Firmen bezogen:

Antibiotika: Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen).

Chemikalien: Biomol (Hamburg), Fluka (Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg).

Enzyme: Restriktionsenzyme kamen von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach). Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym von Sigma (Deisenhofen), T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A und T4-DNA-Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), *Turbo Pfu*-DNA-Polymerase von Stratagene (Heidelberg), *Triple Master* DNA-Polymerase von Eppendorf (Hamburg).

Medienkomponenten: Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), Oxoid (Wesel).

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstämme	Genotyp	Bezugsquelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
<i>Escherichia coli</i> JM109	(F' <i>traD36 lacI</i> Δ <i>lacZ</i> (M15) + + <i>proA B</i>) <i>mcrA</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>thi-1 gyrA96 endA1 hsdR17</i> <i>relA1 supE44 recA1</i>	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dem</i> (λ <i>Its857 indI Sam7 nin5</i> <i>lavUV5-T7gene1</i>)	(Studier and Moffatt, 1986)
<i>Escherichia coli</i> S17.1	Ec294:: [RP4- 2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] Tp ^r , Sm ^r , <i>tra</i> ⁺ <i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>res</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	(Holloway <i>et al.</i> , 1979) D. Haas, Lausanne, CH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PASCHI	PAO1, Δ <i>estA</i> :: Ω Sm ^r /Sp ^r	(Schäfer, 1998)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAML1	Δ <i>dsb</i> :: Ω Sm ^r /Sp ^r	(Leipelt, 1997)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PATE1	Δ <i>dsbC</i> :: Ω Sm ^r /Sp ^r	(Eggert, 1998)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAAU1	Δ <i>dsbA</i> ::Gm ^r Δ <i>dsbC</i> :: Ω Sm ^r /Sp ^r	(Urban, 2000)

Fortsetzung Tab. 2.1:

Bakterienstämme	Genotyp	Bezugsquelle/Referenz
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAAU1	$\Delta dsbA::Gm^r \Delta dsbC::\Omega Sm^r/Sp^r$	(Urban, 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	(Holloway <i>et al.</i> , 1979) D. Haas, Lausanne, CH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PASCHI	PAO1, $\Delta estA::\Omega Sm^r/Sp^r$	(Schäfer, 1998)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Wildtyp	(Nelson <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pseudomonas putida</i> KT0418	KT2440, $\Delta estP::\Omega Gm^r$	diese Arbeit

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Vektoren.

Vektor für <i>E. coli</i>	Genotyp	Quelle/Referenz
pET22b+	ColE1 $P_{T7\Phi 10}$ <i>pelB</i> Ap^r C-His ₆ - ⁺ , Tag ⁶ <i>lacI^q</i>	Novagen, Madison, USA
pEST100	Cm^R P_{lac} <i>phoA</i> <i>estA</i> mit AS-Austausch S38A	(Becker <i>et al.</i> , 2005)
Vektoren mit weitem Wirtsbereich	Genotyp	Quelle/Referenz
pBBR1MCS	Cm^r <i>mob lacZα</i> P_{lac} P_{T7}	(Kovach <i>et al.</i> , 1994)
pTZ110	Ap^r , promotorloses <i>lacZ</i> -Gen	(Schweizer and Chuanchuen, 2001)
pSUP202	ColE1 <i>mob</i> Ap^r Cm^r Tc^r	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
pBSL142	Ap^r , Gm^r , ColE1	(Alexeyev <i>et al.</i> , 1995)
rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle/Referenz
pTZP	700 bp-Fragment aus pBBREstP in pTZ110 (<i>estP::lacZ</i> -Fusion)	diese Arbeit
pBBREstP	3,125 kb- <i>XhoI/BamHI</i> Fragment mit <i>estP</i> in pBBR1MCS P_{lac} -Ktr.	Schell, 2005
pBBR Δ EstP _{Gm}	1,7 kb <i>SmaI/PstI</i> -Fragment (Gm^r) aus pBSL142 in pBBREstP	diese Arbeit
pSUP Δ EstP _{Gm}	4 kb <i>AgeI/SphI</i> -Fragment aus pBBR Δ EstP _{Gm} in pSUP202	diese Arbeit
pBBX+	3,3 kb <i>XhoI</i> -Fragment mit <i>estA</i> in pBBR1MCS P_{lac} -Ktr.	(Wilhelm, 2001)
pBBXC258S	pBBX+ <i>estA</i> mit AS-Austausch C258S	diese Arbeit
pBBXC264S	pBBX+ <i>estA</i> mit AS-Austausch C264S	diese Arbeit
pBBXCDM	pBBX+ <i>estA</i> mit AS-Austausch C258S und C264S	diese Arbeit
pBBX1 <i>NheI</i>	pBBX+ <i>estA</i> mit <i>NheI</i> -Insertion nach Position L306	diese Arbeit
pBBX2 <i>NheI</i>	pBBX+ <i>estA</i> mit <i>NheI</i> -Insertion nach Position N340	diese Arbeit
pBBX <i>NheI</i> ₂	pBBX+ <i>estA</i> mit <i>NheI</i> -Insertion nach Position L306 und N340	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 2.2.

rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle/Referenz
pBBX1 <i>NheI</i>	pBBX+ <i>estA</i> mit <i>NheI</i> -Insertion nach Position L306	diese Arbeit
pBBX2 <i>NheI</i>	pBBX+ <i>estA</i> mit <i>NheI</i> -Insertion nach Position N340	diese Arbeit
pBBX <i>NheI</i> ₂	pBBX+ <i>estA</i> mit <i>NheI</i> -Insertion nach Position L306 und N340	diese Arbeit
pBBXΔH _{Gm} <i>NheI</i> ₂	pBBX+ mit <i>NheI</i> -Insertion nach Position L306 und N340, <i>estA</i> ΔAS309-340, Gm ^r	diese Arbeit
pBBX <i>NheI</i>	pBBX+ <i>estA</i> mit AS-Austausch S307A, A308S zur <i>NheI</i> -Insertion	diese Arbeit
pBBP <i>NheI</i>	pBBREstP <i>estP</i> mit AS-Austausch A296S zur <i>NheI</i> -Insertion	diese Arbeit
pBBP _N AC	pBBREstP <i>estP</i> mit AS-Austausch zur <i>NheI</i> -Insertion, N-Terminus von <i>estP</i> fusioniert mit C-Terminus von <i>estA</i>	diese Arbeit
pBBA _N PC	pBBX+ mit AS-Austausch zur <i>NheI</i> -Insertion, N-Terminus von <i>estA</i> fusioniert mit C-Terminus von <i>estP</i>	diese Arbeit
pETE <i>estA</i>	1,9 kb <i>NdeI/XhoI</i> -Fragment mit <i>estA</i> in pET22b+	diese Arbeit
pETE <i>estA</i> <i>NheI</i> ₂	pETE <i>estA</i> mit <i>NheI</i> -Insertion nach Position L306 und N340	diese Arbeit
pETE <i>estA</i> ΔH	pETE <i>estA</i> <i>NheI</i> ₂ <i>estA</i> Δ AS309-340	diese Arbeit
pETE <i>estA</i> C258S	pETE <i>estA</i> <i>estA</i> mit AS-Austausch C258S	diese Arbeit
pETE <i>estA</i> C264S	pETE <i>estA</i> <i>estA</i> mit AS-Austausch C264S	diese Arbeit
pETE <i>estA</i> CDM	pETE <i>estA</i> <i>estA</i> mit AS-Austausch C258S und C264S	diese Arbeit
pETE <i>estP</i>	1,89 kb <i>NdeI/XhoI</i> -Fragment mit <i>estP</i> in pET22b+	Schell, 2005
pETE <i>estP</i> W173R	pETE <i>estP</i> <i>estP</i> mit AS-Austausch W173R	diese Arbeit
pETE <i>estP</i> _{N-His6}	pET22b+ <i>estP</i> N-Terminus ohne SS G24-L317, C-terminale His ₆ -Fusion	diese Arbeit
pETE <i>estP</i> _N W173R	pETE <i>estP</i> _N mit AS-Austausch W173R	diese Arbeit
pETE <i>estP</i> _{N-His6}	pET22b+ <i>estP</i> N-Terminus ohne SS G24-L317, C-terminale His ₆ -Fusion	diese Arbeit
pETE <i>estP</i> _{N-His6} W173R	pETE <i>estP</i> _{N-His6} mit AS-Austausch W173R	diese Arbeit
pETA _N PC	1,9 kb <i>NdeI/XhoI</i> -Fragment mit <i>estA</i> _N <i>estP</i> _C in pET22b+	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 2.2:

rekombinante Plasmide	Genotyp	Quelle/Referenz
pETP _{NAc}	1,9 kb <i>NdeI/XhoI</i> -Fragment mit <i>estP_{NestAc}</i> in pET22b+	diese Arbeit
pEstA	Cm ^R P _{lac} , <i>phoA</i> , <i>E-tag</i> , <i>estA</i>	diese Arbeit
pEstP	Cm ^R P _{lac} , <i>phoA</i> , <i>E-tag</i> , <i>estP</i>	diese Arbeit
pEstA _{NPc}	Cm ^R P _{lac} , <i>phoA</i> , <i>E-tag</i> , <i>estA_{NestPc}</i>	diese Arbeit
pEstP _{NAc}	Cm ^R P _{lac} , <i>phoA</i> , <i>E-tag</i> , <i>estP_{NestAc}</i>	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Tab. 2.3 : Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Merkmal
<i>estA</i> up	cca ggg cct ggg tgc cga c	-
<i>estA</i> down	ggc gaa cag ctg ggt atc gct g	-
pEST <i>XbaI</i> up	aa <u>tct aga</u> cca ata cgc aaa ccg	<i>XbaI</i> -Schnittstelle
<i>estAC258</i> up	ctg atc ggc acc <u>tcg</u> ttc agc ggc aac g	AS-Austausch C258S
<i>estAC258</i> down	ggt gcc gct gaa <u>cga</u> ggt gcc gat cag	AS-Austausch C258S
<i>estAC264</i> up	ggc aac ggc <u>agc</u> acc atg aac ccg ac	AS-Austausch C264S
<i>estAC264</i> down	ggt cat ggt <u>gct</u> gcc gtt gcc gct g	AS-Austausch C264S
<i>estA</i> 1. <i>NheI</i> up	tcg ctg ctg <u>gct agc</u> tcg gcg ccc tg	<i>NheI</i> -Schnittstelle
<i>estA</i> 1. <i>NheI</i> down	a ggg cgc cga <u>gct agc</u> cag cag cga a	<i>NheI</i> -Schnittstelle
<i>estA</i> 2. <i>NheI</i> up	gac tgg gag aac <u>gct agc</u> tgg cag aac gtc	<i>NheI</i> -Schnittstelle
<i>estA</i> 2. <i>NheI</i> down	gac ctt ctg cca <u>gct agc</u> gtt ctc cca gtc	<i>NheI</i> -Schnittstelle
<i>estA</i> <i>NheI</i> up	cgc <u>tgc tag</u> cgg cgc cct ggg	<i>NheI</i> -Schnittstelle
<i>estP</i> <i>NheI</i> up	cga <u>tgc tag</u> cgg ccc cct ggg aac	<i>NheI</i> -Schnittstelle
<i>estP</i> <i>NheI</i> down	ggg ccg <u>cta gca</u> tcg agt agg cgt a	<i>NheI</i> -Schnittstelle
<i>estA</i> <i>NdeI</i> Up	ata <u>cat atg</u> atc aga atg gcg ctc aag	<i>NdeI</i> -Schnittstelle
<i>estA</i> <i>XhoI</i> down	aaa <u>ctc gag</u> tca gaa gtc cag g	<i>XhoI</i> -Schnittstelle
<i>estPNdeI</i> up	gg gaa ttc <u>cat atg</u> cga aaa gcc ccg	<i>NdeI</i> -Schnittstelle
<i>estP</i> ohne SS <i>NdeI</i>	aaa <u>aca tat</u> ggg ccc ttc gcc cta ttc	<i>NdeI</i> -Schnittstelle
<i>estP_N</i> down	atc acc <u>gag ctc</u> tta <u>ctc gag</u> gag gat cga gta g	<i>SacI/XhoI</i> -Schnittstelle Stopp-Kodon
<i>estP</i> <i>XhoI</i> down	ggc ggc <u>ctc gag</u> tca gaa gtc cac	<i>XhoI</i> -Schnittstelle
<i>estP</i> W173R up	c tac atc atg gtc <u>cgc</u> ctg cta cct gac	AS-Austausch W173R
<i>estP</i> W173R down	gtc agg tag cag <u>gcg</u> gac cat gat gta g	AS-Austausch W173R
<i>PestP</i> <i>XhoI</i> up	aaa <u>ctc gag</u> aac acg ccc agg tc	<i>XhoI</i> -Schnittstelle
<i>PestP</i> <i>BamHI</i> down	aaa <u>gga tcc</u> tct ttg ttt tta tca ggg c	<i>BamHI</i> -Schnittstelle
<i>phoA</i> up	gaa aca gct atg aaa caa agc act att gc	-
<i>e-tag:estA</i> up	gcc <u>ggt acc</u> gta tcc aga tcc gct gga acc gcg tgc cgc ttc tgc tcc ttc gcc cta ttc gac	<i>KpnI</i> -Schnittstelle
<i>e-tag:estA</i> up	cgg <u>ggg ccc</u> tgg gtg cgc cgg tac cgt atc cag atc cgc tgg aac cgc gtg ccg ctt ctc ctt cgc cct att caa ccc	<i>ApaI</i> -Schnittstelle
<i>pest</i> <i>SfiI</i> up	ctc <u>ggc cca gcc ggc</u> cct ggg tgc gcc ggtacc g	<i>SfiI</i> -Schnittstelle
<i>estP</i> <i>XbaI</i> down	taa <u>tct aga</u> tca gaa gtc cac gct aac	<i>XbaI</i> -Schnittstelle
<i>estA</i> <i>XbaI</i> down	taa <u>tct aga</u> gtc aga agt cca ggc tca g	<i>XbaI</i> -Schnittstelle
<i>estP</i> <i>XhoI</i> up	ccg ccg <u>ctc gag</u> tcg ttg agg aag	<i>XhoI</i> -Schnittstelle

Fortsetzung Tab. 2.3.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Merkmal
<i>estP</i> BamHI down	gc gcg gga tcc aat tgc cat tcg	BamHI-Schnittstelle
Gm down	tag gtg gcg gta ctt ggg	-
Oligonukleotide für RT-PCR		
<i>P.p. estP</i> up	tac ggg atc aac ggc aca ac	RT-PCR
<i>P.p. estP</i> down	atc gag tag gcg taa tcg gc	RT-PCR
<i>P.p. rpoD</i> up	aat ggg tac tgt cga gct gc	RT-PCR
<i>P.p. rpoD</i> down	gcc cat gac ttc acg aat gc	RT-PCR
<i>estP</i> XbaI down	taa tct aga tca gaa gtc cac gct aac	XbaI-Schnittstelle
<i>estA</i> XbaI down	taa tct aga gtc aga agt cca ggc tca g	XbaI-Schnittstelle
Gm down	tag gtg gcg gta ctt ggg	-

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Thermo Scientific (Dreieich) oder MWGBiotech (Ebersberg) in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form bezogen. Die DNA wurde jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen, sodass sie in einer Konzentration von 100 pmol/μL vorlagen.

2.4 Nährmedien

Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l Trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefeextrakt

M9-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Lösung 1: 40 g/l Glucose

Lösung 2: 25 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

Lösung 3: 2 g/l CaCl₂ x 2 H₂O

Lösung 4: 70 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 30 g/l KH₂PO₄; 5 g/l NaCl; 10 g/l NH₄Cl

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und in folgendem Verhältnis eingesetzt:

10 % (v/v) Lösung 1; 1 % (v/v) Lösung 2; 1 % (v/v) Lösung 3; 10 % (v/v) Lösung 4

Autoinduktionsmedium (Studier, 2005)

KPi 100 mM, pH 7,0: 10,66 g/l K₂HPO₄; 5,28 g/l KH₂PO₄

TB-Medium: 24 g/l Hefeextrakt; 12 g/l Caseinhydrolysat; 5 g/l Glycerin

in Kpi 100 mM, pH 7,0 lösen

Autoinduktionsmedium: TB-Medium; 0,05 % Glukose; 0,2 % Laktose

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben.

Sterilisation

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Medien und Puffer für 20 Minuten bei 120 °C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert und gegebenenfalls bei einer Temperatur ≤ 60 °C Antibiotika zugesetzt. Temperaturempfindliche Substanzen wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser des Filters: 0.2 μm) und Glaswaren mindestens 3 Stunden bei 180 °C hitzesterilisiert.

Plattentests zur Beweglichkeit von Pseudomonaden:

Schwimmen: M9-Minimalagarplatten mit 0,3 % (w/v) Agar.

Schwärmen: M9-Minimalagarplatten mit 0,5 % (w/v) Agar ohne NH₄Cl in Lösung 4. Als einzige Stickstoffquelle wurde stattdessen 0,05 % (w/v) Glutamat zugesetzt.

Twisting motility: LB-Agarplatten (1,5 % (w/v) Agar). Einzelkolonien wurden mit Zahnstochern durch den Agar bis zum Grund der Petrischale gestochen.

Für den qualitativen Nachweis von Enzymen wurden folgende Indikatorplatten verwendet:

α -Komplementations-Agar (Sambrook *et al.*, 1989)

1 ml 100 mM IPTG in 70 % (v/v) Ethanol; 3 ml 2 % (w/v) X-Gal in DMF; 300 ml LB-Agar

2.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Kulturen von *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden, soweit nicht anders angegeben, in LB-Medium bei 37 °C angezogen. *P. putida* wurde bei 30 °C in LB-Medium kultiviert. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina in Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH) bei 150 UpM kultiviert, wobei das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10 entsprach. Bakterienstämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tabelle 2.4) kultiviert. Als Übernachtskulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine O.D.580 nm = 0,05 beimpft. Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

Tab. 2.4: Konzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika [μ g/ml].

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicillin (Ap)	100	-	-
Carbenicillin (Cb)	-	600	600
Chloramphenicol (Cm)	50	100	300
Spectinomycin (Sp)	-	-	100
Streptomycin (Sm)	-	-	100
Gentamycin (Gm)	-	25	30
Tetracyclin (Tet)	50	100	100
Irgasan (Irg)	-	25	25

2.6 Optische Dichte im Photometer

Die Zelldichte einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (O.D.) bei 580 nm bestimmt. Eine O.D. 580 nm = 1 entspricht dabei ungefähr einer Zellzahl von 1×10^9 Zellen pro ml.

2.7 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, *P. putida* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979) oder durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firmen Invitex (Berlin) und Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben. Chromosomale DNA aus Zellen von *P. putida* und *P. aeruginosa* wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Zur Isolierung von mRNA wurde das RNeasy-Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

2.8 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA- und RNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese oder photometrisch mit dem Photometer der Firma Eppendorf (Hamburg) bei einer Wellenlänge $\lambda = 260$ nm bestimmt. Zur Kontrolle auf Proteinverunreinigung erfolgte eine Messung bei $\lambda = 280$ nm. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm wurde dabei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dsDNA bzw. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ssDNA oder RNA gleichgesetzt. Die Reinheit der DNA-Lösung ergab sich aus dem Quotienten zwischen E260 und E280 ($E260/E280 > 1.8$ für reine DNA).

2.9 Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA erfolgte ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA, die durch reverse Transkription mit den in Tabelle 2.3 angegebenen spezifischen Oligonukleotiden und mit Hilfe reverser Transkriptase (OmniScript™ Reverse Transcriptase; Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben wurde. Die RNA wurde vor der Synthese 5 min bei 65 °C inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der vorbereitete Mastermix aus Reaktionspuffer, Nukleotiden und Enzym dazugegeben. Die Synthese erfolgte für 1 h bei 37 °C. Die synthetisierte cDNA wurde nach DNase-Behandlung nach Angaben des Herstellers (RQ1 DNase; Promega, Mannheim) ohne weitere Aufreinigung als Matrize in eine RT-PCR eingesetzt.

2.10 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA und RNA sowie der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Sambrook in 0,5 - 2 %-igen (w/v) Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989).

Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 × TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA, pH 8,3) verwendet. Als Größenstandard für die DNA-Gele wurde die „1kb-ladder“ oder „100 bp-ladder“ der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep® Gel cleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

2.11 *In vitro*-Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA-Fragmenten wurde nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) sowie nach den Angaben der Hersteller der jeweiligen Enzyme in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.12 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen sowie die Transformation von Plasmid-DNA wurden nach Hanahan durchgeführt (Hanahan, 1983).

2.13 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. putida* oder *P. aeruginosa* durch diparentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 ml einer ÜK des plasmidhaltigen Donorstamms *E. coli* S17-1 mit 1 ml Zellen des jeweiligen Rezipientenstammes von *P. putida* oder *P. aeruginosa* gemischt und durch Zentrifugation (3 min; 5.000 g; RT) sedimentiert. Die Zellen von *P. aeruginosa* wurden zuvor mindestens 1 h bei 43 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden auf einen Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm der Firma Schleicher & Schüll gegeben, der sich auf einer zuvor getrockneten LB-Agarplatte befand. Die Inkubation erfolgte mindestens 4 h bei 30 °C im Fall von *P. putida* und bei 37 °C bei *P. aeruginosa*. Danach wurden die Zellen von dem Filter mit 1 ml LB-Medium gewaschen und in Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁶ auf Selektivagar ausplattiert. Zur Kontraselektion des Donorstamms enthielt der Selektivagar zusätzlich 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, CH).

2.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.14.1 Standard-PCR

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki durchgeführt (Saiki *et al.*, 1988).

Es wurden standardmäßig PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 ng Plasmid- oder 10 ng genomische DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Triple-Master* Polymerase der Firma Eppendorf (Hamburg) oder *Turbo Pfu*-DNA-Polymerase der Firma Stratagene (Heidelberg) im entsprechendem Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: 1 × (5 min, 98 °C); 40 × (50 s, 98 °C; 50 s, 55 – 65 °C je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5 - 3 min, 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments); 1 × (10 min, 72 °C). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „NucleoSpin Extract“-Kits der Firma Macherey & Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers.

Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.14.2 Ortsspezifische Mutagenese

Die Einführung von zielgerichteten Basenaustauschen wurde mittels *overlap extension*-PCR durchgeführt (Ho *et al.*, 1989), wobei bei Austausch eines Kodons nach Gupta und Ghosh auf die Verwendung eines häufig benutzten Triplets geachtet wurde (Gupta and Ghosh, 2001). Für die PCR-Reaktionen wurde die *TripleMaster* DNA-Polymerase der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. In den ersten PCR-Reaktionen wurde durch flankierende Oligonukleotide und Oligonukleotide, die an der zu mutagenisierenden Sequenz binden und die gewünschten Austausche tragen, mutagenisierte Genfragmente erstellt. Hierbei wurden die mutagenisierenden Oligonukleotide so gewählt, dass sich die PCR-Produkte in ihrer Sequenz überschneiden. Anschließend wurden die erstellten Genfragmente zusammen mit den flankierenden Oligonukleotiden in einer weiteren PCR-Reaktion eingesetzt. Die flankierenden Oligonukleotide amplifizierten jeweils die Einzelstränge der Genfragmente, die durch ihre Überlappung miteinander hybridisierten und durch die DNA-Polymerase aufgefüllt wurden, sodass als PCR-Produkt das mutagenisierte Gen entstand.

2.14.3 RealTime-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem Mastercycler[®] ep *realplex* (Firma Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Als Reagenzien dienten die Bestandteile des „Quantitect SYBR Green I“-Kit (Qiagen, Hilden). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNA und hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 521 nm. Bei der Messung erfolgte eine Anregung der in Eppendorf[®] twintec PCR-Platten vorliegenden Proben bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 530 nm. In Tabelle 2.5 ist der Ablauf der RT-PCR sowie der Schmelzkurve aufgelistet. Die Auswertung der RT-PCR wurde mit Hilfe der Software „realplex 1.0 (2005)“ der Firma Eppendorf durchgeführt.

Tab. 2.5: Ablauf der RT-PCR. Nach Vorinkubation erfolgt die Amplifikation/Extinktion in 30 Zyklen. Das Produkt wird daraufhin durch eine Schmelzkurve analysiert.

Programm	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	Fluoreszenz-Detektion
Vorinkubation		95 °C	2 min	1	-
Amplifikation	Denaturierung	94 °C	15 s	30	-
	Annealing	55 °C	30 s		-
	Synthese/ Extinktion	68 °C	30 °C		einfach
Schmelzkurve	Denaturierung	94 °C	15 s	1	-
	Annealing	60 °C 95 °C	15 s		-
	Aufschmelzen der DNA	Temperatur- Erhöhung = 0,1 °C/s	20 min		kontinuierlich
Kühlung		4 °C	∞		-

2.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) oder MWGBiotech (Ebersberg) durchgeführt.

2.16 Konstruktion eines *estP*-defizienten Stammes von *P. putida* KT2440

Zur Überprüfung des *estP*-negativen Phänotyps von *P. putida* KT2440 wurde eine Mutante mit Hilfe des Suizidvektors pSUP202 erzeugt, bei der das *estP*-Gen deletiert und gegen eine Gentamycin-Resistenzkassette (Gm^r) austauscht wurde. Zunächst wurde durch *SmaI/PstI*-Hydrolyse des Vektors pBBREstP das *estP*-Gen deletiert und durch die Gentamycin-Kassette, die zuvor aus dem Plasmid pBSL142 isoliert wurde, durch anschließende Ligation ausgetauscht. Anschließend wurde der resultierende Vektor pBBR Δ EstP $_{Gm}$, der zwischen dem stromaufwärts- und dem stromabwärts-Bereich des *estP*-Gens eine Gm^r -Kassette kodiert, durch *PvuII/NcoI*-Hydrolyse in den Zielvektor pSUP202 kloniert. Die schematische Darstellung der Konstruktion des Mutagenesevektors pSUP Δ EstP $_{Gm}$ ist im Anhang (Abbildung 7.1) dargestellt. Nach der Transformation des *E. coli*-Stammes S17-1 mit dem Mutagenesevektor wurde dieser durch di-parentale Konjugation (2.13) in Zellen von *P. putida* KT2440 eingebracht. Die Transkonjuganden, die auf Selektivagarplatten mit den Antibiotika Gm , Tet und dem zur Gegenselektion verwendeten Detergenz Irgasan wachsen konnten, enthielten den Mutagenesevektor, integriert im Genom, durch homologe Rekombination, da dieser als pSUP202-Derivat in *P. putida* nicht replizieren kann. Für das zweite Rekombinationsereignis, das im Verlust des Vektoranteils aus dem Genom resultierte, wurden die Transkonjuganden in 5 ml LB-Medium mit Gm kultiviert und mehrmals überimpft. Die Bakteriensuspension wurde in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-4} auf LB-Agarplatten mit Gm ausplattiert. Durch paralleles Überimpfen von Einzelkolonien auf Selektivagar mit und ohne Tet wurden die erhaltenen Klone auf den Verlust des pSUP202-Vektoranteils hin untersucht. Die Bestätigung des entstandenen *estP*-defizienten Stammes KT0418 erfolgte, wie in Abbildung 3.22 dargestellt, durch PCR (2.14), RT-PCR (2.18) und immunologischen Nachweis (2.28).

2.17 Gewinnung von Kulturüberständen und Gesamtzellextrakten (GZE)

Um die Expression plasmidcodierter Proteine in *E. coli*, *P. putida* und *P. aeruginosa* nachzuweisen und den zeitlichen Verlauf zu analysieren, wurden Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte (GZE) hergestellt. Aus den Expressionskulturen wurden Proben entnommen und die Zelldichte über Messung der O.D. 580 nm bestimmt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 4.000 UpM, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und im Bedarfsfall sterilfiltriert (Schleicher und Schüll, NC45 Membranfilter, 0,45 μ m Porendurchmesser). Das Zellsediment wurde je nach weiterem Verwendungszweck entsprechend einer O.D. 580 nm = 15 in Tris-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0) aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 2 \times 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Die erhaltenen Proben wurden sofort verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.18 Herstellung von Sphäroblasten (Witholt *et al.*, 1976)

Es wurden Zellen einer ü.N. Kultur, die einer O.D. 580 nm = 5 entsprachen, geerntet (15 min, 6.000 UpM, 4 °C) und in 1 mL Puffer A (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 % (w/v) Saccharose) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 1 mL Puffer B (Puffer A + 5 mM EDTA) und 10 µl Lysozym (2 mg/mL) dazugegeben und für 30 min bei RT inkubiert.

2.19 Herstellung der Periplasma-, Cytoplasma- und Membranfraktion (Pedrotta and Witholt, 1999)

Die generierten Sphäroplasten (2.18) wurden für 20 min zentrifugiert (10.000 x g) und der Überstand als Periplasmafraktion weiter verwendet. Die sedimentierten Sphäroplasten wurden in 1 mL Puffer C (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM MgCl₂) resuspendiert und DNase (0,01 mg/mL) zugefügt. Die Sphäroplasten wurden durch Ultraschall aufgeschlossen (Branson-Sonifier W250, 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt) und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 3.500 x g, 4 °C) entfernt. Gesamtmembranfraktionen wurden durch Zentrifugation (1 h, 14.000 x g, RT) sedimentiert und der resultierende Überstand als Cytoplasmafraktion genutzt. Die Gesamtmembranen wurden in 20 µl Puffer D (100 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert.

2.20 Membranfraktionierung

Präparierte Gesamtmembranfraktionen (2.19) wurden mit 2 % (w/v) Laurylsarcosine gemischt und 20 min bei RT inkubiert, um die innere Membran selektiv zu solubilisieren. Anschließend wurde die innere Membran durch Zentrifugation (1 h, 13.000 UpM, RT) sedimentiert und der Überstand, der die innere Membran enthielt, abgenommen.

2.21 Löslichkeitsanalysen von Proteinen

Um festzustellen, ob Proteine in Lösung oder als Präzipitat vorlagen, wurden die zu untersuchenden Proben zentrifugiert (15 min, 13.000 UpM, RT). Der Überstand wurde vorsichtig von dem Sediment getrennt und die Proteinkonzentration beider Fraktionen durch eine SDS-PAGE (2.26) untersucht.

2.22 Reinigung von *inclusion bodies* der Esterasen

Die O.D. 580 nm der *inclusion bodies* enthaltenden Kultur wurde bestimmt und die Zellen sedimentiert (30 min, 13.000 UpM, 4 °C). Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen Zellaufschlusspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8; 5 mM EDTA) resuspendiert, sodass eine Zelldichte von O.D. 580 nm = 15 erreicht wurde, und aufgeschlossen (Branson-Sonifier W250, 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 13.000 UpM, 4 °C) wurde das Sediment, welches die gereinigten *inclusion bodies* enthielt, in entsprechendem Volumen Zellaufschlusspuffer aufgenommen. Die Ausbeute und der Erfolg der Reinigung wurden durch eine SDS-PAGE (2.26) analysiert.

2.23 *In vitro*-Faltung von Esterasen aus *inclusion bodies*

Die gereinigten *inclusion bodies* wurden in 8 M Harnstoff aufgenommen und durch Inkubation für 15 min bei RT vollständig denaturiert und anschließend zentrifugiert (1 min 13.000 UpM, RT), um die ungelösten Proteine zu sedimentieren. Daraufhin wurden der Überstand 1:10 im Rückfaltungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 M NaCl; 0,5 % N-Dodecyl-N,N-Dimethyl-1-Ammonio-3-Propansulphonat (SB-12)) verdünnt. Nach Inkubation für 3 h bei RT wurde der Ansatz einem Enzymaktivitätstest (2.35.1.1) unterzogen, um den Erfolg der *in vitro*-Faltung zu überprüfen.

2.24 Reinigung der Esterase EstP_N

2.24.1 Affinitätschromatographie mit Hilfe von Ni²⁺-NTA-Säulen

Nach erfolgreicher Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) in Autoinduktionsmedium-Medium (2.4) wurden die Zellen nach 16 h Stunden geerntet. Eine 20 %-ige Zellsuspension in 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 wurde mittels French Press (Thermo Electron Corporation; 40K Cell) mit 1.500 Psi in drei Durchgängen aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (30 min, 13.000 UpM, SS34, 4 °C) des GZE wurden die *inclusion bodies* sedimentiert und vom Überstand getrennt. Nach Denaturierung der *inclusion bodies* in Denaturierungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 8 M Harnstoff) erfolgte eine Ultrazentrifugation (1 h, 37.000 UpM, 4 °C). Der resultierende Überstand wurde auf die Ni²⁺-NTA-Säule gegeben. Die Chromatographie wurde mit einer Ni²⁺-NTA Superflow Säule (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Reinigung erfolgte bei einer Durchflussrate von 2 ml/min bei RT. Zunächst wurde die Säule mit einem 10-fachen Volumen der Säule mit Equilibrierungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl; 8 M Urea; 20 M Imidazol) equilibriert. Anschließend wurde die Proteinprobe unter denaturierenden Bedingungen auf die Säule gegeben und mit Equilibrierungspuffer gewaschen bis alle ungebundenen Proteine von der Säule gespült wurden. Unspezifisch an der Säule gebundene Proteine wurden mit mindestens sechs Säulenvolumen Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl; 8 M Urea; 50 mM Imidazol) von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte durch Waschen der Säule mit einem 6-fachen Säulenvolumen Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl; 8 M Urea; 250 mM Imidazol). Die Fraktionen, bei denen das Elutionsprofil Protein detektierte, wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, bei denen Proteine eluierten, wurden vereinigt und durch eine 1:10 Verdünnung mit Renaturierungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 mM EDTA) mindestens 24 h bei RT renaturiert. Danach erfolgte die Konzentrierung der Proteinlösungen mit Hilfe von Zentrifugationskonzentratoren (Vivaspin 20 ml bzw. 250 ml, VivaScience-Konzentrator, Sartorius Stedim Biotech, Frankreich) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa nach den Angaben des Herstellers in Ausschwingrotoren einer Kühlzentrifuge (5810 R, Eppendorf) bei 4.000 UpM, 4 °C. Zum Umpuffern wurden die konzentrierten Proben dreimal mit Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl) auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und erneut konzentriert.

2.24.2 Größenausschlusschromatographie (HPLC)

Zur Überprüfung des Reinheitsgrades und der Homogenität einer Proteinprobe durch Größenbestimmung diente eine Größenausschlusschromatographie mittels HPLC. Die HPLC wurde mit einer TOSOH TSK Gel G2000SWxL (Gelfiltrationssäule) durchgeführt. Nach Equilibrierung der Säule mit einem sechsfachen Säulenvolumen mit Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5), wurde die Säule mit unterschiedlichen Größenstandards kalibriert

(Tabelle 2.6), um eine Kalibriergerade erstellen zu können. Nach dem Auftragen der gereinigten Proteinproben wurde während der gesamten Chromatographie die Elution von Proteinen durch Messung der Absorption $\lambda = 280$ nm dokumentiert, damit die Retentionszeit des Eluats bestimmt werden konnte.

Tab. 2.6: Standards zur Kalibrierung der HPLC-Säule.

Standard	Konzentration [mg/ml]	Molekulargewicht [kDa]
Thyroglobulin	0,5	660
Ovalbumin	1	45
Chymotrypsinogen	1	25
Ribonuklease A	1	13,7
Aprotinin	1	6,5
L-Tyrosin	0,01	0,18

2.25 Bestimmungen von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen von Lösungen wurden mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kits“ der Firma Pierce (Rockford, USA) ermittelt.

2.26 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Die Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem, bestehend aus einem 5 %-igen Sammel- und einem 12 %-igen Trenngel. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) aufgenommen und vor dem Auftragen 10 min bei 98 °C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merrill mit „Coomassie Brilliant Blue R-250“ (Serva, Heidelberg) gefärbt (Merrill, 1990).

2.27 Nicht-reduzierende/reduzierende zweidimensionale SDS-PAGE (Kadokura *et al.*, 2004)

Die Proteinproben wurden in 20 μ l SDS-Probenpuffer (2.26) ohne β -Mercaptoethanol aufgenommen und gelelektrophoretisch (100 V) in einem 0,75 mm dicken SDS-Gel (12 %) aufgetrennt. Die jeweilige Gelspur wurde ausgeschnitten und 20 min in 2 ml SDS-Probenpuffer mit 5 % β -Mercaptoethanol unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert, um diese daraufhin auf ein zweites, 1,5 mm dickes SDS-Gel (12 %) aufzulegen und erneut elektrophoretisch (100 V) aufzutrennen.

2.28 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die durch SDS-PAGE (2.26) aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung der Apparatur „Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad, München) übertragen (Wilson and Yuan, 1989). Der Proteintransfer erfolgte für 15 min bei 150 mA und weitere 20 min bei 300 mA konstanter Stromstärke in Dunn-Carbonat-Puffer (10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃, 20 % (v/v) Methanol) (Dunn, 1986). Anschließend wurde die PVDF-Membran mindestens 1 h in TBST (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,2 % (v/v) Tween 20) mit 2 % (w/v) Milchpulver blockiert. Der indirekte immunologische Nachweis von dem auf der PVDF-Membran immobilisierten Protein erfolgte unter Verwendung des spezifischen mono-oder polyklonalen Antiserums in der jeweiligen Verdünnung. Die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „ECL-Western Blotting Detection“-System (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Großbritannien) unter Verwendung des Zweit-Antikörpers je nach Herkunft des Primäntikörpers mit Ziege-anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Bio-Rad, München) oder Kaninchen-anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:5.000. Die Visualisierung der Signale erfolgte mit dem Stella Chemilumineszenz-Detektor (raytest, Straubenhardt). Die densitometrische Quantifizierung der Signale wurde mit Hilfe der AIDA Software (raytest, Straubenhardt) durchgeführt.

2.29 Auftrennung von Lipopolysacchariden (LPS) mittels SDS-PAGE

Für die Isolierung von LPS wurde die O.D. 580 nm der jeweiligen ü.N.- Kultur bestimmt und ein Volumen, welches einer Zellzahl von O.D. 580 nm = 1 entsprach, sedimentiert (5 min, 5000 rpm, RT). Dadurch wurde immer eine annähernd gleiche Zellzahl für unterschiedliche Präparationen eingestellt. Das Zellpellet wurde einmal in 1 ml 1 x PBS gewaschen und danach in 100 µl SDS-Probenpuffer (2.26) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend durch Erhitzen auf 100 °C für 30 min aufgeschlossen. Zum Abbau von Proteinen wurden danach 20 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Sigma) dazugegeben und die Probe über Nacht bei 55 °C inkubiert. Je 12 µl der Proben konnten nun ohne weitere Behandlung direkt mittels SDS-PAGE (2.26) aufgetrennt werden. Dazu wurden SDS-Polyacrylamidgele mit einer Endkonzentration von 16 % angefertigt. Zur Aufbewahrung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.30 Silberfärbung von LPS nach SDS-PAGE

Der Nachweis von LPS mittels SDS-PAGE erfolgte nach einer leicht abgewandelten Methode der Silberfärbung, die ursprünglich von Tsai und Frasch entwickelt worden war (Tsai and Frasch, 1982). Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel über Nacht in 100 ml Fixierlösung (25 % Isopropanol, 7 % Essigsäure) auf einem Schüttler ü.N inkubiert. Danach wurde das LPS für 10 min in 100 ml Fixierlösung mit 0,87 g NaJO₄ (Sigma) oxidiert. Nach 3 Waschschritten mit H₂O für je 30 min wurde das Gel für 10 min in einer frisch angesetzten Färbelösung (70 ml H₂O + 1,4 ml 1 M NaOH + 1 ml NH₃ konz. + 1,25 ml 20 % AgNO₃; dabei ist es wichtig, die angegebene Reihenfolge der Substanzen beim Zusammenmischen einzuhalten) inkubiert. Anschließend wurde 3-mal für 15 min mit H₂O gewaschen und dann in 200 ml Entwickler (2,5 % Na₂CO₃ + 27 µl 40 % Formaldehyd, frisch angesetzt und auf 60 °C vorgewärmt) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 ml 50 mM EDTA, pH 8,0, gestoppt. Nach 10 min wurde das Gel in H₂O gelagert.

2.31 Untersuchungen nach Fluoreszenzmarkierung

2.31.1 Durchflusszytometrie und fluoreszenzaktivierte Zellsortierung von *E. coli*-Zellen

Anhand durchflusszytometrischer Analysen können u.a. Proteine an der Oberfläche lebender Zellen durch Immunfluoreszenzmarkierungen mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Dazu wurden 300 µl einer *E. coli*-Kultur, die bei einer O.D. 580 nm = 0,5 bei 37 °C und 150 UpM mit 0,5 mM IPTG induziert wurde, nach 1 h in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß sedimentiert (13.000 Upm, 1 min, RT) und in 10 µl des entsprechenden Primärantikörpers (1:10-verünnung in PBS) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis erfolgte ein Waschschriff mit 500 µl PBS. Die Zellen wurden dann in 10 µl eines Sekundärantikörpers (1:10-verünnung in PBS) aufgenommen und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Je nach Herkunft des Primärantikörpers handelte es sich hierbei um ein anti-Maus- oder anti-Kaninchen IgG-Biotin-Konjugat (Sigma-Aldrich). Nach wiederholtem Waschen mit 500 µl PBS folgte eine Markierung in 10 µl Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (1:10-verdünnung in PBS) für 10 min auf Eis. Diese Inkubation erfolgte abgedunkelt, um ein Ausbleichen des R-Phycoerythrins zu vermeiden. Die Zellen wurden im Anschluss erneut mit 500 µl PBS gewaschen, bevor sie letztlich in 20 µl PBS-Puffern aufgenommen wurden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der markierten Zellen abgedunkelt auf Eis.

Dafür wurde ein MoFlo-Zellsortiergerät (FACS) der Firma Dako Cytomation verwendet. Die Anzahl der Ereignisse wurde bei einer Tropfenfrequenz zwischen 95.000 und 100.000 pro Sekunde auf maximal 30.000 pro Sekunde begrenzt. Es wurden bei jeder Analyse 300.000 Ereignisse (Zellen) detektiert. Die Datenverwaltung erfolgte mit dem Softwarepaket Summit® v4.0.

Alle FACS Analysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kolmar am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU-Darmstadt durchgeführt.

2.31.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von markierten *E. coli*-Zellen

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden 10 µl entsprechend markierter Zellen (2.31.1) auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und auf dem Objektstisch des Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) arretiert. Die Lichtbildaufnahmen eines Gesichtsfeldes wurden abwechselnd mit Phasenkontrast- bzw. Fluoreszenzbeleuchtung durchgeführt.

2.31.3 Spektralphotometrische Untersuchung von fluoreszenzmarkierten *E. coli*-Zellen

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzemission der markierten Proteine auf der Zelloberfläche (2.31.1) wurde ein Fluoreszenzphotometer (Luminiscence Spectrometer LS 50B, Perkin Elmer) verwendet. Es wurde jeweils 1 ml GZE mit einer Zelldichte, die einer O.D. 580 nm von 1 entsprach, in QS Viertelmikroküvetten (Hellma) bei einer Anregungswellenlänge von 475 nm in einem Emissionsbereich von 490 – 550 nm vermessen. Die Dokumentation der Spektren erfolgte mit der Fluorescence Data Manager Software von Perkin Elmer, die Auswertung mit Microsoft Excel. Die jeweilige Fluoreszenzintensität als „relative Fluoreszenzemission“ wurde aus der gemessenen Fluoreszenzemission pro Zelldichte, die einer O.D. 580 nm von 1 entsprach, und pro 1 ml Zellextrakt oder Zellsuspension berechnet.

2.32 Kultivierung von Biofilmen in Mikrotiterplatten

Die Fähigkeit von Zellen, sich an Oberflächen anzuheften, wird als Bildung von Biofilmen bezeichnet. Um zu untersuchen, ob *P. putida* KT2440 und die generierte Mutante KT0418 sich an abiotische Oberflächen anheften und nachfolgend einen Biofilm bildet, wurde das von O'Toole und Kolter entwickelte System modifiziert und angewendet (O'Toole and Kolter, 1998). Hierzu wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte je 1 ml Minimalmedium mit 10 mM Glucose als Kohlenstoffquelle pipettiert. Jede Kavität wurde mit einer ü.N. in LB-Medium gewachsenen *P. putida*-Kultur auf eine O.D. 580 nm = 0,1 angeimpft und für 16 h bei 30 °C stehend inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden jeweils 100 µl einer Kristallviolettlösung (1 % Kristallviolett in 96 % Ethanol) hinzugefügt und bei RT für weitere 15 min stehend inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde vorsichtig 10-mal mit Wasser gewaschen und über Papier für 20 min getrocknet. Die Bildung eines Biofilms ließ sich an einem blau gefärbten, wasserunlöslichen Komplex (Grenzfläche zwischen Luft und Medium) erkennen. Zur Quantifizierung wurden 200 µl 96 %-iges technisches Ethanol in jede Kavität pipettiert und für 10 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde auf 1 ml mit A. dest. der in Alkohol lösliche blaue Komplex aufgefüllt und die Absorption bei 540 nm zum Medium als Referenz quantifiziert.

2.33 Quantitative Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie

Für die Extraktion von Lipiden aus biologischen Proben wurde die Methode von E. G. Bligh und W. J. Dyer gewählt (Bligh and Dyer, 1959). Zum Waschen der Ober- bzw. Unterphase werden entsprechende „synthetische Phasen“ benötigt, die die gleiche Zusammensetzung wie das Extraktionsgemisch aufweisen, aber keine Probe enthalten. Dafür werden 200 µl Chloroform, 200 µl Methanol, 80 µl Wasser und 100 µl 1M KCl-Lösung in ein Glasröhrchen gegeben und 1 min durch Vortexen gemischt. Nach 1 min Zentrifugation bei 3.000 UpM bildete sich eine Phasengrenze. Oberhalb befand sich die „synthetische Oberphase“ (sOF), unterhalb war die „synthetische Unterphase“ (sUF). Die Extraktion der Lipide erfolgte aus 10 mg Bakterienzellen einer ü.N.-Kultur, die in 80 µl Wasser gelöst wurden. Danach wurden 100 µl Chloroform und 200 µl Methanol hinzugegeben und die Probe 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Nun wurden 100 µl Chloroform zur Suspension pipettiert, und 1 min durch Vortexen gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl 1 M KCl-Lösung, und wieder wurde durch 1 min Vortexen die Suspension gemischt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 3.000 UpM entstand eine Phasengrenze, deren Unterphase (UF) mit einer Hamiltonspritze in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Zu der Oberphase in dem alten Gefäß wurden 60 µl der synthetischen Unterphasen pipettiert und 1 min vermischt, gefolgt von einem erneuten Zentrifugationsschritt von 1 min bei 3.000 UpM. Die entstandene UF wurde mit der Hamiltonspritze in das neue Gefäß überführt. Der Waschschrift wurde wiederholt. Im Anschluss wurde 200 µl der synthetischen Oberphase zu der gesammelten UF gegeben, 1 min gevortext und 1 min bei 3.000 UpM zentrifugiert. Die UF wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zu dem Rest im alten Gefäß wurden die verbliebenen 40 µl sUF hinzugeführt, 1 min gemischt, 1 min bei 3.000 UpM zentrifugiert und die UF in das neue Gefäß überführt. Die gesammelten, gewaschenen UF wurden im Argon-Strom eintrocknet. Für die Dünnschichtchromatographie sollten die drei unterschiedlichen Laufmittel 20 min in der jeweiligen Kammer stehen, damit sich ihre Atmosphäre mit Lösungsmitteldampf sättigt. Kammer 4 wird bis 10 mm unter den oberen Rand mit der Färbelösung gefüllt.

Laufmittel 1: 266 ml Essigsäuremethylester, 266 ml 1-Propanol, 266 ml Chloroform, 106 ml Methanol, 96 ml KCL-Lösung (0,25 %); Laufmittel 2: 750 ml n-Hexan, 230 ml Diethylether

20 ml Essigsäure; Laufmittel 3: 1000 ml n-Hexan; Färbelösung: 100 ml H₃PO₄ 85 %, 75 g CuSO₄ x 5 H₂O, 900 ml H₂O.

Die an der Innenwand der Gefäße eingetrockneten Lipid-Extrakte werden in 20 µl Chloroform/Methanol im Mischungsverhältnis 2:1 (Volumen) aufgenommen. Die Proben wurden mit einer Hamiltonspritze punktuell mit einer Entfernung von ca. 1,8 cm vom unteren Rand auf die Dünnschichtplatte (Macherey-Nagel, Düren, Kat.-Nr.811032) aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Platte dann in Lösungsmittel 1 gestellt und entwickelt, bis die Laufmittelfront ca. 2 cm gelaufen ist. Dieser Schritt dauert ca. 10 - 15 min. Nach Trocknen der Platte mittels Heißluftgebläse und darauffolgender Abkühlung wurde die Platte in Laufmittel 2 gestellt. Es folgte eine Entwicklung bis die Laufmittelfront den oberen Rand erreicht hatte (ca. 5 - 8 min). Danach wurde die Platte aus der Kammer genommen und erneut mittels Heißluftgebläse 1 - 2 min getrocknet. Anschließend folgte eine Entwicklung in Laufmittel 3 bis an den oberen Rand. Um die Lipidbanden sichtbar zu machen, wurde die Dünnschichtplatte mit dem Kupfersulfat-Phosphorsäure-Reagenz 3 s überschichtet. Anschließend wurden die Lipidbanden durch ein Heißluftgebläse visualisiert und direkt dokumentiert (Scanner, HP).

2.34 Nachweis der Oberflächenadhäsion von *P. putida* an Maiskörnern

Bakterielle Adhäsion an Maiskörnern wurde beschrieben nach Espinosa-Urgel (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Die Oberfläche von Maiskörnern wurde sterilisiert, indem sie zweimal 15 min in 70 % Ethanol, gefolgt von 2-mal 15 min in Bleichmittel (Natriumhypochlorid 6-14 %, 0,5 % SDS), inkubiert wurden. Nach mehrmaligem Waschen mit sterilem A.dest wurden die Körner 12-16 h in einer Petrischale hydriert.

Die Kultivierung der *P. putida*-Kulturen erfolgte ü.N. bei 30 °C in LB-Medium (2.4). Es wurde 1 ml M9 Minimalmedium (2.4) mit einem oberflächensterilisierten Maiskorn und 5 µl einer Verdünnung, die einer O.D. 580 nm = 1 in LB entsprach, versetzt. Die Verdünnung wurde ebenfalls auf LB Platten ausplattiert und ü.N. bei 30 °C gelagert, um die Zellzahl zu ermitteln, die pro Maiskorn eingesetzt wurde. Nach 1 h Inkubation bei RT erfolgte erst ein Waschschriff mit A. dest., bevor die Maiskörner mit den Bakterien in 1 ml frisches M9-Medium überführt wurden. Danach wurden die Zellen durch 5-minütiges Vortexen mit Glasperlen (Ø 0,3 - 0,5 mm, Roth) von den Maiskörnern gelöst und in unterschiedlichen Verdünnungen (10⁰ - 10⁻⁴) auf LB-Platten ausplattiert und ü.N. bei 30 °C inkubiert.

Alle Experimente wurden mit einer Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.35.1.2 Bestimmung der Enantioselektivität lipolytischer Enzyme

Für die Bestimmung der Enantioselektivität in Form des apparenten *E*-Wertes wurden gereinigte *inclusion bodies* (2.22) eingesetzt, deren enthaltene Proteine zuvor durch *in vitro*-Faltung (2.23) in eine enzymatisch aktive Konformation versetzt worden sind.

Da die verwendeten *p*-Nitrophenylester der 2-Methyldekansäure nicht wasserlöslich waren, mussten diese im Vorfeld einer Messung emulgiert werden. Dazu wurden ca. 12,4 µmol des entsprechenden Enantiomers in 500 µl Ethanol gelöst und gemischt. Diese Suspension wurde anschließend komplett in 10 ml 100 mM K_{pi}-Puffer, pH 7,2; 10 mM MgSO₄ gegeben und sorgfältig durchmischt (Substratkonzentration: 0,001 mol/l). Zur Messung wurden 150 µl (0,18 µmol) der entstandenen Emulsion eingesetzt und durch Zugabe zur entsprechenden Probe direkt in eine Einmalküvette (diese wurde vorher in das Spektralphotometer gestellt) wurde die Reaktion gestartet. Die Hydrolysereaktion wurde für jedes Enantiomer des *p*-Nitrophenylesters separat gemessen. Als Referenz diente 1 ml Kaliumphosphatpuffer ohne Enzym. Die Absorption bei 410 nm am Spektralphotometer (Shimadzu Zweistrahl-Spektralphotometer 1650-PC) wurde auf null kalibriert und die Hydrolyse 30 min bei RT mit dem zum Photometer gehörigen Softwarepaket (UV Probe v 2.20) aufgezeichnet.

Die erhaltenen Absorptionswerte beider Enantiomere wurden dann gegen die Messzeitpunkte aufgetragen. Die Änderungen der O.D. 410 nm pro Minute wurden mit Hilfe einer Regressionsgeraden bestimmt. Der Quotient der erhaltenen Werte bildete den apparenten *E*-Wert.

2.35.1.3 Bestimmung der Esterasespezifität

Bei den Aktivitätstests mit den Derivaten des *p*-Nitrophenols versehen mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge wurde zuerst je eine Stocklösung von 40 mM für jedes Substrat (Sigma) in Dioxan hergestellt. Von dieser Lösung wurden 250 µl in 10 ml Reaktionspuffer (50 mM NaPO₄, pH 8,0; 5 mM Natriumdeoxycholat) gelöst. Die Endkonzentration entsprach 1 mM Substrat und 2,4 % Dioxan. In 1 ml Reaktionsvolumen wurde die Hydrolyse durch Enzymzugabe gestartet und 3 min die Absorption bei 410 nm gemessen.

Die Enzymaktivität in Units wurde in µmol des hydrolysierten *p*-Nitrophenol pro Minute berechnet (Extinktionskoeffizient: $16,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Abramic *et al.*, 1999).

Die Messungen erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Ivana Lescic Asler aus der Arbeitsgruppe Chemische- und Biologische Kristallographie der Physikalischen Chemie am Rudjer Boskovic Institut in Zagreb, Kroatien.

2.35.1.4 Herstellung von Tributyrinagar

Zum Nachweis von extrazellulärer Esteraseaktivität wurden Tributyrinagarplatten gegossen (Kok *et al.*, 1993). Tributyrin ist das Triacylglycerid der Butansäure und somit ein Substrat für Lipasen und Esterasen, da es mit geringem Anteil (0,01 %) auch in Wasser löslich ist (Brockhoff, 1969). Dazu wurden 7,5 ml Tributyrin und 0,75 g Gummi arabicum mit sterilem A. dest. auf ein Endvolumen von 15 ml aufgefüllt und sorgfältig vermischt. Anschließend wurde die Suspension mittels Ultraschall (3 min, 75 W) emulgiert und dann in 500 ml autoklaviertem LB-Agar (auf ca. 60 °C abgekühlt) gemischt. Zur Induktion der Expression relevanter Gene wurde der Agar zusätzlich mit 0,4 mM IPTG komplettiert.

2.35.1.5 Zymogramm (Riedel *et al.*, 2003)

Durch dieses Verfahren wurde die Esterase anhand ihrer Größe und Enzymspezifität gegenüber dem blau-fluoreszierenden Methylumbelliferyl-Butyrat (MU-Butyrat) auf einem SDS-Polyacrylamidgel mittels UV-Licht (UV-Licht = 254 - 366 nm Wellenlänge) visualisiert. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben durch SDS-PAGE (2.26) wurden die Proteine in dem Polyacrylamidgel in 20 ml Renaturierungspuffer (25 % Isopropanol in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) für 20 min bei RT inkubiert und im Anschluss in 20 ml Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5) bei 4 °C ü.N. gewaschen. Danach wurde das Polyacrylamidgel mit 2 ml Substratlösung (0,01 M Methylumbelliferyl-Butyrat in DMSO) überschichtet und die Esteraseaktivität mittels UV-Licht durch eine blau leuchtende Bande visualisiert. Die Dokumentation wurde auf dem „Gel Print 2000i“-Videodokumentationssystem der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sowie mittels des „Eagle Eye II“-Videodokumentationssystems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt.

Nach anschließendem Waschen in Puffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5) oder A. dest. wurde das SDS-Gel mit „Coomassie Brillant Blue R-250“ gefärbt.

2.35.2 Nachweis der Phospholipaseaktivität

Als Substrat der Phospholipase (hier: EstP) wurde 1 mg egg-yolk type XIII-E Phosphatidylcholine (PC (Sigma)) oder 150 µg Lysophosphatidylcholine (LPC (Sigma)) benutzt. Die enzymatische Reaktion verlief bei 37 °C, 300 UpM über Nacht in 500 µl Puffer (5 mM Tris; 1 mM CaCl₂; 1 mM ZnCl₂; pH 7,2).

Nach Extraktion mit 3 ml Chloroform-Methanol (4:1) Lösung wurde die Chloroform-Phase vakuumgetrocknet. Die Produkte wurden in 20 µl Chloroform-Methanol (2:1) Lösung resuspendiert und auf Silika Gel 60 Platte (Merck) zusammen mit den Standards: 100 µg PC und 200 µg LPC dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Für diese Auftrennung wurde das System von Matsuzawa und Hostetler benutzt (Matsuzawa and Hostetler, 1980). Nach Trennung der Dünnschichtchromatographie-Platte mit Chloroform-Methanol-Wasser (65:35:5) bis 7 cm Höhe wurde die DC-Platte getrocknet und erneut bis zum oberen Rand (18 cm) mit dem Laufmittel, bestehend aus Heptan-Diethylether-Ameisensäure (90:60:4), inkubiert. Nach anschließendem Trocknen der Platte wurde diese mit 0,05 %-iger Jodlösung in Chloroform zur Visualisierung der Phospholipide besprüht. Die reversible Gelbfärbung wurde direkt dokumentiert (Scanner, HP).

Zusätzlich wurde der photometrische Phospholipase-Nachweistest für PLA₂ der Firma Cayman (sPLA₂ Assay Kit, Kat.-Nr.765001, Michigan, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.35.3 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde in Toluol-permeabilisierten Zellen mit *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) als Substrat im Spektralphotometer (NovaspecII, Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 420 nm nach Miller bestimmt (Miller, 1972).

2.36 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme „CLONE Manager for Windows 7“ (Scientific and Educational Software), dem „DNA STAR“-Programmpaket (Lasergen) und PSORT (<http://www.psорт.nibb.ac.jp>) (Nakai and Horton, 1999).

Homologievergleiche wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997).

Die 3D-Struktur der C-terminalen Domäne von EstA wurde mit dem Programm Phyre⁶⁴ Server angefertigt (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre) (Kelley and Sternberg, 2009). Die α -Helix von EstA wurde mit einem Programm für Sekundärstrukturen vorhergesagt (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>).

Vorhersagen über mögliche Disulfidbrücken wurden mit dem Programm DISULFIND (Ceroni *et al.*, 2006) (<http://www.predictprotein.org>) durchgeführt.

DNA-Sequenzinformationen von *P. aeruginosa* und *P. putida* wurden von dem „Pseudomonas-Genome Project“ bezogen (<http://www.pseudomonas.com>). Zur Identifizierung von konservierten Proteindomänen wurde die folgende Internetseite genutzt: <http://pfam.wustl.edu/index.html>.

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe eines Scanners, einer digitalen Kamera sowie einer Videodokumentationsanlage digitalisiert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Während der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen der Abbildungen vorgenommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Identifizierung einer α -Helix zwischen den funktionellen Domänen des Autotransporterproteins EstA aus *P. aeruginosa*

Autotransporterproteine zeichnen sich alle durch eine uniforme, strukturelle Organisation aus. Sie bestehen aus einer Signalsequenz für den Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran, einer N-terminalen funktionellen Passagierdomäne und einer C-terminalen Domäne für den Transport über die äußere Membran. Der detaillierte Transportmechanismus der Autotransporterproteine über die äußere Membran wird noch diskutiert. Sequenzvergleiche bestätigen eine hohe funktionelle Homologie der Transportdomänen aller Autotransporter (Yen *et al.*, 2002), während bei den Passagierdomänen eine starke funktionelle Diversität zu verzeichnen ist. Einige Passagierdomänen bleiben auf der Zelloberfläche verankert, während andere ins extrazelluläre Milieu freigesetzt werden. Ebenfalls konnte eine Linker-Region bei einigen Autotransporterproteinen identifiziert werden, die beide Domänen eines Autotransporterproteins miteinander verbindet. Die Kristallstruktur von NalP aus *Neisseria meningitidis* bestätigt eine α -Helix in dem Bereich zwischen beiden funktionellen Domänen, die aber eine kaum konservierte Sequenz besitzt (Oomen *et al.*, 2004).

Es besteht die Vermutung, dass EstA im Inneren der β -Pore ebenfalls eine Linker-Region besitzt, die möglicherweise die Konformation einer α -Helix ausbildet. Aufgrund der derzeit fehlenden Röntgenkristallstruktur von EstA oder anderen homologen Proteinen wurde anhand von Sequenzhomologien ein Modell der Transportdomäne und N-terminalen Linker-Region, die möglicherweise eine α -Helix ausbildet, angefertigt (www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre) (Kelley and Sternberg, 2009). Als Matrize für diese Modellierung diente die Kristallstruktur der Transportdomäne von NalP aus *N. meningitidis* (Oomen *et al.*, 2004). Die Abbildung 3.1 zeigt die hypothetische 3D-Struktur der Transportdomäne mit N-terminaler α -Helix im Lumen der β -Pore von EstA in zwei unterschiedlichen Ansichten.

Die Hypothese wird dadurch bestätigt, dass eine α -Helix im Lumen der β -Pore zwischen AS310 bis AS335 der Aminosäuresequenz des nativen Proteins lokalisiert sein kann. Die α -Helix von EstA dient als sogenannte *junction region*, da sie die Verbindung zwischen Passagierdomäne und Transportdomäne darstellt. Zusätzlich konnte diese α -Helix, bestehend aus 26 Aminosäuren, von einem Programm (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) zur Vorhersage für Sekundärstrukturen postuliert werden.

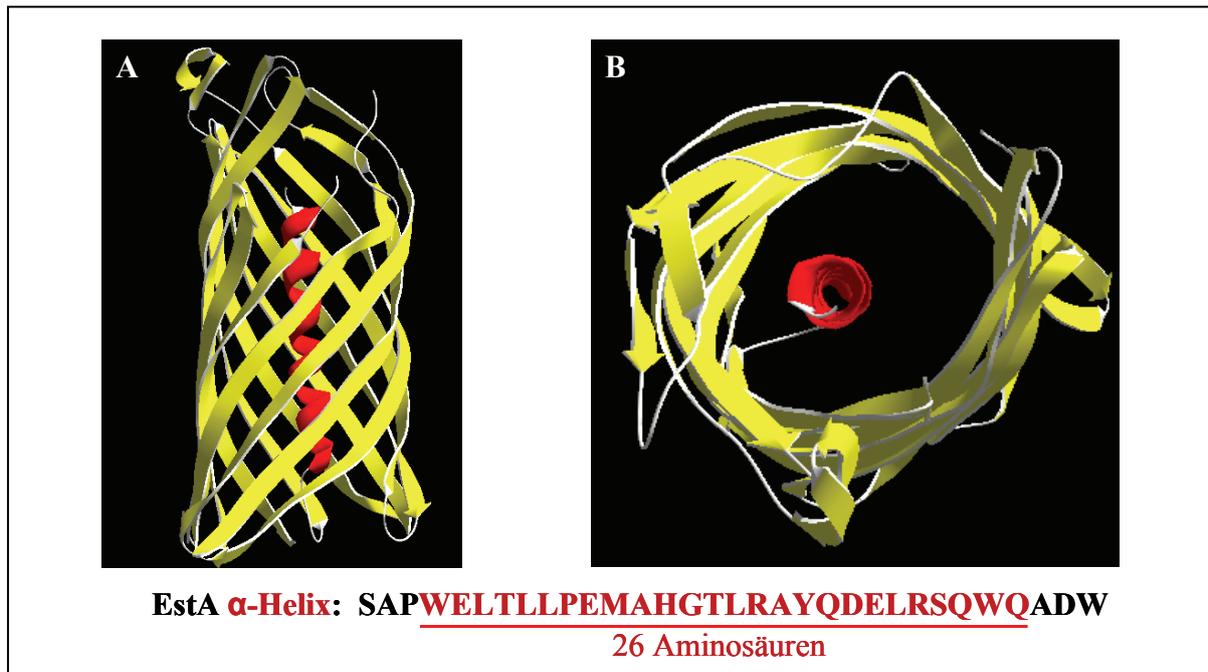


Abb. 3.1: Strukturhomologiemodell der postulierten α -Helix und Transportdomäne von EstA aus *P. aeruginosa*. (A) Seitenansicht. (B) Aufsicht. gelb: Transportdomäne des Autotransporterproteins. rot: vorhergesagte α -Helix von AS310 bis AS335 des nativen Proteins, die eine sogenannte Linker-Region, bestehend aus 26 Aminosäuren, zwischen Passagier- und Transportdomäne darstellt und sich im Lumen der β -Pore befindet. Die 3D-Struktur wurde mit einem Vorhersageprogramm angefertigt (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre) (Kelley and Sternberg, 2009), wobei NalP aus *N. meningitidis* als Matrize diente (Oomen *et al.*, 2004). Ebenfalls wurde die α -Helix mit einem Programm für Sekundärstrukturen vorhergesagt (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>).

Ein Strukturhomologiemodell von EstA lässt eine α -Helix, bestehend aus 26 Aminosäuren, im Lumen der Transportdomäne des Autotransporterproteins vermuten, die eine β -Pore in der Membran bildet.

3.1.1 Bedeutung der α -Helix für das Autotransporterprotein EstA aus *P. aeruginosa*

Bisher wurde die Funktion der α -Helix schon in einigen Autotransporterproteinen untersucht. Ihr konnte bereits eine Rolle als Faltungshelfer für die Passagierdomäne (Berthiaume *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2003) und/oder für die Transportdomäne (Konieczny *et al.*, 2001; Mogensen and Otzen, 2005) zugesprochen werden. Dementsprechend agiert diese Linker-Region als intramolekulares Chaperon, ein sogenanntes Autochaperon (Desvaux *et al.*, 2004). Um die Bedeutung der α -Helix für EstA in *P. aeruginosa* näher zu untersuchen, wurde diese Region des Autotransporterproteins deletiert und der Effekt bezüglich der Sekretion und Aktivität analysiert.

In Abbildung 3.2 sind unterschiedliche Klonierungsstrategien dargestellt, mit denen die α -Helix der Esterase (EstA Δ H) deletiert werden sollte. Dazu erfolgten zuerst die Insertionen zweier *NheI*-Erkennungssequenzen in das *estA*-Gen, indem durch zwei aufeinander folgende *overlap extension*-PCRs (2.14.2) je eine Erkennungssequenz für die *NheI*-Endonuklease eingefügt wurde. Als DNA-Matrize diente der *estA*-Expressionsvektor pBBX+. Die Oligonukleotide *estA* 1.*NheI* up und *estA* 1.*NheI* down bzw. *estA* 2.*NheI* up und *estA* 2.*NheI* down (Tabelle 2.3) wurden zusammen mit den entsprechenden flankierenden Oligonukleotiden *estA* up bzw. *estA* down in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Nach Reinigung der beiden PCR-Fragmente dienten diese in einer weiteren PCR-Reaktion zusammen mit den Oligonukleotiden *estA* up und *estA* down zur vollständigen Amplifizierung des Gens mit den inserierten *NheI*-Erkennungssequenzen. Schließlich wurde nach *MluI*-Hydrolyse des PCR-Produkts und des Zielvektors pBBX+ die Wildtypsequenz durch das mutagenisierte *estA*-Gen ausgetauscht (Abbildung 3.2A). Die *NheI*-Insertionen wurden auch einzeln in das Gen für zukünftige Experimente eingefügt. Die konstruierten Plasmide pBBX1*NheI* und pBBX2*NheI* mit einfach inserierter *NheI*-Erkennungssequenz sowie pBBX*NheI*₂ mit doppelter *NheI*-Insertion und die Positivkontrolle pBBX+ wurden in den *estA*-defizienten Stamm *P. aeruginosa* PASCHI (Δ *estA*) durch Konjugation (2.13) eingebracht. In diesem Stamm konnte eine Hintergrundaktivität durch die chromosomal kodierte Esterase ausgeschlossen werden. Da die Insertionen der Erkennungssequenzen für *NheI*-Endonukleasen die Primärstruktur des *estA*-Gens veränderten, musste die enzymatische Aktivität von EstA mit den mutagenisierten Varianten verglichen werden. Die Esteraseaktivität (2.35.1.1) der ganzen Zellen von ü.N. Kulturen war in den zu untersuchenden Stämmen identisch (ohne Abbildung). Folglich hatten die eingefügten *NheI*-Erkennungssequenzen keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von EstA. Deshalb wurde durch *NheI*-Hydrolyse des Plasmids pBBX*NheI*₂ und anschließende Ligation die DNA-Region in *estA* deletiert, die die postulierte α -Helix kodiert. Nach Transformation (2.12) von *E. coli* DH5 α konnten trotz diverser Versuche und mehrerer Modifikationen keine positiven Klone identifiziert werden.

Eine andere Strategie war es, die Gensequenz, die die Passagierdomäne von EstA kodiert, durch eine Standard PCR-Reaktion (2.14.1) mit den Oligonukleotiden pEST *XbaI* up und *estA* 1.*NheI* down zu amplifiziert. Nach anschließender Hydrolyse mit den Endonukleasen *XbaI* und *NheI* wurde das PCR-Produkt in den zuvor konstruierten Vektor pBBX2*NheI* kloniert (Abbildung 3.2B). Auch hier konnten keine Klone identifiziert werden, die die erwünschte Deletion trugen.

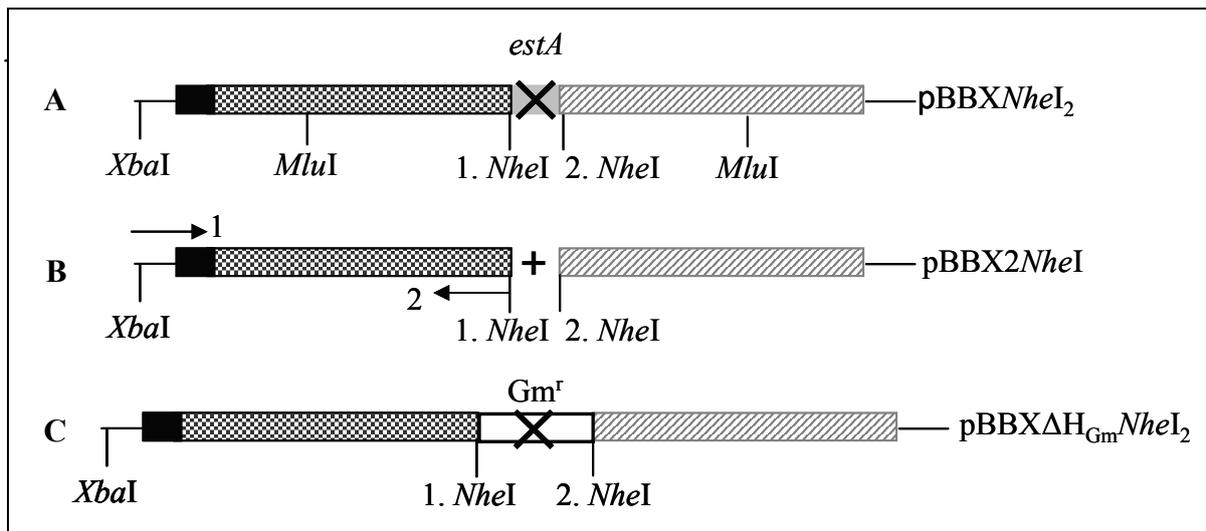


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategien zur Deletion der α -Helix des Autotransporterproteins EstA aus *P. aeruginosa*. (A) Durch *overlap extension*-PCR wurden mit geeigneten Oligonukleotiden am 5'- sowie 3'-Ende der postulierten α -Helix je eine *Nhe*I-Erkennungssequenz in das *estA*-Gen inseriert. Nach *Nhe*I-Hydrolyse und anschließender Ligation wurde die DNA-Sequenz, die die α -Helix kodiert, entfernt. (B) Es wurde die Gensequenz, die die Passagierdomäne von EstA kodiert, mit geeigneten Oligonukleotiden (1: pEST *Xba*I up; 2: *estA* 1. *Nhe*I down) mittels PCR amplifiziert. Nach *Xba*I/*Nhe*I-Hydrolyse wurde das PCR-Produkt in den zuvor konstruierten Vektor pBBX2*Nhe*I kloniert. (C) Die Gentamycin-Kassette wurde aus dem Plasmid pBSL142 durch *Nhe*I-Hydrolyse isoliert. Nach identischer *Nhe*I-Hydrolyse des Plasmids pBBX*Nhe*I₂ wurde die Gentamycin-Kassette für den kodierenden Bereich der α -Helix ersetzt.

Zuletzt erfolgte eine Vorgehensweise, bei der die Gentamycin-Kassette aus dem Plasmid pBSL142 durch *Nhe*I-Hydrolyse isoliert wurde. Nach identischer Hydrolyse des Vektors pBBX*Nhe*I₂ sowie anschließender Ligation wurde die Gentamycin-Kassette mit dem kodierenden Bereich der α -Helix ausgetauscht. Nach Transformation von *E. coli* DH5 α mit dem Ligationsansatz konnten unter Selektionsdruck aufgrund der Gentamycin-Kassette positive Klone identifiziert werden. Jedoch musste in diesem Fall die Resistenzkassette noch durch *Nhe*I-Hydrolyse, Reinigung mittels Agarosegelelektrophorese (2.10) und finaler Ligation (2.11) entfernt werden. Wiederum konnten keine positiven Klone erhalten werden.

Im Verlauf der Klonierungen wurden unterschiedliche Phänomene beobachtet. Hauptsächlich zeigten die Ergebnisse der Sequenzierungen von putativen positiven Klonen, dass Mutationen, Deletionen oder sogar Insertionen im *estA*-Gen aufgetreten waren. Anscheinend störte die Deletion der α -Helix in EstA den Zellmetabolismus so, dass eine erwünschte Expression von EstA Δ H zum Absterben der Zellen führt.

Offensichtlich verursacht EstA Δ H einen starken metabolischen Stress für die Bakterienzelle, sodass zusätzliche Mutationen in das Gen mit deletierter Helix eingefügt werden, die eine Expression unterbinden. Bei einer Expression wäre die Zelle vermutlich nicht lebensfähig.

3.1.2 Deletion der α -Helix in EstA unter der Kontrolle des T7-Promotors in *E. coli* DH5 α und *in vitro*-Untersuchungen von EstA Δ H

Sämtliche Klonierungsstrategien zur Deletion der Sequenz in *estA*, die die α -Helix kodiert, waren nicht erfolgreich. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei allen bisher vorgenommenen Versuchen das *estA*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors (P_{lac}) stand, der sich durch eine konstitutive Expression des Zielgens auszeichnet. Das bedeutet, dass die Transkription von *estA* auch in Abwesenheit von Lactose bzw. IPTG in der Zelle stattfand. Wenn die Expression von EstA Δ H für die Zellen einen metabolischen Stress verursacht oder toxisch ist, wäre bei einer Expression die Zelle nicht lebensfähig, sodass positive Klone nicht entstehen können. Folglich sollte eine Klonierungsstrategie gewählt werden, mit der keine Expression des Zielgens erfolgt. Das sehr gut regulierbare Expressionssystem, basierend auf den pET-Vektoren, wurde eingesetzt, bei denen das Zielgen unter der Kontrolle des T7-Promotors steht. Da das Genom von *E. coli* DH5 α keine T7-Polymerase kodiert, konnte auch keine Transkription des *estA*-Gens erfolgen. Erst in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) konnte die Expression des Zielgens durch die T7-Polymerase nach Induktion mit IPTG stattfinden.

Zuerst wurde das *estA*-Gen unter Einsatz der spezifischen Oligonukleotide *estA NdeI* und *estA XhoI* down (Tabelle 2.3) in einer Standard-PCR-Reaktion amplifiziert. Als DNA-Matrize diente der Expressionsvektor pBBX⁺ bzw. pBBX*NheI*₂. Nach Hydrolyse mit den Endonukleasen *NdeI* und *XhoI* der PCR-Produkte und des Plasmids pET22b⁺ erfolgte eine Ligation (2.11) der Gene mit dem Vektor. Nach einer *NheI*-Hydrolyse des entstandenen Konstruktes pETEstA*NheI*₂ und anschließender Ligation wurde die Sequenz, die die α -Helix kodiert, deletiert. Nach Transformation (2.12) von *E. coli* DH5 α konnte der Vektor pETEstA Δ H erfolgreich identifiziert werden. Daraufhin erfolgte eine Überexpression von EstA Δ H und EstA in *E. coli* BL21 (DE3). Dabei wurde die Expression der Zielgene in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen durch IPTG induziert. Die Positivkontrolle stellte EstA (pETEstA) dar und wurde zusammen mit dem Leervektor pET22b⁺, der Negativkontrolle, äquivalent behandelt. Diese Expression führte zur zellulären Aggregation der Esterasen EstA und EstA Δ H (Wilhelm, 2001). Diese sogenannten *inclusion bodies* bestanden aus einer katalytisch inaktive Form von EstA und erforderten deshalb eine chemische Denaturierung mit anschließender *in vitro*-Faltung, um eine enzymatisch aktive Konformation des Enzyms erreichen zu können. Der Erfolg der Expression wurde mittels SDS-PAGE (2.26) im Gesamtzellextrakt und in der Fraktion mit den *inclusion bodies*

überprüft (Abbildung 3.3A). Die erfolgreiche Expression konnte sowohl von EstA als auch von EstA Δ H im Gegensatz zur Leervektorkontrolle durch eine starke Zunahme der Intensität der Proteinbande mit einer molekularen Masse von ca. 67 kDa detektiert werden. Die Deletion der α -Helix, bestehend aus 26 Aminosäuren, entsprach etwa 3 kDa und war durch den Größenunterschied im SDS-Gel deutlich erkennbar. Nach Rückfaltung der Enzyme im Polyacrylamid-Gel wurde die Esteraseaktivität mittels Zymogramm (2.35.1.5) visualisiert (Abbildung 3.3B). Die Ergebnisse zeigten, dass im Gegensatz zum Wildtyp keine esterolytische Aktivität bei der Variante EstA Δ H erzielt werden konnte. Nach erfolgter *in vitro*-Faltung der gereinigten *inclusion bodies* wurden diese Ergebnisse durch einen Aktivitätstest (2.35.1.1) photometrisch bestätigt. Während EstA nach Aktivierung deutliche Esteraseaktivität zeigte, konnte keine enzymatisch aktive Proteinkonformation der Esterase durch die Deletion der α -Helix erreicht werden (keine Abbildung).

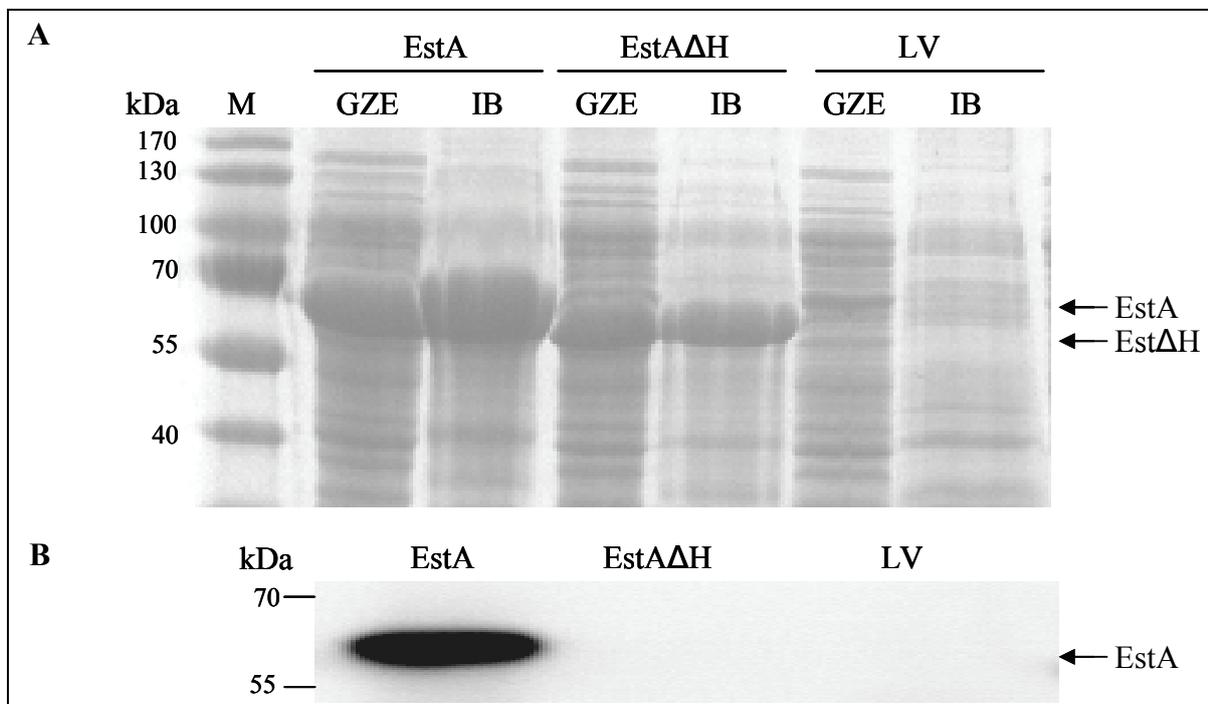


Abb. 3.3: SDS-PAGE-Analyse und Esteraseaktivität mittels Zymogrammgel nach Überexpression der Esterasen EstA und EstA Δ H unter der Kontrolle des T7-Promotors in *E. coli* BL21 (DE3). (A) Als Negativkontrolle diente der Vektor pET22b+ (LV). Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichte (O.D. 580 nm = 0,15) bezogen. (B) Die Esteraseaktivität in einem Zymogramm-Gel wurde mit dem nach Hydrolyse fluoreszierenden Substrat Methylumbelliferyl-Butyrat unter UV-Licht visualisiert. Nach dem anschließenden Färben des Trenngels (12 %) mit Coomassie Brilliant Blue wurden die Proteinbanden sichtbar. GZE: Gesamtzellextrakt; IB: *inclusion bodies*; M: Marker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas).

Die Konstruktion von EstA Δ H unter der Kontrolle des T7-Promotors in *E. coli* DH5 α war erfolgreich. Eine Expression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) in Form von *inclusion bodies*. Eine *in vitro*-Faltung von EstA Δ H konnte kein natives Protein erzielen. Folglich wird diese von der α -Helix des Autotransporterprotein EstA beeinflusst.

3.2 Untersuchungen des Cysteinpaares in der Passagierdomäne des Autotransporterproteins EstA aus *P. aeruginosa*

Generell zeichnen sich Autotransporterproteine durch drei Strukturelemente aus. Die N-terminale Signalsequenz initiiert den Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran und wird danach im Periplasma abgespaltet. Die C-terminale Domäne integriert sich in die äußere Membran und bildet eine β -Pore für die Translokation der katalytisch aktiven Passagierdomäne. Während alle Transportdomänen trotz extremer Sequenzdiversität aufgrund ihrer Funktion homolog sind (Henderson *et al.*, 2004), unterscheiden sich die heterogenen Passagierdomänen vor allem in der Funktion. Dennoch ist ein charakteristisches Merkmal vieler Autotransporterproteine der Besitz von wenigen Cysteinen innerhalb der Passagierdomäne (Henderson *et al.*, 1998; Jose *et al.*, 1995). In der Aminosäuresequenz der Passagierdomäne existiert oft ein Cysteinpaar, maximal sind es zwei Paare. Es konnte gezeigt werden, dass das Cysteinpaar der Passagierdomäne von VacA aus *Helicobacter pylori* die Funktion des Proteins nicht beeinflusst (Letley *et al.*, 2006). Der Autotransporter Ssp-1 von *Serratia marcescens* zeichnet sich durch zwei Cysteinpaare innerhalb der Passagierdomäne aus. Während der Aminosäureaustausch der Cysteine durch Serine eines Paares die Sekretionseffizienz von Ssp-1 steigert, wird diese verhindert durch die Mutagenisierung beider Cysteinpaare (Miyazaki *et al.*, 1989). Bisher ist die Funktion der Cysteine in den Passagierdomänen von Autotransporterproteinen noch ungeklärt.

Das Autotransporterprotein EstA aus *P. aeruginosa* besitzt ebenfalls zwei Cysteinreste C-terminal der Passagierdomäne, deren Bedeutung hinsichtlich des Transports über die äußere Membran und der Aktivität auf der Zelloberfläche untersucht werden sollte.

3.2.1 Das Dsb-System im Periplasma von *P. aeruginosa* hat keinen Einfluss auf die Sekretion und Aktivität von EstA

In Gram-negativen Bakterien wird die Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken durch das periplasmatische Dsb-System (*disulfide-bond-formation*) katalysiert (Tan and Bardwell, 2004). Während das DsbA/DsbB-System die Disulfidbrücken durch Oxidation freier Thiolgruppen generiert, isomerisiert das DsbC/DsbD-System falsch geknüpfte Disulfide (Collet and Bardwell, 2005). Das für Autotransporterproteine charakteristische Cysteinpaar der Passagierdomäne befindet sich bei EstA an Position 258 und 264 des nativen Proteins. Es gibt derzeit nur Vermutungen über eventuelle Funktionen dieser Cysteine. Sequenzvorhersagen postulieren eine Disulfidbrückenbildung zwischen den Cysteinen in

EstA. Folglich sollte untersucht werden, ob eine Disulfidbrücke in EstA zwischen den Cysteinen der Passagierdomäne ausgebildet wird und ob das Dsb-System im Periplasma von *P. aeruginosa* die Ausbildung kalalysiert. Dementsprechend wurde die Esteraseaktivität und Sekretion von EstA nach einer Expression in verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen, die Mutationen im Dsb-System trugen, untersucht. Nach Konjugation (2.13) der *P. aeruginosa*-Stämme PAML1 (*dsbA*-), PATE1 (*dsbC*-), PAAU3 (*dsbA-C*-) und der Positivkontrolle PAO1 (WT) mit jeweils dem *estA*-Überexpressionsplasmids pBBX+ und der entsprechenden Leervektorkontrolle pBBR1MCS (LV) wurden die Kulturen mit einer vergleichbaren O.D. 580 nm in einen Esteraseaktivitätstest (2.35.1.1) eingesetzt. Die ermittelten extrazelluläre Esteraseaktivitäten wurden miteinander verglichen. Parallel erfolgte ein immunologischer Nachweis (2.28) von den äußeren Membranfraktionen der identischen Kulturen durch den spezifischen Antikörper gegen EstA.

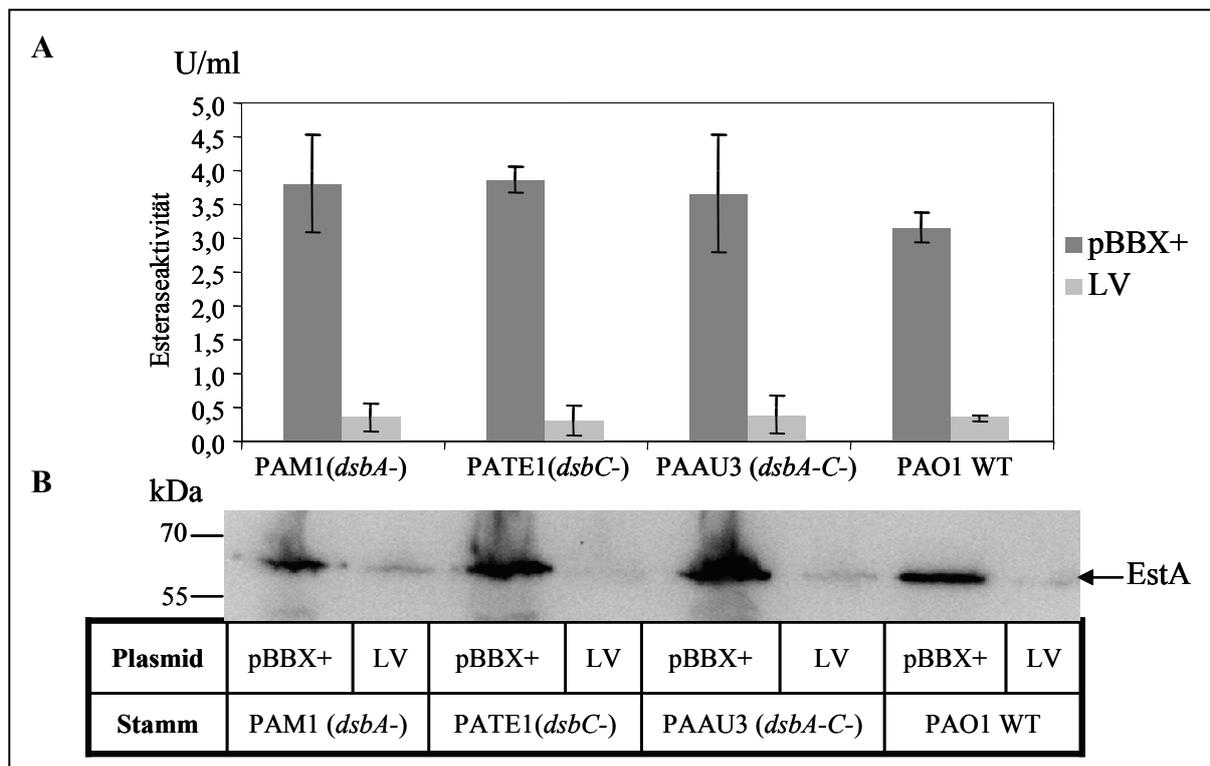


Abb. 3.4: Einfluss von Mutationen im Dsb-System auf die Esteraseaktivität und die Sekretion in verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen. (A) Esteraseaktivitätstests der Zellen der unterschiedlichen *P. aeruginosa*-Stämme PAO1 (WT), PAM1(*dsbA*-), PATE1(*dsbC*-) und PAAU3 (*dsbA-C*-) mit plasmidkodierter Esterase EstA (pBBX+) und entsprechender Leervektorkontrolle pBBR1MCS (LV). Die Werte der Aktivitäten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (B) Immunologischer Nachweis mittels anti-EstA-Antikörper (1:85.000) der äußeren Membranfraktion. Es wurden Kulturen mit einer vergleichbaren O.D. 580 nm für die Experimente verwendet.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Esteraseaktivität der Zellen in allen vier Stämmen nicht signifikant voneinander abwich (Abbildung 3.4A). Die extrazelluläre Aktivität der

plasmidkodierten Esterase war im Vergleich zur Leervektorkontrolle sowohl im Wildtyp PAO1 als auch in den Stämmen *P. aeruginosa* PAML1, PATE1 und PAUU3 deutlich gesteigert. Die Esteraseaktivität der Stämme, die den Leervektor trugen, konnte auf die chromosomal kodierte Esterase EstA zurückgeführt werden. Durch den immunologischen Nachweis konnte EstA in der äußeren Membran detektiert werden (Abbildung 3.4B). In den Stämmen, die das Plasmid pBBX+ beinhalten, war die Intensität der Proteinbanden gleich stark, die der Esterase EstA mit einer molekularen Masse von 67 kDa entsprach. Folglich konnten Sekretionsdefizite ausgeschlossen werden. Zudem unterschieden sich nicht die detektierten Proteinbande in den Stämmen mit Leervektorkontrolle, die von der im Chromosom kodierten Esterase stammten. Letztlich hat das Dsb-System von *P. aeruginosa* keinen Einfluss auf den Transport und die extrazelluläre Aktivität von EstA. Aus diesem Grund wird EstA wahrscheinlich ungefalteten und somit in einer inaktiven Konformation der Enzymdomäne über die äußere Membran transportiert.

Das periplasmatische Dsb-System hat keinen Einfluss auf die Sekretion und Proteinfaltung des oberflächenexponierten Autotransporterproteins EstA aus *P. aeruginosa*.

3.2.2 Substitutionen von Cystein durch Serin an Position 258 und 264 haben keinen Einfluss auf die Sekretion und Esteraseaktivität von EstA

Die Disulfidbrückenbildung kann ein Teil der Proteinfaltung, die die Struktur der Proteine stabilisiert, sein. Dies ist besonders für extrazelluläre Proteine wichtig, da sie erhöhten mechanischen und chemischen Belastungen ausgesetzt sind.

Es konnte kein Einfluss des periplasmatischen Dsb-Systems auf die Esterase EstA in *P. aeruginosa* bestätigt werden, somit wird die Passagierdomäne wahrscheinlich ungefalteten durch die β -Pore transportiert. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C258 und C264 spontan durch Oxidation mit Luftsauerstoff an der Zelloberfläche entsteht.

Um die Bedeutung des Cysteinpaares in der Passagierdomäne zu analysieren, erfolgte eine Substitution der Cysteine durch Serine. Diese strukturell ähnliche Aminosäure unterscheidet sich nur durch die Existenz eines Sauerstoffatoms anstatt des Schwefelmoleküls von Cystein (Abbildung 3.5). Folglich sind beide Moleküle fast gleich groß und haben ähnliche

physiologische Eigenschaften, sodass nur eine minimale Strukturveränderung durch die Mutagenese von EstA erwartet wurde (Letley *et al.*, 2006).

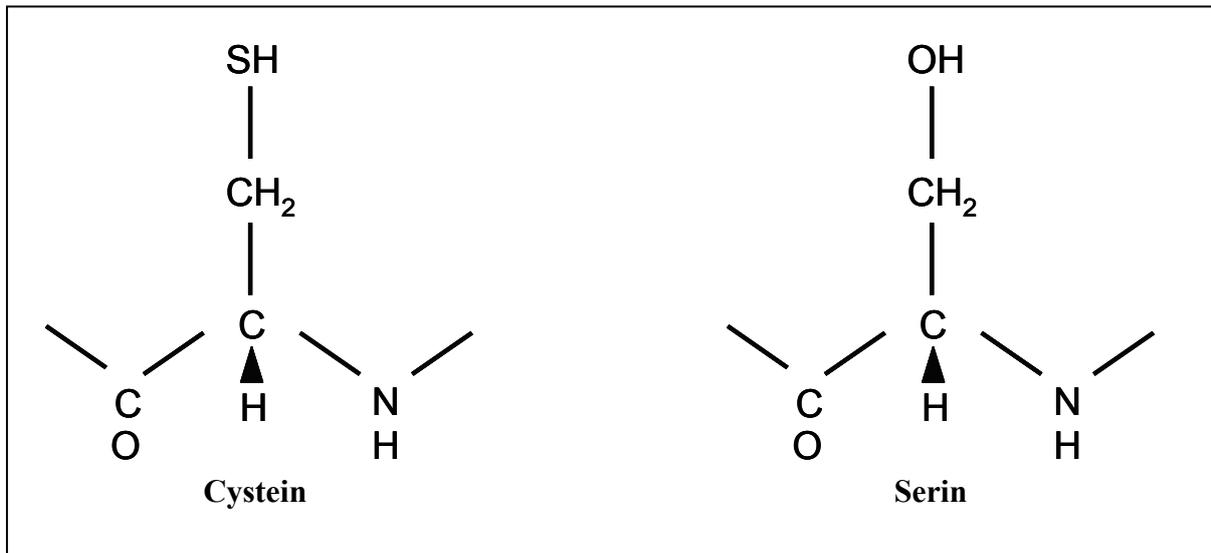


Abb. 3.5: Die Strukturformeln der Aminosäuren Cystein und Serin. Der Unterschied beschränkt sich auf die Existenz eines Schwefelmoleküls bei Cystein (links), das bei Serin (rechts) durch ein Sauerstoffatom ersetzt ist.

Mittels *overlap extension*-PCR (2.14.2) wurde die für die Aminosäurereste C258 und C264 kodierende Sequenz gerichtet mutagenisiert, sodass stattdessen ein Serin kodierendes Triplet entstand. Neben Mutanten mit einzelnen Substitutionen (C258S und C264S) wurde ebenfalls eine Doppelmutante (CDM) erstellt, bei der anstatt der beiden Cysteinreste sich Serine in der Aminosäuresequenz von EstA befanden. Es wurden die Oligonukleotide *estAC258S up*, *estAC258S down* bzw. *estAC264S up*, *estAC264S down* (Tabelle 2.3), die die jeweiligen einzuführenden Mutationen trugen, zusammen mit dem entsprechenden flankierenden Oligonukleotid *estA up* bzw. *estA down* in eine PCR-Reaktion (2.14.1) eingesetzt, um die Mutationen in das Gen *estA* zu inserieren. Als DNA-Matrize diente das Plasmid pBBX+, welches das Gen der Esterase EstA trägt. Die resultierenden mutagenisierten DNA-Fragmente wurden gereinigt und jeweils beide Produkte einer Mutation in eine weitere PCR-Reaktion zusammen mit den Oligonukleotiden *estA up* bzw. *estA down* eingesetzt, um die vollständigen Genfragmente mit der erwünschten Substitution zu amplifizieren. Im Anschluss wurden die mutagenisierten DNA-Produkte analog zum Vektor pBBX+ kloniert, der das *estA*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors trägt, um eine moderate, konstitutive Expression gewährleisten zu können. Durch Hydrolyse des Plasmids pBBX+ und der PCR-Produkte mit der Restriktionsendonuklease *MluI* erfolgte ein Austausch der Wildtypsequenz von *estA* durch die Fragmente, die sich durch die Mutationen auszeichneten. Die resultierenden Vektoren pBBXC258S, pBBXC264S und pBBXCDM sowie die Positivkontrolle pBBX+ und der

entsprechende Leervektor pBBR1MCS wurden durch Konjugation (2.13) in den *estA*-defizienten *P. aeruginosa*-Stamm PASCHI übertragen, in dem eine Hintergrundaktivität durch die chromosomal kodierte Esterase ausgeschlossen werden konnte.

Es wurden Einzelkolonien der unterschiedlichen Stämme auf Tributyrinplatten übertragen und deren Esteraseaktivität durch Bildung klarer Höfe um die Bakterienkolonie herum verifiziert (Abbildung 3.6A). Parallel dazu wurden Aktivitätstests (2.35.1.1) mit Flüssigkulturen der gleichen Stämme zur Bestimmung der extrazellulären Esteraseaktivität durchgeführt (Abbildung 3.6B). Zusätzlich dienten diese Proben zur Präparation der Membranfraktionen und einen darauffolgenden immunologischen Nachweis der Esterase EstA zur Lokalisation in der äußeren Membran (Abbildung 3.6C).

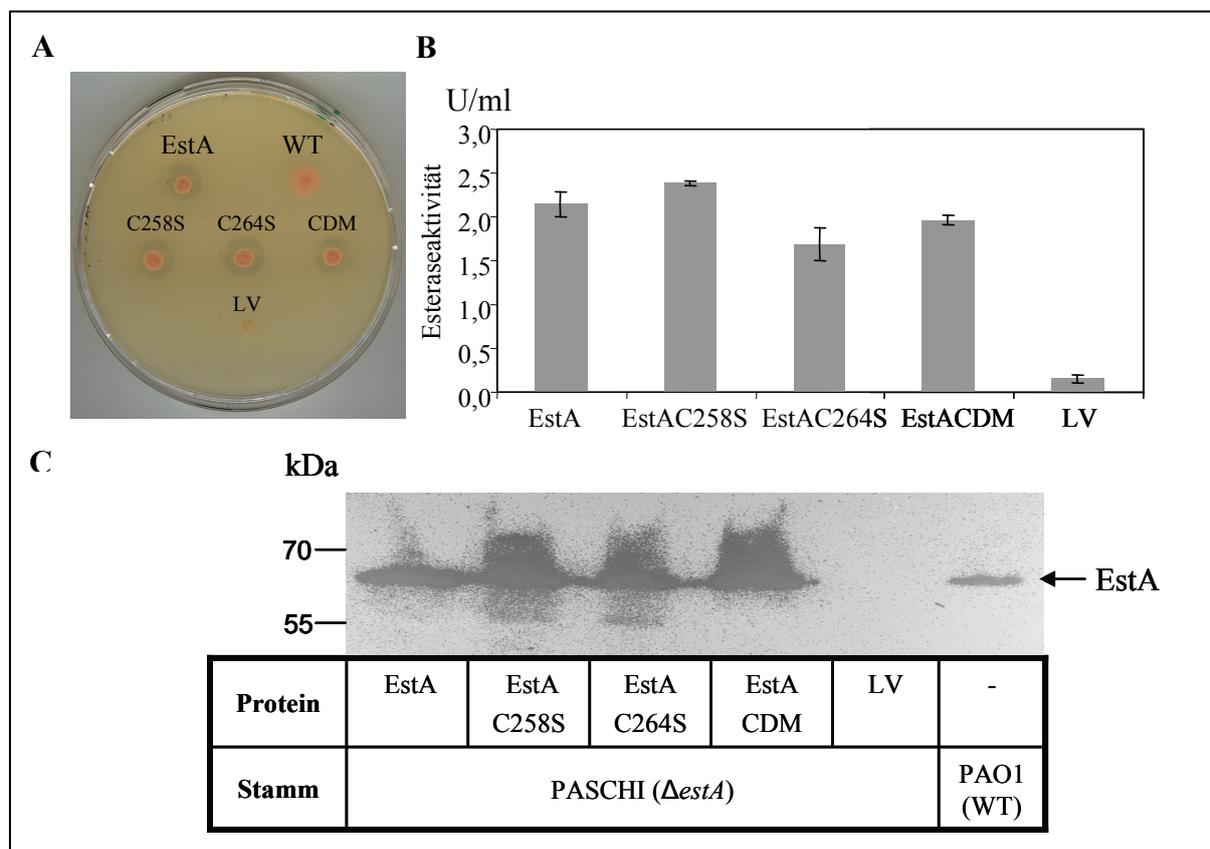


Abb. 3.6: Bestimmung der esterolytischen Aktivität und immunologischer Nachweis der EstA-Varianten in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* PASCHI. (A) Nachweis der lipolytischen Aktivität mittels Tributyrinplatten. Die Größe der gebildeten Höfe um die Bakterienkolonie wurde durch drei voneinander unabhängige Kultivierungen bestätigt. (B) Bestimmung der extrazellulären Esteraseaktivität mit ganzen Zellen von Flüssigkulturen mit einer vergleichbaren O.D. 580 nm = 15 mit dem Substrat *p*-NPC. Die Enzymaktivitäten sind in U/ml angegeben und entsprechen den Mittelwerten von je drei voneinander unabhängigen Messungen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben. (C) Immunologischer Nachweis der EstA-Varianten in der äußeren Membranfraktion. Die aufgetragenen Volumina der Proben sind auf gleiche Zelldichte bezogen O.D. 580 nm = 5.

Die Hofbildung um die Bakterienkolonien auf Tributyrinagar war bei allen *P. aeruginosa*-Stämmen, abgesehen von der Leervektorkontrolle und dem Wildtyp, vergleichbar. Dies ließ eine gleiche lipolytische Aktivität von EstA, EstAC258S, EstAC264S und der Doppelmutante EstACDM vermuten. Ebenso konnten anhand des photometrischen Aktivitätstests keine signifikanten Abweichungen der EstA-Varianten bezüglich der Esteraseaktivität auf der Zelloberfläche von *P. aeruginosa* PASCHI festgestellt werden. Durch den immunologischen Nachweis der Esterase wurden gleiche Proteinkonzentrationen in der äußeren Membranfraktion lokalisiert. Die Ergebnisse belegten, dass die charakteristischen Cysteine die Translokation und extrazelluläre Aktivität von EstA nach einer Expression in dem *estA*-defizienten Stamm PASCHI nicht beeinflussten.

Die Substitutionen C258S und C264S beeinflussen weder die Sekretion noch behindern sie die Proteinfaltung von EstA in eine enzymatisch aktive Konformation auf der Zelloberfläche von <i>P. aeruginosa</i> .
--

3.2.3 *In vivo*-Untersuchungen potenzieller Disulfidbrücken der Esterase EstA in *P. aeruginosa*

Obwohl offensichtlich das Cysteinpaar, das ein charakteristisches Merkmal der katalytischen Domäne vieler Autotransporterproteine ist, keine essenzielle Bedeutung für EstA bezüglich der Sekretion und Enzymaktivität in *P. aeruginosa* hat, konnte noch nicht geklärt werden, ob eine Disulfidbrücke in EstA ausgebildet wird. Dazu sollte *in vivo* die Existenz möglicher Disulfidbrücken untersucht werden, indem mittels 2D-SDS-PAGE das Laufverhalten des Wildtyps EstA mit dem der Doppelmutante EstACDM unter nicht-reduzierender/reduzierender-Bedingungen verglichen wurde.

Die *estA*-defizienten *P. aeruginosa*-Stämme, PASCHI pBBEstACDM und PASCHI pBBX+, wurden ü.N. bei 37 °C in dem cysteinfreien Nährmedium M9 (2.4) kultiviert. Es erfolgte eine Membranpräparation (2.19) der Kulturen mit einer vergleichbaren O.D. 580 nm unter Zusatz von Iodoacetamid, das freie Thiolgruppen in Proteinen spezifisch alkyliert. Dadurch wurden potenzielle Disulfidbrücken vor Resolubilisierung durch eventuell entstehende Reduktionsmittel wie Gluthation, Thio- oder Glutaredoxine, die eigentlich *in vivo* die Bildung von Disulfidbrücken verhindern, geschützt. Durch eine 2D-SDS-PAGE (2.27) können Disulfidbrücken im Protein *in vivo* detektiert werden. Nach dem Färben können die Proteine anhand ihres Laufverhaltens in einem Polyacrylamidgel in drei Kategorien eingeteilt werden. Die Proteine ohne Disulfidbrücken befinden sich auf einer Geraden, da ihr Laufverhalten sowohl unter nicht-reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen identisch ist. Die Proteine unter der diagonalen Linie sind Oligomere, die durch intermolekulare Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden sind. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen verhalten sich diese Proteine als Oligomere mit einem Molekulargewicht des reduzierten Monomers. Die Proteine, die sich durch intramolekulare Disulfidbrücken auszeichnen, sind oberhalb der Diagonalen lokalisiert, da sie durch eine kompakte Konformation schneller unter nicht-reduzierenden als unter reduzierenden Bedingungen durch das Gel wandern. Eine spezifische Identifizierung der Esterasen in einer SDS-PAGE erfolgte durch Visualisierung mit Hilfe eines Zymogramms (2.35.1.5).

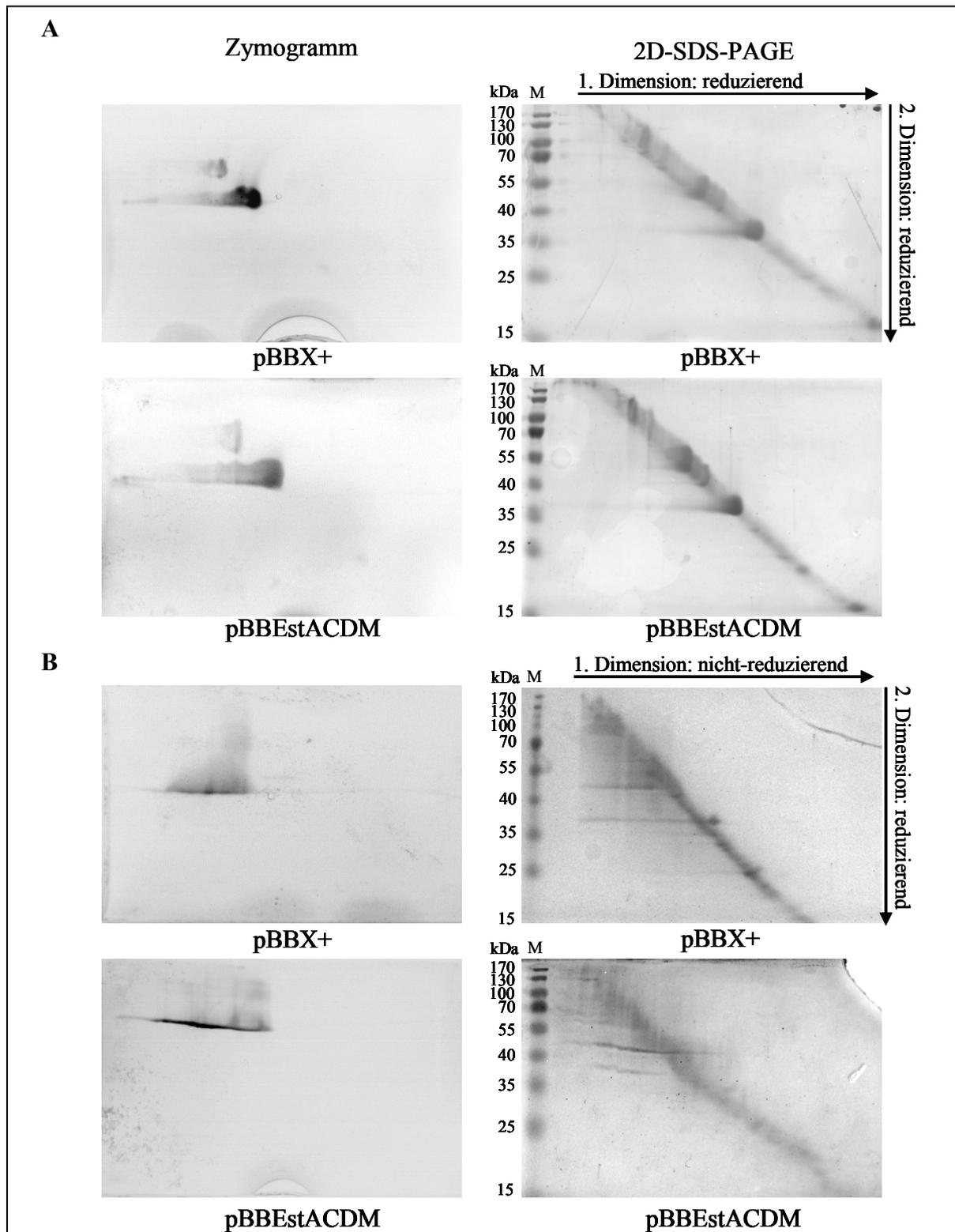


Abb. 3.7: Nachweis einer potenziellen Disulfidbrücke der Esterase EstA in *P. aeruginosa* PASCHI mittels Zymogramm nach 2D-SDS-PAGE. (A) Beide Dimensionen der 2D-SDS-PAGE wurden zur Kontrolle unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. (B) Die erste Dimension erfolgte unter nicht-reduzierenden- und die zweite Dimension unter reduzierenden Bedingungen. Nach Kultivierung von *P. aeruginosa* PASCHI mit dem Plasmid pBBX+ bzw. pBBEstACDM in M9-Medium erfolgte die Membranpräparation der Zellen mit einer vergleichbaren O.D. 580 nm = 5. Nach Visualisierung der Esteraseaktivität im Zymogramm (links) durch das unter UV-Licht fluoreszierende Substrat Methylumbelliferyl-Butyrat wurden die 2D-SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (rechts). M: Marker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas).

Die Ergebnisse zeigten, dass beide Esterasen, EstA und EstACDM, unter reduzierten Bedingungen auf der Geraden lokalisiert sind (Abbildung 3.7A). Wenn die erste Dimension unter nicht-reduzierenden und die zweite Dimension unter reduzierenden Bedingungen erfolgte (Abbildung 3.7B), konnten die Esterasen durch ihre Aktivität im Zymogramm unterhalb der Geraden visualisiert werden. Dieses Verhalten konnte nicht auf potenzielle Disulfidbrücken zurückgeführt werden, da EstA und die Doppelmutante EstACDM ein vergleichbares Signal zeigten und die Doppelmutante keine Disulfidbrücke ausbilden kann.

Es konnte unter den gewählten Bedingungen keine Disulfidbrückenbildung zwischen den Cysteinen C258 und C264 in dem Autotransporterprotein EstA in *P. aeruginosa* festgestellt werden.

3.2.4 Der Einfluss der Substitutionen C258S und C264S auf die *in vitro*-Faltung und Enzymaktivität von EstA

Offensichtlich wird durch den Verlust der Cysteine in der Passagierdomäne die Sekretion und Proteinfaltung von EstA auf der Zelloberfläche nicht signifikant beeinträchtigt. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass die Cysteine an der Proteinfaltung beteiligt sind und die aktive Konformation des Enzyms stabilisieren. Für Experimente zur Proteinstabilität sollten die Gene, die für die EstA-Varianten kodieren, analog zu pETEstA unter der Kontrolle des T7-Promotors kloniert werden. Dadurch war eine heterologe Überexpression in dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3), der eine chromosomal kodierte T7-Polymerase trägt, gewährleistet. Dazu wurden die Gene jeweils mit den spezifischen Oligonukleotiden *estA NdeI* up und *estA XhoI* down (Tabelle 2.3) in einer Standard-PCR-Reaktion (2.14.1) amplifiziert. Als DNA-Matrize dienten die Plasmide pBBXC258S, pBBXC264S und pBBXCDM. Nach einer *NdeI/XhoI*-Hydrolyse der PCR-Produkte und des Zielvektors pET22b+ folgte jeweils eine Ligation. Daraufhin wurde *E. coli* BL21 (DE3) mit den resultierenden Konstrukten pETEstAC258S, pETEstAC264S und pETEstACDM und der Positivkontrolle pETEstA transformiert (2.12). Die Überexpression wurde mittels SDS-PAGE (2.26) überprüft (Abbildung 3.8). Bei dieser Expression kam es zur Bildung zellulärer Aggregate der Esterase.

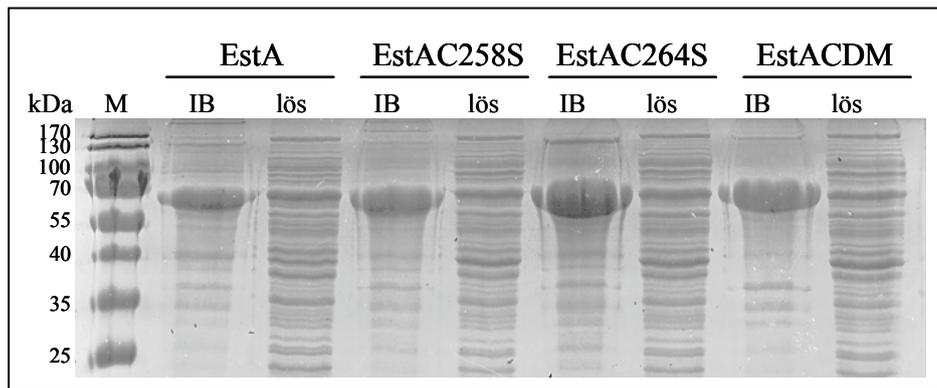


Abb. 3.8: SDS-PAGE zur Analyse der Esterasen EstA, EstAC258S, EstAC264S und EstACDM nach der Überexpression unter der Kontrolle des T7-Promotors in *E. coli* BL21 (DE3). Nach Überexpression mit den Plasmiden pETEstA, pETEstAC258S, pETEstAC264S und pETEstACDM wurde die lösliche Fraktion (lös) von den *inclusion bodies* (IB) getrennt. Die aufgetragenen Volumina der Proben entsprachen einer äquivalenten Zelldichte (O.D. 580 nm = 0,15). Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde die Trenngel (12 %) mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. M: Marker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas).

Diese ungefalteten Proteinaggregate werden *inclusion bodies* genannt und erforderten nach einer chemischen Denaturierung durch Harnstoff eine *in vitro*-Faltung, um das Protein in eine enzymatisch aktive Form zu überführen. Bei einer Faltung von Proteinen, die Disulfidbrücken enthalten, muss deren korrekte Ausbildung garantiert werden, damit eine native Konformation erreicht wird. Die Bildung von Cysteinbrücken verläuft reversibel über Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen. Das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) dient dazu, Disulfidbrücken, darunter auch willkürlich ausgebildete, wieder zu lösen. Um den Effekt von DTT während der Proteinfaltung auf EstA und die mutagenisierten Varianten der Esterase zu überprüfen, wurde die *in vitro*-Renaturierung sowohl ohne als auch mit Zusatz von DTT 3 h bei RT durchgeführt. Mögliche Einflüsse auf die Proteinfaltung wurden durch die resultierende spezifische Esteraseaktivität (2.35.1.1) ermittelt.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.9 zeigen, dass der Einsatz von DTT bei der *in vitro*-Faltung die Esteraseaktivität von EstA und der Einzelmutanten EstAC258S und EstAC264S beeinträchtigt. Hingegen konnte bei der Doppelmutante, die kein Cystein in der Passagierdomäne mehr besaß, nach der *in vitro*-Faltung sowohl mit als auch ohne DTT eine gleiche spezifische Aktivität gemessen werden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die spezifischen Aktivitäten der Varianten von EstA im Vergleich zum Wildtypprotein signifikant vermindert waren. Dies kann ein Hinweis auf mögliche strukturelle Fehlfaltungen durch die Modifikationen der Aminosäuresequenz von EstA sein.

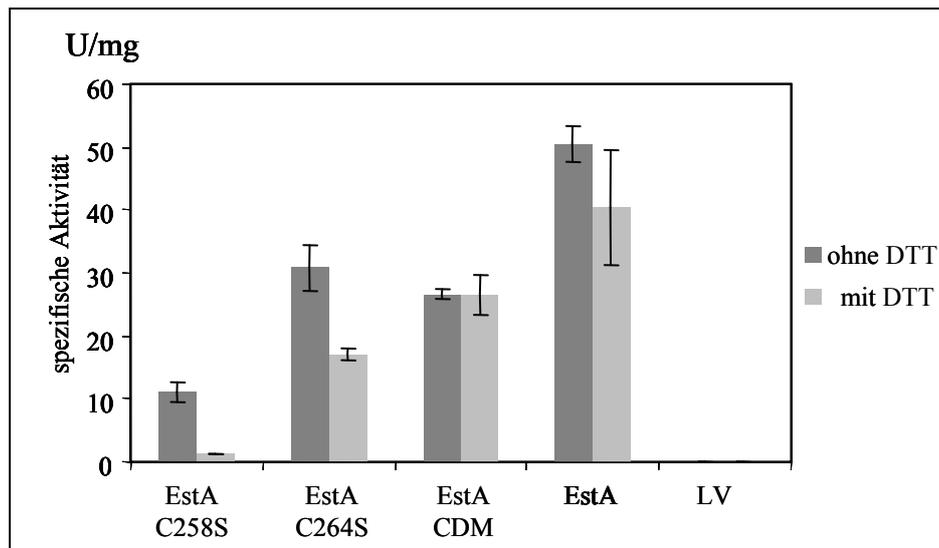


Abb. 3.9: Einfluss von Dithiothreitol (DTT) bei der *in vitro*-Faltung auf die spezifische Esteraseaktivität der Esterase EstA und den Varianten EstAC258S, EstAC264S und EstACDM. Nach Renaturierung der gereinigten *inclusion bodies* von EstA, EstAC258S, EstAC264S und EstACDM mit und ohne Einsatz von 10 nmol DTT für 3 h bei RT, erfolgte ein Esteraseaktivitätstest. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Test ermittelt. Die Esteraseaktivität ist in U/mg angegeben. Die Mittelwerte entsprechen den Werten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Die Esterase EstA ist sehr temperaturunempfindlich, wofür die Stabilität der Transportdomäne vermutlich mitverantwortlich ist. Dies unterstützten auftretende Doppelbanden des Proteins nach einer SDS-PAGE, die bereits als Merkmal von Autotransportern beschrieben worden sind und ein Hinweis für eine unvollständige Denaturierung des Proteins sind (Oomen *et al.*, 2004; Shiell *et al.*, 2007). Wie bereits erwähnt, ist für extrazelluläre Proteine durch ihre erhöhte chemische Belastung diese Strukturstabilität von Vorteil, die durchaus von Disulfidbrücken gestärkt werden kann. Deshalb wurde die Aktivität der Wildtypesterase EstA im Vergleich zu den Varianten EstAC258S, EstAC264S und EstACDM nach thermischer Inaktivierung bei 90 °C analysiert. Dazu wurden die enzymatisch aktiven Proteine nach der *in vitro*-Faltung in unterschiedlichen Zeitintervallen bei 90 °C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt, um im Anschluss die Enzymaktivität durch einen Aktivitätstest (2.35.1.1) zu bestimmen. Die abfallenden Aktivitäten sind prozentual in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 90 °C angegeben. Die Proben ohne thermische Einflüsse entsprechen 100 %. Es sollte berücksichtigt werden, dass die Proteine während der Inkubationszeit des Aktivitätstests nach der thermischen Denaturierung wieder renaturieren können.

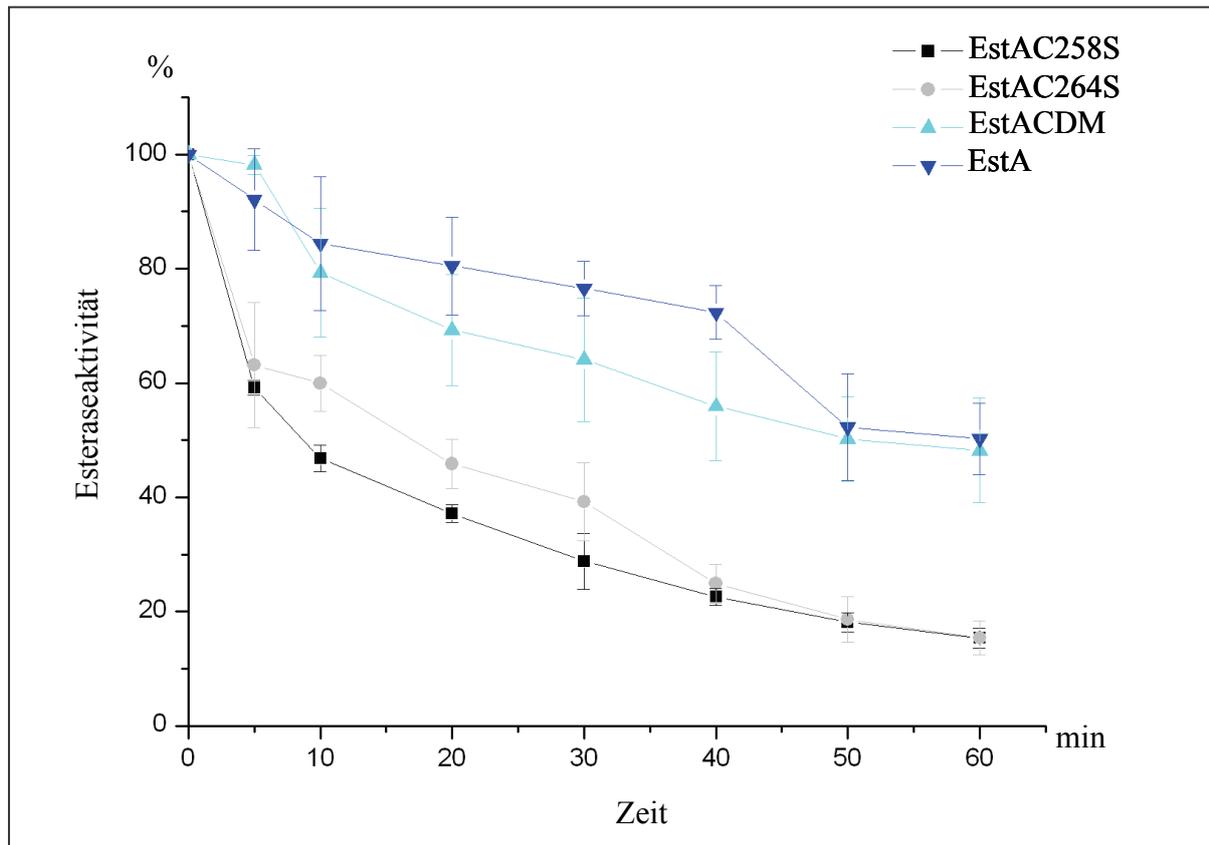


Abb. 3.10: Esteraseaktivität nach thermischer Inaktivierung von EstA und den Varianten EstAC258S, EstAC264S und EstACDM. Das Diagramm zeigt den Einfluss auf die Esteraseaktivität der thermischen Denaturierung bei 90 °C. Nach Überexpression von *estA*, *estAC258S*, *estAC264S* und *estACDM* in BL21 (DE3) wurden die gereinigten *inclusion bodies* mit 8 M Harnstoff denaturiert und im Anschluss 3 h bei RT renaturiert. Die Proteinproben wurden in verschiedenen Zeitintervallen bei 90 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und die relative Esteraseaktivität direkt bei einer Absorption mit einer Wellenlänge von 410 nm bestimmt. Im Diagramm ist die verbleibende lipolytische Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei 90 °C in Prozent dargestellt, wobei die jeweilige unbehandelte Probe 100 % entspricht. Zu sehen sind die Mittelwerte aus vier voneinander unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung. Die Standardabweichung entspricht den Fehlerbalken.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei den Einzelmutanten EstAC258S und EstAC264S nach fünfminütiger Inkubation bei 90 °C eine Esteraseaktivität von 60 % in Relation zu den Kontrollproteinen, bei denen keine thermische Denaturierung erfolgte, gemessen wurde. Hingegen konnte bei EstA und der Doppelmutante EstACDM 90 % der Aktivität ermittelt werden. Nach 1 h thermischer Inaktivierung verblieb den Einzelmutanten weniger als 20 % ihrer lipolytischen Aktivität. Es wurde beobachtet, dass die Doppelmutante zwar mit steigender Inkubationszeit ihre Aktivität schneller verringerte, dennoch besaßen sowohl EstA als auch EstACDM nach 1 h noch 50 % von der Aktivität im Vergleich zu den Proteinen, die nicht bei 90 °C inkubiert wurden.

Die Cysteine an Position 258 und 264 sind vermutlich an der *in vitro*-Faltung des Autotransporters EstA beteiligt und unterstützen die Proteinfaltung. Dennoch sind die Cysteine nicht essenziell für eine enzymatisch aktive Konformation.

3.3 Die Esterase EstP aus *P. putida* KT2440 ist das erste charakterisierte Autotransporterprotein eines nicht-pathogenen Bakteriums

Während *P. aeruginosa* ein opportunistischer, fakultativ humanpathogener Krankheitserreger ist, wird *P. putida* KT2440 als biologisch sicher eingestuft und als G.R.A.S. (*generally regarded as safe*)-Organismus bezeichnet. Dennoch weist das Genom von *P. putida* eine Homologie von 85 % der offenen Leserahmen zu denen von *P. aeruginosa* auf (Nelson *et al.*, 2002).

Alle bisher beschriebenen Autotransporterproteine stammen aus pathogenen Gram-negativen Bakterien und sind an der Virulenz der jeweiligen Organismen in unterschiedlicher Weise beteiligt. Allerdings konnte anhand von Homologievergleichen das Autotransporterprotein EstP aus *P. putida* KT2440 identifiziert werden, das durch den offenen Leserahmen PP0418 kodiert wird. Die Esterase EstP gehört zur GDSL-Familie der lipolytischen Enzyme mit einer unbekannter physiologischen Funktion (Schell, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde EstP aus *P. putida* KT2440 charakterisiert, um die Funktion eines Autotransporters in einem avirulenten Stamm zu analysieren.

3.3.1 Die lipolytische Aktivität der Esterase EstP im homologen Wirt *P. putida* KT2440

Da die Esterase EstP bereits als Mitglied der GDSL-Hydrolasen klassifiziert wurde (Schell, 2005), sollte es ein lipolytisches Enzym darstellen, welches bevorzugt kurzkettige Glycerinester von Fettsäuren hydrolysiert. Um EstP zu charakterisieren und die Funktion zu überprüfen, sollte zunächst die Expression von *estP* mit Hilfe der charakteristischen lipolytischen Aktivität im Wildtyp *P. putida* KT2440 analysiert werden. Die Überexpression mit dem Plasmid pBBREstP, bei dem das *estP*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors steht, sollte mit der Leervektorkontrolle im selben Stamm verglichen werden. Da vermutet wurde, dass die katalytische Passagierdomäne des postulierten Autotransporterproteins auf der Zelloberfläche exponiert wird, erfolgten die Aktivitätstests mit dem standardisierten Substrat *p*-Nirophenyl-Caproat (*p*-NPC) und ganzen Zellen. Die ermittelte extrazelluläre Esteraseaktivität (2.35.1.1) des Wildtyps betrug 0,23 U/ml und entsprach der ermittelten Aktivität der Zellen, die den Leervektor beinhalten. Eine deutliche Steigerung der esterolytischen Aktivität erbrachte die *estP*-Überexpression in *P. putida* KT2440 von 1,49 U/ml (Abbildung 3.11A). Die Esteraseaktivität war auffallend gering im Wildtyp *P. putida* KT2440, sodass eventuelle Hintergrundaktivitäten durch andere lipolytische Enzyme berücksichtigt werden mussten. Folglich wurde noch ein weiterer Nachweis

durchgeführt, bei dem die Esterase EstP sowohl anhand der lipolytischen Aktivität als auch durch ihre kalkulierte molekulare Größe identifiziert werden konnte. Zur Visualisierung der Aktivität der Esterase wurde ein Zymogramm gel hergestellt, mit dem die Proteine der Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend im Gel renaturiert wurden (2.35.1.5). Durch Überschichtung des SDS-Gels mit dem Esterasesubstrat Methylumbelliferyl-Butyrat, das nach hydrolytischer Spaltung unter UV-Licht fluoresziert, konnte EstP sowohl anhand seiner molekularen Größe von 64 kDa als auch durch Esteraseaktivität identifiziert werden.

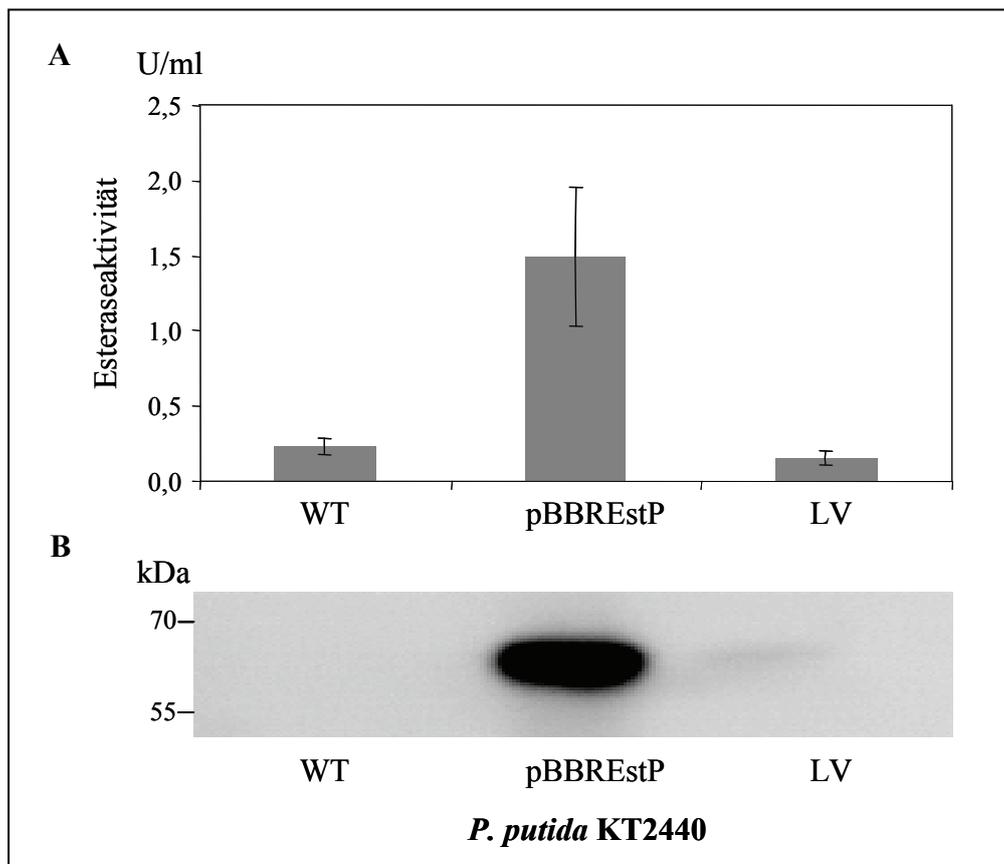


Abb. 3.11: Die Esteraseaktivität von EstP in *P. putida* KT2440. (A) Esteraseaktivitätstest (*p*-NPC) der ganzen Zellen des Wildtyps (WT) und *P. putida* KT2440 mit plasmidkodierter Esterase (pBBREstP) gegenüber der Leervektorkontrolle pBBR1MCS (LV). Die Werte der Aktivität sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (B) Zusätzlich wurden die Aktivitäten der Gesamtzellextrakte in einem Zymogramm gel durch das fluoreszierende Substrat Methylumbelliferyl-Butyrat mittels UV-Licht visualisiert.

Dabei wurde deutlich, dass nur Aktivität bei der *estP*-Überexpression *P. putida* KT2440 durch eine leuchtende Bande, die der molekularen Größe von EstP entsprach, auf einer SDS-PAGE sichtbar wurde. In dem Wildtyp-Stamm konnte keine Esteraseaktivität detektiert werden, die auf EstP schließen ließ (Abbildung 3.11B). EstP zeigte keine Esteraseaktivität in

P. putida KT2440 mittels Zymogrammigel. Entweder wurden nur geringe Proteinmengen exprimiert, oder dieser Nachweis für die Esteraseaktivität von EstP in *P. putida* KT2440 ist nicht sensitiv genug. Vielleicht erfolgte sogar gar keine Expression des Autotransporterproteins EstP in *P. putida* KT2440. Dies würde die Annahme stützen, dass Autotransporterproteine nur in pathogenen Organismen eine physiologische Aufgabe übernehmen.

3.3.2 Untersuchung der Transkription des Autotransporterproteins EstP in *P. putida* KT2440

Das Autotransporterprotein EstP konnte nicht eindeutig physiologisch in *P. putida* KT2440 durch Esteraseaktivität nachgewiesen werden. Somit stellte sich die Frage, ob die Aktivität von EstP nur sehr gering ist, oder es sogar keine gibt. Dafür wurde zunächst überprüft, ob *estP* überhaupt im homologen Wirt transkribiert wurde. Dazu sollte das Transkript des *estP*-Gens durch RT-PCR nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle diente *P. putida* KT2440, der das *estP*-Expressionsplasmid trug. Parallel wurde der entsprechende Leervektor pBBR1MCS äquivalent behandelt. Als Positivkontrolle diente *rpoD*, ein sogenanntes *house keeping*-Gen, das konstitutiv von *P. putida* KT2440 exprimiert wird. Des Weiteren wurden alle Ansätze zusätzlich ohne reverse Transkriptase als Negativkontrollen in die RT-PCR eingesetzt. Um die Transkription quantifizieren zu können, wurden die Stämme bei 30 °C kultiviert, bis sie eine O.D. 580 nm von 0,9 erreichten. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus diesen Stämmen isoliert (2.7) und die jeweilige mRNA unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotide *P.p estP* down für *estP* bzw. *P.p. rpoD* down für das *rpoD*-Gen (Tabelle 2.3) durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in einer RT-PCR nachgewiesen. Für die Amplifizierung wurden neben den bereits für die cDNA-Synthese verwendeten Oligonukleotiden zusätzlich die Oligonukleotide *P.p. estP* up (*estP*) und *P.p. rpoD* up (*rpoD*) (Tabelle 2.3) benötigt. Die Auswahl der Oligonukleotidpaare erfolgte so, dass im Falle von *estP* ein 107 bp großes Fragment und bei *rpoD* ein 85 bp großes Fragment amplifiziert wurde. Während der einzelnen Zyklen wurden die PCR-Produkte durch den Farbstoff SYBER-*Green* detektiert, der nur an doppelsträngige DNA bindet und dabei fluoresziert. Indem die jeweiligen PCR-Produkte mit Hilfe von Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, konnten spezifische PCR-Produkte von *estP* und *rpoD* anhand ihrer Größe, abgesehen von den Proben ohne reverse Transkriptase, in jeder Probe identifiziert werden (Abbildung 3.12A+B). Da in den entsprechenden Negativkontrollen keine DNA detektiert werden konnte, wurde sichergestellt, dass keine Verunreinigungen mit genomischer DNA vorlagen.

Durch Transkriptanalyse mittels Agarosegelen (2.10) ist es nicht möglich, die RNA-Menge der unterschiedlichen Proben zu verifizieren. Für eine Quantifizierung der Transkriptmenge wurde die Fluoreszenz der einzelnen Proben durch SYBER-Green detektiert und mit Hilfe des Programms „realplex“ (Eppendorf) analysiert. Die Ergebnisse der relativen Transkriptmenge beziehen sich auf 500 ng Gesamt-RNA. Es konnte im Wildtyp 0,6 pg und eine ähnliche Menge RNA im Wildtyp mit Leervektorkontrolle von 0,3 pg ermittelt werden. Währenddessen nahm die Transkription bei der *estP*-Überexpression in *P. putida* KT2440 um mehr als ein 10-faches mit 6,6 pg RNA zu (Abbildung 3.12 C).

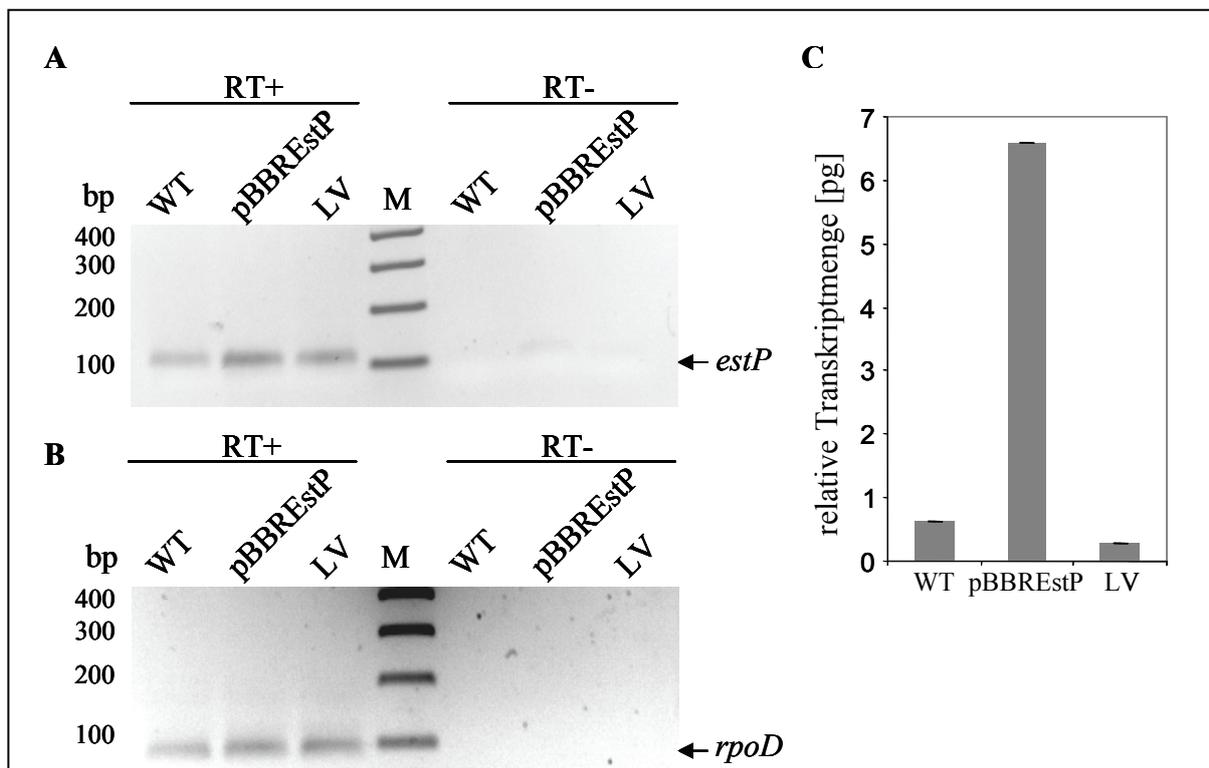


Abb. 3.12: Nachweis des Transkriptes von *estP* in *P. putida* KT2440. Die in einer RT-PCR amplifizierte PCR-Fragmente von *estP* (A) und *rpoD* (B) konnten durch Agarosegele (2 %) identifiziert werden. Dabei entsprach *estP* einer Größe von 107 bp und *rpoD* von 85 bp. Bei den Negativkontrollen ohne Einsatz der reversen Transkriptase konnte keine DNA detektiert werden. Die relative Transkriptmenge, ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA, wurde durch das „realplex“-Programm (Eppendorf) ermittelt (C). Dargestellt ist die relative Transkriptmenge von *estP* in pg, ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA. Es konnte in allen Stämmen Transkript nachgewiesen werden, wobei die Überexpression im Wildtyp deutlich mehr *estP* exprimiert. Die Werte der relativen Transkriptmenge sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (RT+): mit Reverser Transkriptase; (RT-): ohne Reverse Transkriptase; bp: Basenpaare; M: Marker „GeneRuler™ 100bp Plus“ (Fermentas); LV: Leervektor (pBBR1MCS); WT: Wildtyp.

Es konnte deutlich Transkript von *estP* in *P. putida* KT2440 nachgewiesen werden. Um Hinweise zu bekommen, zu welchem Zeitpunkt des Wachstums die Transkription von *estP* in *P. putida* KT2440 erfolgte, wurde eine transkriptionale Reportergenfusion konstruiert und

Expressionsstudien in Abhängigkeit der Zelldichte durchgeführt. Zur Erstellung der episomalen Reporterfusion diente der Vektor pTZ110, der das *lacZ*-Gen promotorlos kodiert. Dafür wurde ein 700 pb großes DNA-Fragment der Stromaufwärts-Region des *estP*-Gens bis zum Translationsstartpunkt mit dem *lacZ*-Gen fusioniert. Dieser neu entstandene Vektor wurde mit pTZP bezeichnet und durch Konjugation (2.13) in den Wildtyp *P. putida* KT2440 eingebracht. Der Leervektor pTZ110 wurde äquivalent behandelt, um die Hintergrundaktivität des promotorlosen *lacZ*-kodierenden Vektors zu berücksichtigen. Die intrazelluläre β -Galaktosidaseaktivität ist ein Maß der *estP*-Promotoraktivität und somit für die Transkription, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wachstumskurve bestimmt wurde (Abbildung 3.13).

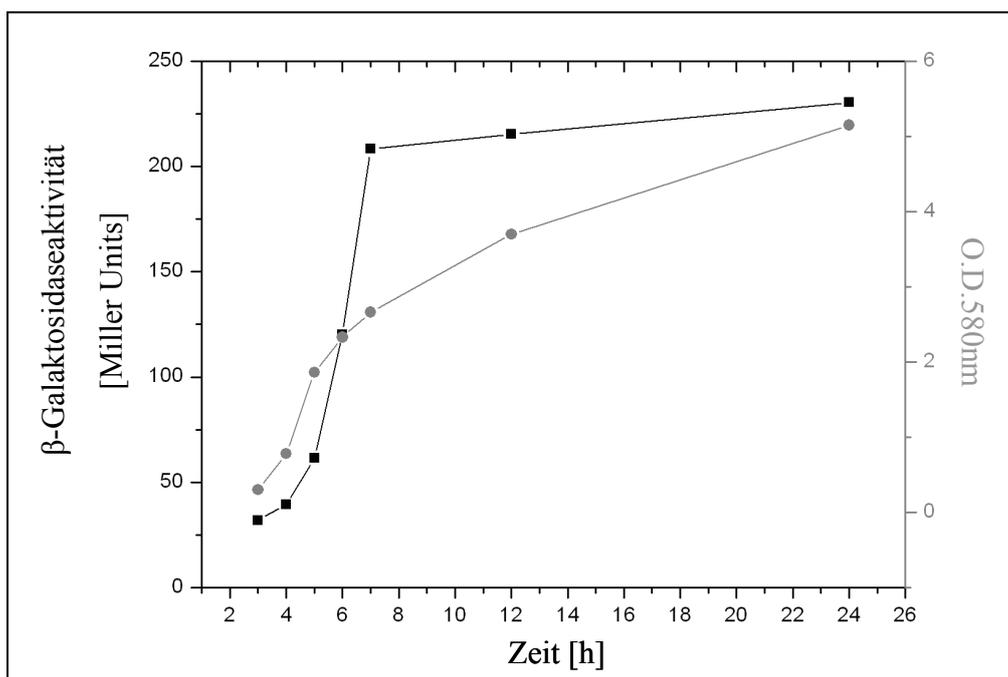


Abb. 3.13: Expression von *estP* in *P. putida* KT2440 in Abhängigkeit des Wachstums. Die dargestellte β -Galaktosidaseaktivität entspricht der Differenz der Werte der episomalen transkriptionalen *estP::lacZ*-Fusion (pTZP) und der Hintergrundaktivität des Leervektors (pTZ110) im Wildtypstamm *P. putida* KT2440. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium bei 30 °C. Die Zelldichte (O.D. 580 nm) und die β -Galaktosidaseaktivität [Miller Units] wurden in je drei unabhängigen Experimenten bestimmt und als Mittelwert dargestellt.

Nach 24 h wurde ein Maximum der β -Galaktosidaseaktivität von 230 Miller Units bestimmt. Allerdings stieg die Aktivität signifikant innerhalb der sechsten und siebten Stunde der Wachstumsphase von 130 auf 208 Miller Units an, während nur noch eine geringe Zunahme auf 215 Miller Units nach 12 h gemessen wurde. Folglich ist die stärkste Transkription, ausgehend von diesem Promotor, in der späten logarithmischen Wachstumsphase von *P. putida* KT2440 zu beobachten. Die Promotoraktivität steigerte sich mit zunehmender Zellzahl, was sich durch eine vermehrte β -Galaktosidaseaktivität äußerte.

Die Esteraseaktivität von EstP in *P. putida* KT2440 ist gering. Die Transkription des Gens dieses Autotransporterproteins konnte während der späten logarithmischen Wachstumsphase in *P. putida* KT2440 nachgewiesen werden. Durch eine Reporterfusion konnte eine steigende Promotoraktivität mit einer zunehmenden Zellzahl assoziiert werden.

3.3.3 EstP ist in der äußeren Membran von *P. putida* KT2440 lokalisiert

Obwohl EstP kaum zellgebundene esterolytische Aktivität in *P. putida* KT2440 zeigte, konnte das Transkript des postulierten Autotransporterproteins nachgewiesen werden. Während die C-terminale Domäne bei allen bisher beschriebenen Autotransporterproteinen wegen ihrer Transportfunktion durch die äußere Membran weitgehend konserviert ist, sind die N-terminalen Domänen dieser Familie äußerst heterogen, was auf eine physiologische Vielfalt schließen lässt. Die meisten Passagierdomänen werden auf der Zelloberfläche proteolytisch ins extrazelluläre Medium abgespaltet, alternativ verbleiben einige auch mit der Transportdomäne auf der Oberfläche verankert (Henderson *et al.*, 2004). Es gibt sogar ein Beispiel, bei dem die Passagierdomäne des Autotransporters angeblich ins Periplasma ragt (Talker-Huiber *et al.*, 2003). Durch Sequenzanalysen konnte EstP aus *P. putida* KT2440 bereits der Familie der Autotransporterproteine zugeordnet werden (Schell, 2005). Eine Exposition der katalytischen Domäne von EstP auf der Zelloberfläche konnte bisher nur vermutet werden, da nach *estP*-Überexpression lipolytische Aktivität mit ganzen Zellen gemessen werden konnte.

Um das Protein EstP in *P. putida* KT2440 zu lokalisieren, wurde ein immunologischer Nachweis durchgeführt. Nachdem die Bakterien in LB-Medium ü.N. bei 30 °C kultiviert wurden, erfolgte die Präparation der Zellfraktionen. Dabei wurde in Überstand, Gesamtzellextrakt (2.17), Cytoplasma, Periplasma, Gesamtzellmembran (2.19) und in innere - und äußere Membranfraktion (2.20) unterschieden.

Die Proteine, die in den einzelnen Fraktionen enthalten waren, wurden zunächst durch SDS-PAGE (2.26) ihrer Größe nach aufgetrennt. Danach erfolgte der immunologische Nachweis (2.28) durch Verwendung des spezifischen Antiserums gegen die N-terminale Domäne von EstP (EstP_N) (Abbildung 3.14).

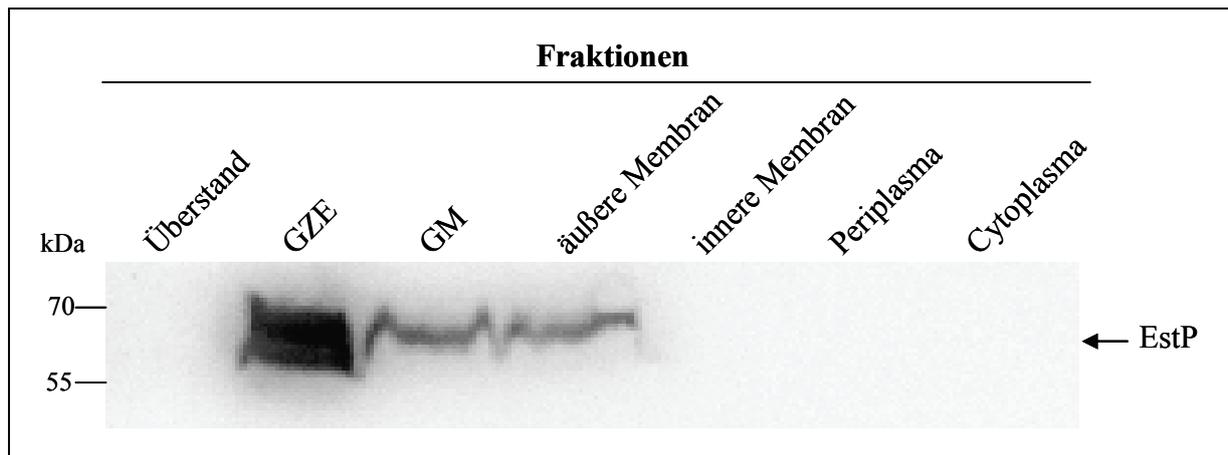


Abb. 3.14: Immunologischer Nachweis von EstP zur Lokalisation in der äußeren Membran von *P. putida* KT2440. Der Wildtypstamm wurde in LB-Medium ü.N. bei 30 °C kultiviert und anschließend fraktioniert. Durch immunologischen Nachweis mit Hilfe des EstP_N spezifischen Antiserums wurden die einzelnen Fraktionen auf die Präsenz von EstP untersucht. Die Fraktionierung der Bakterien erfolgte ausgehend von einer O.D. 580 nm = 5. GZE: Gesamtzellextrakt, GM: Gesamtmembran.

Durch den EstP_N-spezifischen Antikörper konnte eine spezifische Bande von EstP im Gesamtextrakt und in den Fraktionen der Gesamt- und äußeren Membran detektiert werden. Hingegen war kein Signal im Überstand, Cytoplasma, Periplasma oder der inneren Membran zu identifizieren. Daraus ließ sich der Schluss ziehen, dass EstP in der äußeren Membran lokalisiert ist.

3.3.4 Lokalisation der Esterase EstP im heterologen Wirt *E. coli*

Eines der bekannten Display-Systeme zur bakteriellen Zelloberflächenpräsentation stellt die Verwendung monomerer Autotransporterproteine dar. Die Präsentation von Fremdproteinen auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien bietet zahlreiche Anwendungsspektren für biotechnologische Applikationen. Es gibt bisher nur charakterisierte Autotransporterproteine aus pathogenen Organismen, die als Autodisplay-System eingesetzt werden. Da eine Expression im homologen Wirt industriell aufgrund erforderlicher Sicherheitsmaßnahmen zu aufwendig wäre, wird generell der Modellorganismus *E. coli* verwendet (Becker *et al.*, 2005). Folglich sollte überprüft werden, ob EstP auch im heterologen Wirt *E. coli* auf der Zelloberfläche exponiert wird und als Displaysystem eingesetzt werden kann, um heterologe Proteine auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Somit käme dem Autotransporterprotein EstP eine besondere Bedeutung zu, da es sowohl im homologen als auch im heterologen Wirt exprimiert werden könnte.

Für die Lokalisationsstudien im heterologen Wirt wurden das *estP*-Überexpressionsplasmid pBBREstP sowie der entsprechende Leervektor pBBR1MCS in *E. coli* DH5α eingebracht und

die Stämme in LB-Medium ü.N. bei 37 °C kultiviert. Es erfolgte die Bestimmung der zellgebundenen Esteraseaktivität (2.35.1.1) mit dem Substrat *p*-Nirophenyl-Caproat (*p*-NPC) durch eine Messung mit ganzen Zellen (Abbildung 3.15). Die Ergebnisse zeigten deutlich eine gesteigerte Aktivität der *estP*-Überexpressionskultur von 0,63 U/ml im Vergleich zur Leervektorkontrolle mit 0,17 U/ml. Da in den Aktivitätstest ganze Zellen eingesetzt wurden, deuteten die Experimente eindeutig darauf hin, dass die katalytisch aktive Domäne von EstP im heterologen Wirt ebenfalls auf der Zelloberfläche exponiert vorlag.

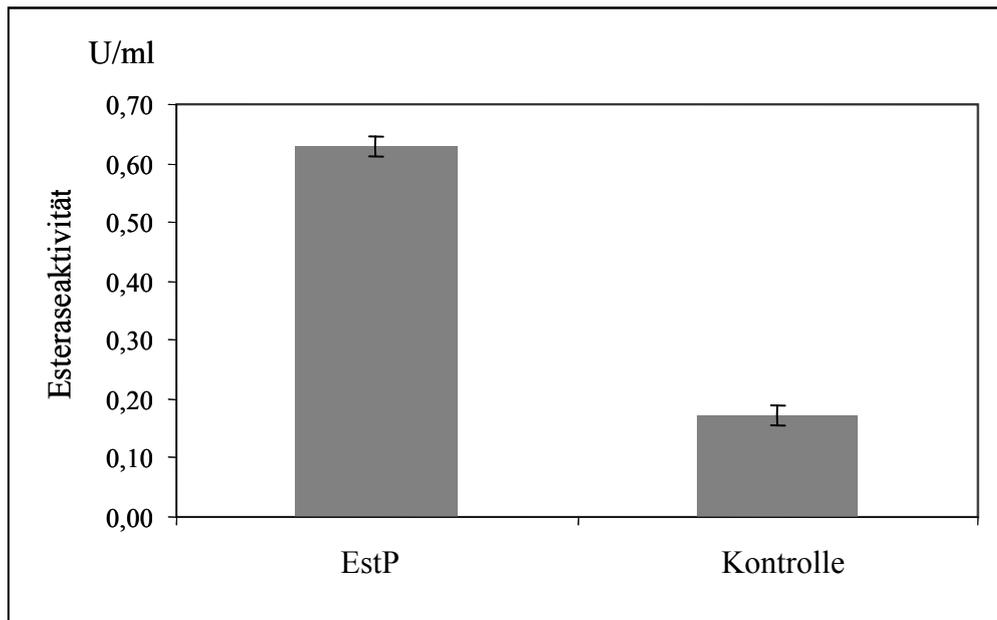


Abb. 3.15: Esteraseaktivität von EstP nach Expression im heterologen Wirt *E. coli* DH5 α . Nach Kultivierung von *E. coli* mit dem *estP*-Überexpressionsplasmid pBBREstP (EstP) und dem entsprechenden Leervektor pBBR1MCS (Kontrolle), wurden die Kulturen auf eine vergleichbare O.D. 580 nm = 15/ml eingestellt, und es wurden 10 μ l jeder Probe mit ganzen Zellen in den Aktivitätstest (*p*-NPC) eingesetzt. Die Endpunktbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 410 nm. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von je drei unabhängigen Messungen.

Die ermittelten Esteraseaktivitäten der Überexpression von *estP* im heterologen Wirt *E. coli* DH5 α war allerdings deutlich geringer als im Vergleich zum homologen Wirt *P. putida* KT2440 (Kapitel 3.3.1).

Es konnte deutlich zellgebundene Esteraseaktivität auf der Zelloberfläche von *E. coli* ermittelt werden, sodass anschließend ein genauere Nachweis der Oberflächenpräsentation von EstP im heterologen Wirt mit Hilfe der *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Methode (2.31) erfolgte. Bei einer Kultivierung der Expressionsstämme in LB-Medium bei 37 °C erfolgte die Induktion der *estP*-Expression durch IPTG. Die Zellen wurden nach 1 h geerntet. Nach einer immunhistochemischen Markierungskaskade der Zellen mit dem EstP_N-spezifischen-Antiserum, gefolgt von einem biotinylierten anti-Kaninchen-Antiserum und komplettiert mit

einem Streptavidin-R-Phycoerythrin-Konjugat, erfolgte die Analyse der Zellen durchflusszytometrisch. Die Zellen, die die Passagierdomäne von EstP auf der Zelloberfläche exponierten, konnten nur auf diese Weise detektiert werden. Die Negativkontrolle diente zur Ermittlung der Region (R1) im Fluoreszenzmissionshistogramm, in der die Zellen nicht markiert waren (Abbildung 3.16A). Zellen besitzen generell eine Hintergrundfluoreszenz. Eine Steigerung der Fluoreszenz war durch die spezifische Proteinmarkierung der zellgebundenen Passagierdomäne von EstP zu detektieren. Dies ist durch die Verschiebung des Höchstwertes der Fluoreszenz im Histogramm nach rechts zu erkennen. Diese Fluoreszenzsteigerung war eindeutig bei 98 % der markierten Zellen mit einer *estP*-Überexpression im Vergleich zur Leervektorkontrolle zu beobachten (Abbildung 16B). Die signifikante Zunahme der relativen Fluoreszenz bestätigte anschaulich die Vermutung, dass die Passagierdomäne von EstP auf der Zelloberfläche präsentiert wird.

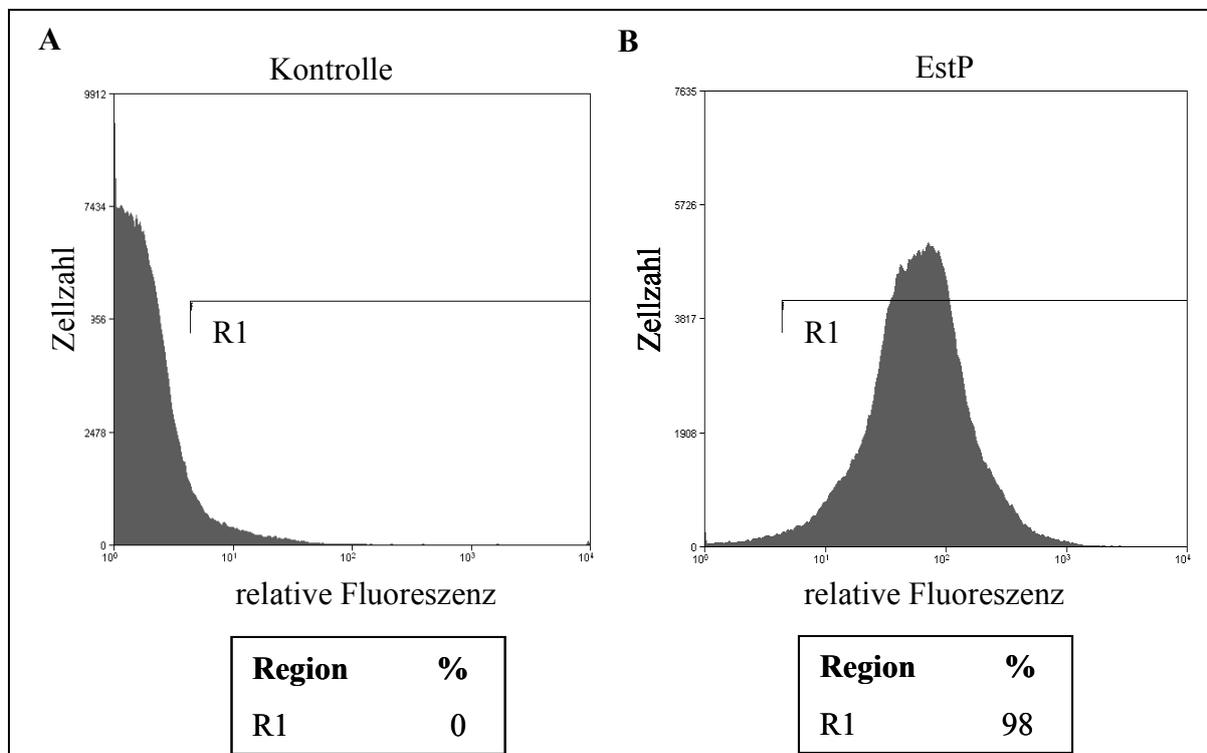


Abb. 3.16: FACS-Analyse nach Fluoreszenzmarkierung der Passagierdomäne von EstP im heterologen Wirt *E. coli* DH5a. Nachdem die *estP*-Expression bei einer O.D. 580 nm = 0,5 mit IPTG induziert wurde, konnte die Präsentation der Passagierdomäne von EstP mit spezifischen anti-EstP_N-Antikörpern nachgewiesen werden (A). Als Negativkontrolle dienten Zellen mit dem entsprechenden Leervektor pBBR1MCS (Kontrolle), die zur Ermittlung der Region (R1) mit den unmarkierten Zellen dienten (B). Das FACS-Histogramm zeigt die relative Fluoreszenz pro Zelle auf einer logarithmischen Skala und die Zellzahl. Je Messung wurden 300.000 Zellen detektiert.

Das Autotransporterprotein EstP ist sowohl im homologen Wirt *P. putida* KT2440 als auch im heterologen Stamm *E. coli* DH5a in der äußeren Membran verankert, wobei die N-terminale Passagierdomäne auf der Zelloberfläche exponiert ist. Folglich kann EstP als Oberflächendisplaysystem eingesetzt werden.

3.3.5 Die Esterase EstP ist auch eine Phospholipase B

Nach der Identifizierung des GDSL-Konsensusmotivs und der konservierten, charakteristischen Bereiche in der katalytischen N-terminalen Domäne von EstP konnte für dieses Enzym auch experimentell die postulierte enzymatische Aktivität einer Esterase nachgewiesen werden. EstP katalysiert die Hydrolyse des kurzkettigen Standardsubstrats *p*-Nitrophenyl-Caproat (*p*-NPC). Dies entspricht jedoch nicht zwangsläufig der natürlichen physiologischen Funktion von EstP in *P. putida* KT2440.

Es konnte bereits einigen GDSL-Hydrolasen neben einer Esteraseaktivität auch die Aktivität einer Phospholipase zugeordnet werden. Darunter befinden sich eine Phospholipase A (PLA) aus *Legionella pneumophila* (Flieger *et al.*, 2002), eine Phospholipase B (PLB) aus *Moraxella bovis* (Shiell *et al.*, 2007) sowie McaP aus *Moraxella catarrhalis* (Timpe *et al.*, 2003). Durch Homologievergleiche mittels BLAST (NCBI) stellte sich für EstP eine Identität von 23 % und eine Ähnlichkeit von 34 % zu PLB heraus. Außerdem zeigte sich eine Identität von 22 % und eine Ähnlichkeit von 35 % zu McaP. Darüber hinaus konnte die ebenfalls homologe Esterase EstA aus *P. aeruginosa* als eine Phospholipase B identifiziert werden (Gdynia, 2006).

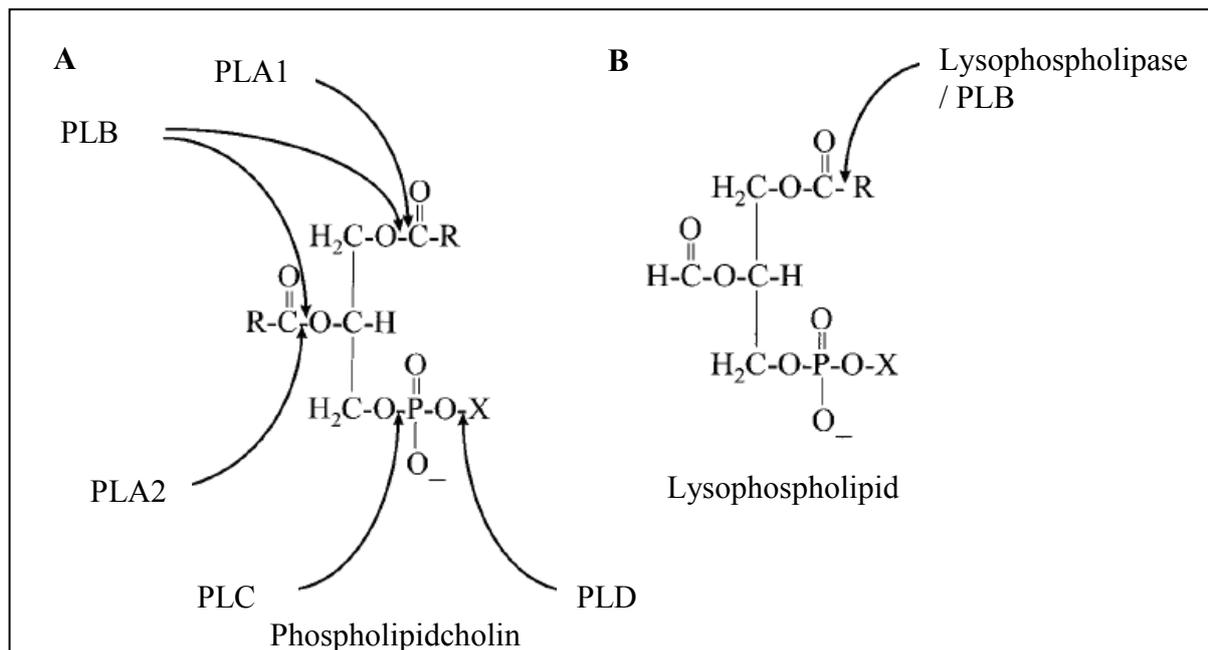


Abb. 3.17: Klassifizierung der Phospholipasen in Abhängigkeit ihrer Hydrolyseposition eines Phospholipids. (A) Die Phospholipasen (PL) A (A1 und A2), B, C und D spalten Phospholipidcholin. (B) Die Lysosphospholipasen und PLB spalten Lysosphospholipid.

Phospholipasen (PL) werden in Abhängigkeit ihrer Substratspezifität in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (Abbildung 3.17). Je nach Position der Hydrolyse wird zwischen PLA und PLB, die Fettsäuren aus Phospholipiden freisetzen, sowie PLC und PLD, die die

Phosphodiesterbindung hydrolysieren, unterschieden. Die PLA werden in zwei Untergruppen, PLA₁ und PLA₂, unterteilt, die die Freisetzung der Fettsäuren entweder an Position *sn*-1 (PLA₁) oder *sn*-2 (PLA₂) eines Phospholipids katalysieren. Die PLB spalten Phospholipide sowohl an Position *sn*-1 als auch an *sn*-2 und können ebenfalls zusammen mit den Lysophospholipasen (LPL) die freie Fettsäure des Lysophospholipids hydrolysieren.

Es wurden die Membranfraktionen der Kulturen von *P. putida* KT2440 mit dem *estP*-Expressionsplasmid pBBREstP (KT2440 EstP), der Positivkontrolle *P. aeruginosa* PAO1 mit dem *estA*-Expressionsplasmid pBBX+ (PAO1 EstA) und der Negativkontrolle *P. aeruginosa* PASCHI ($\Delta estA$) isoliert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte ü.N. bei 30 °C in LB-Medium. Es wurde stets ein äquivalentes Volumen der Kulturen für die Präparation der Membranfraktionen verwendet, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Vor der Analyse der Phospholipaseaktivität wurde die lipolytische Aktivität in den jeweiligen Membranfraktionen durch einen Esteraseaktivitätstest (2.35.1.1) überprüft. Die Esteraseaktivität in den Membranfraktionen betrug für EstP 2,3 U/ml und für EstA 3,1 U/ml und war im Vergleich zur Negativkontrolle PASCHI mit 0,1 U/ml deutlich höher (Abbildung 3.18A). Dies garantierte die lipolytische Aktivität beider Esterasen in den isolierten Membranfraktionen, so konnten anschließend die Proben zum Nachweis der Phospholipaseaktivität einsetzen werden.

Für die Überprüfung der Phospholipaseaktivität wurde zunächst das Substrat PC verwendet (Timpe *et al.*, 2003) und jeweils mit einer der Membranfraktionen der Stämme in eine Reaktion eingesetzt. Als Negativkontrollen diente die Membranfraktion von KT2440 EstP ohne Zusatz des Substrats. Als Standard wurde bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung sowohl PC (1 mg) als auch LPC (200 µg) aufgetragen (Timpe *et al.*, 2003). Die enzymatische Reaktion verlief ü.N. bei 37 °C. Die Quantifizierung der Reaktion erfolgte nach Chloroform-Extraktion mittels dünnschichtchromatographischer Auftrennung (2.36.2). Die Produkte wurden mit Jod reversibel auf der Kieselgelplatte gefärbt.

Die Ergebnisse der Reaktionsansätze mit PC zeigen keine Veränderungen des Substrats (Abbildung 3.18B). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Löslichkeit von PC während des Reaktionsverlaufs nicht vollständig gewährleistet war.

Daraufhin wurde die Fähigkeit der enzymatischen Hydrolyse der identischen Membranfraktionen gegenüber dem Substrat LPC analysiert, das ein spezifisches Substrat sowohl für Lysophospholipasen als auch für Phospholipasen B darstellt (Abbildung 3.18C).

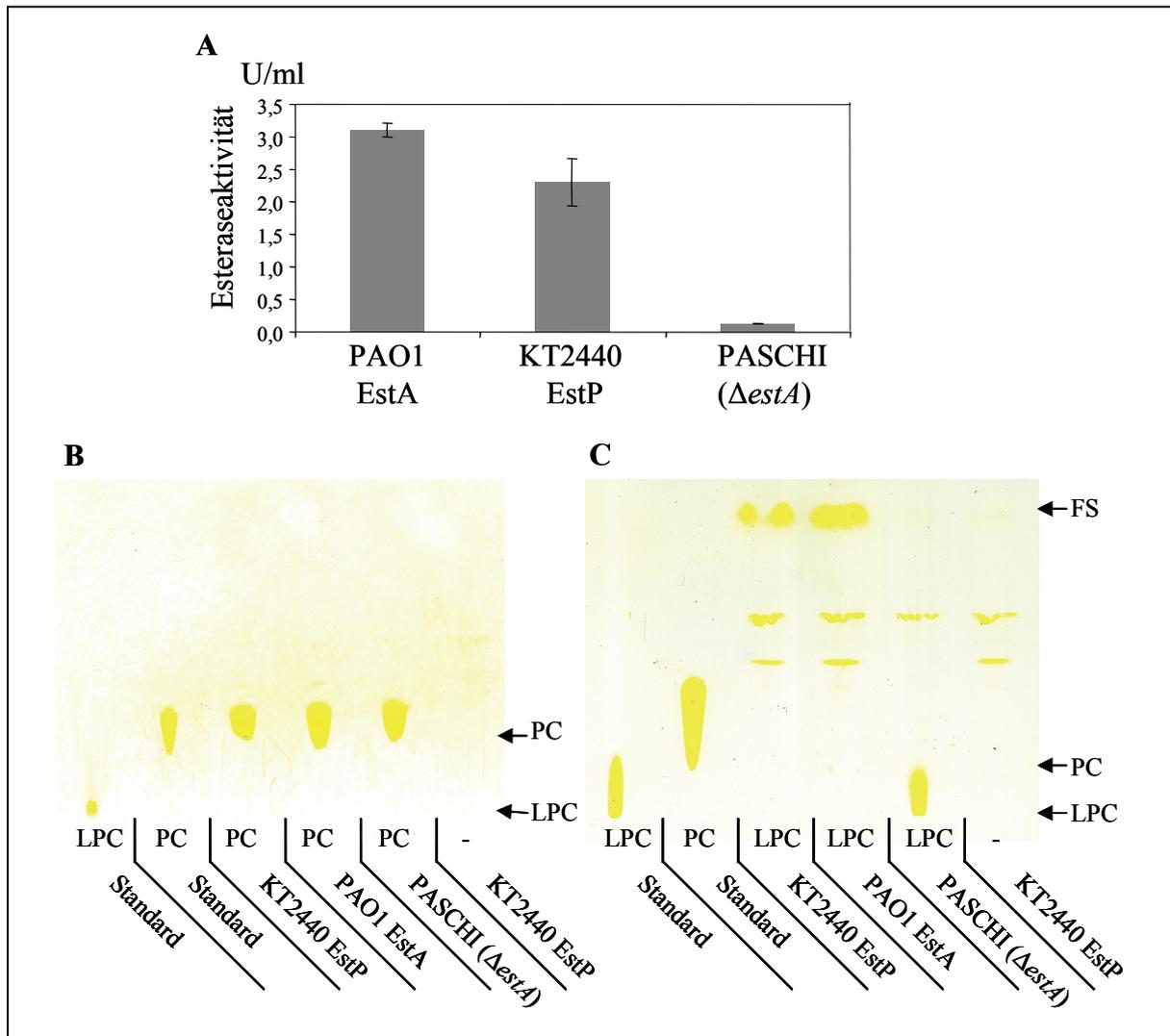


Abb. 3.18: Esteraseaktivität und Dünnschichtchromatographie zum Nachweis der Phospholipaseaktivität von EstP in der Membranfraktion von *P. putida* KT2440. Es wurden jeweils die Membranfraktionen der Kulturen von *P. putida* KT2440 mit dem Plasmid pBBREstP (KT2440 EstP), der Positivkontrolle *P. aeruginosa* mit dem Plasmid pBBX+ (PAO1 EstA) und *P. aeruginosa* PASCHI ($\Delta estA$) in die Reaktionen eingesetzt. **(A)** Ein Aktivitätstest (*p*-NPC) bestätigte die lipolytische Aktivität der Membranfraktionen. Die Endpunktbestimmung erfolgte photometrisch bei 410 nm. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von je drei unabhängigen Messungen. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung zeigt die Extrakte der enzymatischen Reaktion von 1 mg PC **(B)** und 150 μ g LPC **(C)** mit jeweils den entsprechenden Membranfraktionen. Als Standard dienten PC (1 mg) und LPC (200 μ g) (Sigma). PC: Phosphatidylcholin, LPC: Lysophosphatidylcholin, FS: Fettsäuren (Farn *et al.*, 2001).

Die Produkte dieser Phospholipase-Reaktion, die nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung detektiert wurden, zeigten freie Fettsäuren (FS) in den Reaktionsansätzen der Membranfraktion von KT2440 EstP sowie in der Positivkontrolle PAO1 EstA. In den Ansätzen, die als Negativkontrollen dienten, wurde das Substrat nicht hydrolysiert. Zusätzlich wurden noch Lipidbanden detektiert, die wahrscheinlich Bestandteile der Membranfraktionen sein könnten, deren Isolierung ebenfalls durch die Extraktion des Reaktionsansatzes erfolgte.

Da in der Negativkontrolle ohne Zugabe des Substrats ähnliche Signale auftraten, wurde diese Vermutung bestätigt. Dennoch ergaben die Ergebnisse ein deutliches Anzeichen für eine Lysophospholipase- oder Phospholipase B-Aktivität, die wahrscheinlich auf EstP bzw. EstA zurückzuführen war.

Bei der enzymatischen Umsetzung von LPC erfolgt die Hydrolyse an Position *sn*-1. Um EstP eine PLB-Aktivität zuteilen zu können, sollte zusätzlich ein spezifischer Nachweis für eine Phospholipase A₂ (PLA₂) (2.35.2), die Phospholipide an Position *sn*-2 hydrolysiert, erfolgen. Nach der Hydrolyse einer Thiolesterbindung an Position *sn*-2 durch eine PLA₂ bei dem Substrat 1,2-Dithio-Phosphatidylcholin erfolgt eine Reaktion der frei werdenden Thiolgruppe mit DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure), die durch eine Absorption bei $\lambda = 414$ nm gemessen werden kann (Abbildung 3.19). Die Ergebnisse zeigten, dass in der Membranfraktion von KT2440 EstP eine PLA₂-Aktivität von 1,74 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ im Gegensatz zur Negativkontrolle PASCHI ohne Aktivität detektiert werden konnte. Für die Positivkontrolle PAO1 EstA ließ sich eine Aktivität von 3,39 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ ermitteln. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass in der Membranfraktion von KT2440 EstP neben einer Esteraseaktivität die Hydrolyse an Position *sn*-1 und *sn*-2 eines Phospholipides katalysiert wurde. Dies lässt vermuten, dass EstP eine Phospholipase B ist.

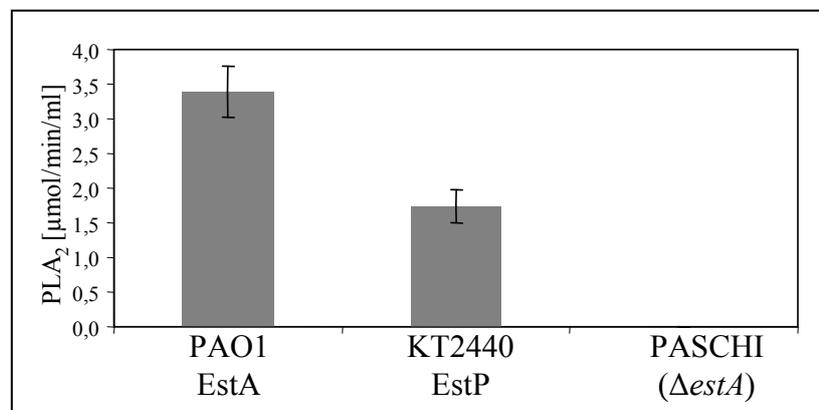


Abb. 3.19: Photometrischer Aktivitätstest zum Nachweis der A2-Phospholipaseaktivität von EstP in der Membranfraktion von *P. putida* KT2440. Es wurden jeweils die Membranfraktionen der *estP*-Überexpression in *P. putida* (KT2440 EstP) und als Positivkontrolle die *estA*-Überexpression in *P. aeruginosa* (PAO1 EstA) in die PLA₂-Reaktionen (Cayman) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die Membranfraktion von PASCHI (ΔestA). Die Messung der Absorptionsteigerung erfolgte bei $\lambda = 414$ nm und wurde in [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$] angegeben. Der Extinktionskoeffizient von DTNB ist $10,66 \text{ mM}^{-1}$. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von je drei unabhängigen Messungen.

Um die Phospholipaseaktivität eindeutig auf die Esterase EstP begrenzen zu können, wurden die Experimente mit reinem Protein wiederholt. Dazu wurde *estP* unter der Kontrolle des T7-Promotors heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) überexprimiert. Nach Aufreinigung der

inclusion bodies (2.22), Denaturierung und *in vitro*-Faltung (2.23) resultierte ein katalytisch aktives Protein, das in die Phospholipaseaktivitätstests eingesetzt werden konnte. Daraufhin wurde erneut eine Dünnschichtchromatographie von den Extrakten aus den Reaktionen mit dem Substrat LPC durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine PLA₂ eines Bienengifts (Cayman), da diese zur Hydrolyse von LPC nicht fähig ist (Timpe *et al.*, 2003). Es wurde 1 µg Enzym in jede Reaktion eingesetzt.

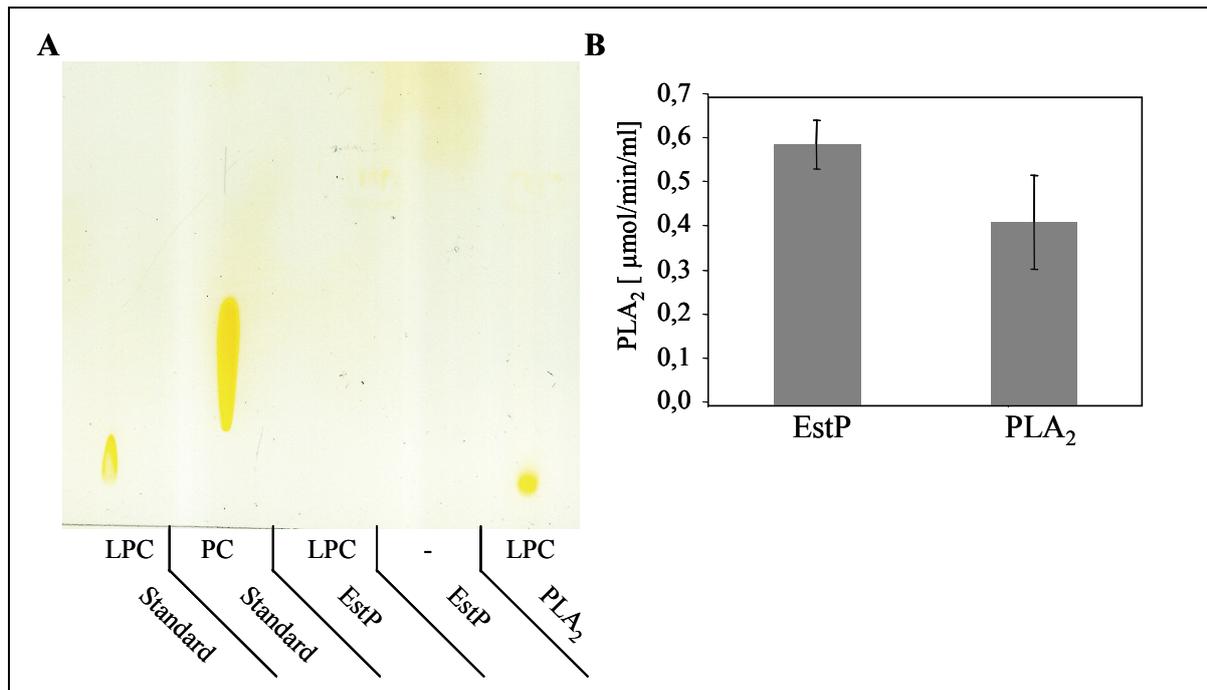


Abb. 3.20: Dünnschichtchromatographie und photometrischer Aktivitätstest zum Nachweis der Phospholipaseaktivität von EstP. (A) Es wurde jeweils 1 µg Protein in jede Enzymreaktion eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die PLA₂ (Cayman). Die dünnschichtchromatographische Auftrennung zeigt die Extrakte der enzymatischen Reaktion von 150 µg LPC. Als Standard dienten PC (1 mg) und LPC (200 µg) (Sigma). (B) Die angegebenen Werte des photometrischen Nachweistests entsprechen der Differenz der jeweiligen Enzymaktivität von EstP bzw. PLA₂ und der Negativkontrolle (Puffer). PLA₂ diente bei diesem Test als Positivkontrolle. Die Messung der Absorptionsteigerung erfolgte bei 414 nm und wurde in [µmol/min/ml] angegeben. Der Extinktionskoeffizient von DTNB bei 414 nm entspricht 10,66 mM⁻¹. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von je drei unabhängigen Messungen. PC: Phosphatidylcholin, LPC: Lysophosphatidylcholin.

Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie zeigten, dass EstP das Substrat LPC vollständig hydrolysiert (Abbildung 3.20A). Die komplette Degradation des Substrats ist ebenfalls ein Hinweis auf eine PLB-Aktivität. Hingegen konnte die Negativkontrolle PLA₂ die Hydrolyse von LPC nicht katalysieren.

Zusätzlich wurde ein photometrischer Nachweistest für die lipolytische Aktivität an Position *sn*-2 durchgeführt. In diesem Versuch diente eine PLA₂ des Bienengifts (Cayman) allerdings

als Positivkontrolle. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass EstP eine PLA₂-Aktivität besitzt (Abbildung 3.20B).

Die Untersuchungen der Phospholipaseaktivität der Esterase EstP aus *P. putida* KT2440 verifizieren die Aktivität einer PLB, da EstP die Fähigkeit besitzt, die Hydrolyse sowohl an Position *sn*-1 als auch an Position *sn*-2 eines Phospholipids zu katalysieren.

Die Esterase EstP, die der Familie der GDSL-Hydrolasen zugeordnet wurde, besitzt neben der Aktivität einer Esterase zusätzlich eine Phospholipase B-Aktivität, da sie die Hydrolyse von Phospholipiden an Position *sn*1- und *sn*-2 katalysiert.

3.3.6 Konstruktion eines *estP*-defizienten Stammes von *P. putida* KT2440

In dieser Arbeit soll die physiologische Funktion von EstP aus dem nicht virulenten Stamm *P. putida* KT2440 untersucht werden, da alle bisher charakterisierten Autotransporterproteine in pathogenen Organismen zu finden sind und mit der jeweiligen Virulenz in Verbindung gebracht werden. Obwohl das Genom von *P. putida* KT2440 eine Homologie von 85 % gegenüber dem von *P. aeruginosa* zeigt, konnten keine Virulenzfaktoren in *P. putida* identifiziert werden (Nelson *et al.*, 2002).

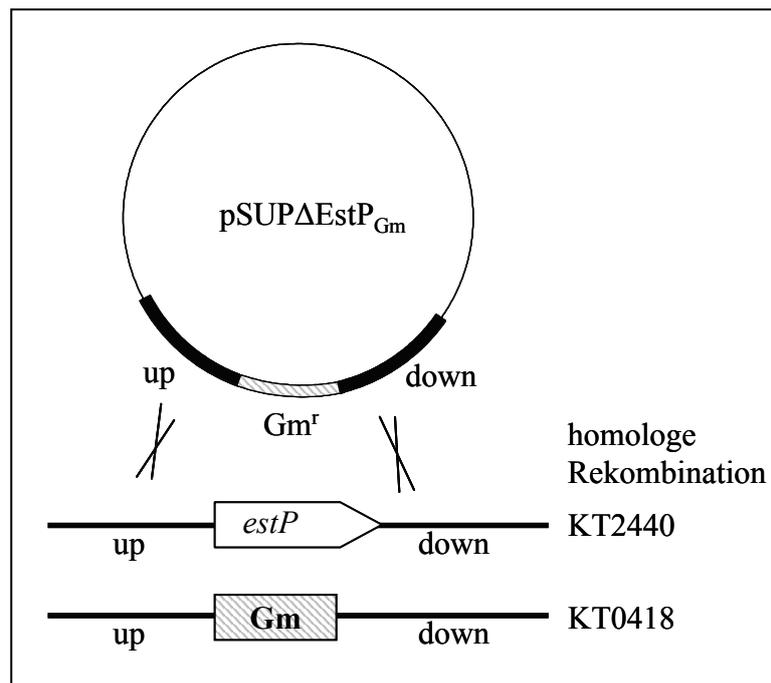


Abb. 3.21: Schematische Darstellung der Konstruktion eines *estP*-defizienten Stammes von *P. putida* KT2440. Ein 1,7 kb-Fragment von *estP* wurde durch eine Gm^r -Kassette ausgetauscht und in den Suizidvektor pSUP202 mit den flankierenden stromaufwärts- (up) und stromabwärts- (down) Bereichen von *estP* kloniert. Die detaillierte Konstruktion der Mutagenese-Vektoren pBBRΔEstP_{Gm} und pSUPΔEstP_{Gm} befindet sich im Anhang (Abbildung 7.1). Durch homologe Rekombination (*double crossover*) wurde ein 1,7 kb-Fragment von *estP* im Genom von *P. putida* KT2440 durch eine Gm^r -Kassette ersetzt. Der resultierende Stamm wurde *P. putida* KT0418 genannt.

Zur Analyse der physiologischen Funktion von EstP in *P. putida* KT2440 wurde eine Mutante konstruiert, in der ein 1,7 kb großes Fragment des *estP*-Gens deletiert und durch eine Gentamycin-Resistenzkassette (Gm^r) im Genom von *P. putida* KT2440 ausgetauscht wurde (Abbildung 3.21). Diese Mutante wird im Folgenden als KT0418 bezeichnet, da der offene Leserahmen PP0418 das Gen *estP* kodiert. Ein detailliertes Schema der Konstruktion der *estP*-Deletionsmutante ist im Anhang zu finden (Abbildung 7.1).

Der Nachweis der Gm^r -Kassette, die das 1,7 bp-Fragment des *estP*-Gens ersetzt, erfolgte durch PCR-Analyse mit spezifischen Oligonukleotiden (Abbildung 3.22A). Ein

Oligonukleotid (*estP* *NdeI* up) sollte am Start-Kodon des *estP*-Gens binden und das andere Oligonukleotid (Gm down) (Tabelle 2.3) in der stromabwärts-Region der Resistenzkassette. Nur bei einem erfolgreichen Austausch des *estP*-Fragments durch eine Gm^r-Kassette konnte ein DNA-Fragment mit der erwarteten molekularen Größe von 1,35 kb durch eine PCR-Reaktion amplifiziert werden. Als Negativkontrollen dienten das Expressionsplasmid von *estP* (pBBREstP) sowie chromosomale DNA vom Wildtyp *P. putida* KT2440. Als Positivkontrollen wurden die Mutagenesevektoren pBBRΔEstP_{Gm} und pSUPΔEstP_{Gm} parallel in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten für die putative Mutante das erwünschte PCR-Produkt mit einer molekularen Größe von 1,35 kb, das mit den Positivkontrollen übereinstimmte. Hingegen konnten bei den Negativkontrollen nur unspezifische Produkte identifiziert werden, da nur das Oligonukleotid der stromaufwärts-Region an der DNA binden konnte.

Um die *estP*-Deletion zu bestätigen, wurde außerdem eine RT-PCR (2.14.3) zur Transkriptanalyse (Abbildung 3.22B) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente *P. putida* KT2440, der plasmidkodiertes *estP* (PBBREstP) beinhaltet und zudem der Wildtypstamm ohne Plasmid. Des Weiteren wurden alle Ansätze zusätzlich ohne reverse Transkriptase als Negativkontrollen in die RT-PCR eingesetzt. Die Oligonukleotide wurde so gewählt, dass ein DNA-Fragment mit einer molekularen Größe von 107 bp entstand. Die Ergebnisse bestätigen, dass *P. putida* KT0418 ein *estP*-defizienter Stamm von *P. putida* ist, da im Vergleich zu den Negativkontrollen kein PCR-Produkt nachweisbar war.

Ein immunologischer Nachweis von *P. putida* KT0418 mit EstP_N-spezifischem Antiserum vervollständigte den Nachweis eines *estP*-defizienten Stammes (Abbildung 3.22C). Es konnte in der Mutante kein EstP nachgewiesen werden, während EstP im Wildtyp deutlich detektierbar war.

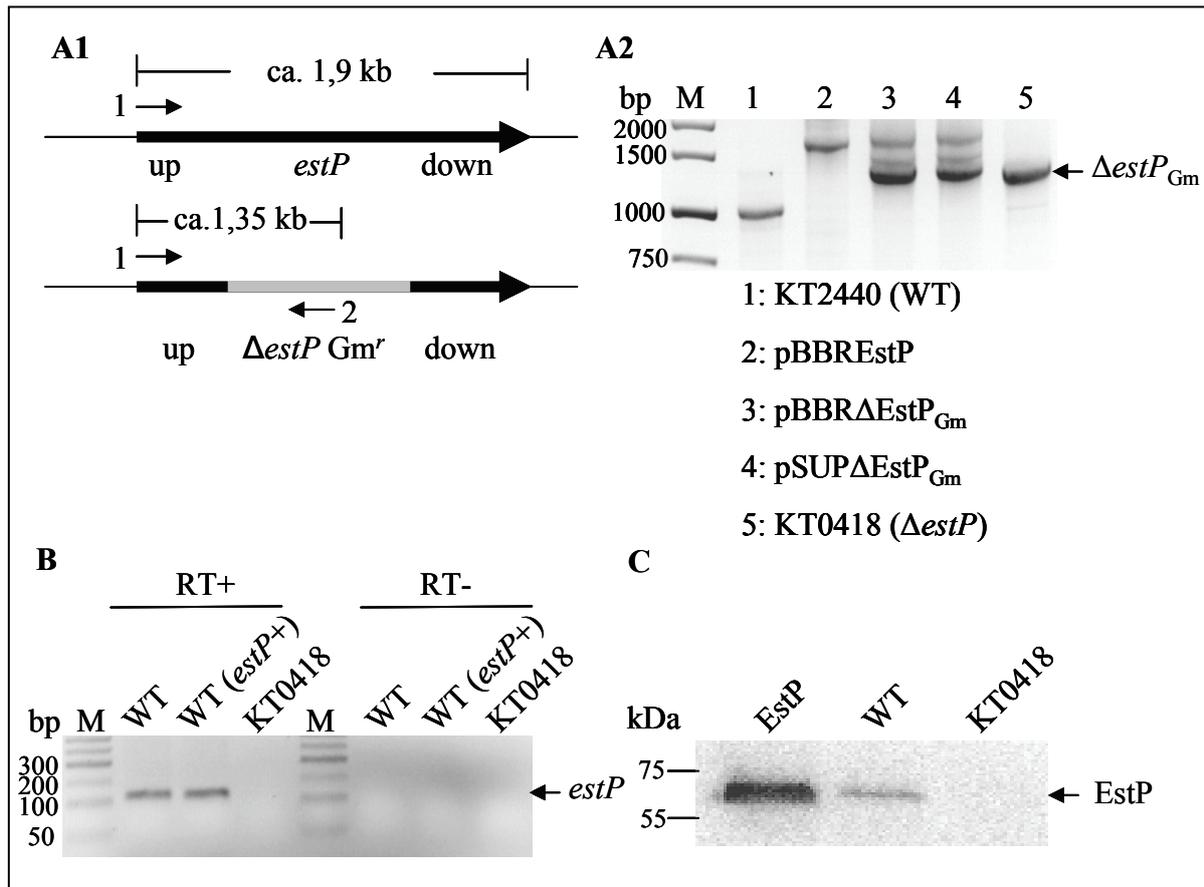


Abb. 3.22: Nachweise der *estP*-defizienten Mutante KT0418 von *P. putida* KT2440. (A) PCR-Nachweis der *estP*-negativen Mutante. (A1) Schematische Darstellung der Hybridisierungsstellen der mit 1 und 2 bezeichneten Oligonukleotide an die DNA sowie die Größenangaben der erwarteten PCR-Produkte. (A2) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 0,8 % Agarosegel. Verwendete Oligonukleotide: *estP* *NdeI* up (1) Gm down (2) (Tabelle 2.3). (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%). Verwendete Oligonukleotide: *P.p. estP* up und *P.p. estP* down (Tabelle 2.3). Als Negativkontrolle wurden äquivalente Reaktionen ohne reverse Transkriptase durchgeführt. (C) Immunologischer Nachweis unter Verwendung des spezifischen Antiserums von EstP_N (1:85.000). Als Positivkontrolle wurde zusätzlich zum Wildtypstamm 5 ng natives EstP eingesetzt. RT+: mit reverse Transkriptase, RT-: ohne reverse Transkriptase, M: Marker „GeneRuler™ 100bp Plus“ (Fermentas), WT: Wildtyp, bp: Basenpaare.

Die Konstruktion des *estP*-defizienten Stammes KT0418 von *P. putida* KT2440 war erfolgreich. Die Mutante wurde mittels PCR, RT-PCR und immunologischem Nachweis bestätigt.

3.3.7 Der *estP*-defiziente Stamm KT0418 zeigt eine verminderte Esteraseaktivität

Da EstP eine Esterase ist, sollte zuerst die esterolytische Aktivität des konstruierten *estP*-defizienten Stammes *P. putida* KT0418 im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. In die Aktivitätstests wurden ganze Zellen eingesetzt, da die katalytische Domäne von EstP auf der Zelloberfläche exponiert wird. Die Kultivierung der Stämme erfolgte ü.N. bei 30 °C in LB-Medium. Nach der Zellernte wurden die Zellen zur Vergleichbarkeit auf eine einheitliche O.D. 580 nm eingestellt. Nach 15 min Reaktionszeit erfolgte eine Endpunktbestimmung photometrisch bei 410 nm. Die ermittelten Esteraseaktivitäten wurden in Prozent angegeben, wobei der Wildtyp 100 % entsprach. Die Ergebnisse zeigten, dass die *estP*-Deletion eine Verminderung um 71 % der zellgebundenen Esteraseaktivität bewirkte. Die verbliebene Aktivität der Mutante war offensichtlich eine Hintergrundaktivität und ist wahrscheinlich auf die Existenz weiterer lipolytischer Enzyme von *P. putida* KT0418 zurückzuführen. Diese Resultate bestätigen die vorherigen Vermutungen, dass EstP eine auffallend geringe lipolytische Aktivität auf der Zelloberfläche von *P. putida* KT2440 besitzt, die mit Zymogramm nicht nachweisbar war (Abbildung 3.11).

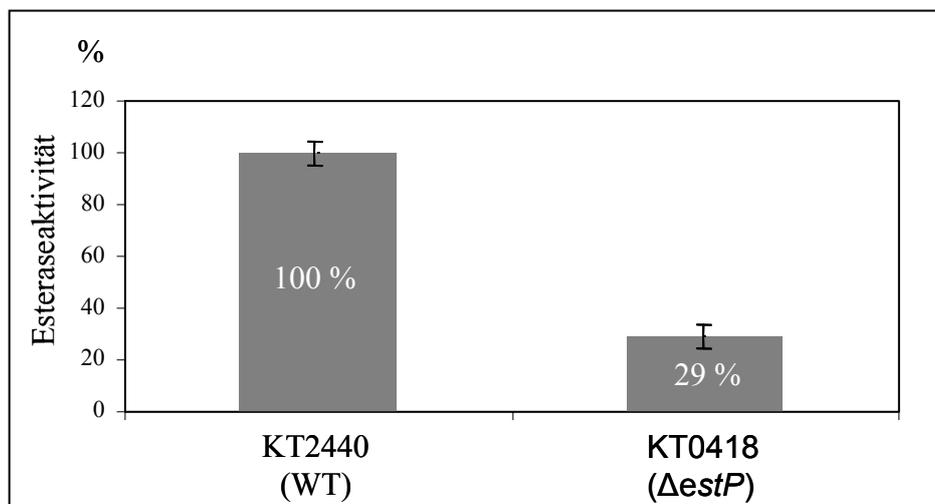


Abb. 3.23: Extrazelluläre Esteraseaktivität von *P. putida* KT2440 (WT) und KT0418 ($\Delta estP$). Nach Kultivierung des Wildtyp-Stammes KT2440 sowie des *estP*-defizienten Stammes *P. putida* KT0418 ($\Delta estP$) wurden die Kulturen auf eine vergleichbare O.D. 580 nm = 15/ml eingestellt und 10 μ l der ganzen Zellen in den Aktivitätstest (*p*-NPC) eingesetzt. Die Endpunktbestimmung erfolgte photometrisch bei 410 nm und ist in Prozent [%] angegeben, wobei die Wildtypaktivität 100 % entsprach. Es wurden die Mittelwerte aus je drei unabhängigen Messungen angegeben, deren Standardabweichungen durch Fehlerbalken dargestellt sind.

Die *estP*-Deletionsmutante *P. putida* KT0418 zeigt verminderte Esteraseaktivität im Vergleich zum Wildtypstamm KT2440.

3.3.8 Untersuchungen des *estP*-negativen Phänotyps von *P. putida* KT0418

Einige Membranproteine haben Einfluss auf das Wachstumsverhalten der jeweiligen Organismen (Sauer and Camper, 2001). Zudem führt eine Deletion eines Autotransporterproteins, dessen C-terminale Transportdomäne eine β -Pore in der äußeren Membran bildet, zwangsläufig zu einer Veränderung der Komposition der äußeren Membran. Außerdem sind Phospholipasen Esterasen, die spezifisch die Esterbindungen von Phospholipiden (PL) hydrolysieren. Sie machen einen Hauptbestandteil der bakteriellen Zellmembran aus. Phospholipasen haben eine bedeutende Funktion im Phospholipidmetabolismus vieler Organismen (Banerji *et al.*, 2008). Dennoch werden diese Phänomene hauptsächlich in pathogenen Organismen diskutiert, weil sie meist mit der jeweiligen Virulenz verbunden sind. Um das Wachstumsverhalten unter standardisierten Laborbedingungen beurteilen zu können, wurde das Zellwachstum des Wildtyps KT2440 im Vergleich zum *estP*-defizienten Stamm KT0418 bei einer Temperatur von 30 °C für 24 h beobachtet. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Probenentnahme zur Bestimmung der Zelldichte bei 580 nm. Es konnten keine Unterschiede bezüglich des Wachstums zwischen beiden Kulturen bei 30 °C festgestellt werden (Abbildung 3.24).

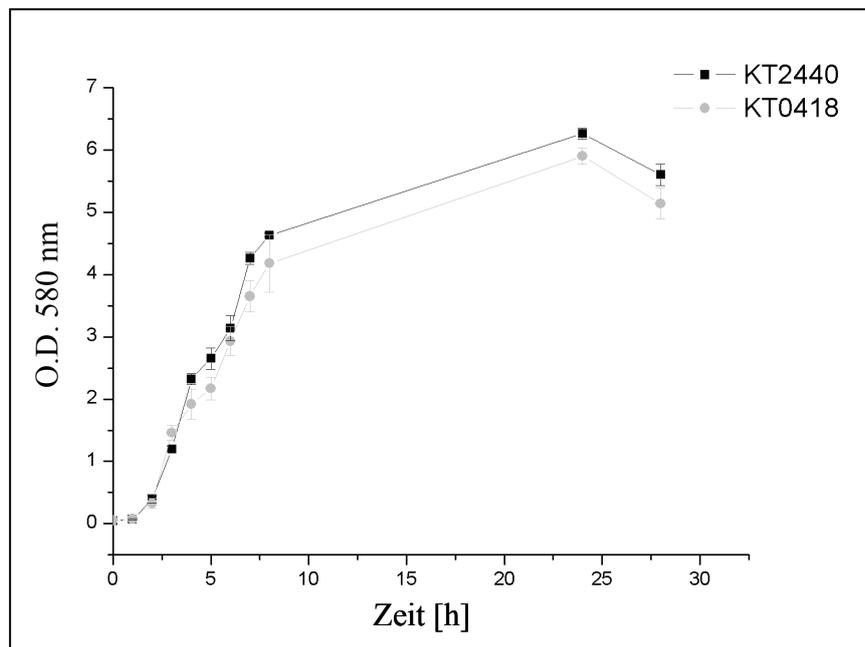


Abb. 3.24: Wachstumsverhalten von *P. putida* Wildtyp KT2440 im Vergleich zur Mutante KT0418 ($\Delta estP$). Die Wachstumskurve wurde anhand der Bestimmung der O.D. 580 nm zu unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium bei 30 °C und 120 Upm. Es wurden die Mittelwerte aus je drei unabhängigen Messungen angegeben, deren Standardabweichungen durch Fehlerbalken dargestellt sind.

P. putida KT2440 ist ein metabolisch vielseitiges Bodenbakterium, das die Fähigkeit besitzt, toxische, organische Verbindungen zu verstoffwechseln (Dos Santos *et al.*, 2004; Nelson *et al.*, 2002). Bakterien sind in ihrer natürlichen Umgebung unterschiedlichen Faktoren ausgesetzt, sodass die Lebensbedingungen sich oft von ihrem eigentlichen Optimum massiv unterscheiden. Das Überleben erfordert bei Veränderungen der Umwelt eine schnelle, adaptive Reaktion. Stressfaktoren im Boden können organische Verbindungen, Temperaturschwankungen, pH- und osmotische Einflüsse sein (Reva *et al.*, 2006). Bakterien besitzen einige Mechanismen, die ihre Membranstrukturen verändern, um z.B. organische Lösungsmittel oder saures Milieu tolerieren zu können (Ramos *et al.*, 2001). Es wurde bereits gezeigt, dass Lipopolysaccharide (LPS) an der Zellantwort und der Resistenz gegenüber organischem Säurestress beteiligt sind (Barua *et al.*, 2002).

Die Untersuchungen des Wachstumsverhaltens des Wildtyps KT2440 im Vergleich zur Mutante KT0418 unter extremen Bedingungen sollten Hinweise liefern, ob EstP eventuell bei Umbauprozessen von Phospholipiden an der Membranoberfläche oder sogar in einer Signalkaskade für eine Stressantwort der Zelle beteiligt ist. Dafür wurden bei der Kultivierung unter ausgewählten Stressbedingungen in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die Zelldichte bei 580 nm bestimmt.

Beide Stämme zeigten keine Unterschiede bezüglich des Wachstums unter den gewählten Bedingungen, sodass keine Hinweise auf die physiologische Funktion der Esterase EstP in *P. putida* KT2440 gefunden werden konnten. Die Stressfaktoren sind zur Übersicht in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1: Übersicht der ausgewählten Stressfaktoren zur Analyse des Wachstumsverhalten von *P. putida* KT0418 ($\Delta estP$) im Vergleich zum Wildtyp (WT) KT2440. +: Wachstum, -: kein Wachstum.

Bedingungen/ Stress	Temperatur					HCl	Harnstoff	Hexadekan	Toluol	Tween 20	Sodiumbenzoat
	[°C]					[pH]	[M]	[%]	[%]	[%]	mM
	4	8	16	37	42	4,5	0,8	10	0,5	1	45
KT2440 (WT)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
KT0418 ($\Delta estP$)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+

Die Esterase EstP ist ebenfalls eine Phospholipase B, da sie die Fähigkeit besitzt, Phospholipide an Position *sn*-1 und *sn*-2 zu hydrolysieren (3.3.5). Phospholipide sind

Membranbestandteile, die wichtige physiologische Funktionen übernehmen und möglicherweise ein natürliches Substrat für EstP darstellen. Folglich wurden die Komposition der Lipopolysaccharide (LPS) sowie der Lipide, die die Hauptkomponenten der Membran verkörpern, analysiert.

Darüber hinaus ist *P. putida* KT2440 für die Kolonisierung von Böden, Gewässern sowie von Oberflächen und Pflanzenwurzeln, von z.B. Kartoffeln, Gerste oder Mais, bekannt (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 1998). Membranproteine können bei der Adhäsion von Bakterien beteiligt sein (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000), sodass EstP bei der Kolonisierung der Lebensräume für *P. putida* KT2440 eine Bedeutung haben könnte. Aus diesen Gründen wurden die Phänotypen des Wildtyps mit der Mutante bezüglich der Schwimmbewegung, Biofilmbildung und Adhäsionsfähigkeit untersucht und tabellarisch dargestellt (Tabelle 3.2). Die gewählten Experimente erbrachten keine Hinweise unter den durchgeführten Versuchsbedingungen auf die physiologische Funktion von EstP in *P. putida* KT2440.

Tab. 3.2: Zusammenstellung der untersuchten Phänotypen von *P. putida* KT0418 ($\Delta estP$) im Vergleich zum Wildtyp (WT). +: Phänotyp vorhanden.

Phänotypen	Schwimmen	Biofilmbildung	Adhäsion	LPS	Lipide
KT2440 (WT)	+	+	+	+	+
KT0418 ($\Delta estP$)	+	+	+	+	+

Eine Deletion von EstP in *P. putida* KT2440 hat keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten unter den getesteten Bedingungen. Die Konstruktion des *estP*-defizienten Stammes *P. putida* KT0418 erbrachte keine Hinweise auf die physiologische Funktion des Autotransporterproteins EstP, da keine Veränderungen der Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp beobachtet wurden.

3.4 Generierung einer enantioselektiven Variante der Esterase EstP

Lipasen und Esterasen sind lipolytische Enzyme, die als Biokatalysatoren häufig in der organischen Synthese eingesetzt werden, weil sie ein breites Substratspektrum auszeichnet, unabhängig von Kofaktoren sind, meist in organischen Lösungsmitteln stabil sind und eine gute Stereoselektivität in der kinetischen Racematspaltung aufweisen (Bornscheuer, 2002b).

Durch vergangene Arbeiten konnte nach Mutagenisierung eine Variante der Esterase EstA aus *P. aeruginosa* mit veränderter Enantioselektivität gegenüber dem *R*-Enantiomer eines Derivats der 2-Methyldekansäure (2-MDA) identifiziert werden. Nach anschließender Nukleotidsequenzanalyse dieser Mutante konnte eine Aminosäuresequenz des Enzyms für diese veränderte Präferenz gegenüber dem verwendeten Substrat verantwortlich gemacht werden (Becker *et al.*, 2008).

Derzeit können nur unsichere Vermutungen für die Struktur der GDSL-Esterase EstP vorgenommen werden, da bisher keine Kristallstruktur mit ausreichender Homologie bekannt ist. Die Aminosäuresequenz der Thioesterase I (TAP) aus *E. coli*, deren Kristallstruktur gelöst wurde, weist mit 20 % die höchste Homologie gegenüber der Passagierdomäne von EstP auf (Lo *et al.*, 2003).

Es konnten bisher keine Hinweise gefunden werden, die auf die physiologischen Funktion der Esterase EstP aus *P. putida* KT2440 schließen lassen. In diesem Kapitel sollten die strukturellen und biochemischen Aspekte näher untersucht werden. Da bisher lediglich spekulative Aussagen anhand hypothetischer Modelle der Proteinstruktur von EstP getroffen werden können, sollte ein effizientes Reinigungsverfahren für EstP etabliert werden, das ausreichende Proteinmengen in homogener Form für eine anschließende Kristallisation zur Strukturaufklärung erzielt.

3.4.1 Untersuchungen zur Enantioselektivität der Variante EstP W173R

Durch ein spezielles Hochdurchsatz-Durchmusterungsverfahren konnte eine Variante von EstA identifiziert werden, die durch den Austausch der Aminosäure Thryptophan (W) an Position 185 in Arginin (R) des nativen Proteins eine Veränderung der Enantioselektivität verursachte. Die Variante EstA W185R erzielte eine gesteigerte Präferenz gegenüber dem *R*-Enantiomer der 2-MDA (Becker *et al.*, 2008).

Die Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen der katalytisch aktiven Domänen der Esterasen EstP aus *P. putida* und EstA aus *P. aeruginosa* ergaben eine Identität von 58 % und eine Ähnlichkeit von 22 %. Bei beiden Enzymen konnten beinahe eine vollständige Übereinstimmung der fünf konservierten Bereiche, die für die GDSL-Hydrolasen charakteristisch sind, dokumentiert werden. Die analoge Aminosäure W185 in EstA ist in EstP an Position 173 lokalisiert (Abbildung 3.25).

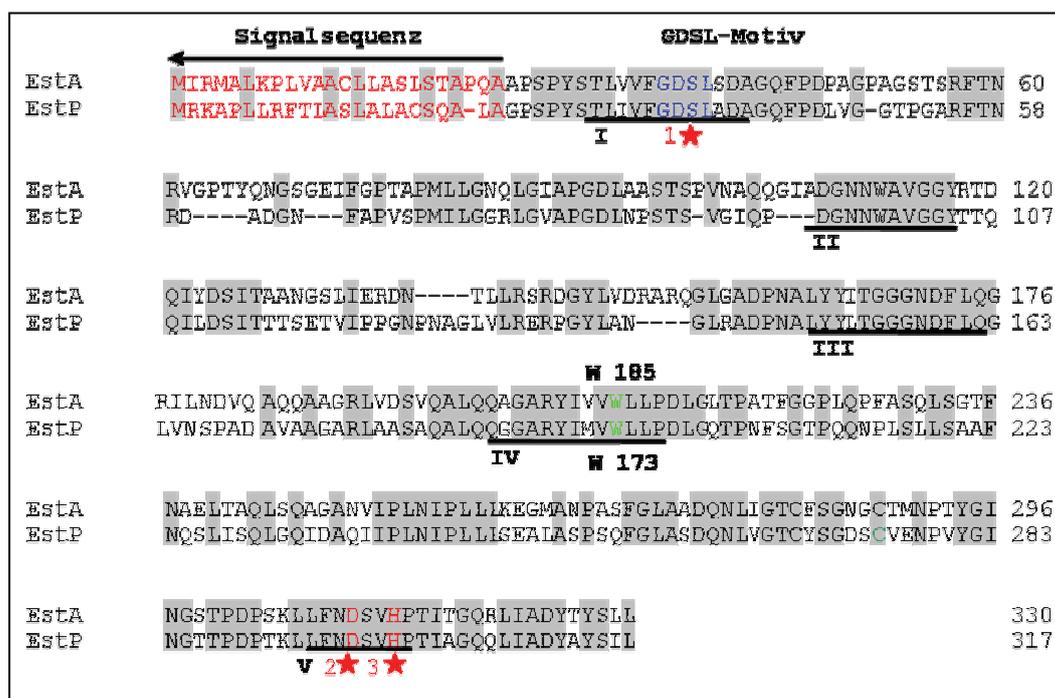


Abb. 3.25: Homologievergleich der katalytisch aktiven Domänen der Esterasen EstA aus *P. aeruginosa* und EstP aus *P. putida*. Die identischen Aminosäuren sind grau unterlegt. Die GDSL-Motive sind blau und die postulierten Signalsequenzen rot geschrieben. Die konservierten Bereiche (Block I - V) der GDSL-Familie sind schwarz unterstrichen und die postulierten katalytischen Triaden sind mit roten Sternen gekennzeichnet. Die Aminosäure Tryptophan (W) an Position 185 (EstA) bzw. 173 (EstP) ist grün geschrieben.

Da bisher noch keine Röntgenkristallstruktur von EstA zur Interpretation des Aminosäureaustausch W185R existiert, wurde ein Modell der N-terminalen katalytischen Domäne von EstA von Filip Kovacic aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit dem Programm Phyre⁶⁴-Server

(www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre) (Kelley and Sternberg, 2009) angefertigt. Dies sollte mögliche Anhaltspunkte bezüglich der molekularen Mechanismen des Enzyms liefern. Die Modellierung basierte auf der Kristallstruktur der Lipase/Acyltransferase EfPLip aus *Enterococcus faecalis* (Zhang *et al.*, unveröffentlicht), deren Aminosäuresequenz allerdings nur eine Homologie von 17 % besitzt. Somit war es nur möglich eine ungefähre Struktur von AS186 bis AS306 von EstA zu modellieren.

In Abbildung 3.26A ist diese Modellstruktur der N-terminalen Domäne von EstA dargestellt. Dabei wurde die postulierte katalytische Triade mit S14 (Serin), D286 (Aspartat) und H289 (Histidin) und die Aminosäure W185, deren Substitution eine Veränderung der Enantioselektivität zur Folge hatte, gelb markiert. Das Tryptophan an Position 185 konnte eindeutig als *hot spot* mit Einfluss auf die Enantioselektivität von EstA identifiziert werden (Becker, 2007). Anhand dieses Strukturmodells sind allerdings nur Spekulationen möglich, die die Wirkung der Mutation W185R für EstA erklären. Die Position 185 scheint in unmittelbarer Nähe der Bindetasche von EstA lokalisiert zu sein.

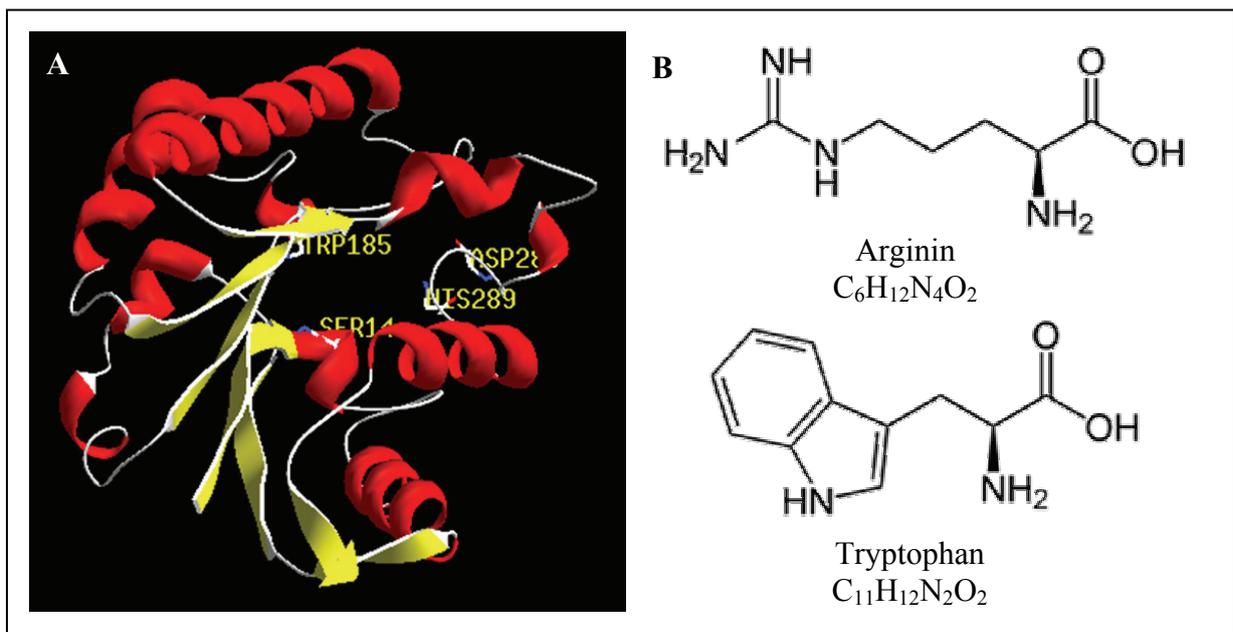


Abb. 3.26: (A) Strukturhomologiemodell der N-terminalen Domäne von EstA aus *P. aeruginosa* und (B) die Strukturformeln der Aminosäuren Arginin und Tryptophan. Die postulierte katalytische Triade aus S14 (Ser), D286 (Asp) und H289 (His) sowie W185 (Trp) sind gelb hervorgehoben (Phyre⁶⁴-Server).

Für Untersuchungen mutagenisierter Varianten eines Enzyms auf Veränderungen der Enantioselektivität gegenüber einem chiralen Carbonsäurerest sollten die katalytischen Eigenschaften des Wildtyps bezüglich des verwendeten Substrats berücksichtigt werden. Es wird vorausgesetzt, dass das Enzym möglichst unselektiv beide enantiomeren Esterbindungen der Carbonsäure hydrolysiert. In Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Retz

(MPI für Kohlenforschung, Mühlheim an der Ruhr) und Prof. Kolmar (Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, TU Darmstadt) wurden die Enantiomere der 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenyl (2-MDA-*p*-NP) ausgewählt. Durch das chirale Zentrum der Methylsubstitution am C2-Kohlenstoffatom liegt die Carbonsäure in Form eines *R*- und *S*-Enantiomers vor (Abbildung 3.27).

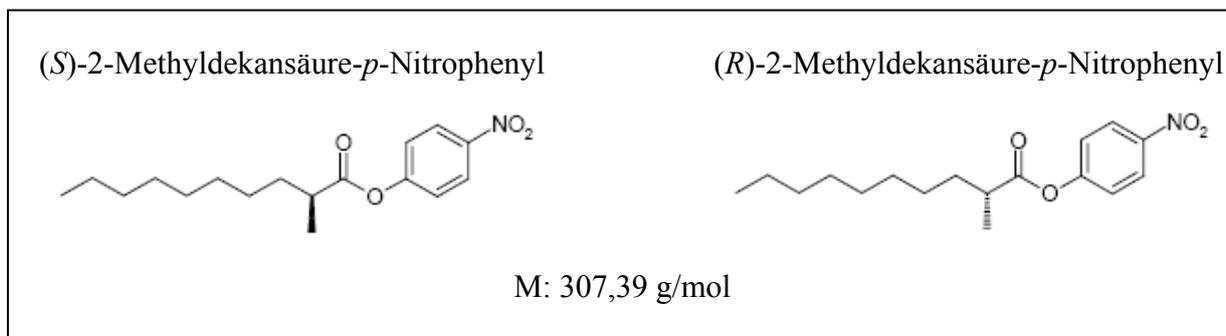


Abb. 3.27: Strukturformel und Molekulargewicht der verwendeten Ester der 2-Methyldekansäure.

Um die strukturellen Veränderungen der Substitution EstA W185R bezüglich der gesteigerten Enantioselektivität gegenüber dem *R*-Enantiomer der 2-MDA-*p*-NP im Vergleich zu EstP beurteilen zu können, wurde die Punktmutation W173R durch eine *overlap-extension* PCR (2.14.2) in *estP* eingefügt. Danach erfolgten entsprechende Aktivitätstests mit separaten Reaktionsansätzen für beide Enantiomere. Zur Mutagenisierung von *estP* wurden die zielgerichteten, mutagenisierenden Oligonukleotiden *estP* W173R up bzw. *estP* W173R down (Tabelle 2.3) zusammen mit den Oligonukleotiden *estP* *Nde*I up bzw. *estP* *Xho*I down und dem Vektor pETEstP als DNA-Matrize in eine PCR-Reaktion eingesetzt (2.14.1), um die Mutation in die DNA-Fragmente zu inserieren. Diese wurden daraufhin gereinigt und in eine weitere PCR-Reaktion mit den flankierenden Oligonukleotiden *estP* *Nde*I up und *estP* *Xho*I eingesetzt, um das vollständige mutagenisierte Gen *estP* W173R zu amplifizieren. Danach wurde das PCR-Produkt in den Expressionsvektor pET22b+ unter der Kontrolle des T7-Promotors kloniert. Das gewünschte Produkt konnte durch Nukleotidsequenzierung (Firma Sequiserve, Vaterstätt) bestätigt werden. Nach heterologer Überexpression von *estP* und der Variante *estP* W173R in *E. coli* BL21 (DE3) für 16 h bei 37 °C in Autoinduktionsmedium (2.4), wurden die Zellen geerntet, die *inclusion bodies* isoliert (2.22), durch Zugabe von Harnstoff denaturiert und anschließend mit dem geeigneten Renaturierungspuffer verdünnt. Nach 3 h erfolgte ein Aktivitätstest (2.35.1.1) mit den renaturierten Proteinen.

Bevor ein Vergleich der Aktivitäten von EstP mit EstP W173R hinsichtlich beider Enantiomere der 2-MDA-*p*-NP erfolgte, sollten die Esteraseaktivitäten mit dem Standard-Substrat für Esterasen *p*-Nitrophenyl-Caproat (*p*-NPC) überprüft werden (Wilhelm *et al.*, 1999). Für die Vergleichbarkeit der Hydrolyse wurde bei jedem Experiment die gleiche Proteinkonzentration eingesetzt.

Zur raschen Bestimmung der Enantioselektivität *E* wurden verschiedene Methoden entwickelt. Da in der Praxis die Ermittlung des *E*-Werts bei irreversiblen, Hydrolase-katalysierten Reaktionen unter kompetitiven Bedingungen nach dem Endpunkt-Prinzip sehr aufwendig ist (Chen *et al.*, 1982), wurde eine Methode zur Berechnung eines Schätzwertes (*Quick E*) entwickelt. Nach diesem System kann der *E*-Wert nach einer Hydrolyse, die eine Hydrolase katalysierte, abgeschätzt werden (Janes and Kazlauskas, 1997). Die Enzymreaktionen verlaufen dabei unter nicht kompetitiven Bedingungen, d.h. jedes Enantiomer wird getrennt von dem Enzym ohne Berücksichtigung potenzieller inhibitorischer und beeinflussender Effekte umgesetzt. Die jeweiligen *E*-Wert-Berechnungen erfolgten mit Hilfe einer linearen Regressionsgerade (Trendlinie), die von dem Programm Microsoft Excel für jeden Reaktionsverlauf erstellt wurde. Der Quotient aus beiden ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten ergibt den scheinbaren *E*-Wert, der auch als apparenter *E*-Wert (E_{app}) bezeichnet wird.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Aktivität gegenüber dem Standard-Esterasesubstrat *p*-NPC bei der Variante EstP W173R im Vergleich zu EstP signifikant vermindert war. Bei EstP wurde eine Aktivität von 29,6 U/mg ermittelt, während EstP W173R mit 20,4 U/mg nur noch 69 % der lipolytischen Aktivität des Wildtyps zeigte (Abbildung 3.28A). Die Verläufe der Hydrolysereaktionen von EstP zeigten im Vergleich zu EstP W173R gegenüber den enantiomeren *p*-Nitrophenylestern der 2-MDA deutliche Unterschiede (Abbildung 3.28B). Die Bestimmung des apparenten *E*-Werts (E_{app}) von EstP ergab 1,2 mit einer leichten Präferenz für das *R*-Enantiomer. Hingegen wurde bei der Variante EstP W173R mit einem E_{app} -Wert von 2,7 eine Verschiebung der Enantioselektivität gegenüber dem *R*-Enantiomer der 2-MDA-*p*-NP ermittelt.

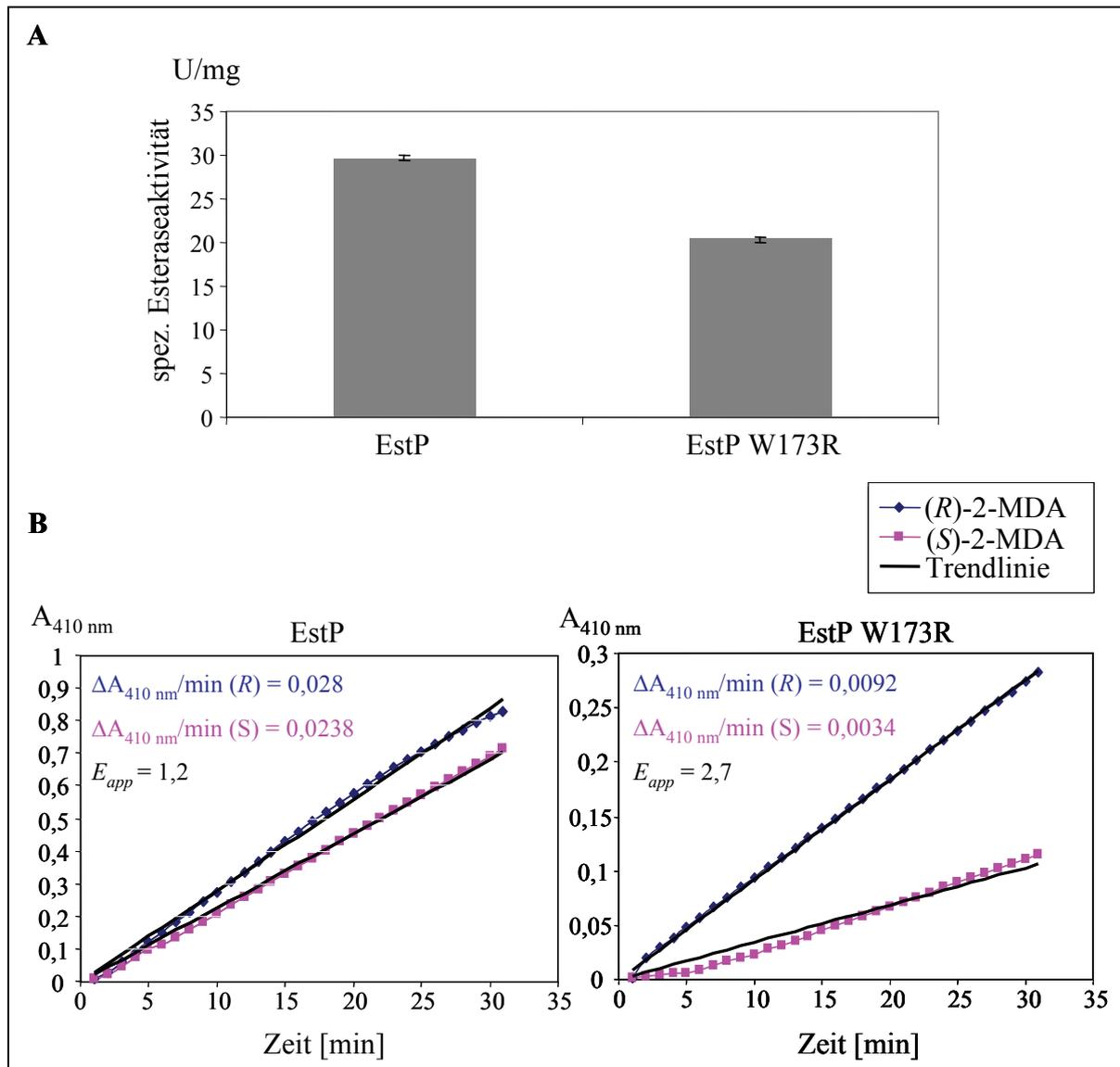


Abb. 3.28: Die spezifische Esteraseaktivität und der Verlauf der Hydrolysereaktion der Enantiomeren des *p*-Nitrophenylesters der 2-MDA von EstP und der Variante EstP W173R. (A) Spezifische Esteraseaktivität gegenüber dem Standardsubstrat *p*-NPC. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen. (B) Es wurde der Hydrolyseverlauf von EstP (links) und der Variante EstP W173R (rechts) gegenüber dem (*R*)-Enantiomer (blau) und (*S*)-Enantiomer (pink) des *p*-Nitrophenolester der 2-MDA dargestellt. In den Diagrammen ist die Zeit gegen die Absorption bei 410 nm ($A_{410 \text{ nm}}$) aufgetragen. Der Quotient der Reaktionsgeschwindigkeit aus beiden Reaktionen ergibt den apparenten *E*-Wert (E_{app}).

3.4.2 Die Enantioselektivität der Variante EstP_N W173R

Es besteht die Möglichkeit, nur die N-terminale katalytische Domäne des Autotransporterproteins EstP (EstP_N) für enzymatische Untersuchungen zu exprimieren. Da in diesem Kapitel die strukturellen und biochemischen Veränderungen der Passagierdomäne von EstP, die durch die Substitution W173R entstanden sind, untersucht werden sollten, erfolgten die weiteren Experimente nur mit der Passagierdomäne EstP_N und der Variante EstP_N W173R. Dafür wurden die Genregionen, die die N-terminalen Domänen beider Proteine kodieren, durch eine

PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *estP* ohne SS *NdeI* up und *estP_N* down (Tabelle 2.3) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden nach *NdeI/SacI*-Hydrolyse analog zu den Vollängenproteinen ohne Signalsequenzen in den Expressionsvektor pET22b+ unter der Kontrolle des T7-Promotors kloniert und heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert.

Die isolierten *inclusion bodies* (2.22) von EstP_N und EstP_N W173R wurden denaturiert und daraufhin durch *in vitro*-Faltung aktiviert (2.23), um durch Aktivitätstests den Einfluss der Substitution W173R auch für die Passagierdomäne von EstP hinsichtlich der Enantioselektivität gegenüber der 2-MDA überprüfen zu können. Gegebenenfalls wären Aktivitätsunterschiede zwischen dem Vollängenprotein von EstP bzw. EstP W173R und der Passagierdomäne EstP_N bzw. EstP_N W173R von großem Interesse.

Zuerst wurde die Esteraseaktivität (2.35.1.1) von EstP_N und EstP_N W173R mit dem Standard-Substrat *p*-NPC verglichen (Abbildung 3.29A). Die Ergebnisse der spezifischen Aktivität ergaben bei der Variante EstP_N W173R eine Verminderung um 51 % im Vergleich zu der Aktivität des Wildtyps EstP_N. Die spezifische Esteraseaktivität von EstP_N entsprach 351 U/mg und EstP_N W173R 172 U/mg. Zusätzlich fiel eine Aktivitätssteigerung $K_{\text{kat}}[\text{s}^{-1}]$ um mehr als das fünffache der N-terminalen Domänen EstP_N in Relation zum Vollängenprotein EstP auf, wenn die unterschiedliche molekulare Masse der Enzyme berücksichtigt wurde (Tabelle 3.3). Weitere Untersuchungen werden im folgenden Kapitel 3.5 betrachtet.

Tab. 3.3: Übersicht der ermittelten Enzymaktivitäten von EstP, EstPW173R, EstP_N und EstP_N W173R gegenüber *p*-NPC. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von drei unabhängig durchgeführten Messungen und der entsprechenden Standardabweichung.

Enzym	[U/mg]	$K_{\text{kat}} [\text{s}^{-1}]$
EstP	29,6 ± 0,30	33,0 ± 0,9
EstP W173R	20,4 ± 0,31	22,8 ± 0,4
EstP_N	351,0 ± 29,0	181,3 ± 15,0
EstP_N W173R	172,0 ± 7,00	88,9 ± 3,0

Die Enantioselektivitäten gegenüber den enantiomeren *p*-Nitrophenylestern der 2-MDA zeigten die gleiche Tendenz wie die Messungen des Vollängenproteins 3.4.1. Während beim Wildtyp EstP_N der E_{app} -Wert von 1,2 mit leichter Präferenz zum *R*-Enantiomer sich mit dem Ergebnis von EstP deckte, konnte eine erneute Zunahme der Enantioselektivität von EstP_N W173R gegenüber dem *R*-Enantiomer mit einem E_{app} -Wert von 4,8 ermittelt werden (Abbildung 3.29B).

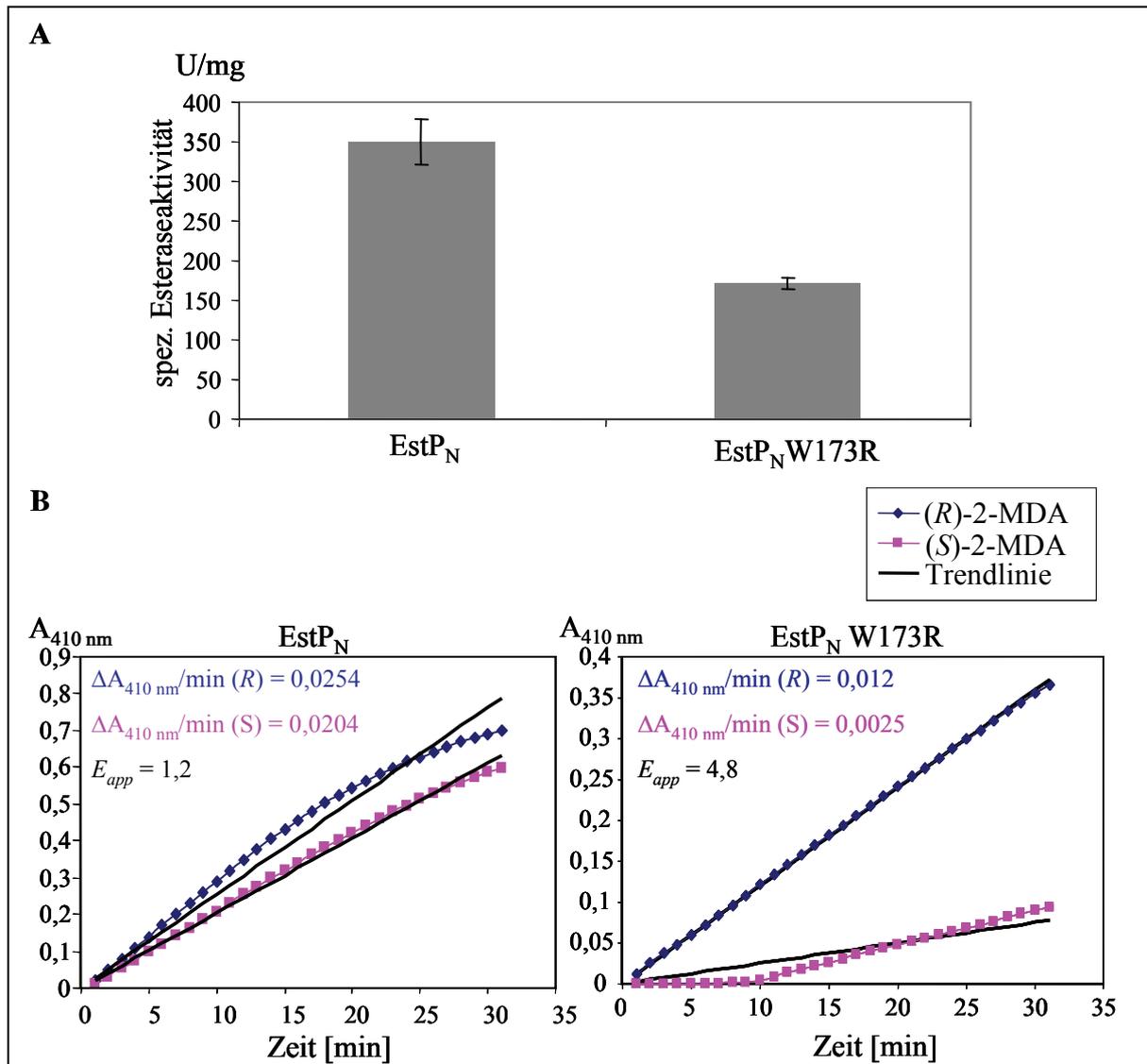


Abb. 3.29: Bestimmung der Esteraseaktivität und der Verlauf der Hydrolysereaktion der Enantiomeren des *p*-Nitrophenylesters der 2-MDA von EstP_N und der Variante EstP_N W173R. (A) Spezifische Esteraseaktivität gegenüber dem Standardsubstrat *p*-NPC. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen. (B) Es wurde der Hydrolyseverlauf von EstP (links) und der Variante EstP W173R (rechts) gegenüber dem (*R*)-Enantiomer (blau) und (*S*)-Enantiomer (pink) des *p*-Nitrophenylesters der 2-MDA dargestellt. In den Diagrammen ist die Zeit gegen die Absorption bei 410 nm ($A_{410 \text{ nm}}$) aufgetragen. Der Quotient der Start-Reaktionsgeschwindigkeit aus beiden Reaktionen ergibt den apparenten *E*-Wert (E_{app}).

Die Esterasevarianten EstP W173R und EstP_N W173R zeigten eine signifikante Steigerung der Enantioselektivität mit Präferenz gegenüber dem *R*-Enantiomer der 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenolester. Dieser Effekt wird von einer Aktivitätsminderung gegenüber dem Standardsubstrat *p*-NPC begleitet. Gleichzeitig ist die Esteraseaktivität der Passagierdomäne EstP_N deutlich höher als im Vergleich zum Volllängenprotein EstP.

3.4.3 Optimierung der heterologen Überexpression und Reinigung von EstP_N und EstP_N W173R

Präzise Vorhersagen der Struktur-Funktions-Beziehungen von EstP aus *P. putida* KT2440 sind derzeit aufgrund der fehlenden Kristallstruktur nicht möglich. Ebenfalls existiert bisher noch keine Kristallstruktur einer GDSL-Hydrolase, die ausreichende Homologien zu EstP aufweist, um ein Strukturmodell herleiten zu können. Die Thioesterase I (TAP-like-Protein) aus *E. coli*, deren Röntgenstruktur gelöst wurde (Lo *et al.*, 2003), zeigt mit 20 % die größte Homologie zu EstP_N. Die Modellierungen einer hypothetischen Struktur von EstP_N, basierend auf dieser Matrize, würde nur ein lückenhaftes Modell liefern, da die Thioesterase I aus *E. coli* nur aus 179 Aminosäuren besteht. Folglich wären Interpretationen von strukturellen Veränderungen durch Substitutionen nur spekulativ. Um künftige Stukturanalysen und Vorhersagen über Einflüsse einzelner Aminosäuren auf die molekularen Mechanismen zu ermöglichen, sollte die Röntgenkristallstruktur von EstP_N aufgeklärt werden. Parallel sollte die Variante EstP_N W173R behandelt werden, um die strukturelle Veränderung, die durch die Substitution W173R bewirkt wurde und für die Steigerung der Enantioselektivität verantwortlich ist, direkt vergleichen zu können.

Um eine Kristallisation zu ermöglichen, sollte zuerst die heterologe Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) optimiert werden, um ausreichend Protein für die Etablierung eines effizienten Reinigungsverfahrens mit anschließenden Kristallisationsversuchen zur Verfügung stellen zu können.

Für die heterologe Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) wurde bereits ein System etabliert, welches auf dem Vektor pET22b+ basiert (Schell, 2005). Dieses Plasmid trägt das Gen *estP_N* (pETE_{estP_N}) bzw. *estP_NW173R* (pETE_{estP_NW173R}) ohne Signalsequenz unter der Kontrolle des T7-Promotors. Bei diesem Expressionssystem aggregiert die Esterase intrazellulär und bildet *inclusion bodies*. Diese können durch Zentrifugation von den anderen Proteinen getrennt werden und nach einer chemischen Denaturierung durch *in vitro*-Faltung in eine enzymatisch aktive Form überführt werden (Schell, 2005).

Die Überexpression erfolgte 16 h bei 30 °C in Autoinduktionsmedium (2.4). Anschließend wurden die Zellen geerntet, die *inclusion bodies* gereinigt (2.22) und die einzelnen Fraktionen durch eine SDS-PAGE (2.26) analysiert. Die Abbildung 3.30 zeigt ein hohes Expressionslevel in Form von *inclusion bodies* der Esterasen EstP_N sowie EstP_N W173R im Vergleich zur Negativkontrolle durch eine Intensitätszunahme der Proteinbande, die mit etwa 31 kDa den berechneten Molekulargewichten der Zielproteine entsprach.

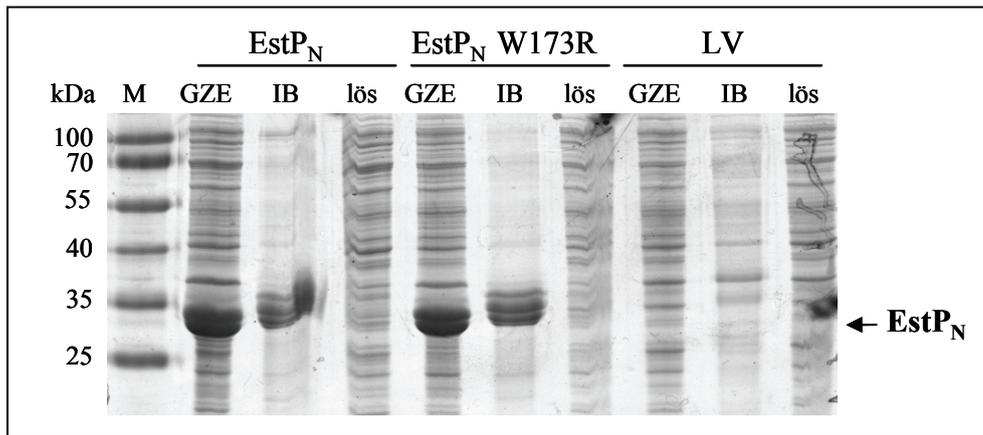


Abb. 3.30: SDS-PAGE der heterologen Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) in Autoinduktionsmedium und Reinigung der inclusion bodies von EstP_N und EstP_N W173R. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt das Expressionslevel der inclusion bodies von EstP_N und EstP_N W173R in den einzelnen Fraktionen. Als Negativkontrolle erfolgte eine äquivalente Expression mit dem Plasmid pET22b+ (LV). Die aufgetragenen Volumina der Proben wurde auf die gleiche Zelldichte (O.D. 580 nm = 0,15) bezogen. Das Trenngel (12 %) wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. M: Marker, „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas); GZE: Gesamtzellextrakt, IB: inclusion bodies, lös.: lösliche Proteinfraction.

Bei einer heterologen Expression von *estP_N* und *estP_N* W173R konnte in Autoinduktionsmedium die Bildung der jeweiligen inclusion bodies gesteigert werden. Dieses Medium erwies sich als vorteilhaft, da es sowohl eine hohe Zelldichte als auch eine effiziente Überexpression des Zielproteins erzielte.

Nach Aufarbeitung des Gesamtzellextrakts konnten die inclusion bodies schon weitgehend von Fremdproteinen isoliert werden. Dennoch wurde kein elektrophoretisch reines Protein isoliert. Folglich waren weitere Reinigungsschritte erforderlich. Die Experimente für die Optimierung der Reinigung von EstP_N und der Variante EstP_N W173R erreichten die erwünschte Homogenität durch eine immobilisierende Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). Für diese Reinigungsmethode wurden die Proteine C-terminal mit einem Histidin-Hexapeptid (*His₆-Tag*) fusioniert, um sie mit einer Ni²⁺-NTA-Säule leicht reinigen zu können. Diese *His₆*-Fusion resultierte nach *Xho*I-Hydrolyse der Expressionsvektoren pETEstP_N und pETEstP_N W173R und anschließender Ligation.

Die Fusionsproteine EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R konnten mit Hilfe eines immunologischen Nachweises durch eine Markierung mit den spezifischen Antikörpern gegen den *His₆-Tag* detektiert werden (Abbildung 3.31). Die Signale der spezifischen Proteinbanden entsprachen der molekularen Größe von EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R von etwa 31 kDa.

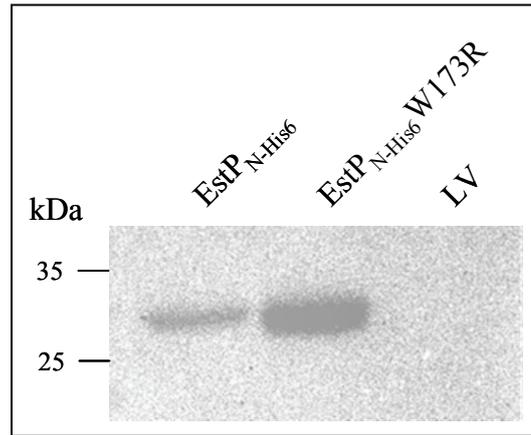


Abb. 3.31: Immunologischer Nachweis der Fusionsproteine EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R nach heterologer Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3). Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das Histidin-Hexa-Peptid (anti-His₆) (Invitrogen). Als Negativkontrolle diente *E. coli* BL21 (DE3) mit pET22b+ (LV). Die aufgetragenen Volumina wurden auf eine gleiche Zelldichte von O.D. 580 nm = 0,15 bezogen.

Die Reinigung der Fusionsproteine EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6}W173R sollte unter denaturierenden Bedingungen erfolgen, da diese in nativem Zustand nicht erfolgreich war (Schell, 2005). Nach der heterologer Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) mit den Plasmiden pETEStP_{N-His6} und pETEStP_{N-His6}W173R in Autoinduktionsmedium wurden die Zellen nach 16 h geerntet. Nach Isolierung der *inclusion bodies*, in denen die Esterasen enthalten waren, wurden diese chemisch unter Einsatz von Harnstoff denaturiert und mit Hilfe einer IMAC gereinigt (2.24). Danach wurden die Proteine durch *in vitro*-Faltung (2.23) in eine enzymatisch aktive Konformation überführt.

Der Reinigungsverlauf der Esterasen mittels IMAC ist exemplarisch von EstP_{N-His6} in Abbildung 3.32A dargestellt. Das Bandenmuster der SDS-PAGE lässt erkennen, dass EstP_{N-His6} selektiv an der Säulenmatrix gebunden hat, sodass die Elution des Proteins in nahezu elektrophoretischer homogener Form erfolgte. Nach Vereinigung der Fraktionen der Elution und anschließender Renaturierung wurden die Proteine konzentriert und deren Aktivitäten durch einen Esteraseaktivitätstest (2.35.1.1) überprüft (ohne Abbildung). Zum Schluss wurden je 5 µg der Endprodukte von EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6}W173R mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.32B). Die Proteine erwiesen sich als elektrophoretisch homogen.

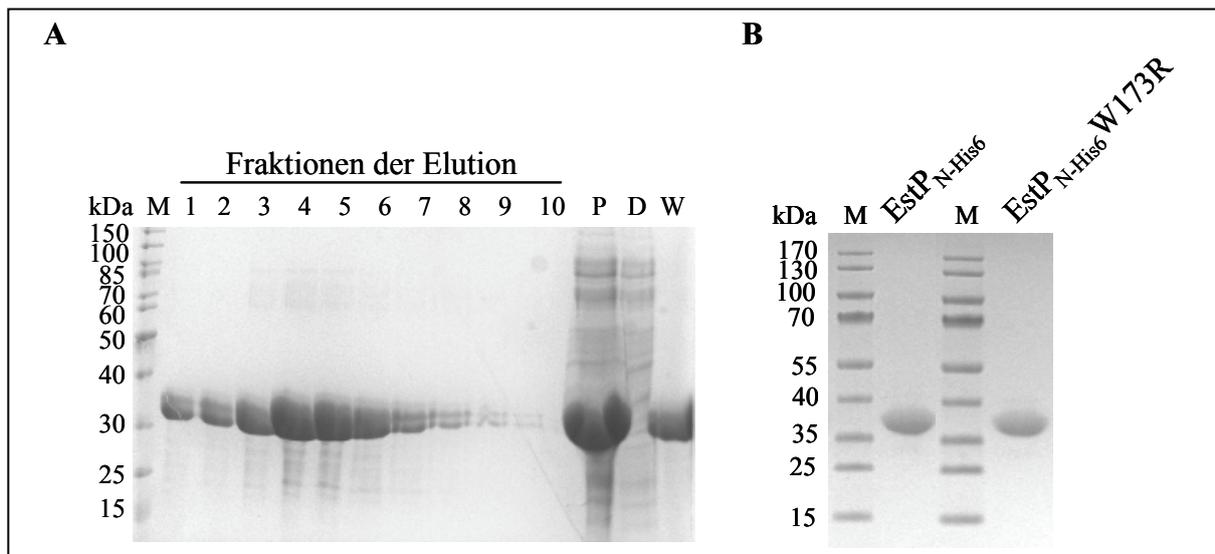


Abb. 3.32: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von EstP_{N-His6} durch eine immobilisierende Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) und Nu-PAGE[®] mit den gereinigten Endprodukten von EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R. (A) Auf die SDS-PAGE (12%) wurden je 10 µl der einzelnen Fraktionen zur Analyse aufgetragen. (B) Das Gel (Nu-PAGE[®], 4 - 12 %-iges Bis-Tris Gel (Invitrogen)) wurde jeweils mit 5 µg der gereinigten, renaturierten Proteine beladen. M: Marker (A) „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“, (B) „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas), 1-10: Fraktionen der Elution, P: Proteinrohextrakt, D: Durchfluss, W: Waschfraktion.

Für Kristallisationsexperimente von Proteinproben ist ein hoher Grad an Reinheit und Homogenität wichtig. Die Proteine waren elektrophoretisch rein, wodurch grobe Verunreinigungen durch Fremdproteine auszuschließen waren. Hingegen waren nach der Säulenchromatographie mögliche Fehlfaltungen, die bei der *in vitro*-Faltung entstanden sein könnten, durch SDS-PAGE-Analyse nicht erkennbar, da diese unter denaturierenden Bedingungen erfolgte. Für eine Bestätigung, dass die Zielproteine in homogener Form vorliegen, wurde eine analytische Größenausschlusschromatographie mit einer HPLC-Analyse (2.24.2) durchgeführt. Dabei können mögliche fehlgefaltete Proteinkonformationen erkannt werden, falls die ungleichen Faltungsintermediate bei unterschiedlichen Retentionszeiten detektiert werden. In den Chromatogrammen der HPLC-Analyse konnte jeweils nur ein Signal detektiert werden (Abbildung 3.33). Letztlich konnten Fremdproteine und fehlgefaltete Proteine mit veränderter Retentionszeit ausgeschlossen werden. Anhand der Kalibrierkurve (Abbildung nicht gezeigt) wurde für EstP_{N-His6} ein Molekulargewicht von 34,9 kDa und für EstP_{N-His6} W173R eine Größe von 34,5 kDa ermittelt.

Die Reinigung der Proteine konnte erfolgreich optimiert werden, sodass ausreichend große Mengen reines Protein für Kristallisationsexperimente zur Strukturaufklärung bereitgestellt werden konnten. Die Kristallisationsstudien finden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Arne Skerra am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München statt.

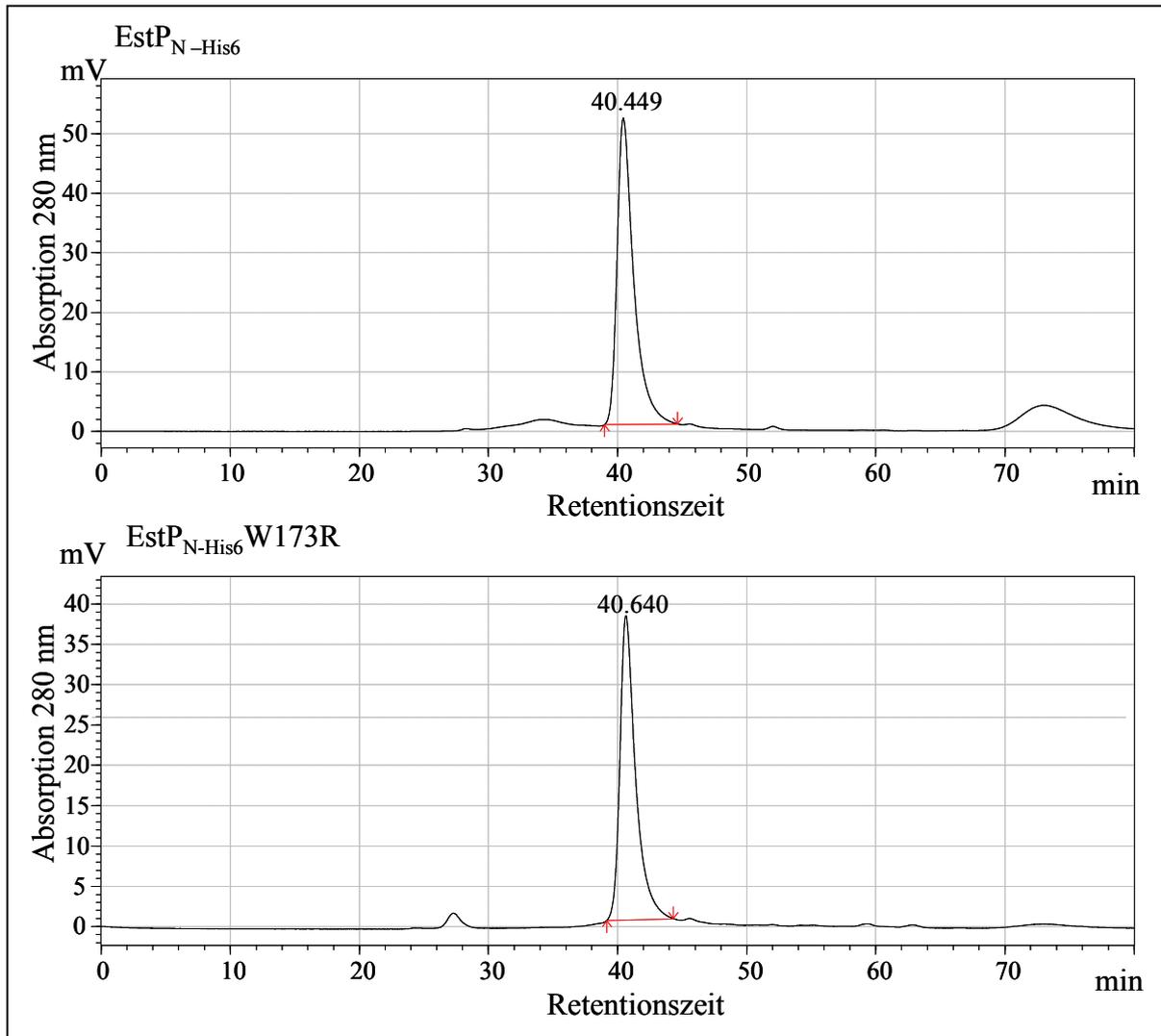


Abb. 3.33: HPLC-Chromatogramme der gereinigten Fusionsproteine EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R. Die Proben wurden in einer Konzentration von 1,5 mg/ml auf eine TOSOH TSK gel G2000SWxL Gelfiltrationssäule gegeben. Die photometrische Proteindetektion erfolgte bei 280 nm.

Die Optimierung der heterologen Expression in *E. coli* BL21 (DE3) und die anschließenden Reinigungen von EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R waren erfolgreich. Es konnten insgesamt 223 mg EstP_{N-His6} W173R und 85 mg EstP_{N-His6} gereinigt und für Kristallisationsexperimente zur Verfügung gestellt werden.

3.4.4 Die Enantiopräferenz der Esterasevarianten EstP_{N-His6} W173R und EstP W173R

Für eine zuverlässige Charakterisierung von Enzymen hinsichtlich ihrer Enantioselektivität sollten die apparenten E -Werte (E_{app}) mit den wahren E -Werten (E_{true}) übereinstimmen, da sie sich aus Konkurrenzexperimenten ergeben. Während die Berechnungen der E_{app} -Werte durch die jeweilige anfängliche Hydrolyserate der separaten Reaktionsansätze sowohl für das *S*- als auch für das *R*-Enantiomer der 2-MDA erfolgt (Janes and Kazlauskas, 1997), beschreibt der E_{true} -Wert eines Enzyms immer ein Gesamtsystem unter kompetitiven Bedingungen (Racematspaltung). Dabei werden die Enantiomerenüberschüsse des Edukts und des Produkts sowie der Umsatz bei der Berechnung berücksichtigt (Chen *et al.*, 1982). Auf diese Weise werden potenzielle inhibitorische und beeinflussende Effekte der Reaktion einkalkuliert. Für die Bestimmung der Stereoselektivität (E_{true}) wurde für EstP und EstP_{N-His6} sowie EstP W173R und EstP_{N-His6} W173R eine Racematspaltung der 2-MDA-*p*-NP durchgeführt. Nach der Reaktion wurde das Edukt ebenso wie die entstandenen Produkte mit Hilfe einer gaschromatographischen Analyse unter Verwendung chiraler Trennsäulen analysiert. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Reetz am MPI für Kohlenforschung (Mülheim) durchgeführt. Ein repräsentatives Beispiel eines Chromatogramms der Gaschromatographie-Analyse von EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6}W173R wurde in Abbildung 3.34 dargestellt. Alle weiteren GC-Chromatogramme befinden sich im Anhang (Abbildung 7.2).

Die Berechnungen der scheinbaren Enantioselektivitäten der Wildtypproteine EstP und EstP_{N-His6} ergaben einen E_{app} -Wert von 1,2 mit geringer Präferenz für das *R*-Enantiomer (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2) und entsprachen exakt dem wahren E -Wert ($E_{true} = 1,2$), der durch GC-Analyse bestimmt wurde (Tabelle 3.3). Während ein E_{app} -Wert für EstP W173R von 2,7 ermittelt werden konnte, resultierte ein signifikant höherer E_{true} -Wert von 20 nach gaschromatographischer Analyse der Racematspaltung. Der E_{app} -Wert von EstP_{N-His6} W173R entsprach 4,8, hingegen betrug der E_{true} -Wert = 2 - 3 und zeigte eine moderate Erhöhung der Enantioselektivität. Da bei EstP_{N-His6} W173R, im Gegensatz zu EstP W173R, unter den gleichen Bedingungen der racemischen Hydrolyse von 2-MDA-*p*-NP eine deutlich geringere Verschiebung der Enantioselektivität resultierte, wurden die Reaktionsbedingungen variiert. Anschließend erfolgte ebenfalls eine gaschromatographische Analyse des Edukts und der Produkte. Während keine thermischen Einflüsse der racemischen Hydrolyse von 2-MDA-*p*-NP durch EstP_{N-His6} W173R beobachtet werden konnten (ohne Abbildung), war eine pH-Wert-Abhängigkeit der Stereoselektivität erkennbar (Tabelle 3.3). Bei einer Hydrolyse

des racemischen Gemischs der *p*-NP-2-MDA in Tris-HCL-Puffer [pH 8,0], zeigte EstP_N W173R eine Steigerung der Enantioselektivität mit Präferenz für das *R*-Enantiomer mit einem E_{true} -Wert von 4 - 5. Bei einer racemischen Hydrolysereaktion von 2-MDA-*p*-NP in Zitratpuffer [pH 5,2] konnte ein E_{true} -Werts von 18 erzielt werden. Eine Zusammenfassung der ermittelten E -Werte der Enzyme in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

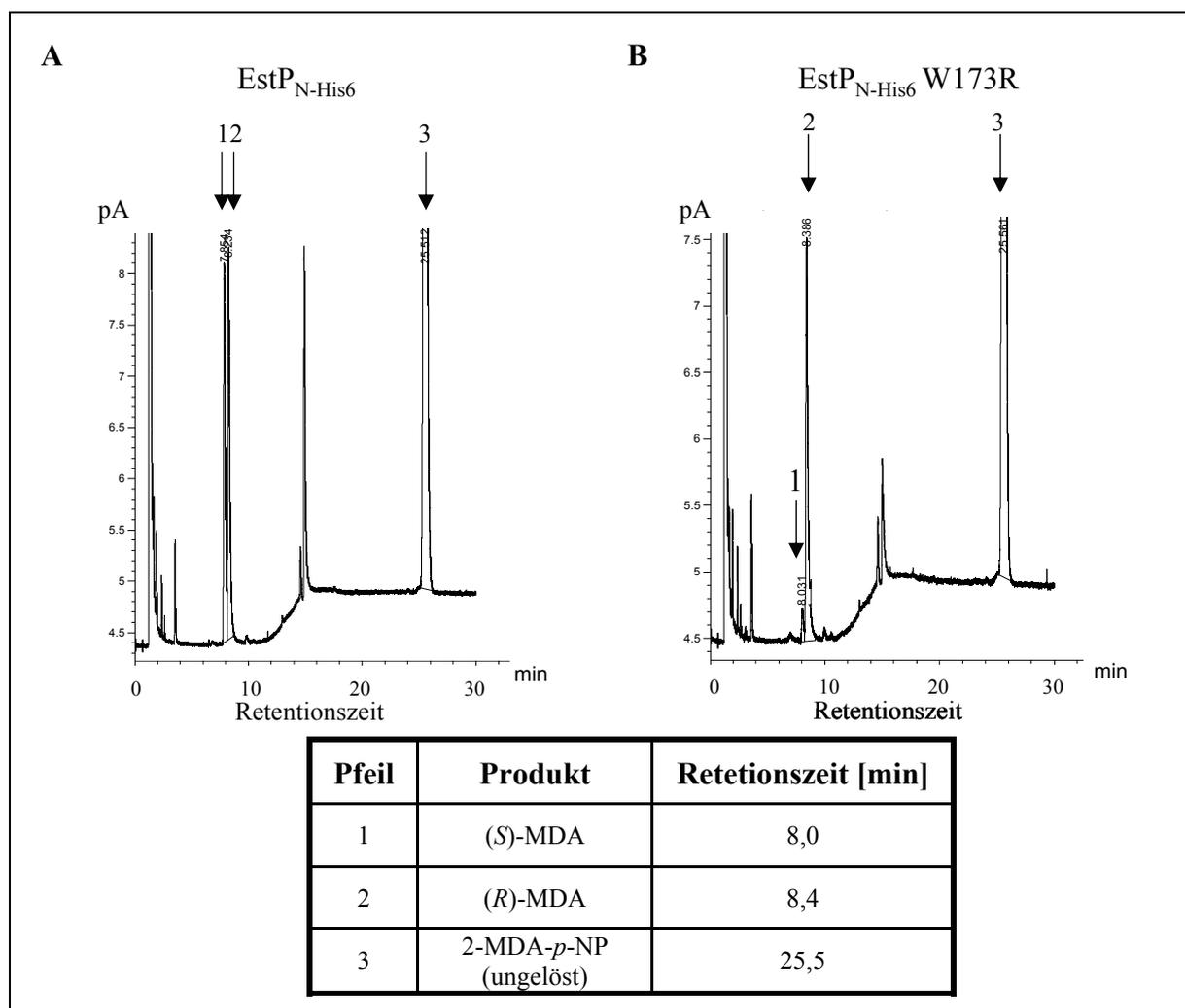


Abb. 3.34: Gaschromatographische Analyse nach lipolytischer Hydrolyse des 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenolesters durch EstP_{N-His6} (A) und EstP_{N-His6} W173R (B) in Zitratpuffer [pH 5,2]. In den Diagrammen ist jeweils die Leitfähigkeit des Detektors [pA] gegen die Retentionszeit [min] aufgetragen. Die Signale der Endprodukte bzw. des ungelösten Substratgemisches sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. In der Tabelle werden die Diagramme erklärt, indem den Pfeilen die entsprechenden Produkte sowie die Retentionszeiten zugeordnet werden.

Tab. 3.4: Zusammenfassung der ermittelten E_{app} - und E_{true} -Werte von EstP, EstP_{N-His6} und den Mutanten in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen.

Protein	Stereoselektivität	E_{app}	E_{true}
Phosphat-Puffer [pH 7,2]			
EstP	<i>R</i>	1,2	1,2
EstP W173R	<i>R</i>	2,7	20
EstP _{N-His6}	<i>R</i>	1,2	1,2
EstP _{N-His6} W173R	<i>R</i>	4,8	2 - 3
Tris-HCL-Puffer [pH 8,0]			
EstP _{N-His6}	<i>R</i>	-	1,2
EstP _{N-His6} W173R	<i>R</i>	-	4 - 5
Zitrat-Puffer [pH 5,2]			
EstP _{N-His6}	<i>R</i>	-	1,2
EstP _{N-His6} W173R	<i>R</i>	-	18

Durch gaschromatographische Analyse und Bestimmung des E_{true} -Werts konnte eine deutliche Steigerung der Enantioselektivität mit Präferenz gegenüber dem *R*-Enantiomer de 2-MDA-*p*-NPE der Varianten EstP W173R und EstP_{N-His6} W173R festgestellt werden. Zudem war zu beobachten, dass die optimalen Reaktionsbedingungen des Vollängenproteins EstP W173R und der katalytischen Domäne EstP_{N-His6} W173R unterschiedlich waren. Dies ist einer der ersten experimentellen Hinweise darauf, dass die Interaktionen zwischen beiden Autotransporterdomänen zu Veränderungen der Enzymaktivität führen können.

3.5 Konstruktion, Expression und Charakterisierung der Chimäre aus den homologen Autotransporterproteinen EstA aus *P. aeruginosa* und EstP aus *P. putida*

Die homologen Esterasen EstA aus *P. aeruginosa* und EstP aus *P. putida* sind beide monomere Autotransporterproteine und gehören zur Familie der GDSL-Hydrolasen. Durch Homologievergleiche lassen sich die nativen Proteine in eine N-terminale katalytisch aktive Domäne von 309 (EstA) bzw. 297 (EstP) Aminosäuren und eine C-terminale Transportdomäne von 287 (EstA) bzw. 283 (EstP) Aminosäuren unterteilen. Die Domänen werden in beiden Fällen wahrscheinlich durch eine α -Helix miteinander verbunden. Da bei diesen Autotransporterproteinen die Enzymdomäne auf der Zelloberfläche der Bakterien kovalent gebunden bleibt, ist es möglich, dass intramolekulare Interaktionen zwischen beiden Domänen für die zelluläre Lokalisation der Passagierdomäne und für die physiologische Funktion der Enzyme von Bedeutung sind.

Es wurde ein Modell konstruiert, das die postulierte Aminosäureorganisation der β -Pore von EstA, die von der Transportdomäne in der äußeren Membran gebildet wird, schematisch darstellt (Abbildung 3.35). Daran ist zu erkennen, dass die großen extrazellulären Schleifen von einer hohen Anzahl geladener Aminosäuren geprägt sind (Abbildung 3.35).

Zusätzlich wird die Vermutung, dass die Passagierdomäne sowohl von EstA als auch von EstP auf irgendeine Weise mit der jeweiligen Transportdomäne auf der Zelloberfläche interagiert, durch die Beobachtungen des vorherigen Kapitels 3.4.4 gestützt.

Um mögliche Interaktionen zwischen Passagier- und Transportdomäne der Autotransporterproteine EstA und EstP zu analysieren, sollten in diesem Kapitel Chimäre konstruiert werden. Anschließend sollte eine Expression der Chimäre sowohl in *P. putida* als auch in *P. aeruginosa* erfolgen und mögliche Unterschiede bezüglich der Sekretion und Enzymaktivität im Vergleich zu den Wildtypproteinen untersucht werden.

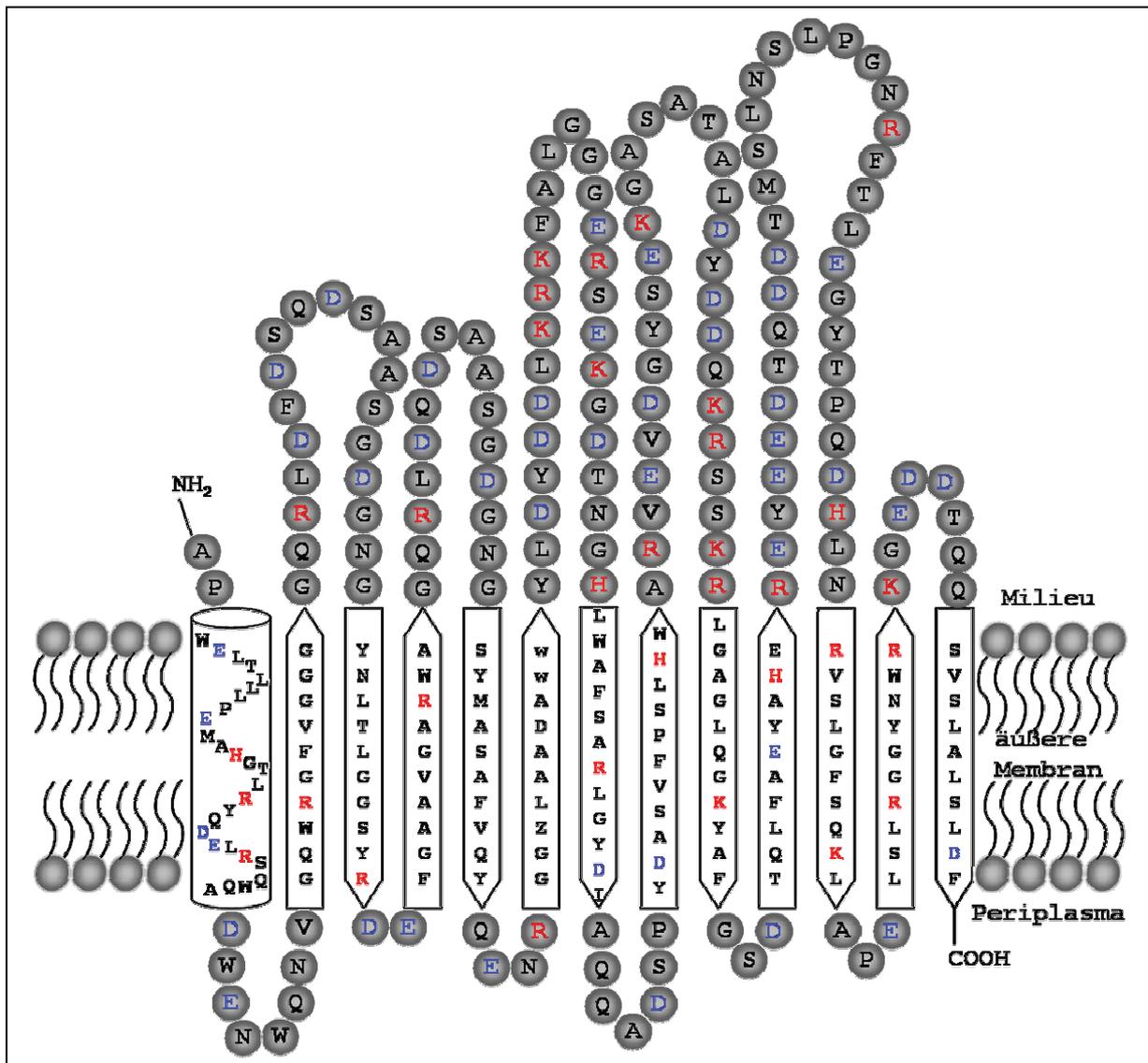


Abb. 3.35: Schematische Darstellung der postulierten Organisation der Aminosäuren der Transportdomäne von EstA in der äußeren Membran von *P. aeruginosa*. Die Transportdomäne von EstA bildet 12 amphipathische β -Faltblätter (Pfeile) und eine α -Helix (Zylinder). Die bei neutralem pH-Wert positiv geladenen Aminosäuren Lysin (K), Arginin (R) und Histidin (H) sind rot, die negativ geladene Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) ist blau markiert.

3.5.1 Konstruktion der Chimäre EstA_NP_C und EstP_NA_C und Expression in *P. aeruginosa* und *P. putida*

Wahrscheinlich finden molekulare Interaktionen zwischen der Passagier- und Transportdomäne von EstA und EstP auf der Zelloberfläche statt. Um Untersuchungen durchführen zu können, die diese Theorie stützen könnten, sollten Chimäre der Autotransporterproteine EstA und EstP konstruiert werden. Danach sollten die eventuellen Unterschiede bezüglich der Sekretion und Aktivität analysiert werden. Die Chimäre wurden durch einen Austausch der homologen Passagierdomänen von EstA und EstP erstellt. Für die Konstruktion der Chimäre wurden die Expressionsvektoren pBBX+ und pBBREstP gewählt. Dabei handelt es sich um das pBBR1MCS Plasmid, bei dem die Gene von *estA* bzw. *estP* unter der Kontrolle des konstitutiven *lac*-Promotors stehen. Für einen leichten Austausch der Genregionen, die die jeweilige Passagierdomäne von EstA bzw. EstP kodieren, wurde jeweils durch eine *overlap extension*-PCR (2.14.2) in das 3'-Ende der Gensequenz eine *NheI*-Erkennungssequenz eingefügt. Dafür wurde je ein mutagenisierendes Oligonukleotid *estA NheI* up oder *estA NheI* down (*estA*) bzw. *estP NheI* up oder *estP NheI* down (*estP*) (Tabelle 2.3) zusammen mit dem jeweiligen flankierenden Oligonukleotid *estA* up oder *estA* down bzw. *estP XhoI* up oder *estP BamHI* down (Tabelle 2.3) in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Als DNA-Matrize dienten die Expressionsplasmide pBBX+ (*estA*) bzw. pBBREstrP (*estP*). Nach Reinigung der PCR-Produkte konnten diese zusammen mit den entsprechenden flankierenden Oligonukleotiden in eine weitere PCR-Reaktion eingesetzt werden, um die Gene *estP* bzw. *estA*, die eine *NheI*-Erkennungssequenz trugen, vollständig zu amplifizieren. Danach wurden die Gene analog zu pBBX+ und pBBREstP durch *MluI*-Hydrolyse (*estA*) bzw. durch *XhoI/BamHI*-Hydrolyse in die jeweiligen Vektoren kloniert. Es resultierten die Plasmide pBBX*NheI* und pBBP*NheI*. Eine anschließende *NheI/ApaI*-Hydrolyse dieser Vektoren ermöglichte einen leichten Austausch der Genregionen *estA_N* und *estP_N*, die die Passagierdomänen kodieren (Abbildung 3.36).

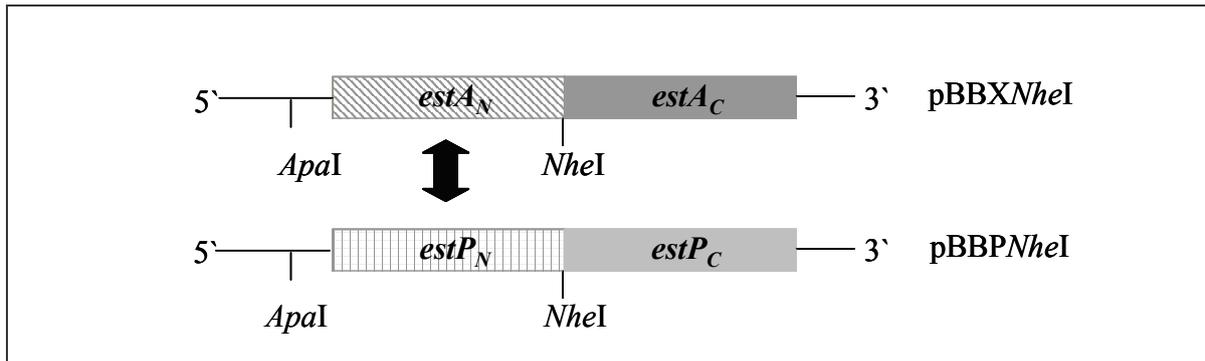


Abb. 3.36: Schematische Darstellung der Konstruktion der Chimäre. Die Konstruktion ging von den Expressionsvektoren pBBXNheI (*estA*) und pBBPNheI (*estP*) aus. Durch eine overlap extension-PCR wurde in die Gene *estA* und *estP* jeweils eine *NheI*-Erkennungssequenz eingefügt. Dies ermöglichte den Austausch der DNA-Fragmente, die die jeweilige Passagierdomäne kodieren, nach einer Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *NheI*.

Anfangs sollten die Chimäre EstA_NP_C und EstP_NA_C sowohl in *P. aeruginosa* PASCHI (Δ *estA*) als auch in *P. putida* KT0418 (Δ *estP*) exprimiert werden, da in diesen Stämmen eine Hintergrundaktivität der chromosomal kodierten Esterasen EstA bzw. EstP ausgeschlossen werden konnte. Dazu wurden die Expressionsvektoren der Chimäre pBBA_NP_C und pBBP_NA_C und der Wildtypproteine pBBX⁺ und pBBREstP ebenso wie der entsprechende Leervektor pBBR1MCS durch Konjugation (2.13) in die Deletionsmutanten von *P. aeruginosa* PASCHI (Δ *estA*) und *P. putida* KT0418 (Δ *estP*) eingebracht. Um zu überprüfen, ob die Stämme die Chimäre überhaupt exprimieren können und der Transport der Autotransporterproteine nicht beeinträchtigt ist, wurden Esteraseaktivitätstest (2.35.1.1) von ganzen Zellen der jeweiligen Kulturen durchgeführt. Bei einer Expression, gefolgt von einer Translokation der Enzymdomäne auf die Zelloberfläche, sollten die lipolytischen Aktivitäten durch Einsatz der ganzen Zellen zu ermitteln sein. Die Aktivitäten wurden in U/ml berechnet (Abbildung 3.37). Während bei der Leervektorkontrolle in beiden Stämmen annähernd keine Aktivität gemessen werden konnte, wurden eindeutig Esteraseaktivitäten bei den Chimären EstA_NP_C und EstP_NA_C und bei den Wildtypproteinen EstA und EstP sowohl in *P. aeruginosa* PASCHI (Abbildung 3.37A) als auch in *P. putida* KT0418 (Abbildung 3.37B) gemessen. Da in die Messung ganze Zellen eingesetzt wurden, konnte auf extrazelluläre Esteraseaktivität geschlossen werden. Folglich war von einer erfolgreichen Translokation der Chimäre in beiden Stämmen auszugehen. Darüber hinaus konnte eine Aktivitätssteigerung des Chimärs EstA_NP_C in Relation zu den Wildtypproteinen EstA und EstP in beiden Stämmen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war die esterolytische Aktivität von EstP_NA_C sowohl in *P. aeruginosa* als auch in *P. putida* deutlich geringer.

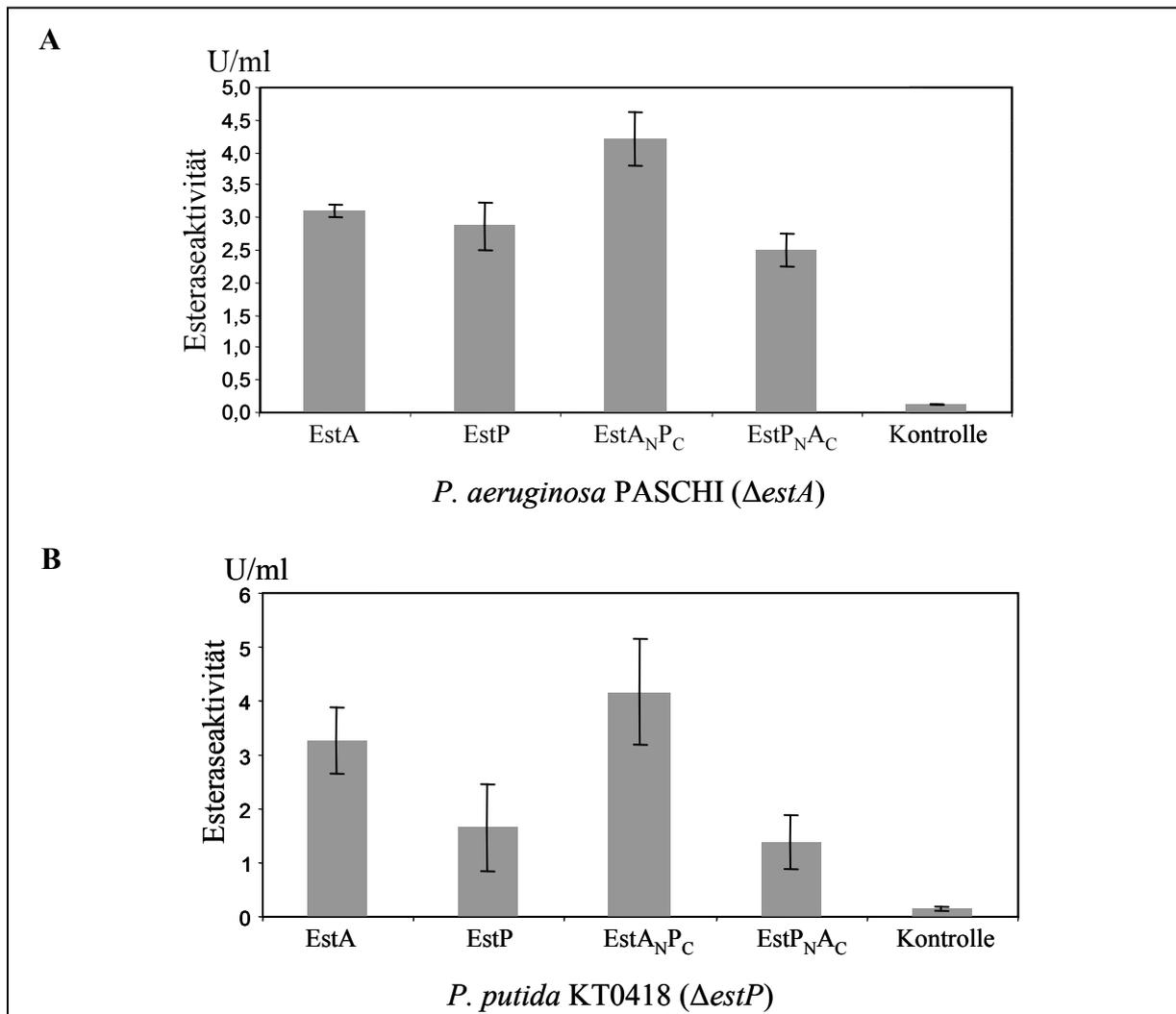


Abb. 3.37: Extrazelluläre Esteraseaktivität der Wildtypproteine EstA und EstP sowie der Chimäre EstA_NP_C und EstP_NA_C nach Überexpression in *P. aeruginosa* PASCHI und *P. putida* KT0418. *P. aeruginosa* PASCHI ($\Delta estA$) (A) sowie *P. putida* KT0418 ($\Delta estP$) (B) trugen die Expressionsplasmide der Wildtypproteine pBBX+ (EstA), pBBREstP (EstP), der Chimäre pBBEstA_NP_C (EstA_NP_C) und pBBP_NA_C (EstP_NA_C) und den Leervektor pBBR1MCS (Kontrolle). Es wurde eine vergleichbare O.D. 580 nm der Kulturen in den Aktivitätstest eingesetzt. Die ermittelten Aktivitäten sind in U/ml angegeben. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung darstellen.

Die Chimäre EstA_NP_C und EstP_NA_C können sowohl in *P. aeruginosa* als auch in *P. putida* erfolgreich exprimiert und auf die Zelloberfläche transportiert werden. Die extrazellulären Esteraseaktivitäten der Chimäre unterschieden sich voneinander. Während EstA_NP_C die höchste Aktivität in beiden Stämmen zeigt, ist diese von dem Chimär EstP_NA_C deutlich vermindert.

3.5.2 Heterologe Expression der Chimäre in *E. coli*

Aufgrund des Typ-V-Transportmechanismus werden Autotransporterproteine dazu verwendet, heterologe Proteine auf der Zelloberfläche von Gram-negativen Bakterien zu präsentieren (Jose *et al.*, 1995). Durch sogenannte Oberflächen-Display-Systeme können heterologe Proteine nativ auf der bakteriellen Zelloberfläche exponiert werden. Dieses Verfahren bietet bei biotechnologischen Anwendungen den Vorteil, dass eine heterologe Expression im Modellorganismus *E. coli* erfolgen kann (Schultheiss *et al.*, 2008).

Die Wildtypproteine EstA aus *P. aeruginosa* und EstP aus *P. putida* lassen sich auf der Oberfläche von *E. coli*-Zellen exponieren. Dementsprechend sollte untersucht werden, ob die katalytische aktive Passagierdomäne der Chimäre EstA_NP_C und EstP_NA_C ebenfalls auf der Zelloberfläche von *E. coli* exponiert wird. Zusätzlich sollte die Funktionalität als Display-System mit den Wildtypen EstA und EstP verglichen werden.

Nach Transformation von *E. coli* DH5 α (2.12) mit den entsprechenden Vektoren der Chimäre, der Wildtypproteine und der entsprechendem Leervektorkontrolle wurde zuerst ein Esteraseaktivitätstest mit dem Standardsubstrat *p*-NPC (2.35.1.1) von ganzen Zellen durchgeführt. Die lipolytische Aktivität wurde in U/ml angegeben (Abbildung 3.38).

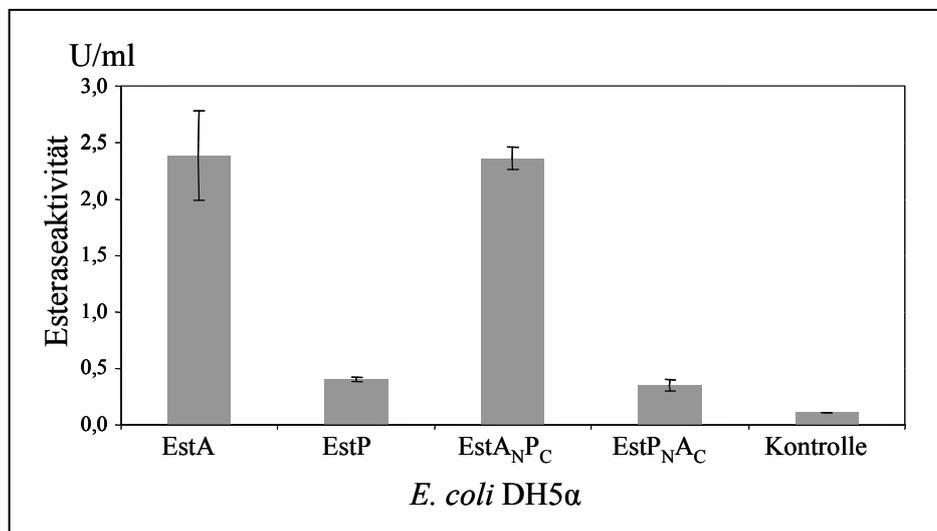


Abb. 3.38: Die extrazelluläre Esteraseaktivität von EstA, EstP und der Chimäre EstA_NP_C und EstP_NA_C nach heterologer Überexpression in *E. coli* DH5 α . Die *E. coli*-Zellen trugen jeweils die Expressionsplasmide der Wildtypproteine pBBX+ (EstA), pBBREstP (EstP), der Chimäre pBBEstA_NP_C (EstA_NP_C) und pBBP_NA_C (EstP_NA_C) und dem Leervektor pBBR1MCS (Kontrolle). Es wurden ganze Zellen mit einer vergleichbaren O.D. 580 nm in den Aktivitätstest eingesetzt. Die ermittelten extrazellulären Aktivitäten gegenüber dem Substrat *p*-NPC sind in U/ml angegeben. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen angegeben, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen.

Die Esterase EstP und das Chimär EstP_NA_C zeigten nach Expression in *E. coli* DH5 α eine vergleichbare extrazelluläre Aktivität, während die Esteraseaktivität von EstA mit der von

dem Chimär EstA_{NPC} übereinstimmte. Die Aktivitäten von EstP und EstP_{NAC} sind im Vergleich zu EstA und EstA_{NPC} signifikant vermindert. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass die Aktivität durch die jeweilige Passagierdomäne determiniert wurde.

Da die extrazellulären Esteraseaktivitäten von EstP und EstP_{NAC} gegenüber EstA und EstA_{NPC} deutlich abwichen, sollte überprüft werden, ob der Transport der Passagierdomäne auf die Zelloberfläche von *E. coli* beeinträchtigt ist. Dazu wurden die Passagierdomänen auf der Zelloberfläche von lebenden Zellen durch spezifische, fluoreszierende Antikörper markiert und mittels FACS-Analyse untersucht (2.31). Die *E. coli*-Zellen, die EstA bzw. EstA_{NPC} exprimierten, wurden entsprechend mit dem Primärantikörper gegen EstA behandelt, während im Fall von EstP und EstP_{NAC} zuerst der Antikörper gegen EstP_N zur Oberflächenmarkierung verwendet wurde. Als Negativkontrolle diente jeweils eine äquivalente Markierung der Zellen, die den Leervektor pBBR1MCS beinhalten. Die Immunfluoreszenzmarkierung wurde durch den sekundären Antikörper anti-Kaninchen, gefolgt von einem Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat vervollständigt. Vor der FACS-Analyse der relevanten Zellen diente die jeweilige Negativkontrolle zur Ermittlung der Region (R1) im Fluoreszenzemissionshistogramm, in der unmarkierte Zellen erfasst wurden. Die spezifische fluoreszierende Proteinmarkierung auf der Zelloberfläche verursacht eine Steigerung der Fluoreszenz, die im Histogramm eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals nach rechts zur Folge hatte (Abbildung 3.39).

Die Fluoreszenzemissionshistogramme der FACS-Analyse zeigten im Vergleich zu den Kontrollen in allen *E. coli*-Stämmen deutliche Fluoreszenzsignale der markierten Zellen. Folglich wurden die Passagierdomänen sowohl von EstA und EstA_{NPC} (Abbildung 3.39A) als auch von EstP und EstP_{NAC} (Abbildung 3.39.B) an der Zelloberfläche exponiert. Dennoch unterschieden sich die Zellzahlen mit einem Fluoreszenzsignal, die EstA bzw. EstA_{NPC} exprimierten, von denen, die EstP bzw. EstP_{NAC} auf der Zelloberfläche exponierten. Dies spiegelte sich durch die ungleichen Fluoreszenzintensitäten wider. Es war zu beobachten, dass die Enzyme EstP und EstP_{NAC} zwar die geringste extrazelluläre Aktivität zeigten, aber das stärkste Fluoreszenzsignal auf der Zelloberfläche von *E. coli* besaßen. Da unterschiedliche Primärantikörper bei der Immunfluoreszenzmarkierung verwendet wurden, konnten keine weiteren Vergleiche unternommen werden.

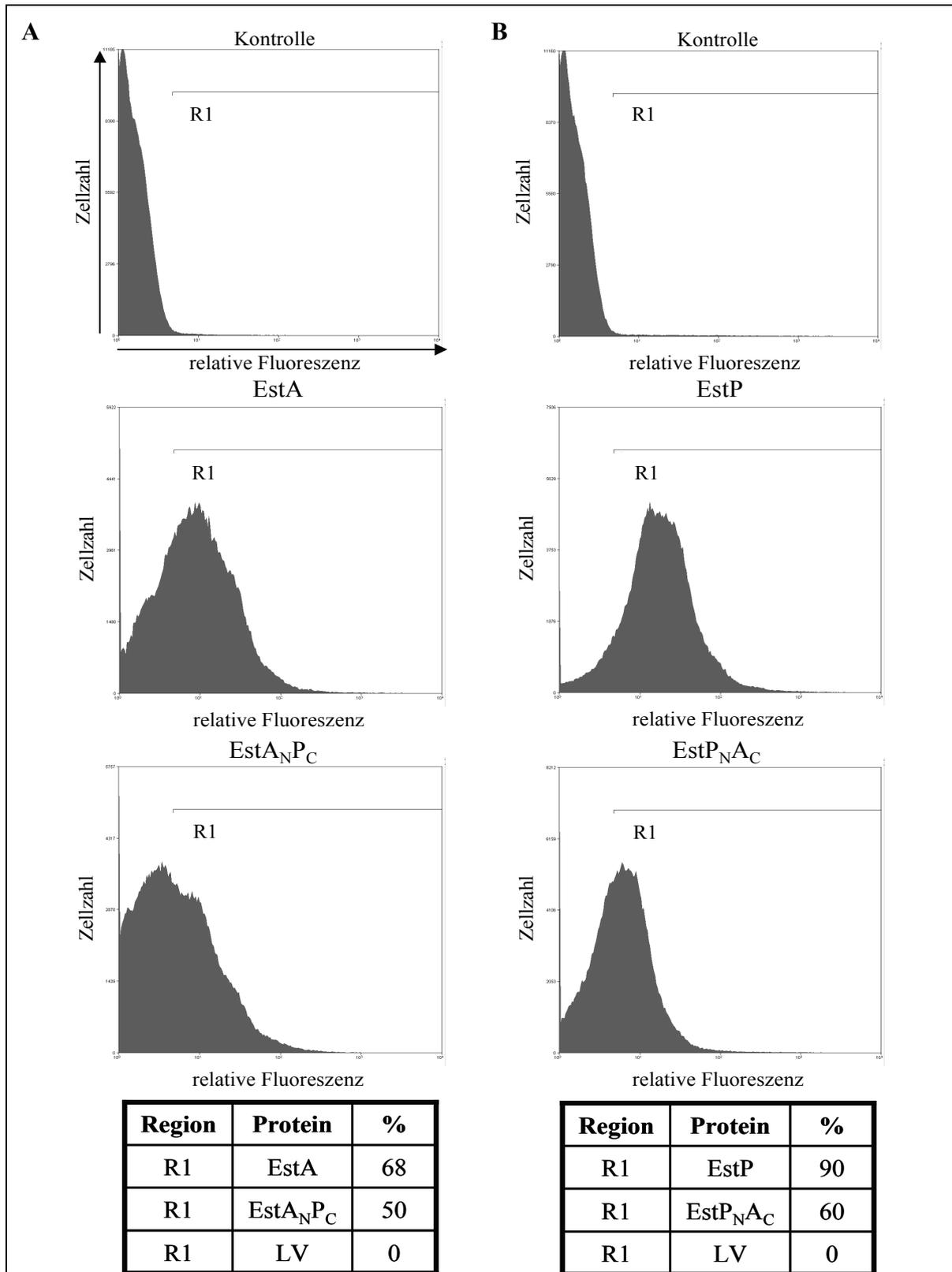


Abb. 3.39: FACS-Analyse der Oberflächenpräsentation von EstA, EstP und der Chimäre EstA_NP_C und EstP_NA_C in *E. coli* DH5α. Die Präsentation der Proteine auf der Zelloberfläche wurde je nach Passagierdomäne mit dem Primärantikörper anti-EstA (A) oder anti-EstP_N (B) nachgewiesen. Die FACS-Histogramme zeigen die relative Fluoreszenz pro Zelle und der Zellzahl. Als Negativkontrolle dienten äquivalent behandelte Zellen mit dem entsprechenden Leervektor pBBR1MCS (Kontrolle) zur Ermittlung der Region (R1), in der die unmarkierten Zellen im Histogramm erfasst wurden. In der Tabelle sind die Fluoreszenzintensitäten in Prozent [%] angegeben, wobei 300.000 Zellen mit einem Fluoreszenzsignal 100 % entsprechen

3.5.3 Ein biotechnologisches Verfahren zur Oberflächenpräsentation in *E. coli*

Auf dem Transportmechanismus der Typ-Va-Autotransporterproteine basierend wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Kolmar ein Verfahren entwickelt, womit heterologe, lipolytische Enzyme auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert werden können (Becker *et al.* 2005). Um die Oberflächenpräsentation der Wildtypproteine EstA und EstP sowohl untereinander als auch mit den Chimären EstA_NP_C und EstP_NA_C vergleichen zu können, wurden identische Konstrukte erstellt, die auf diesem Expressionssystem basieren. Dafür wurde das Plasmid pEst100 (Tabelle 2.3) für die eigenen Fragestellungen modifiziert. Zuerst wurden die Gene, die für EstA, EstP und die Chimäre kodieren, mit Hilfe einer PCR-Reaktion (2.14) durch den Einsatz der Oligonukleotide *e-tag:estA* up und *estA XbaI* down bzw. *e-tag:estP* up und *estP XbaI* down (Tabelle 2.3) am 5'-Ende mit der Sequenz eines E-Epitop (GAPVPQPDPLEPR) fusioniert. Dadurch ist ein einheitlicher immunologischer Nachweis mit monoklonalen Antikörpern zur Quantifizierung aller Konstrukte möglich. Als Matrize dienten die Expressionsvektoren der entsprechenden Gene: pBBX+ (*estA*), pBBREstP (*estP*), pBBEstA_NP_C (*estA_NP_C*) und pBBEstP_NA_C (*estP_NA_C*). Für einen vergleichbaren, effizienten Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran von *E. coli* wurde jeweils die eigene Signalsequenz von EstA, EstP und der Chimäre gegen die der alkalischen Phosphatase PhoA aus *E. coli* ausgetauscht. Dafür wurden die PCR-Produkte durch eine weitere PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *pest SfiI* up und *estA XbaI* down bzw. *estP XbaI* down (Tabelle 2.3) erneut amplifiziert. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in den Vektor pEst100 kloniert. Die resultierenden Expressionplasmide wurden entsprechend mit pEstA, pEstP, pEstA_NP_C sowie pEstP_NA_C bezeichnet und durch Transformation (2.12) in *E. coli* JM109 eingebracht. Abbildung 3.40 zeigt eine schematische Darstellung der Autotransporterproteine, lokalisiert in der äußeren Membran.

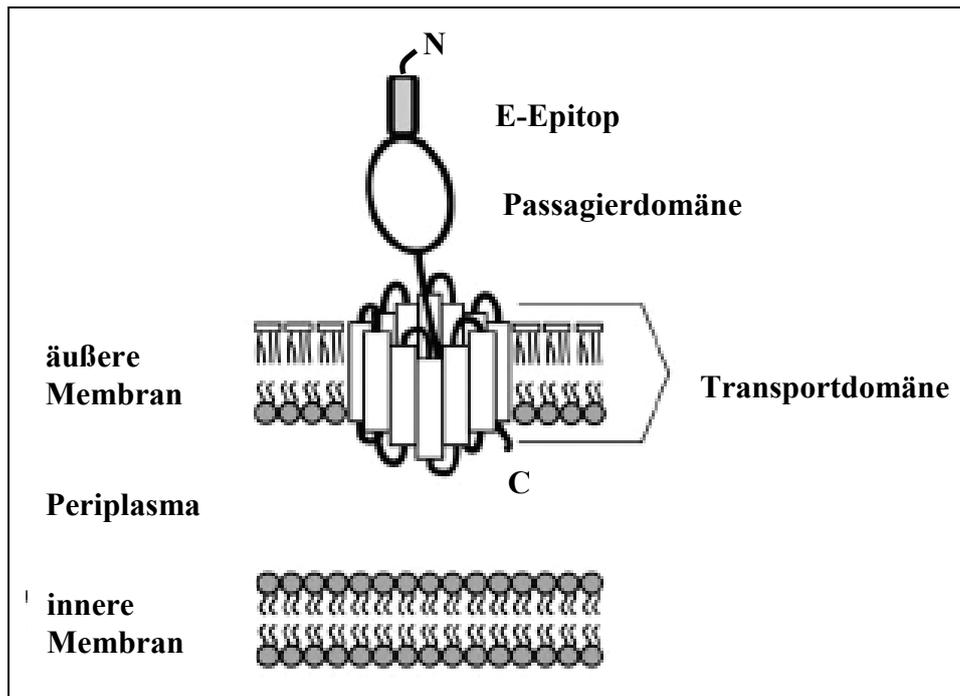


Abb. 3.40: Schematische Darstellung einer Passagierdomäne eines Autotransporters mit E-Epitop-Fusion auf der Zelloberfläche von *E. coli*. Die Autotransporterproteine bestehen aus einer C-terminalen Transportdomäne, die in der äußeren Membran eine β -Pore bildet, und einer enzymatischen, extrazellulären Passagierdomäne. Zum Nachweis der Oberflächenpräsentation durch eine monoklonale Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte eine N-terminale E-Epitop-Fusion (modifiziert nach Becker *et al.* 2005).

Zur Überprüfung der funktionalen Expression und zum quantitativen Vergleich der Fusionsproteine erfolgte ein Aktivitätstest (2.35.1.1) sowie ein immunologischer Nachweis (2.28) der Proteine. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die das Plasmid pEst100 trugen, da ohne Fusion mit einem heterologen Passagierprotein kein Protein exprimiert werden konnte. Zuerst wurden Einzelkolonien der verschiedenen Stämme auf IPTG-haltige Tributyrinagar-Platten (2.35.1.4) überführt, um die Hofbildung durch Esteraseaktivität um die Kolonien zu beobachten. Parallel wurde ein Esteraseaktivitätstest mit ganzen Zellen von Flüssigkulturen durchgeführt, um die Aktivitäten von EstA, EstP, EstA_NP_C sowie EstP_NA_C auf der Zelloberfläche vergleichen zu können. Die Expression wurde dafür bei einer O.D. 580 nm von 0,5 mit IPTG induziert. Nach 1 h wurden die Zellen mit einer vergleichbaren Zelldichte geerntet und sowohl für die Bestimmung der extrazellulären Aktivität (2.35.1.1) als auch für einen immunologischen Nachweis (2.28) eingesetzt. Die Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte durch eine Markierung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das E-Epitop (Amersham). Der immunologische Nachweis ist ein Maß für die Molekülkonzentration in der Zelle, da jeder monoklonale Antikörper nur an ein einziges E-Epitop binden kann. In Abbildung 3.41 sind die Ergebnisse dargestellt.

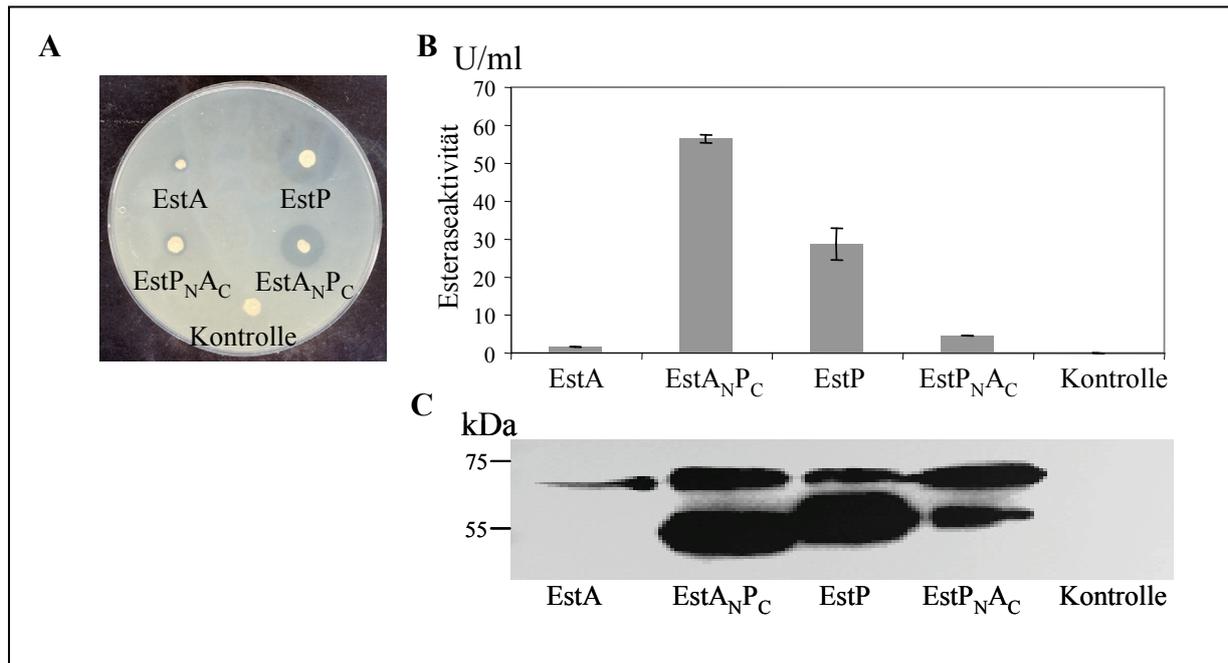


Abb. 3.41: Bestimmung der Esteraseaktivität und immunologischer Nachweis der Fusionsproteine nach Überexpression in *E. coli* JM109. (A) Nachweis der lipolytischen Aktivität durch Tributyrinagar-Platten. Die Größe der Höfe um die jeweilige Bakterienkolonie wurde durch drei unabhängig angezogene Kulturen auf Indikatorplatten bestätigt. (B) Photometrischer Aktivitätstest mit ganzen Zellen mit *p*-NPC als Substrat. Die Kulturen wurden jeweils bei einer O.D. 580 nm = 0,5 mit IPTG induziert, nach 1 h geerntet und auf eine vergleichbare optische Dichte eingestellt. Die Enzymaktivitäten repräsentieren die Mittelwerte von je drei unabhängig voneinander angezogenen Kulturen mit Doppelbestimmung. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. (C) Immunologischer Nachweis der Fusionsproteine. Es wurden die identischen Proben des Photometertests benutzt. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das E-Epitop (Amersham) verwendet. Als Negativkontrolle (Kontrolle) diente das Plasmid pEst100.

Während bei der Negativkontrolle JM109 pEst100 (Kontrolle) keine Hofbildung um die Bakterienkolonie zu beobachten war, konnte bei den Wildtypproteinen EstA und EstP ebenso wie bei den Chimären EstA_NP_C und EstP_NA_C lipolytische Aktivität durch die Bildung klarer Höfe um die jeweilige Kolonie beobachtet werden. Es waren Aktivitätsunterschiede durch größere Durchmesser der Höfe im Fall von EstP und EstA_NP_C im Vergleich zu EstA und EstP_NA_C ersichtlich (Abbildung 3.41A). Die Ergebnisse des photometrischen Aktivitätstests ergaben, dass das Wildtypprotein EstP und das Chimär EstA_NP_C im Verhältnis zu EstA und EstP_NA_C eine gesteigerte extrazelluläre Aktivität besaß. Bei dem Chimär EstA_NP_C konnte eine etwa doppelt so hohe extrazelluläre Esteraseaktivität von 56,5 U/ml auf den Zellen gemessen werden als bei dem Wildtypprotein EstP von 28,7 U/ml (Abbildung 3.42B). Die Signalstärke der Banden des immunologischen Nachweises dieser Proteine deutet auf signifikante Unterschiede bezüglich der Proteinkonzentrationen der Esterasen in der Zelle hin, da die Signalstärke der Banden aufgrund der eingesetzten monoklonalen Antikörper äquivalent zur Proteinkonzentration ist (Abbildung 3.41C).

Die densitometrische Analyse der Proteinsignale des immunologischen Nachweises ergab, dass EstA im Gesamtzellextrakt von *E. coli* JM109 die geringste Signalintensität der Proteinbande besaß. Hingegen war die Proteinkonzentration sowohl von EstP als auch von den Chimären deutlich höher. Die Proteinkonzentration des Chimärs EstA_NP_C war am höchsten und erklärte wahrscheinlich die drastische Aktivitätszunahme auf der Zelloberfläche von *E. coli* JM109. Eine Übersicht der relativen Signalintensitäten aller Proteine ist in Tabelle 3.5 zusammengestellt.

Tab. 3.5: Densitometrische Analyse der Signalintensitäten der immunologisch detektierten Proteine in *E. coli* JM109. Die relative Signalintensität wurde jeweils auf EstA (100 %) bezogen. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Analysen angegeben.

Protein	relative Signalintensität [%]
EstA	100
EstA _N P _C	976 ± 12
EstP	892 ± 15
EstP _N A _C	571 ± 18

Da anhand dieser Analyse der Proteinkonzentration im Gesamtzellextrakt keine Aussagen bezüglich der Translokation und Lokalisation der Wildtypproteine und der Chimäre getroffen werden konnten, erfolgte zusätzlich eine Quantifizierung der Molekülzahl auf der Zelloberfläche von *E. coli* JM109 mittels FACS-Messung. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Stefanie Heil aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Kolmar am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU Darmstadt durchgeführt. Um eine ungefähre Anzahl der präsentierten Proteine auf der Zelloberfläche von *E. coli* JM109 bestimmen zu können, erfolgte die Immunfluoreszenzmarkierung (2.31) mit steigenden Konzentrationen des primären anti-E-Epitop-Antikörpers. Daraufhin wurden ein biotinylierter anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper sowie ein Streptavidin-R-Phycoerythrin-Konjugat im Überschuss zu den Zellen gegeben. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine unmarkierte Probe in 4 ml PBS verdünnt und 1 ml der Zellsuspension im Durchflusszytometer gezählt. Von den markierten Proben wurden je 300.000 Zellen auf ihre relative Fluoreszenz hin untersucht. Von allen Messungen wurde die durchschnittliche relative Fluoreszenz pro Zelle berechnet. Dies geschah durch Multiplikation des Betrags jedes Fluoreszenzkanals mit der Anzahl der für diesen Kanal gemessenen Zellen. Diese Werte wurden für jede Messung addiert und durch die Zahl der gemessenen Zellen dividiert

(300.000 Zellen). Anhand der durchschnittlichen relativen Fluoreszenzen pro Zelle und der eingesetzten Menge des anti-E-Epitop-Antikörpers konnte die Molekülzahl pro Zelle berechnet werden. In Tabelle 3.6 sind die durchschnittlich ermittelten Molekülzahlen pro Zelle für jedes Protein dargestellt.

Tab. 3.6: Bestimmung der Molekülzahl pro Zelle von EstA, EstP, EstA_{NP_C} und EstP_{NA_C} auf der Oberfläche von *E. coli* JM109. Bei jeder Messung wurden 300.000 Zellen detektiert.

Protein	Molekülzahl pro Zelle
EstA	16.000
EstA _{NP_C}	4.900
EstP	2.100
EstP _{NA_C}	900

Die durchschnittlichen Zahlen der Moleküle auf der Zelloberfläche von *E. coli* JM109 deuteten auf erhebliche Unterschiede bezüglich der Translokationseffizienz der Proteine hin. Bei EstA wurde die höchste Molekülzahl pro Zelle ermittelt, während das Chimär EstP_{NA_C} die wenigsten Moleküle auf der Zelloberfläche präsentierte. Das Chimär EstA_{NP_C} exponierte im Vergleich zu EstP mehr als doppelt so viele Moleküle pro Zelle. Die Ergebnisse waren, abgesehen von EstA, vergleichbar mit den ermittelten Proteinkonzentrationen und extrazellulären Aktivitäten in *E. coli* JM109. Hingegen war die Molekülzahl auf der Zelloberfläche von EstA sehr hoch.

Da sich die Ergebnisse bei der Esterase EstA trotz mehrmaliger Wiederholung der Versuche widersprachen, wurde eine direkte Begutachtung der Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie (2.32) durchgeführt. Die Abbildung 3.42 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *E. coli* JM109, für die die Proteine auf der Zelloberfläche ebenfalls mit monoklonalen Antikörpern gegen das E-Epitop markiert wurden. Nur bei einer Oberflächenpräsentation der Autotransporterproteine auf der Zelle konnte eine Markierung erfolgen, die durch grün-fluoreszierende *E. coli*-Zellen visualisiert wurde. Es war zu beobachten, dass bei den *E. coli*-Zellen, die die Esterase EstA präsentieren sollten, teilweise unmarkierte Zellen zu beobachten waren. Folglich exponierten manche Zellen kein EstA auf der Zelloberfläche. Dieses Resultat erklärte die geringe Proteinkonzentration im Gesamtzellextrakt im Vergleich zur ermittelten Molekülzahl pro Zelle. Zudem konnte beobachtet werden, dass nur die Zellen von *E. coli* JM 109 mit EstA während der Präparation schleimähnlich waren.

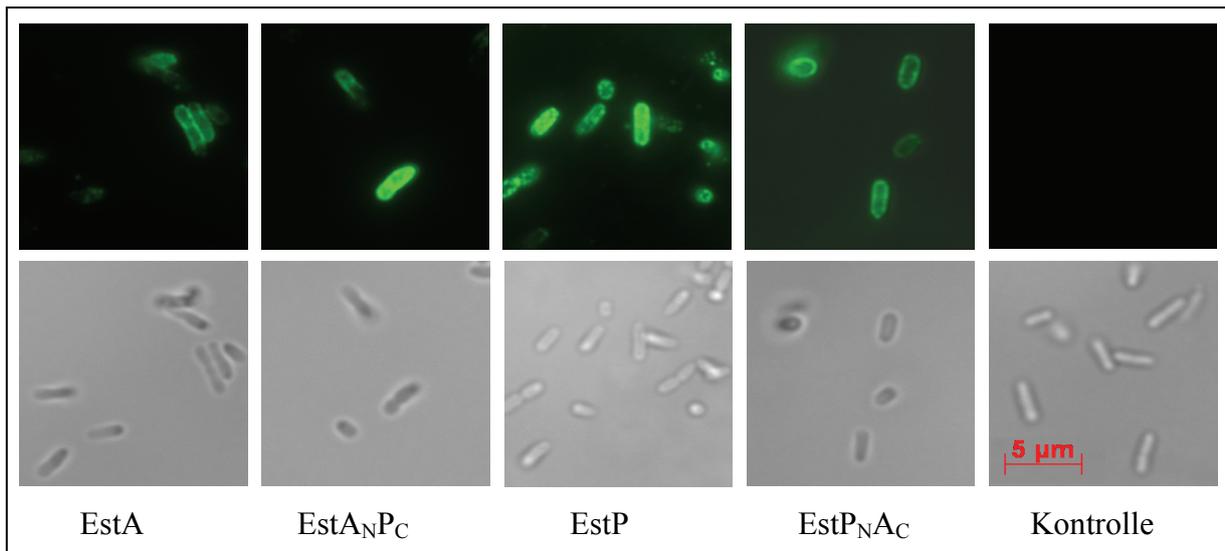


Abb. 3.42: Fluoreszenz- (oben) und phasenkontrastmikroskopische (unten) Aufnahmen identischer Ausschnitte von *E. coli* JM109 mit EstA, EstA_NP_C, EstP, EstP_NA_C und pEst100 (Kontrolle). Der Nachweis der Oberflächenpräsentation erfolgte durch eine Markierung mit monoklonalen Antikörpern gegen das E-Epitop (Amersham).

Bei der Fluoreszenzmikroskopie konnte beobachtet werden, dass die Zellen, die markiertes EstP und EstA_NP_C auf der Oberfläche exponierten, intensiver leuchteten als die Zellen mit zellgebundenem EstA und EstP_NA_C. Um diesen Eindruck zu quantifizieren, wurden parallel die relativen Fluoreszenzen der gleichen Proben photometrisch gemessen, die für die mikroskopischen Analysen verwendet wurden. Durch den Einsatz des monoklonalen anti-E-Epitop-Antikörpers ist die ermittelte relative Fluoreszenz ein Maß der Proteinkonzentration auf der Zelloberfläche und ermöglicht somit einen Vergleich der verschiedenen Stämme. Dafür war es essenziell, eine vergleichbare Zelldichte der einzelnen Expressionskulturen in die photometrische Messung einzusetzen (Abbildung 3.43).

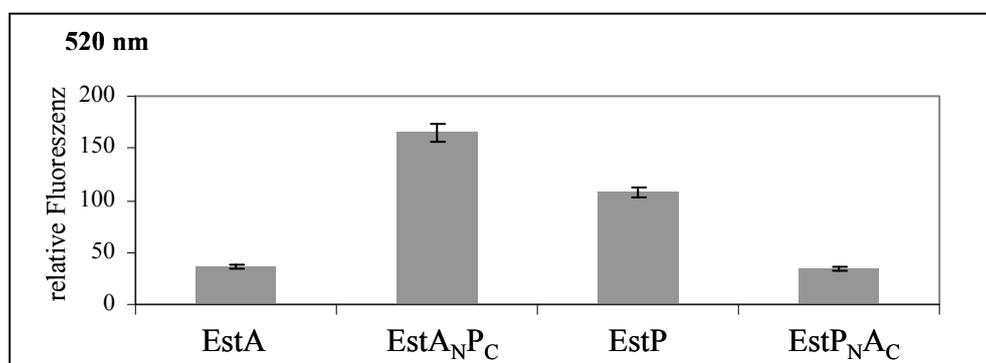


Abb. 3.43: Quantitative Analyse der Oberflächenpräsentation von EstA, EstP, EstA_NP_C und EstP_NA_C in *E. coli* JM109. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit monoklonalen anti-E-Epitop-Antikörpern. Die dargestellten Werte der relativen Fluoreszenz bei 520 nm entsprechen der jeweiligen Differenz aus den Daten der Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrolle (pEst100) und der markierten Zellen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen.

Die Ergebnisse der ermittelten relativen Fluoreszenz stimmten mit den Beobachtungen bei der Fluoreszenzmikroskopie überein. Bei den Zellen, die das Chimär Est_NP_C auf der Zelloberfläche exponierten, konnte die höchste relative Fluoreszenz ermittelt werden, gefolgt von dem Wildtypprotein EstP. Eine deutlich geringere relative Fluoreszenz zeigte das Chimär EstP_NA_C sowie EstA.

Durch die eigene Signalsequenz der alkalischen Phosphatase PhoA konnte die extrazelluläre Aktivität von EstP und EstP_NA_C nach heterologer Expression in *E. coli* JM109 gesteigert werden. Als Oberflächendisplaysystem eignen sich am besten das Chimär Est_NP_C und das Wildtypprotein EstP, da eine höhere Expression und Translokation zu beobachten war.

3.5.4 Die Esterasen EstA, EstP und die Chimäre haben ein unterschiedliches Substratspektrum

Bisher zeigten die Ergebnisse *in vivo* zwischen den Esterasen EstA und EstP und der Chimäre nach einer Expression sowohl im homologen als auch im heterologen Wirt deutliche Unterschiede.

Um mögliche Veränderungen der Chimäre im Vergleich zu den Wildtypproteinen bezüglich der Substratspezifität analysieren zu können, wurden Untersuchungen des Substratspektrums mit *p*-NP-Estern unterschiedlicher Kettenlänge durchgeführt. Dazu wurden die Proteine in reiner, aktiver Form verwendet.

Für die heterologe Überexpression der entsprechenden Gene in *E. coli* BL21 (DE3) wurde ein T7-Expressionssystem verwendet, da auf diese Weise bereits hohe Ausbeuten an *inclusion bodies* von EstA und EstP produziert werden konnten. Zuerst wurden die Gene der Chimäre mittels PCR-Reaktion (2.14) durch die spezifischen Oligonukleotide *estA* *NdeI* up und *estP* *XhoI* down für *estA*_NP_C sowie *estP* *NdeI* up und *estA* *XhoI* down für *estP*_NA_C (Tabelle 2.3) amplifiziert. Die Klonierung erfolgte analog zu den bereits vorliegenden Expressionsvektoren pETE_{EstA} und pETE_{EstP} in das Plasmid pET22b⁺ unter der Kontrolle des T7-Promotors. Anschließend erfolgte eine Transformation (2.12) von *E. coli* BL21(DE3) mit den resultierenden Vektoren pETA_NP_C und pETP_NA_C sowie mit pETE_{EstA}, pETE_{EstP} und dem Leervektor pET22b⁺ als Negativkontrolle. Die Überexpression, die Isolierung der *inclusion bodies* (2.22) und die erzielten Proteine nach *in vitro*-Rückfaltung (2.23) wurden jeweils durch eine SDS-PAGE (2.26) analysiert (Abbildung 3.44).

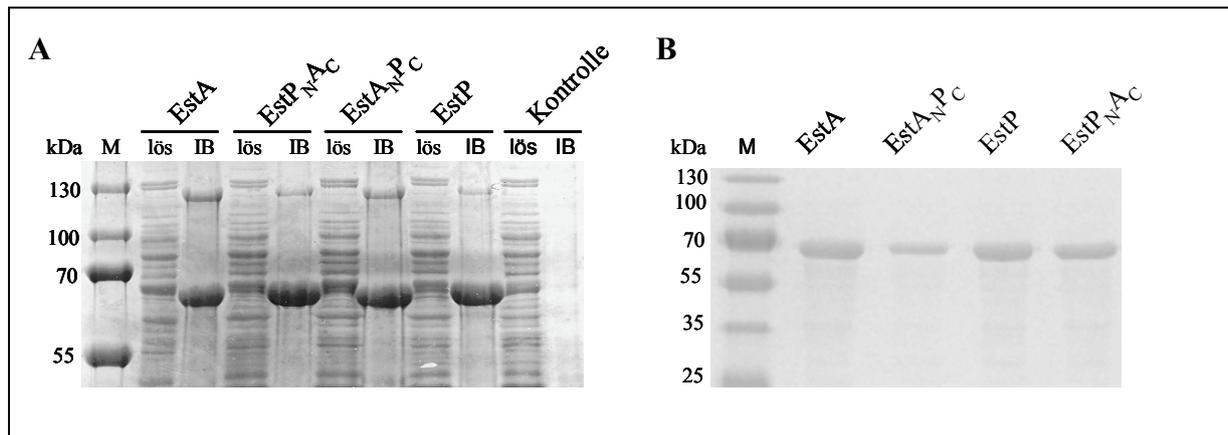


Abb. 3.44: SDS-PAGE-Analyse der *inclusion bodies* (A) und Proteinausbeute nach *in vitro*-Faltung (B) der Esterasen EstA und EstP sowie der Chimäre EstA_{NPC} und EstP_{NAC}. Die Überexpression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) unter der Kontrolle des T7-Promotors. Die aufgetragenen Volumina wurden auf eine gleiche Zelldichte von O.D. 580 nm = 0,15 bezogen. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Trenngele (12 %) mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. M: Marker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas), lös: lösliche Fraktion, IB: *inclusion bodies*.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte eine erfolgreiche Überexpression für alle vier Proteine in Form von *inclusion bodies*. Diese wurde durch eine enorm gesteigerte Intensität der Proteinbanden mit einer molekularen Größe von etwa 64 kDa visualisiert (Abbildung 3.44.A). Durch Isolierung der *inclusion bodies* (2.22), chemische Denaturierung und *in vitro*-Faltung (2.23) mit dem Ziel, eine native Konformation der Enzyme zu erreichen, konnten die Esterasen in einer annähernd elektrophoretisch homogenen Form gewonnen werden (Abbildung 3.44B). Eine Quantifizierung der Proteinproben erfolgte durch einen BCA-Test (2.25) und gab Auskunft über die Proteinkonzentration.

Die gereinigten Proteine EstA, EstP, EstA_{NPC} und EstP_{NAC} wurden mit vergleichbaren Konzentrationen in Aktivitätstests eingesetzt, bei denen *p*-NP-Ester mit unterschiedlichen Kettenlängen als Substrat dienten (2.35.1.3). Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ivana Lescic Asler aus dem Institut der Physikalischen Chemie vom Rudjer Boskovic Institut in Zagreb durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse ist exemplarisch in Abbildung 3.45 dargestellt. Die Aktivitäten der Esterasen zeigten signifikante Unterschiede bezüglich der verwendeten Substrate. Das Wildtypprotein EstA wies die geringste lipolytische Aktivität auf. Bei EstP konnten höhere spezifische Aktivitäten gegenüber den Substraten im Vergleich zu EstA gemessen werden. Die spezifischen Aktivitäten des Chimärs EstA_{NPC} waren höher als bei EstP_{NAC}. Die Esteraseaktivität der katalytischen Domäne der gereinigten Autotransporter-proteine war abhängig von der fusionierten Transportdomäne.

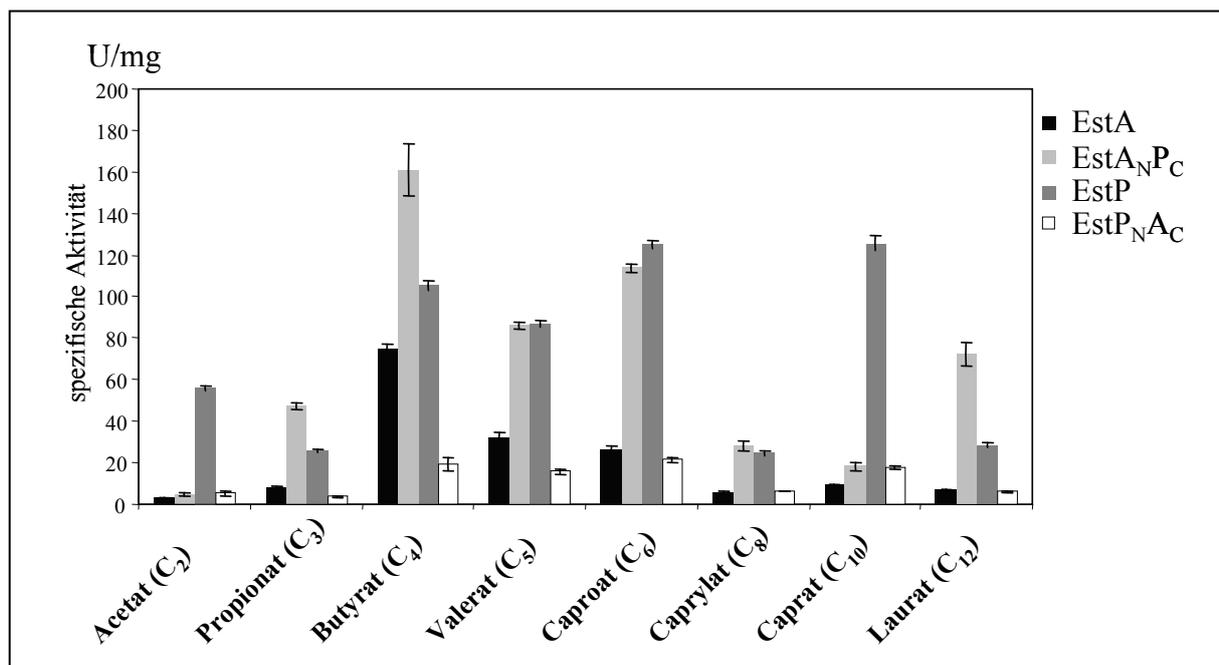


Abb. 3.45: Vergleich der Aktivitäten der Esterasen EstA, EstP, EstA_NP_C und EstP_NA_C nach *in vitro*-Faltung gegen *p*-Nitrophenolester mit unterschiedlichen Kettenlängen. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten sind in U/mg angegeben. Die Standardabweichungen resultierten aus drei unabhängigen Experimenten und sind als Fehlerbalken dargestellt.

Anschließend wurden die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und die maximale Geschwindigkeit (V_{max}) der Enzyme exemplarisch für das Substrat *p*-NPB (Butyrat) mit einer Kettenlänge der Fettsäure von vier Kohlenstoffatomen bestimmt. Der K_m -Wert spiegelt die Affinität des Enzyms zum Substrat wider, und der V_{max} gibt die maximale Hydrolysegeschwindigkeit an. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tab. 3.7: Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) von EstA, EstP, EstA_NP_C und EstP_NA_C bei der Hydrolyse von *p*-Nitrophenyl-Butyrat.

Enzym	V_{max} [U/mg]	K_m [mmol/l]
EstA	220,1 ± 17,1	0,73 ± 0,09
EstA _N P _C	42,6 ± 2,8	0,50 ± 0,03
EstP	84,7 ± 2,2	0,27 ± 0,02
EstP _N A _C	11,3 ± 0,5	0,58 ± 0,03

Die Esterase EstA zeigte die niedrigste Affinität für das Substrat *p*-NPB, allerdings ist die Hydrolyseeffizienz am höchsten. Das Chimär EstA_NP_C besitzt eine etwas höhere Affinität für das Substrat, aber nur einen fünffach niedrigeren V_{max} -Wert als EstA. Hingegen zeigte EstP

wiederum die höchste Affinität der vier verglichenen Enzyme für *p*-NPB, während EstP_{NAC} sowohl niedrige Affinität als auch niedrige Effizienz zeigte. Dennoch bewegten sich die ermittelten K_m -Werte im Gegensatz zu den V_{max} -Werten der einzelnen Proteine ungefähr in der gleichen Größenordnung.

Die Unterschiede sind als Hinweise für Interaktionen zwischen der N-terminalen enzymatischen Domäne und der Transportdomäne zu betrachten, die wahrscheinlich Konformationsänderungen verursachen. Möglicherweise wurde die katalytische Triade bezüglich der Substrataffinität verändert, ebenso wie die Erreichbarkeit des aktiven Zentrums für das Substrat.

Die *in vitro*-Faltung der Chimäre war erfolgreich, da enzymatisch aktives Protein erzielt wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die spezifische Aktivität der Passagierdomäne wahrscheinlich durch die Transportdomäne beeinflusst wird. Vermutlich bewirken Interaktionen Konformationsmodifikationen, sodass die Substratspektren der Proteine variieren.

4 DISKUSSION

Die Esterase EstA aus *P. aeruginosa* ist ein Autotransporterprotein, dessen katalytische aktive Domäne zu den GDSL-Hydrolasen zählt und im Gegensatz zu vielen anderen Autotransportern auf der Zelloberfläche exponiert bleibt (Wilhelm *et al.*, 1999). Die Mitglieder der Familie der Autotransporterproteine weisen alle eine charakteristische strukturelle Organisation auf, die teilweise durch die gelöste Kristallstruktur der Transportdomäne des Autotransporters von NalP aus *N. meningitidis* bestätigt werden konnte (Oomen *et al.*, 2004). Neben der Struktur der Membrandomänen von Hia aus *Haemophilus influenzae*, einem trimeren Autotransporterprotein (Meng *et al.*, 2006) und der 3D-Struktur eines Autotransporters aus der SPATE-Familie (Yen *et al.*, 2008), ist noch eine komplette Passagierdomäne der Hämoglobin-Protease Hbp aus *E. coli* bekannt (Otto *et al.*, 2005). Darüber hinaus existieren nur strukturelle Kenntnisse von Teilbereichen dieser Proteinfamilie (Gangwer *et al.*, 2007; Nummelin *et al.*, 2004; Szczesny and Lupas, 2008; Yeo *et al.*, 2004). In dieser Arbeit sollten Strukturelemente des Autotransporterproteins EstA näher untersucht werden.

4.1 Die α -Helix von EstA ist für das Autotransporterprotein essenziell

Autotransporterproteine werden über den Typ-V-Sekretionsweg durch die äußere Membran auf die Zelloberfläche transportiert, nachdem sie durch den Sec-abhängigen Transportweg das Periplasma erreicht haben. Diese Proteine lassen sich alle anhand einheitlicher Strukturelemente identifizieren: die Sec-abhängige Signalsequenz für den inneren Membrantransport, die funktionelle N-terminale Passagierdomäne und die C-terminale Transportdomäne, die sich in die äußere Membran inseriert und eine β -Pore bildet. Die Kristallstruktur der Transportdomäne von NalP zeigte eine Membranpore aus 12 β -Faltblättern mit einer α -Helix im Lumen (Oomen *et al.*, 2004). Die Struktur dieser Domäne des trimeren Autotransporters Hia besitzt sogar drei vergleichbare α -Helices im Inneren der Pore, die aus je vier transmembranen β -Faltblättern der drei Monomeren besteht (Meng *et al.*, 2006).

Das Innere der Pore von NalP ist durch 20 geladene Aminosäurereste äußerst hydrophil. Die α -Helix interagiert mit der inneren Porenwand durch Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen sowie van-der-Waals-Kräften. Obwohl die Vermutung nahe liegt, dass die Helix die Pore verschließt, nachdem die Passagierdomäne ins extrazelluläre Milieu abgespaltet wurde, verbindet ein mit Wasser gefüllter Tunnel zum Ionenaustausch das

Periplasma mit dem extrazellulären Milieu. Experimente unterstützen die Annahme, dass die Helix eine Art Ventil darstellt, da eine Deletion die Funktion der Pore behindert (Oomen *et al.*, 2004). Sequenzvergleiche von Autotransporterproteinen sagen aus (Yen *et al.*, 2002), dass die prinzipiellen Strukturmerkmale konserviert sind. Darüber hinaus wird eine derartige Sekundärstruktur für viele Autotransporter im Inneren der Transportdomäne postuliert. Dennoch ist die Sequenz in dieser Linker-Region kaum konserviert (Oomen *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit konnte anhand der Aminosäuresequenz von EstA aus *P. aeruginosa* eine Region, bestehend aus 26 Aminosäuren, zwischen der Passagier- und Transportdomäne identifiziert werden, die vermutlich die Konformation einer α -Helix ausbildet. Die Prognose einer helicalen Struktur wurde anhand eines Strukturhomologiemodells der Transportdomäne von EstA, bei dem die Struktur von NalP aus *N. meningitidis* als Matrize benutzt wurde, gestärkt. Die α -Helix dient offensichtlich als sogenannte *junction region*, da sie eine Verbindung zwischen Passagier- und Transportdomäne darstellt. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass diese α -Helix für das Autotransporterprotein EstA essenziell ist. Eine Deletion der Region im *estA*-Gen, die diese Helix kodiert, war unter der Kontrolle des *lac*-Promotors in *E. coli* DH5 α nicht möglich. Wahrscheinlich verursachte diese Deletion bei einer konstitutiven Expression von EstA Δ H einen zu großen Stress auf den Zellmetabolismus, sodass die Bakterien unter diesen Bedingungen nicht mehr lebensfähig waren. Bisher gibt es kaum vergleichbare Studien.

Es wurde berichtet, dass einige Autotransporterproteine, beispielsweise die Protease IgA aus *Neisseria* (Klauser *et al.*, 1993), das VirG-Protein aus *Shigella* (Suzuki *et al.*, 1995), AIDA-I aus *E. coli* (Maurer *et al.*, 1999) und das Adhäsion Hia aus *H. influenzae* (St Geme and Cutter, 2000), diese Linker-Region für eine korrekte Insertion in die äußere Membran und die Translokation der Passagierdomäne auf die Oberfläche benötigen. Bei Untersuchungen eines Display-Systems, basierend auf einem Autotransporterprotein aus *P. putida*, wurde festgestellt, dass sowohl das Expressionslevel als auch die Präsentation auf der Zelloberfläche abhängig von der Länge der vorhergesagten α -Helix ist. Bereits Verkürzungen dieser Region um wenige Aminosäuren beeinflussen die Translokation eines heterologen Passagierproteins durch die äußere Membran und/oder behindern die Stabilität der β -Pore (Yang *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde die Expression der Transportdomäne von NalP (NalP β) mit und ohne α -Helix in *E. coli* verglichen. Nachdem der Transport über die innere Membran durch eine Fusion mit der Signalsequenz des Membranproteins PhoE erfolgt war, inserierten beide Varianten von NalP zwar korrekt in die Membran, allerdings war das Expressionslevel der Variante ohne α -Helix erheblich vermindert im Gegensatz zu NalP β . Zusätzlich zeigten die

Zellen eine erhöhte Antibiotikasensitivität, woraus geschlussfolgert wurde, dass die fehlende α -Helix die Funktion der Pore durch Erhöhung der Permeabilität behinderte (Oomen *et al.*, 2004).

Diese Befunde bestätigen die Hypothese, dass eine Expression von EstA mit deletierter Helix (EstA Δ H) unter der Kontrolle des *lac*-Promotors nicht möglich ist. Die Transportdomäne kann unter gegebenen Umständen zwar eine Pore in der äußeren Membran bilden, hat aber möglicherweise die Fähigkeit für den Transport der Passagierdomäne verloren. Dieser Zustand verursacht vermutlich einen metabolischen Stress für die Bakterienzellen, sodass sie nicht lebensfähig sind. Somit konnten keine positiven Klone identifiziert werden. Es fanden Modifikationen im Gen *estA Δ H* statt, die eine Expression verhinderten und für den Zellmetabolismus nicht letal waren. Ebenfalls könnte eine fehlende α -Helix auch die Permeabilität der Membranpore erhöhen und die Flüssigkeitsregulation der Zellen stören.

Ähnliche Untersuchungen wurden bisher nur *in vitro* durchgeführt, indem die Strukturunterschiede der Transportdomäne von NalP mit und ohne α -Helix verglichen wurden. Dabei wurde festgestellt, dass die α -Helix die Struktur der Membranpore stabilisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die β -Pore von NalP auch ohne α -Helix die Konformation einnimmt, dennoch wird unter diesen Bedingungen die Struktur destabilisiert und zeichnet sich durch mehr Flexibilität aus. Da die Helix die Pore vermutlich regulativ verschließt, wird die Pore durch eine Deletion permeabler (Khalid and Sansom, 2006).

Während die Passagierdomäne von NalP nach dem Transport ins extrazelluläre Milieu abgespaltet wird, bleibt diese bei der Esterase EstA mit der Transportdomäne als Membrananker verbunden und wird auf der Zelloberfläche exponiert (Wilhelm *et al.*, 1999). Dementsprechend dient die α -Helix als Verbindungselement zwischen beiden Autotransporterdomänen und nicht allein zum Verschluss der Membranpore.

Da die Deletion von EstA unter der Kontrolle des *lac*-Promotors nicht erfolgen konnte, weil eine konstitutive Expression des Zielgens stattfand, wurde für die *in vitro*-Untersuchungen eine Expression unter der Kontrolle eines T7-Promotors gewählt. Dabei erfolgten die Klonierungsschritte in einem Stamm, der keine T7-Polymerase im Genom kodierte, sodass dementsprechend keine Transkription des Gens stattfinden konnte. Bei anschließender Überexpression von EstA und EstA Δ H in dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3), der die T7-Polymerase chromosomal kodiert, wurden die Proteine in Form von *inclusion bodies* exprimiert. Diese Expression erschien für EstA Δ H vorteilhaft zu sein, da eine große Menge an *inclusion bodies* produziert werden konnten. Dieses Expressionssystem erfordert zuerst eine Denaturierung der *inclusion bodies*, um die Proteine zu lösen. Nach einer *in vitro*-Faltung

konnte im Gegensatz zum Wildtypprotein EstA kein katalytisch aktives EstA Δ H erhalten werden. Die einfachste Erklärung könnte sein, dass durch die abwesende α -Helix die Verbindung beider Domänen des Autotransporterproteins fehlt. Demzufolge müsste ein Teil der Passagierdomäne sich im Lumen der Pore befinden. Da die Transportdomäne von EstA strukturell der von NalP sehr ähnelt, ist die Pore zu klein für eine globuläre native Proteinstruktur (Oomen *et al.*, 2004). Zudem ist die Porengröße vermutlich durch die fehlende stabilisierende Wirkung der α -Helix verkleinert (Khalid and Sansom, 2006). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass die α -Helix für das Autotransporterprotein EstA unverzichtbar ist.

4.2. Die charakteristischen Cysteine haben keinen bedeutsamen Einfluss auf die Sekretion und Aktivität des Autotransporterproteins EstA in *P. aeruginosa*

Die primäre Struktur der Esterase EstA zeigt die Charakteristika eines Autotransporterproteins (Wilhelm *et al.*, 1999). Die C-terminalen Domänen der Autotransporterproteine weisen weitgehende Homologien auf, die auf die konforme Transportfunktion und Membranintegration zurückzuführen sind. Hingegen sind die Funktionen der Passagierdomänen sehr unterschiedlich, aber zeichnen sich häufig durch wenige, meist zwei nahe beieinander liegende Cysteine aus. Der Autotransporter Ssp-1 aus *Serratia mercescens* besitzt ausnahmsweise zwei Cysteinpaare innerhalb der Passagierdomäne (Tabelle 4.1). Obwohl die Cysteine ein Charakteristikum für Autotransporterproteine darstellen, ist ihre Bedeutung noch ungeklärt (Letley *et al.*, 2006).

Die Esterase EstA aus *P. aeruginosa* PAO1 besitzt ebenfalls zwei dieser typischen Cysteine an Position 258 und 264 im nativen Protein, die unter den homologen Proteinen in Pseudomonaden konserviert sind.

Tab. 4.1: Kontingent an Cysteinen mehrerer Autotransporterproteine.

Protein	Organismus	Funktion	Anzahl der Cysteine	Anzahl der C-C Paare (Abstand in AS)	Akzession -nummer
EstA	<i>P. aeruginosa</i>	Esterase	2	1 (5)	AF005091
EspC	<i>E. coli</i>	Endotoxin	2	1 (7)	Q9EZE7
EspP	<i>E. coli</i>	proteolytisches Toxin	2	1 (10)	032555
Hap	<i>H. influenzae</i>	Adhesin	2	1 (11)	P45387
IgA1	<i>N. meningitidis</i>	Protease	2	1 (11)	Q9AIU6
IgA1	<i>H. influenzae</i>	Adhesin	2	1 (11)	P44969
IgA1	<i>N. gonorrhoeae</i>	Protease	2	1 (11)	P09790
VacA	<i>H. pylori</i>	Toxin	2	1 (11)	Q48245
Pet	<i>E. coli</i>	proteolytisches Toxin	2	1 (5)	068900
Ssp-1	<i>S. marcescens</i>	Protease	5	2 (9/5)	P29805
AIDA-I	<i>E. coli</i>	Adhesin	0	0	Q03155
Brk	<i>B. pertussis</i>	Adhesin/Serum Resistenz	0	0	Q45340

Durch den Typ-V-Sekretionsmechanismus der Autotransporterproteine haben Gram-negative Bakterien die Fähigkeit, große Proteine über die äußere Membran transportieren zu können (Henderson *et al.*, 2004). Allerdings sind viele fundamentale Fragen bezüglich des Mechanismus zurzeit noch nicht geklärt. Prinzipiell erfolgen Transportstudien von Autotransporterproteinen durch eine Fusion mit heterologen Passagierproteinen, von denen bekannt ist, dass sie sich im Periplasma falten und Disulfidbrücken ausbilden (Jong *et al.*, 2007). Es gibt Vermutungen, dass nach dem Transport über die Cytoplasmamembran ein periplasmatisches Intermediat gebildet wird. Dies würde zumindest die Existenz eines partiell gefalteten Proteins bestätigen. Diese Intermediate, die resistent gegenüber Proteasen sind, konnten anhand von Disulfidbrückenbildungen durch das periplasmatische Dsb-System nachgewiesen werden (Brandon and Goldberg, 2001; Klauser *et al.*, 1990; Skillman *et al.*, 2005; Veiga *et al.*, 1999).

Interaktionen mit periplasmatischen Chaperonen werden ebenfalls in Betracht gezogen und wurden bei dem Autotransporter IcsA aus *Shigella flexneri* mit dem Chaperon Skp bereits beobachtet (Wagner *et al.*, 2009). Hingegen gibt es auch Beobachtungen, die die These stützen, dass der Transport über die äußere Membran mit einem ungefalteten Protein erfolgt. Dabei konnten die Passagierproteine von Hybridproteinen nur in Anwesenheit reduzierender Agenzien transportiert werden (Klauser *et al.*, 1990; St Geme and Cutter, 2000). Letztlich gibt es deutliche Hinweise auf ein vorübergehendes Verweilen von Autotransporterproteinen im Periplasma. Durch Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen im Periplasma

würde eine haarnadelähnliche Struktur entstehen, da die Cysteine sehr nahe beieinander liegen. Es wurde bereits postuliert, dass eine Disulfidbrücke die Proteinkonformation, die für einen Transport mit dem *Hairpin*-Modell, eingenommen werden muss, stabilisieren würde (Jose *et al.*, 1995).

Im Periplasma wird die Bildung von Disulfidbrücken durch DsbA und DsbB katalysiert, während DsbC und DsbD eher fehlgefaltete Proteine korrigieren (Nakamoto and Bardwell, 2004).

In dieser Arbeit wurden dementsprechend Expressionsstudien von EstA in unterschiedlichen Dsb-defizienten Stämmen von *P. aeruginosa* durchgeführt. Anhand der extrazellulären Esteraseaktivität und dem immunologischen Nachweis von EstA in der äußeren Membran konnte deutlich gezeigt werden, dass das periplasmatische Dsb-System keinen Einfluss auf die Sekretion oder Proteinfaltung in eine enzymatisch aktive Konformation von EstA hat. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen mehrerer Studien überein, bei denen die Präsenz von DsbA, einem bedeutenden Katalysator, die Bildung von Disulfidbrücken in *E. coli*, unabhängig von der Proteinstabilität und Sekretion von Autotransportern durch die äußere Membran war (Brandon and Goldberg, 2001; Veiga *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu gab es Befunde zur Passagierdomäne von VacA aus *H. pylori*, die zeigten, dass nach einem Austausch der typischen Cysteine durch Serine der Transport gehemmt war (Letley *et al.*, 2006).

Eine vergleichbare Mutagenese von EstA hatte keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Expression und Sekretion in *P. aeruginosa* zur Folge. Obwohl eine Disulfidbrückenbildung zwischen den Aminosäuren C258 und C264 von dem Vorhersageprogramm DISULFIND (Ceroni *et al.*, 2006) (<http://www.predictprotein.org>) postuliert wurde, konnten keine experimentellen Daten diese Hypothese *in vivo* bestätigen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Cysteine und eine mögliche Bildung einer Disulfidbrücke sowohl für die Sekretion als auch für eine enzymatisch aktive Proteinkonformation nicht bedeutungsvoll sind. Diese Resultate deuten auf einen ungefalteten Transport der Passagierdomäne von EstA über die äußere Membran hin.

Diese Schlussfolgerung wurde ebenfalls durch die Existenz der Kristallstrukturen der Transportdomänen von NalP, EspP und Hia bestätigt, deren Lumen zu eng für eine globuläre, tertiäre Proteinkonformation sind (Barnard *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2006; Oomen *et al.*, 2004). Dennoch konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob der Transport über die äußere Membran in einem ungefalteten Zustand erfolgt und die native Enzymkonformation erst extrazellulär entsteht. Die katalytische Domäne von EstA wird unabhängig von dem Dsb-

System im Periplasma sowie ohne Einflüsse des Cysteinpaares auf die Zelloberfläche transportiert. Folglich sollte die Möglichkeit des Omp85-Modells in Erwägung gezogen werden. Dieses hoch konservierte Protein (PA3648 in *P. aeruginosa*) ist bei der Insertion vieler Membranproteine, möglicherweise auch bei Autotransporterproteinen, in die äußere Membran beteiligt (Voulhoux *et al.*, 2003). Die Transportdomäne (TpsB) des *Two-partner*-Sekretionsmechanismus gehört ebenfalls zur Omp85-Familie, die bei der Translokation von Proteinen über die äußere Membran beteiligt ist (Thanassi *et al.*, 2005).

Die Cysteine sind an der *in vitro*-Faltung des Autotransporterproteins EstA beteiligt

Die Bildung von Disulfidbrücken ist essenziell für die Faltung, Aktivität und Stabilität vieler Proteine, die vom Cytoplasma exportiert werden. Besonders extrazelluläre Proteine benötigen eine stabile Konformation, da sie erhöhten mechanischen und chemischen Belastungen ausgesetzt sind. Da die meisten Autotransporterproteine zwei Cysteine C-terminal der katalytischen Domäne besitzen, wird diesem Cysteinpaar besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Einerseits wird vermutet, dass sie bei der Sekretion involviert sind, andererseits wurde den Cysteinen bereits eine stabilisierende Aufgabe der tertiären Proteinstruktur von Autotransportern zugesprochen (Shiell *et al.*, 2007). Bei einer homologen Expression der Esterase EstA in *P. aeruginosa* erfolgte der Transport auf die Zelloberfläche vermutlich unabhängig von externen Einflüssen. Die Mechanismen der Sekretion und der Proteinfaltung gehen *in vivo* ineinander über, sodass eine Erklärung der einzelnen molekularen Prozesse sehr schwer ist. Da keine Anzeichen einer Disulfidbrückenbildung bei einer Expression im homologen Wirt *P. aeruginosa* gefunden werden konnten, wurden die Proteine alternativ im heterologen Wirt *E. coli* exprimiert. Bei einer Expression unter der Kontrolle des T7-Promotors aggregiert die Esterase EstA im Cytoplasma, und es bilden sich *inclusion bodies*, die bedingt durch Interaktion hydrophober und exponierter Bereiche der ungefalteten Proteine entstehen (Villaverde and Carrio, 2003). Die *inclusion bodies* von EstAC258S, EstAC264S, EstACDM und EstA konnten durch Zentrifugation von den anderen Proteinen getrennt werden. Danach war eine *in vitro*-Faltung nach chemischer Denaturierung nur in Gegenwart von Detergenzien möglich, um eine native Proteinkonformation erzielen zu können (Oomen *et al.*, 2004; Wilhelm, 2001). Diese Aktivierung wurde dazu genutzt, um die Cystein-Varianten von EstA näher zu analysieren. Bei der Faltung von Proteinen, die Disulfidbrücken enthalten, muss deren korrekte Ausbildung garantiert werden, um die native Konformation erreichen zu können. Bei Faltungsprozessen von Proteinen können

Disulfidbrückenbindungen eine entscheidende Bedeutung haben, die durch Reduktionsmittel wie DTT oder β -Mercaptoethanol aufgelöst werden können. Dies konnte bereits bei der Lipase aus *Burkholderia cepacia* (Hobson *et al.*, 1995) oder auch aus *P. aeruginosa* gezeigt werden (Liebeton *et al.*, 2001). Bei Autotransporterproteinen wurde bisher nur *in vivo* von Veränderungen durch reduzierende Bedingungen berichtet (Jose *et al.*, 1996). Nach der *in vitro*-Faltung der Cystein-Varianten von EstA konnten aktive Enzymkonformationen erzielt werden. Allerdings wurden durch verminderte Esteraseaktivitäten der Mutanten im Vergleich zum Wildtypprotein deutlich, dass die Aminosäure-Modifikationen die Aktivität von EstA beeinträchtigen. Die Zugabe von reduzierendem DTT während der *in vitro*-Faltung beeinflusste sowohl das Wildtypprotein EstA als auch die Einzelmutanten EstAC258S und EstAC264S. Hingegen zeigte DTT bei der Doppelmutante EstACDM keine Wirkung auf die spezifische Esteraseaktivität. Bei der Doppelmutante konnte DTT mit keinem freien Schwefelatom reagieren und beeinflusst dementsprechend die Proteinfaltung dieser Variante nicht, während das Reduktionsmittel die Faltung der anderen Varianten durchaus hemmt.

Trotz der Substitutionen und Zusatz reduzierender Detergenzien bei der Proteinfaltung erzielten die EstA-Varianten eine katalytisch aktive Konformation. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die Cysteine, die ein wichtiges Merkmal vieler Autotransporter darstellen, für EstA keine essenzielle Bedeutung haben.

Darüber hinaus zeichnen sich Autotransporterproteine durch eine auffallend hohe Stabilität gegenüber hohen Temperaturen aus, wie es z.B. bei der Phospholipase B (PLB) aus *Moraxella bovis* beschrieben wurde (Shiell *et al.*, 2007). Dieses Autotransporterprotein PLB besitzt Homologie gegenüber der Esterase EstA (21 % Identität, 20 % Ähnlichkeit).

Um das Verhalten der nativen Proteinvarianten bei hohen Temperaturen untereinander vergleichen zu können, wurden diese während einer thermischen Inaktivierung schrittweise analysiert. Nach *in vitro*-Faltung der denaturierten *inclusion bodies* wurden die Proteinproben in unterschiedlichen Zeitintervallen bei 90 °C inkubiert und die verbleibende Aktivität mit einem Esteraseaktivitätstest ermittelt. Da dieser photometrische Aktivitätstest bei einer Temperatur von 90 °C nicht möglich ist, da das Substrat unter diesen Bedingungen zerfällt, erfolgte die Durchführung bei 30 °C. Dabei ist zu berücksichtigen, dass während der Reaktionszeit des Aktivitätstests eine Renaturierung der Esterasen erfolgen kann. Folglich ist die gemessene Aktivität als Maß der Rückfaltung nach thermischer Denaturierung zu betrachten, wobei die Proteinstabilität berücksichtigt wird. Es wurde eine bemerkenswerte Faltungseffizienz des Autotransporterproteins EstA deutlich, die allerdings auch bei der Doppelmutante zu finden war. Hingegen konnte ein deutlich höherer Aktivitätsverlust bei den

Einzelmutanten nach thermischer Denaturierung festgestellt werden. Die Ergebnisse sind ein Hinweis, dass die enzymatisch aktive Domäne von EstA eine kompakte Molekülstruktur darstellt, deren Faltung von den Cysteinen nicht signifikant beeinflusst wird. Dennoch kann den Cysteinen eine Bedeutung bei der Proteinfaltung zugesprochen werden, da die Einzelmutanten die Faltung von EstA erschweren und eventuell Fehlfaltung auslösen. Es ist durchaus anzunehmen, dass die Cysteine auch an der Stabilität von EstA beteiligt sind, dennoch konnte durch die durchgeführten Experimente dies nicht eindeutig bewiesen werden. Die experimentellen Ergebnisse deuten nicht auf die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 258 und 264 hin. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass die Substitutionen der Cysteine von EstA die Konformation des Proteins verändern.

Aufklärend wäre nur die Auflösung der Kristallstruktur von EstA. Derzeit existiert nur ein unvollständiges Homologiemodell der katalytischen Domäne von EstA, das von Filip Kovacic aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt worden ist. Als Matrize für die Modellierung diente die Kristallstruktur einer putativen Lipase/Acyltransferase EfPLip aus *Enterococcus faecalis* (Zhang *et al.*, unveröffentlicht). Da dieses Protein mit 195 Aminosäuren sehr klein ist, konnte nur eine Struktur der Passagierdomäne von EstA, bestehend aus 186 Aminosäuren, modelliert werden, bei der die zwei Cysteine nicht inbegriffen sind.

4.3. Charakterisierung des ersten Autotransporterproteins aus einem avirulenten Stamm

P. putida und *P. aeruginosa* sind beide typische Boden-Saprophyten mit unterschiedlichen und teilweise überlappenden Lebensgewohnheiten und Habitaten. Allerdings unterscheidet sich *P. putida* durch die Fähigkeit, Pflanzenwurzeln kolonisieren zu können (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000), während *P. aeruginosa* ein fakultativ humanpathogener Krankheitserreger ist. *P. putida* ist ein biologisch sicheres Bakterium, dessen Genom eine Homologie von 85 % zu dem von *P. aeruginosa* aufweist (Nelson *et al.*, 2002). Durch Sequenzanalysen konnten in *P. putida* KT2440 im Gegensatz zum opportunistischen humanpathogenen Krankheitserreger *P. aeruginosa* keine Gene für Virulenzfaktoren identifiziert werden. Autotransporterproteine stellen einen Sekretionsmechanismus dar, indem sie ihre katalytisch aktive Passagierdomäne selbst und energieunabhängig über die äußere Membran transportieren. Obwohl bisher alle Autotransporterproteine mit der Virulenz ihrer jeweiligen Organismen assoziiert wurden (Henderson and Nataro, 2001; Potvin *et al.*, 2003), konnte ein offener Leserahmen in dem Genom von *P. putida* in der *trpE-trpG* Region mit auffallender Ähnlichkeit zu *estA*

identifiziert werden (Essar *et al.*, 1990). Durch die bekannte Genomsequenz konnten in *P. putida* KT2440 vier offene Leserahmen, die potenzielle Autotransporterproteine kodieren, gefunden werden. Das Protein, das der offene Leserahmen PP0418 kodiert, wurde aufgrund der Homologie zu EstA als EstP bezeichnet. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte EstP bereits anhand der fünf charakteristischen konservierten Bereiche (Block I – V) als GDSL-Hydrolase klassifiziert werden. Dies konnte durch Aktivitätstest mit einem Standardsubstrat für Esterasen bestätigt werden. Des Weiteren wurden die Charakteristika von Autotransporterproteinen in der Aminosäuresequenz von EstP erkannt und somit wurde dieses Protein dieser Familie zugeordnet (Schell, 2005). Während EstP das erste beschriebene Autotransporterprotein aus einem avirulenten Stamm ist, konnte das homologe Protein EstA mit der Virulenz von *P. aeruginosa* assoziiert werden. Die Esterase EstA ist beteiligt an der Rhamnolipid-Produktion, an der Beweglichkeit der Bakterienzellen durch Schwimmen, Schwärmen und *Twitchen* und folglich auch bei der Biofilmbildung (Wilhelm *et al.*, 2007). Da das Genom von *P. putida* KT2440 weder ein Operon für die Rhamnolipid-Synthese enthält noch sich die Bakterienzellen mit Schwärmen und *Twitchen* unter standardisierten Wachstumsbedingungen fortbewegen können, sollten die Esterase EstP charakterisiert und die physiologische Funktion in *P. putida* KT2440 analysiert werden.

Das Autotransporterprotein EstP wird auf der Zelloberfläche exponiert

Die Esterase EstP aus *P. putida* KT2440 wurde durch Sequenzvergleiche identifiziert und gehört zur Familie der GDSL-Hydrolasen. Während bei einer Überexpression des Enzyms im homologen Wirt eine deutliche extrazelluläre Esteraseaktivität detektierbar war, konnte mit den Zellen des Wildtyps kaum Aktivität gemessen werden. Obwohl Autotransporterproteine nicht ausschließlich in pathogenen Organismen zu finden sind, wurden bisher diese Proteinfamilie nur in virulenten Stämmen beschrieben und als Virulenzfaktoren kategorisiert. Dennoch konnten im Genom von *P. putida* KT2440 vier offene Leserahmen, die potenzielle Autotransporterproteine kodieren, gefunden werden. Anhand einer Transkriptanalyse konnte in *P. putida* nachgewiesen werden, dass das Gen *estP* transkribiert wird. Parallel wurde eine Steigerung der Transkription in der späten logarithmischen Wachstumsphase durch eine Fusion mit einem Reporter gen beobachtet. Vermutlich ist EstP daher ein funktionell aktives Autotransporterprotein aus dem avirulenten Stamm *P. putida* KT2440. Nach einer Überexpression im homologen Wirt konnte EstP in der äußeren Membran lokalisiert werden, sodass sichergestellt werden konnte, dass EstP durch die postulierte N-terminale Signalsequenz

effizient über die Cytoplasmamembran exportiert wird. Anhand der molekularen Größe von EstP ist auch davon auszugehen, dass die N-terminale Passagierdomäne mit der C-terminalen Transportdomäne verbunden bleibt. Neben EstA zeigte EstP auch Homologien zu EstE aus *Xanthomonas vesicatoria*. Bei beiden Proteinen dient die Transportdomäne als Membrananker, allerdings mit dem Unterschied, dass EstA auf der Zelloberfläche exponiert ist und EstE dem Periplasma zugewandt sein soll (Talker-Huiber *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe einer Immunfluoreszenzmarkierung die Passagierdomäne von EstP auf der Zelloberfläche von *E. coli* lokalisiert werden. Folglich bleibt diese nach dem Transport durch die äußere Membran mit der Transportdomäne verbunden. Ebenso verhalten sich die Autotransporter EstA aus *P. aeruginosa* und McaP aus *Moraxella bovis*. Daher sollte es möglich sein, basierend auf dem Transportmechanismus EstP als Autodisplaysystem einzusetzen, um heterologe Proteine auf der Oberfläche zu präsentieren.

Die Esterase EstP zeigt Phospholipase B-Aktivität

Die Einordnung der Esterase EstP zur Familie der GDSL-Hydrolasen erfolgte durch die Identifizierung des GDSL-Konsensusmotivs. Es beinhaltet das putative katalytische, nukleophile Serin aus dem konservierten Bereich (Block I), während die anderen Mitglieder der katalytischen Triade, Aspartat und Histidin, in Block V wiederzufinden sind (Upton and Buckley, 1995; Wilhelm *et al.*, 1999). Mitglieder der GDSL-Familie existieren in vielen Bakterien: eine Phospholipase A aus *Legionella pneumophila* (Banerji *et al.*, 2008), eine Esterase aus *X. vesicatoria* (Talker-Huiber *et al.*, 2003), ein Lecithin-abhängiges Hämolysin aus *Vibrio cholerae* (Shinoda *et al.*, 1991), eine Acyltransferase/Phospholipase A aus *Aeromonas salmonicida* (Wong *et al.*, 1989) oder SseJ aus *Salmonella typhimurium* (Ruiz-Albert *et al.*, 2002). Dies zeigt, dass Lipasen/Esterasen, Phospholipasen, Hämolysine und Acyltransferasen zur Gruppe der GDSL-Hydrolasen gehören. Homologievergleiche mit Hilfe des BLAST-Servers (NCBI) der Aminosäuresequenz der Esterase EstP erzielten neben dem homologen Protein EstA aus *P. aeruginosa* die meisten Übereinstimmungen mit einer Phospholipase B aus *Moraxella catarrhalis* (Shiell *et al.*, 2007) sowie zu McaP aus *Moraxella bovis* (Timpe *et al.*, 2003). Mit einer Identität von 25 % weist die Phospholipase B McaP zwar keine besonders hohe Homologie zu EstP auf, allerdings scheint das Protein dennoch sehr ähnlich zu sein. Es ist auch ein Autotransporterprotein, dessen Passagierdomäne auf der Zelloberfläche exponiert bleibt, es gehört der GDSL-Familie an und weist neben der Esteraseaktivität noch Aktivität einer Phospholipase B auf. Allerdings stammt McaP wie alle

bisher charakterisierten Autotransporterproteine aus einem pathogenen Gram-negativen Bakterium, wo es als Adhäsion fungiert und somit an der Virulenz beteiligt ist (Lipski *et al.*, 2007). Unter zusätzlicher Berücksichtigung, dass für die Esterase EstA ebenfalls Aktivität einer Phospholipase B (PLB) nachgewiesen werden konnte (Gdynia, 2006), sollte EstP entsprechend auf Phospholipaseaktivitäten untersucht werden. Phospholipasen werden anhand ihrer spezifischen Substratbindestelle, die sie hydrolysieren, klassifiziert (Schmiel and Miller, 1999). Dafür wurden sowohl das Substrat Phosphatidylcholin (PC) als auch Lysophosphatidylcholin (LPC) verwendet. Während PC Hydrolysemöglichkeiten für alle Phospholipasen (A1,A2, B - D) bietet, ist LPC ein spezifisches Substrat für PLB oder Lysophospholipasen (LPL) (Timpe *et al.*, 2003). Anfangs wurden die Membranfraktionen der Überexpressionsstämme von EstP und den entsprechenden Kontrollen eingesetzt. Die Ergebnisse der enzymatischen Reaktion lassen sich mittels Dünnschichtchromatographie analysieren. Nachdem die Esteraseaktivität in den Membranfraktionen mit dem Standardsubstrat *p*-NPC für EstP bestätigt werden konnte, wurden mit Hilfe der dünnschichtchromatographischen Auftrennung die Extrakte der Phospholipasereaktion visualisiert. Da das Substrat PC unverändert war, deutete dies auf eine ausbleibende Phospholipaseaktivität hin. Hingegen resultierte bei der Enzymreaktion von LPC durch EstP sowie bei der Positivkontrolle EstA ein vollständiger Abbau des Substrats. Lediglich freie Fettsäuren waren sichtbar bei der Visualisierung der Spaltprodukte. Die komplette Degradation des Substrats ist ein eindeutiger Hinweis auf eine Phospholipaseaktivität von EstP bzw. der Kontrollreaktion mit EstA (Bosch, 1982). Obwohl die Spaltprodukte der Hydrolyse an Position *sn*-1 nicht eindeutig detektierbar waren, konnte an dieser Stelle von einer LPL oder sogar von einer PLB ausgegangen werden. Für weitere Analysen der Substratspezifität wurde ein photometrischer PLA₂-Test verwendet. Die Hydrolyse eines Phospholipids an Position *sn*-2 wird durch PLA₂ katalysiert und führt zu freien Fettsäuren und Lysophospholipid. Bei dem Test wurde das Substrat 1,2-Dithio-phosphatidylcholin benutzt. Nach enzymatischer Reaktion durch EstP an einer Thioesterbindung an Position *sn*-2 wurde eine Fettsäure freigesetzt, sodass die frei werdende Thiolgruppe mit DTNB (= 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) reagieren konnte. Diese enzymatische Reaktion von EstP, die spezifisch für PLA₂ ist, konnte durch eine Zunahme der Absorption bei 414 nm gemessen werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass EstP das spezifische Substrat einer PLB bzw. einer LPL an Position *sn*-1 hydrolysieren konnte. Darüber hinaus konnte noch deutlich eine PLA₂-Aktivität nachgewiesen werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass EstP eine PLB ist. Die Enzymreaktionen wurden schließlich mit

gereinigtem Protein bestätigt, damit die Aktivität wirklich auf EstP zurückgeführt werden konnte.

Folglich weist die GDSL-Hydrolase EstP aus *P. putida* neben einer Aktivität einer Esterase noch die einer PLB auf. Beide Enzymaktivitäten sind typisch für lipolytische Enzyme, deren Substratspektren sich unterscheiden. Die Bezeichnung „Esterase“ erhielt EstP zum einen wegen der Homologie zur Esterase EstA und zum anderen durch die Fähigkeit, Esterbindungen vom Standardsubstrat *p*-NPC sowie von Tributyrin spalten zu können (Schell, 2005). Die eigentliche physiologische Funktion von EstP ist allerdings noch ungeklärt. Bei Spekulationen bezüglich der potenziellen physiologischen Funktion von EstP in *P. putida* muss die Herkunft aus einem avirulenten Bakterium berücksichtigt werden. Es wurde bisher meist der Bezug der Phospholipasen zur Virulenz der jeweiligen Bakterien beschrieben (Ghannoum, 2000; Schmiel and Miller, 1999; Songer, 1997). Die Phospholipase B McaP fungiert als Adäsin an humane Epithelzellen (Lipski *et al.*, 2007). Dementsprechend könnte EstP bei der Kolonisation der Rhizosphäre beteiligt sein. Die Tatsache, dass die Passagierdomäne von EstP genauso wie bei McaP zellgebunden bleibt, stützt diese Vermutung. In diesem Fall bleibt allerdings die Funktion der Enzymaktivität auf der Zelloberfläche ungeklärt.

Membranproteine und Phospholipasen sind wichtige Enzyme des Lipidstoffwechsels, da sie Esterbindungen der Phospholipide hydrolysieren, die einen Hauptbestandteil der äußeren Membran von Bakterien darstellen (Banerji *et al.*, 2008). Eine Beteiligung bei der Biogenese der äußeren Membran könnte für EstP auch in Betracht gezogen werden.

Die physiologische Funktion des Autotransporterproteins EstP in *P. putida* KT2440

Da alle bisher charakterisierten Autotransporterproteine aus pathogenen Bakterien stammen und mit ihrer jeweiligen Virulenz assoziiert werden, gab es wenige Hinweise, die auf die physiologische Funktion von EstP in *P. putida* KT2440 schließen ließen. Lediglich die Phospholipaseaktivität lässt eine Beteiligung am Lipidmetabolismus vermuten. Für die funktionellen Untersuchungen des Autotransporterproteins EstP in einem avirulenten Stamm, dessen zellgebundene Passagierdomäne eine Esterase ist und ebenfalls eine Aktivität einer PLB zeigt, wurde zunächst ein *estP*-defizienter Stamm von *P. putida* erstellt. Dafür wurde eine Genregion von *estP* gegen eine Gentamycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Die Konstruktion dieser *estP*-Deletionsmutante, auch *P. putida* KT0418 genannt, ist schematisch in Abbildung 7.1 dargestellt. Die erfolgreiche Konstruktion der Mutante *P. putida* KT0418

konnte mit verschiedenen Nachweismethoden bestätigt werden. Zudem war die extrazelluläre Esteraseaktivität basierend auf EstP, bei dem *estP*-negativen Stamm *P. putida* KT0418 im Vergleich zum Wildtyp vermindert. Folglich konnte geschlussfolgert werden, dass die lipolytische Zelloberflächenaktivität von EstP für *P. putida* eine physiologische Bedeutung hat. Durch gleiche Zelldichten beider Stämme im Verlauf einer Wachstumskurve konnte sichergestellt werden, dass die Deletion von EstP durch die fehlende Membraninsertion der β -Pore oder sogar deren Funktion auf der Zelloberfläche keinen wachstumslimitierenden Faktor unter standardisierten Bedingungen verursachte. Da die Transkription von *estP* in der späten logarithmischen Wachstumsphase erfolgt, übernimmt es vermutlich erst in dieser Lebensphase physiologische Funktionen für die Bakterien. In dieser Lebensphase einer multizellulären Gemeinschaft ist eine Zell-Zell-Kommunikation eine wichtige Voraussetzung für die Existenz vieler Organismen, da viele Gene einer zelldichteabhängigen Regulation unterliegen. Solche Kommunikationssysteme, wie beispielsweise das *Quorum-sensing*-System, konnten im Genom von *P. aeruginosa* identifiziert und mit der Virulenz in Verbindung gebracht werden. Ein vergleichbares Kommunikationssystem wurde bisher in *P. putida* KT2440 nicht nachgewiesen (Nelson *et al.*, 2002), dennoch wurden einige indirekte Anzeichen einer zelldichteabhängigen Genregulation dokumentiert (Espinosa-Urgel and Ramos, 2004).

Das Überleben von Bakterien in der Umwelt ist abhängig von der Anpassungsfähigkeit an die äußeren Einflüsse. Dabei spielt die Zellmembran eine Schlüsselrolle durch die Interaktionen der Zellen untereinander und mit der Umgebung. Sie dient als physikalische Barriere und ist zudem ausschlaggebend bei der Kolonisation von Lebensräumen. Im Allgemeinen spielen Lipopolysaccharide (LPS), Flagellen und äußere Membranproteine eine physiologische Rolle bei der Ausscheidung externer Stoffe, Zelladhäsion und Oberflächenkolonisation (Burrows *et al.*, 1997; de Weger *et al.*, 1989; Williams and Fletcher, 1996).

In dieser Arbeit wurde der Stamm *P. putida* KT0418 im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich einiger Phänotypen untersucht, die Hinweise über die Funktionalität von EstP liefern könnten. Zuerst wurde die Anpassungsfähigkeit der Stämme gegenüber Stressfaktoren aus der Umgebung verglichen. Die Überlebensfähigkeit von *P. putida* in Gegenwart natürlicher Habitats setzt eine Besiedelung von Oberflächen mit einem limitierten Nährstoffangebot und eine Toleranz gegenüber verschiedenen Stressfaktoren aus der Umgebung voraus (Dos Santos *et al.*, 2004). Im Boden, besonders in der Rhizosphäre, sind die Organismen oft extremen Temperaturschwankungen, Abweichungen des pH-Optimums, osmotischem- oder oxidativem Stress ausgesetzt (De Angelis and Gobbetti, 2004; Hallsworth *et al.*, 2003; Phadtare, 2004).

Bakterien sind in ihrer natürlichen Umgebung ständig mit Temperaturen konfrontiert, die von ihren optimalen Wachstumsbedingungen abweichen und auf die sie sich einstellen müssen, um überleben zu können. Bei niedrigen Temperaturen muss beispielsweise die Membranfluidität vermindert werden. Durch die Stabilität von Autoporterproteinen bei höheren Temperaturen könnten diese durchaus eine physiologische Rolle bei einer Stressantwort auf erhöhte Temperaturen spielen. Veränderungen in extreme pH-Werte können Membranproteine zerstören und viele cytoplasmatische Prozesse beeinträchtigen. Kurzkettige Fettsäuren, Acetate und Benzoate sind schädlicher als anorganische Säuren, da sie besser die Zellmembran durchqueren können und Protonen abgeben (Hirshfield *et al.*, 2003). Veränderungen der Membranoberfläche und Pufferkapazitäten der zellulären Proteine tragen passiv zu einem konstanten pH-Wert bei, während Protonenpumpen und Transportproteine aktiv helfen, sich den Stressfaktoren anzupassen. Es wurde bereits dokumentiert, dass sowohl Chaperone (Lambert *et al.*, 1997) als auch Lipopolysaccharide (LPS) (Barua *et al.*, 2002) bei der Resistenz gegenüber kurzkettigen Fettsäuren involviert sind. Die generelle Barriere aller Stressfaktoren stellt zuerst die äußere Membran von *P. putida* dar. Durch Veränderungen der Membranzusammensetzung kann diese sich auf äußere Einflüsse einstellen. Da EstP auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass das Protein an Membranumbauprozessen beteiligt ist. Um einen ersten Eindruck zu gewinnen, ob EstP bei einer zellulären Stressantwort auf der Zelloberfläche eine Rolle spielt, wurden Wachstumskurven von *P. putida* KT2440 im Vergleich zum Wildtyp KT2440 in Gegenwart unterschiedlicher Stressfaktoren aufgenommen. Bei den gewählten Bedingungen war jedoch das Wachstumsverhalten bei beiden Stämmen identisch, sodass davon auszugehen war, dass die Deletion von EstP in *P. putida* keine Einschränkungen bei der Stressantwort unter den ausgewählten Bedingungen verursachte.

P. putida KT2440 besitzt ein großes Repertoire an Membrantransportern. Es besitzt 15 % mehr als *P. aeruginosa*, wobei die größte Bedeutung den ABC-Transportern beigemessen wird. Diese werden für die metabolischen Abbauprozesse des Bakteriums zur erfolgreichen Kolonisation in der Rhizosphäre benötigt (Nelson *et al.*, 2002).

Obwohl *P. putida* KT2440 als ein biologisch sicherer Stamm anerkannt ist, weist das Bakterium, wie bereits erwähnt, weitreichende evolutionäre Gemeinsamkeiten mit dem opportunistischen, humanpathogenen Krankheitserreger *P. aeruginosa* und auch anderen pflanzenpathogenen Pseudomonaden vor. Die Gene, die virulenzassoziierte Proteine kodieren, wurden in *P. putida* als Adhäsionsproteine identifiziert (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Darunter befindet sich auch das einzige *Two-partner*-Sekretionssystem aus *P. putida* KT2440,

das bei der Adhäsion zur Kolonisation von Mais und Wurzeln beteiligt ist (Molina *et al.*, 2006). Die *Two-partner*-Sekretionsproteine, ausgenommen das in *P. putida* KT2440, wurden ebenfalls bisher nur aus pathogenen Bakterien beschrieben. Das Genom von *P. putida* kodiert vier potenzielle Autotransporterproteine, wovon EstP das erste ist, das in dieser Arbeit charakterisiert wurde. Da auch das homologe Autotransporterprotein McaP als Adhäsion beschrieben wurde (Lipski *et al.*, 2007) und EstA an der Beweglichkeit der Zellen und der damit verbundenen Biofilmbildung beteiligt ist (Wilhelm *et al.*, 2007), wurde die EstP-Deletionsmutante KT0410 ebenfalls auf Unterschiede in Bereichen, die zur Oberflächenbesiedelung unerlässlich sind, untersucht. Die Ergebnisse konnten allerdings wiederum keine Anzeichen auf einen möglichen Einfluss von EstP bei der Adhäsion an Maiskörnern, Zellmobilität und bei der Biofilmbildung erbringen.

Die Untersuchungen der Membrankomponenten, LPS und Lipide, zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der Mutante KT2440 und dem Wildtyp KT2440. Es ist durchaus möglich, dass eventuelle Modifikationen durch EstP mit den durchgeführten analytischen Methoden nicht erfasst werden konnten.

Obwohl die physiologische Funktion von EstP in *P. putida* KT2440 nicht aufgeklärt werden konnte, lässt sich dennoch darüber spekulieren, ob dieses zellgebundene Autotransporterprotein im natürlichen Umfeld bei der Kolonisation der Rhizosphäre eine Aufgabe hat. Darüber hinaus wäre eine Charakterisierung der drei verbleibenden hypothetischen Autotransporterproteine, die das Genom von *P. putida* KT2440 kodiert, ebenfalls interessant.

4.4 Die Substitution W173R führt zu einer Steigerung der Enantioselektivität von EstP

Das biotechnologische Interesse an Esterasen beruht darauf, dass diese lipolytischen Enzyme keine Kofaktoren benötigen und eine verhältnismäßig hohe Stabilität in organischen Lösungsmitteln vorweisen (Bornscheuer, 2002b). Aufgrund der zunehmenden Bedeutung in der Biotechnologie wurden bereits viele Esterasen beschrieben (Panda and Gowrishankar, 2005). Für die pharmazeutische Industrie ist die Herstellung enantiomerenreiner Verbindungen von großer Bedeutung. Demnach war es für diese Arbeit interessant, die biochemischen Eigenschaften aufgrund struktureller Veränderungen von EstP näher zu untersuchen. Obwohl die enzymatische Optimierung durch die biotechnologische Relevanz der Lipasen und Esterasen in den letzten Jahren ansteigt (Bornscheuer *et al.*, 1999; Bornscheuer *et al.*, 2002; Chirumamilla *et al.*, 2001; Schmid and Verger, 1998; Schmidt and

Bornscheuer, 2005), gibt es dennoch nur eine geringe Anzahl erfolgreicher Optimierungen durch Modifikationen (Bornscheuer, 2002a).

Ein Beispiel stellt die Esterase EstA aus *P. aeruginosa* dar, bei der durch ein neues Selektionsverfahren (Becker *et al.*, 2007) eine Variante isoliert werden konnte, die eine Steigerung der Enantioselektivität gegenüber dem *R*-Enantiomer der 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenylester (2-MDA-*p*-NPE) aufweist. Darüber hinaus konnte die Aminosäure in der Sequenz von EstA identifiziert werden, ein sogenannter *hot spot*, der für die Veränderung dieser Substratspezifität verantwortlich ist. Durch die Substitution von Thryptophan durch Arginin an der Position 185 und zwei weitere Aminosäureaustausche wurde eine Variante von EstA erzeugt, die sich durch eine Steigerung der Enantioselektivität und einen E_{app} -Wert von 16,3 auszeichnet (Becker *et al.*, 2008). Die dafür verantwortliche Aminosäure wurde dazu benutzt, um eine äquivalente strukturelle Modifikation zu verursachen und die Struktur-Funktions-Beziehung von EstP zu analysieren. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte, dass die Aminosäure W185 von EstA bei EstP der Position 173 entspricht.

Sowohl das Volllängenprotein EstP als auch die aktive Domäne EstP_N wurden entsprechend mutagenisiert und daraufhin analysiert. Bei der Charakterisierung der esterolytischen Aktivitäten stellte sich heraus, dass die spezifische Aktivität der Passagierdomäne EstP_N im Vergleich zum Volllängenprotein EstP signifikant höher war. Eine mögliche Erklärung könnte eine Interaktion der Passagierdomäne mit der Transportdomäne sein. Dabei behindert vermutlich die Transportdomäne die Zufuhr der Substrate in die Enzymbindetasche. Dagegen ist die Passagierdomäne von allen Seiten erreichbar für die Substrate, wenn der C-terminale Membranteil fehlt.

Veränderungen gegenüber der Substratspezifität wurden auch bei der Sorbit-Dehydrogenase (SDH) aus *Rhodobacter sphaeroides* beobachtet. Das reine Protein SDH hydrolysierte zuerst Sorbitol, dann Galactiol und zuletzt Arabitol. Durch eine Fusion mit einem Membrananker zur Oberflächenpräsentation resultierte eine Umkehrung der präferierten Substratspezifität (erst Arabitol, gefolgt von Sorbitol und Galactiol) (Jose and von Schwichow, 2004).

Nach dem Austausch der Aminosäure Thryptophan gegen Arginin an Position 173 des nativen EstP resultierte bei beiden Proteinvarianten EstP W173R und EstP_N W173R, im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypproteinen, eine Reduktion der spezifischen Aktivität gegenüber dem Standardsubstrat *p*-NPC.

Dieses begleitende Phänomen der Aktivitätsminderung bei Veränderungen der Substratspezifität ist durchaus bekannt. Bei EstA konnte dieses Resultat ebenfalls beobachtet werden. Es wurden Varianten isoliert, deren Gesamtaktivität beispielsweise 41 % der

Wildtypaktivität bei einem E_{app} von nur 1,1 oder sogar 8 % der Wildtypaktivität bei einem E_{app} von 3,3 betrug (Becker, 2007). In anderen Arbeiten wurden Varianten der Esterase EstB aus *Burkholderia gladioli* isoliert, die eine gesteigerte Enantioselektivität, begleitet durch verminderte Gesamtaktivität von etwa 63 % ($E_{app} = 1,5$) bis ungefähr 14 % ($E_{app} = 27,3$), im Vergleich zum Wildtypprotein zeigten (Ivancic *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel stellen identifizierte Varianten der Lipase aus *P. aeruginosa* (PAL) dar, die im Gegensatz zum Wildtyp sterisch umfangreiche Substrate hydrolysierten, allerdings eine verminderte Aktivität gegenüber den Standardsubstraten zeigten (Reetz *et al.*, 2006).

Es könnten für diese Begleiterscheinung Strukturveränderungen im Bereich des katalytischen Zentrums verantwortlich sein. Eine Vergrößerung der Substratbindetasche könnte dazu führen, dass Substrate mit einem kleineren Molekulargewicht für eine Hydrolyse unvorteilhaft binden (Benkovic and Hammes-Schiffer, 2003; Fersht, 1998; Garcia-Viloca *et al.*, 2004). Zur schnellen Überprüfung, ob W185 von EstA ebenfalls bei der homologen Esterase EstP an der Position 173 eine Strukturveränderung bewirkt, die zu einer Verschiebung der Enantioselektivität führt, wurde ein Verfahren zur Ermittlung eines Schätzwertes für die Enantioselektivität (*Quick E*) angewendet. Bei irreversiblen Enzymreaktionen, die durch Hydrolasen katalysiert werden, ist die Bestimmung der Enantioselektivitäten in der Praxis sehr aufwändig. Nach einer Reaktion unter kompetitiven Bedingungen (Racematspaltung) müssen die Enantiomerenüberschüsse des Edukts und Produkts ebenso wie der Umsatz ermittelt werden, damit der E -Wert berechnet werden kann. Zur Erleichterung wurde hier ein Verfahren angewandt, das nach einer Hydrolysereaktion einen Schätzwert für die Enantioselektivität liefert, den sogenannten apparenten E -Wert (E_{app}). Im Gegensatz zur Endpunkt-Bestimmung zur Berechnung des wahren E -Werts (E_{true}), erfolgt die Enzymreaktion nicht unter kompetitiven Bedingungen, sondern die Hydrolyse jedes Enantiomers verläuft unabhängig (Abbildung 4.1). Der apparente E -Wert ist der Quotient aus beiden Start-Reaktionsgeschwindigkeiten.

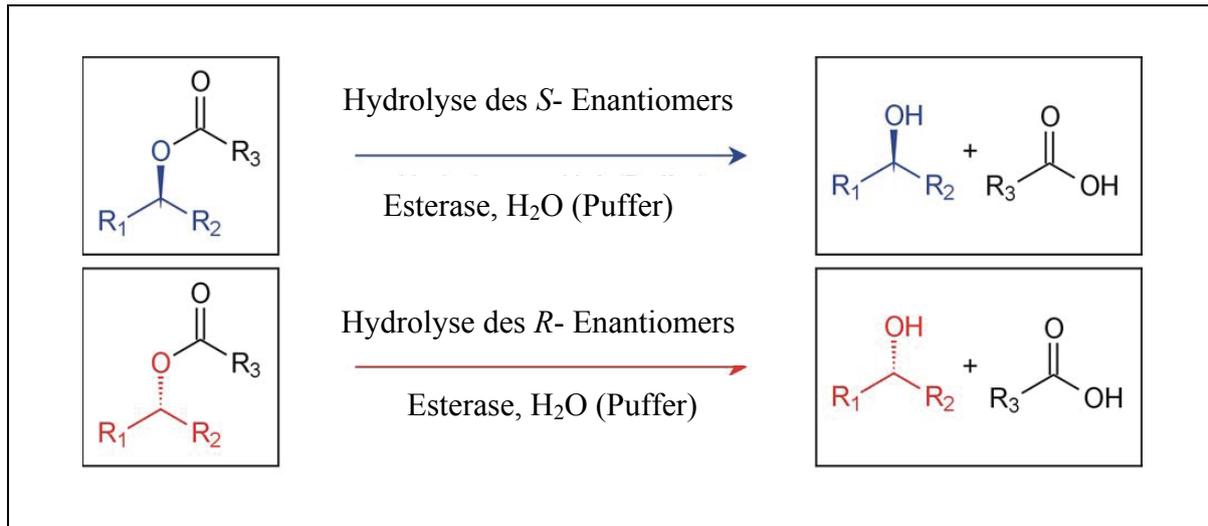


Abb. 4.1: Esterolytische Reaktion unter nicht-kompetitiven Bedingungen. Die Reaktion des (*S*)- bzw. (*R*)-Enantiomers verläuft in separaten Ansätzen. Der Quotient beider Startreaktionsgeschwindigkeiten entspricht dem Schätzwert (E_{app} -Wert).

Mit dieser Methode wurde für EstP W173R ein E_{app} -Wert von 2,7 und für die Passagierdomäne (EstP_{N-His6} W173R) ein E_{app} -Wert von 4,8 mit erhöhter Präferenz für das *R*-Enantiomer der 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenylester berechnet. Das Wildtypprotein war nahezu unselektiv ($E_{app} = 1,2$). Die Verschiebung der Enantioselektivität war nicht vergleichbar mit dem E_{app} -Wert der Variante von EstA. Dabei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass bei EstP diese invertierte Selektivität durch eine Substitution erzielt wurde, während EstA bei einem E_{app} -Wert von 16,3 noch zwei weitere Mutationen besaß. Es wurden auch weitere Varianten von EstA isoliert, die vergleichbare Steigerungen der Enantioselektivität zeigten, z.B. eine Variante mit einem E_{app} -Wert von 5,0 mit 4 Substitutionen oder einen E_{app} -Wert von 4,5 mit 3 Substitutionen (Becker *et al.*, 2008). Auch die Ergebnisse aus anderen veröffentlichten Arbeiten sind mit den Enantioselektivitäten und den damit verbundenen Substitutionen vergleichbar. Varianten der Lipase aus *P. aeruginosa* mit veränderten Selektivitäten von einem E_R -Wert von 2,0 mit 1 Substitution oder einem E_R -Wert von 1,1 mit 4 Substitutionen wurden isoliert (Zha *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist die Isolierung zweier Varianten einer weiteren Lipase aus *Burkholderia cepacia* mit einer Steigerung des E -Werts von $E_R = 33$ bzw. $E_R = 38$ mit je 4 Substitutionen. Allerdings lag bei diesen Arbeiten eine strukturelle Information vor (Koga *et al.*, 2003). Da bei EstP eine signifikante Steigerung der Enantioselektivität durch eine Substitution an Position W173 verursacht wurde, stellt diese Aminosäure vermutlich eine entscheidende Bedeutung dar, die für diese Veränderung der Selektivität ausschlaggebend ist.

Da derzeit noch keine Kristallstruktur einer vergleichbaren GDHL-Hydrolase für Interpretationen der molekularen Mechanismen der Aminosäureaustausche zur Verfügung steht, sollte ein Fokus dieser Arbeit die Produktion großer Proteinmengen und eine anschließende Reinigung der katalytischen Domäne von EstP sein. Daraus sollte eine ausreichende homogene Proteinmenge resultieren, die für Kristallisationsexperimente zur Strukturaufklärung bereitgestellt werden kann. Es wurde sowohl die Domäne des Wildtypproteins als auch die enantioselektivere Variante gereinigt, um gegebenenfalls deren Strukturen direkt miteinander vergleichen zu können. Die hohe Proteinproduktion, die Verkürzung der Proteine um ihre C-terminale Transportdomäne sowie das Fehlen der Sec-abhängigen Signalsequenz führten zur Bildung von *inclusion bodies* im Cytoplasma von *E. coli*. Diese haben meist sehr stabile Strukturen, die hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen zwischen Faltungsmediatoren des rekombinanten Proteins entstehen (Villaverde and Carrio, 2003). Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proteinsynthese, -faltung und -aggregation lässt meist die unerwünschten *inclusion bodies* entstehen (Fahnert *et al.*, 2004). Trotz erforderlicher Solubilisierung und anschließender Renaturierung der *inclusion bodies* bringt ihre Bildung auch Vorteile mit sich. Es können große Mengen Protein erzielt werden, die vor Proteasen geschützt sind und sich leicht von den anderen Proteinen isolieren lassen (Carrio and Villaverde, 2002; Fahnert *et al.*, 2004; Graumann and Premstaller, 2006).

Es stellte sich in dieser Arbeit eine Expression in *inclusion bodies* als vorteilhaft heraus. Auf diese Weise konnte eine große Proteinmenge produziert werden, die durch nur wenige Zentrifugationsschritte eine weitgehende Trennung von kontaminierenden Proteinen ermöglichte. Eine anschließende Reinigung mittels Affinitätschromatographie wurde somit erleichtert, durch die die Proteine EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R bis zur Homogenität gereinigt werden konnten. Folglich wurden Kristallisationsexperimente ermöglicht. Der Nachteil bei einer Expression in *inclusion bodies* ist die unerlässliche *in vitro*-Rückfaltung, bei der sich die Proteine in ihre native Konformation falten. Bei der Renaturierung tritt möglicherweise eine unerwünschte Konkurrenzreaktion, die Bildung von Aggregaten aus fehlgefaltetem Protein, auf. Der Erfolg der Renaturierung kann zwar durch Aktivitätstests überprüft werden, gibt allerdings keinen Aufschluss darüber, ob die Reaktion komplett erfolgreich verlaufen ist und das Protein sich homogen im nativen Zustand befindet.

Anhand einer HPLC-Analyse wurden mögliche Konformere mit einem abweichenden Molekulargewicht von EstP_{N-His6} bzw. EstP_{N-His6} W173R ausgeschlossen. Darüber hinaus blieben Proteinkonformationen unerkannt, die von der nativen Struktur abweichen und eine Kristallisation möglicherweise erschweren oder sogar behindern. Für Kristallisations-

experimente zur Strukturaufklärung wurden ausreichende Mengen von beiden Proteinen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Arne Skerra am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München bereitgestellt.

Die Enantioselektivität eines Enzyms beschreibt immer ein Gesamtsystem, sodass jede Änderung eines Reaktionsparameters einen Einfluss haben kann. Folglich können nicht nur Modifikationen durch Mutationen entstehen. Es wirken auch die Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Druck oder der pH-Wert, die Substratstruktur oder das Reaktionsmilieu auf die Stereospezifität.

Für eine genauere Charakterisierung wurden die Hydrolyse-Reaktionen abschließend noch unter kompetitiven Bedingungen durchgeführt, um die wahren Enantioselektivitäten (E_{true} -Wert) der EstP-Varianten und des Wildtyps mittels GC- bzw. HPLC-Analyse unter Verwendung chiraler Trennsäulen bestimmen zu können. Dabei konkurrieren die beiden Enantiomere um die Hydrolyse durch den Biokatalysator, in diesem Fall die Esterasevarianten von EstP. Während EstP W173R eine signifikante Steigerung der Enantioselektivität mit einem E_R -Wert = 20 bei einem pH-Wert von 7,2 zeigte, konnte eine deutliche pH-Abhängigkeit der Passagierdomäne EstP_{N-His6} W173R beobachtet werden. Im Gegensatz zum Volllängenprotein zeigte die mutagenisierte Passagierdomäne bei einem pH-Wert von 7,2 eine geringere Veränderung der Enantioselektivität mit einem E_R -Wert von 2 - 3. Während die Enantio-selektivität durch Veränderung des pH-Werts von 7,2 auf 8,0 auf einen E_R -Wert von etwa 4 - 5 gesteigert werden konnte, erzielte ein niedrigerer pH-Wert von 5,2 einen E_R -Wert von 18.

Bisher gibt es nur wenige Veröffentlichungen über die pH-abhängige Enantioselektivität von Proteinen. Dennoch wird über ähnliche Resultate bei einer Lipase aus *Candida rugosa* berichtet, bei der die Hydrolyse des 2-Chloroethylesters von Ketoprofen bei einem pH-Optimum für Aktivität und Selektivität bei 4,0 und 2,2 lag (Liu *et al.*, 1999). Dieses Enzym zeigte bei einer Senkung des pH-Werts von 9,0 auf 7,5 eine Steigerung der Enantioselektivität von 3 auf 20. Zudem war die spezifische Aktivität bei pH 7,5 doppelt so hoch wie bei pH 9,0 (Barton *et al.*, 1990). In weiteren Arbeiten wurde ebenfalls über Einflüsse des pH-Werts auf die Aktivität dieser Lipase berichtet. Ein pH von 5,6 steigerte die Hydrolyserate gegenüber dem Substrat Methylester von Ibuprofen. Im Gegensatz dazu wurde bei einem pH-Wert von 7,2 die Esterspaltung des Butylester von Ibuprofen bevorzugt (James *et al.*, 2003). Eine Schweineleberesterase zeigte pH-abhängige Enantioselektivität in einem pH-Bereich von 6,0 und 7,5 bei der Hydrolyse des Dimethylesters. Während bei pH 6,0 die Aktivität des Enzyms abnahm, steigerte sich die Enantioselektivität (Grandjean *et al.*, 1991).

Ein extrazelluläres, Cellulose-abbauendes Enzym (Cel7A) zeigte steigende Affinität verbunden mit einer Selektivität bei einem pH-Wert von 5,0, während ein pH 7,0 eine Verminderung beider Eigenschaften bedeutete (Fagerstrom *et al.*, 2007).

Dadurch wird ersichtlich, dass der pH-Wert die Enantioselektivität der mutagenisierten Esterase beeinflusste. Eine einfache, aber durchaus einsichtige Erklärung könnte sein, dass der pH-Wert die Proteinkonformation verändert. Vermutlich verändert ein niedriger pH-Wert die Ladung der Bindetasche von EstP_{N-His6} W173R, die die Substratbindung des *R*-Enantiomers der 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenylester begünstigt, was zu einer signifikanten Steigerung der Enantioselektivität dieser Enzymvariante führte.

Die Eigenschaften der Volllängenproteine EstP und EstP W173R sind abweichend von denen der Passagierdomäne, das den ersten eindeutigen Hinweis auf mögliche Interaktionen zwischen beiden Domänen darstellt und im Folgenden diskutiert wird.

4.5 Die Chimäre aus EstA und EstP geben Hinweise auf Interaktionen zwischen der Passagier- und der Transporterdomäne von Autotransporterproteinen

Eine *in vitro*-Expression sowohl der Passagierdomänen EstA_N und EstP_N als auch der entsprechenden Volllängenproteine dieser Autotransporter erfolgte durch Aggregation in *inclusion bodies*. Durch eine *in vitro*-Faltung nach einer chemischen Denaturierung konnte erfolgreich natives Protein erzielt werden, was entsprechende Enzymreaktionen bestätigten. Die Passagierdomänen alleine zeichneten sich dabei durch eine höhere Aktivität im Vergleich zu den Ergebnissen der vollständigen Autotransporterproteine aus. Die einfachste Erklärung dafür könnte eine zwanghaft verbundene Behinderung der fusionierten Transportdomäne sein, die anscheinend den Zugang des Substrats vermindert. Da die Passagierdomänen unabhängig von ihren Transportdomänen einen katalytisch aktiven Zustand erreichen konnten, widerlegt dies die Vermutung, dass der Membranteil oder eine sogenannte *junction region* (Oliver *et al.*, 2003) zumindest *in vitro* die Faltung der Passagierdomäne in irgendeiner Weise beeinflusst oder sogar katalysiert.

Ein Modell der postulierten Aminosäureorganisation der Transportdomäne in der äußeren Membran von EstA (Abbildung 3.35) zeigt auffallend große extrazelluläre Schleifen in Relation zu kleinen periplasmatischen Schleifen. Zudem ist die Sequenz auf der Zelloberfläche von einer großen Anzahl geladener Aminosäuren geprägt, was auf eine Interaktion durch die ersichtliche Reaktionsbereitschaft mit der dort lokalisierten Passagierdomäne schließen ließ. Diese Organisation der Transportdomäne in der äußeren Membran wird unterstützt durch die bekannte Kristallstruktur der entsprechenden Domäne

von NalP, bei der die extrazellulären Schleifen ebenfalls deutlich größer als die auf der periplasmatischen Membranseite sind (Oomen *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu der Protease NalP, die nach der Translokation ins extrazelluläre Milieu abgespaltet wird, verbleiben die funktionellen Passagierdomänen von EstA und EstP auf der Zelloberfläche exponiert. Aus diesem Grund wird spekuliert, inwieweit beide eng beieinander liegenden Domänen miteinander interagieren. Vielleicht beeinflusst die Membrandomäne die Konformation oder die Position der katalytischen Triade der Enzymdomäne, damit diese befähigt ist, ihre physiologische Funktion auf der Zelloberfläche ausüben zu können. Die ersten Hinweise für mögliche Interaktionen zwischen der Passagier- und der Transportdomäne wurden in Kapitel 4.4 diskutiert. Um weitere Anhaltspunkte zu erhalten, wurden Chimäre aufgrund der weitgehenden Homologie der Autotransporter EstA und EstP konstruiert. Durch eventuelle Unterschiede der Hybride bezüglich der Sekretion und der extrazellulären Aktivität im Vergleich zu den Wildtypproteinen könnten Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen beider Domänen gezogen werden. Bisher wurden Hybridproteine von Autotransportern nur in Zusammenhang mit anderen Fragestellungen erstellt. Einerseits bieten sich Fusionen heterologer Passagiere mit dem Membrananker von Autotransportproteinen für Studien des Typ-V-Sekretionsmechanismus an (Dautin and Bernstein, 2007). Andererseits dienen Autotransporterproteine als sogenanntes Displaysystem zur eleganten Präsentation rekombinanter Proteine auf der Oberfläche lebender Gram-negativer Bakterien (Jose and Meyer, 2007). In dieser Arbeit wurden erstmals Chimäre durch den Austausch zweier homologer Passagierdomänen konstruiert. Bei der Charakterisierung der Hybride nach der Expression in *P. aeruginosa* und in *P. putida* wurden erstmals Unterschiede bezüglich der esterolytischen Aktivität auf der Zelloberfläche der Bakterien beobachtet. Es konnte die höchste Esteraseaktivität bei den Stämmen, die das Chimär EstA_NP_C exprimierten, im Vergleich zu den Stämmen, die das Chimär EstP_NA_C bzw. die Wildtypproteine auf der Zelloberfläche exponierten, ermittelt werden. Allerdings konnte an dieser Stelle die gemessene Aktivität noch nicht mit der Effizienz der Oberflächenpräsentation verglichen werden.

Um die Präsentation der Passagierdomänen auf der Zelloberfläche visualisieren zu können, erfolgte eine Expression in *E. coli*, da diese nach immunologischer Oberflächenmarkierung der Proteine mittels Durchflusszentrifugierung detektiert werden konnten. Die extrazelluläre Aktivität war in diesem heterologen Wirt sowohl von EstP als auch von EstP_NA_C im Gegensatz zu EstA und EstA_NP_C deutlich vermindert. Dennoch zeigten die Passagierdomänen dieser Autotransportervarianten die intensivsten Signale auf der Zelloberfläche (Abbildung

3.39). Die immunologischen Markierungen mit dem entsprechenden polyklonalen Antikörperserum gegen EstA bzw. EstP_N lieferten nur eine grobe quantitative Abschätzung der exponierten Proteine auf der Oberfläche von *E. coli*. Für eine exaktere Analyse der oberflächenexponierten Esteraseaktivität ist eine genauere Quantifizierung der Proteinmenge erforderlich.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Kolmar am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU-Darmstadt wurde ein Oberflächendisplaysystem basierend auf der Membranverankerung des Autotransporterproteins EstA für *E. coli* konstruiert (Becker *et al.*, 2005). Um einen effizienten Transport über die Cytoplasmamembran zu garantieren, wurde die homologe Signalsequenz der alkalischen Phosphatase (PhoA) verwendet. Die Sequenz des E-Epitops wurde zur einheitlichen, immunologischen Detektion mit den Proteinen fusioniert. Dieses System wurde für weitere Analysemöglichkeiten der Chimäre modifiziert, um die Oberflächenpräsentation sowie die zellgebundene Esteraseaktivität miteinander vergleichen zu können. Des Weiteren garantiert die identische Signalsequenz einen effizienten Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran, sodass nur der Typ-V-Sekretionsmechanismus der Chimäre mit den Wildtypproteinen über die äußere Membran verglichen werden konnte.

Nach Expression der modifizierten Displayssysteme in *E. coli* bestätigten sich die bisherigen Ergebnisse, da auf der Oberfläche des Stammes, der das Chimär EstA_NP_C exprimiert, eine signifikant höhere esterolytische Aktivität zu verzeichnen war als bei den restlichen Proteinvarianten. Bedeutsam war eine deutlich geringere Oberflächenaktivität des Chimärs EstP_NA_C und eine weitere Verminderung der Aktivität des Wildtypproteins EstA. Aufgrund einer identischen Signalsequenz und einem vergleichbaren immunologischen Nachweis durch monoklonale Antikörper konnte festgestellt werden, dass die Esteraseaktivität auf der Oberfläche von *E. coli* in Verbindung mit der Proteinmenge in der äußeren Membran steht. Daraus lässt sich folgern, dass die Transportdomäne von EstP die beiden Passagierdomänen erstaunlich effizienter über die äußere Membran transloziert als die entsprechende Domäne von EstA. Bei weiteren Analysen stellte sich heraus, dass die Expression des Wildtyps von EstA in *E. coli* JM109 nicht konstant verlief. Das hatte zur Folge, dass in einer scheinbar homogenen Zellsuspension sowohl Zellen, die kein EstA auf der Zelloberfläche präsentierten, als auch EstA-präsentierende Zellen gemischt waren. Das führte zu einer Verfälschung der Messergebnisse bei der Quantifizierung der Proteinmenge. Eine EstA-Expression wird von den Bakterien nicht uneingeschränkt toleriert. Dies zeigte sich auch durch eine schleimähnliche Konsistenz der Zellen während der Präparationen. Weitere Experimente zur

genauerer Ergründung der ausbleibenden Expression von EstA wurden nicht durchgeführt. Dennoch konnte eine Schätzung der Oberflächenpräsentation der Chimäre und der Wildtypproteine durchgeführt werden. Erstaunlicherweise ist die Molekülmenge des Chimärs EstA_NP_C gefolgt von EstP am höchsten, während bei dem Hybrid EstP_NA_C eine signifikant verminderte Transporteffizienz beobachtet wurde.

Die Konstruktion eines Chimärs einer ebenfalls homologen Esterase (ApeE) mit dem AIDA-I-Displaysystem hatte auch bedeutende Unterschiede in Relation zum Wildtypprotein zur Folge. Analog resultierte eine höhere Substratkonversion des Chimärs im Vergleich zum Wildtypprotein aus einem deutlich stärkeren Expressionslevel (Schultheiss *et al.*, 2008).

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass die Effizienz der Expression und der darauffolgende Transport über die äußere Membran dieser Autotransporterproteine abhängig von der Kombination der Domänen ist. Wahrscheinlich treten beide Proteindomänen während der gesamten Sekretion in gegenseitige Wechselwirkung. Zudem konnte die extrazelluläre Aktivität von EstP nach einer Expression in *E. coli* durch eine Fusion mit der homologen Signalsequenz der alkalischen Phosphatase PhoA gesteigert werden.

Die Transportdomäne von EstP kann ebenfalls als Display-System für die Präsentation heterologer Proteine auf der Zelloberfläche eingesetzt werden. Darüber hinaus gab es deutliche Anzeichen, dass eine Expression von EstP im Vergleich zu EstA für die Zellen stressfreier ist, obwohl die Proteine sich in der Aminosäuresequenz sehr ähnlich sind. Ein weiterer überzeugender Vorteil für die Verwendung von EstP als Oberflächendisplayssystem bei biotechnologischen *Screening*-Verfahren und bei der Entwicklung von Ganzzell-Biotransformatoren für die chemische Industrie ist die Tatsache, dass dieses Autotransporterprotein aus dem biologisch sicheren Bakterium *P. putida* KT2440 stammt. Hingegen kommt EstA aus dem opportunistisch humanpathogenen Bakterium *P. aeruginosa*, der in Bereichen biotechnologischer Verfahren keine Konkurrenz gegenüber *P. putida* KT2440 darstellt. Dieser wird bereits neben anderen Stämmen wie *P. putida* 3SK in der Biotechnologie sowie in der Produktion eingesetzt (Shimazu *et al.*, 2003).

Bisher lieferten die Ergebnisse nur beträchtliche Unterschiede bezüglich des Expressionslevels und der Sekretionseffizienz, was durchaus eine Interaktion beider Domänen vermuten lässt. Sie findet allerdings nicht auf der Zelloberfläche statt. Diese Experimente liefern keine adäquaten Ergebnisse über unterschiedliche spezifische Aktivitäten zwischen den Wildtypproteinen und der Chimäre. Aus diesem Grund wurde *in vitro* die Produktion und Reinigung von EstA, EstP und den Hybriden realisiert, um die spezifischen Aktivitäten

gegenüber den Substraten, die sich durch unterschiedliche Kettenlängen der kovalent gebundenen Fettsäuren unterscheiden, direkt vergleichen zu können. Im Allgemeinen wurde beobachtet, dass die Enzymaktivitäten der Proteine gegenüber den verwendeten Substraten voneinander abwichen. Dabei zeigte sich eine ähnliche Tendenz der *in vivo*-Untersuchungen, obwohl die Messungen mit gereinigten Proteinen unabhängig von der Expression und Sekretion erfolgten. Das Chimär EstA_NP_C und das Wildtypprotein zeigten deutlich höhere spezifische Aktivitäten in Relation zu EstA und EstP_NA_C. Die Vermutung, dass die Transportdomäne durch strukturelle Veränderungen der Passagierdomäne einen beachtlichen Effekt auf die Enzymaktivität erzeugt, wird deutlich gestützt.

Letztlich waren eindeutige Anzeichen für molekulare Interaktionen zwischen der katalytischen Domäne und der Transportdomäne zu beobachten. Veränderungen der spezifischen Enzymaktivitäten entstanden möglicherweise durch strukturelle Modulationen der katalytischen Triade und/oder der Kapazität der Substratbindetasche. Darüber hinaus wird eventuell auch die Zugänglichkeit des Substrats zum katalytischen Zentrum verändert.

Weitere Kenntnisse des Zusammenspiels von Passagier- und Transportdomäne würden Mutagenisierungen im Bereich der extrazellulären Schleifen der Membranpore liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* ist ein Autotransporterprotein, dessen Transportdomäne eine β -Pore in der äußeren Membran bildet, um die Passagierdomäne an die Zelloberfläche zu transportieren. Anhand eines Strukturmodells wurde postuliert, dass nach dem Transport die Passagierdomäne durch eine α -Helix im Lumen der Pore mit der Transportdomäne verbunden bleibt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese α -Helix essenziell für EstA ist. Die Konstruktion der Deletionsmutante EstA Δ H war nur unter Bedingungen möglich, bei denen keine Expression erfolgte. Eine Produktion des Proteins konnte nur stattfinden, wenn die Zellen EstA Δ H in denaturierten Aggregaten in Form von *inclusion bodies* exprimierten.

Ein weiteres gemeinsames, charakteristisches, strukturelles Merkmal von Autotransporterproteinen sind meist zwei nahe beieinander liegende Cysteine in der Passagierdomäne. Trotz der extremen Diversität der Aminosäuresequenzen dieser Domänen, welche die verschiedensten Funktionalitäten widerspiegeln, sind diese Cysteinreste in fast allen Autotransporterproteinen vorhanden, sodass ihnen eine besondere Bedeutung zugesprochen wird. Bei EstA befinden sich diese Aminosäuren an Position 258 und 264. Jedoch konnte bei EstA den Cysteinresten keine offensichtliche Funktion zugeordnet werden, weder bei der Sekretion noch bei der Enzymaktivität. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Substitutionen C258S und C264S einen Einfluss auf die *in vitro*-Faltung von EstA haben.

Fast alle der bisher beschriebenen Autotransporterproteine stammen aus pathogenen Organismen und werden mit der jeweiligen Virulenz assoziiert. Die Autotransporterproteine sind jedoch nicht nur in virulenten Mikroorganismen zu finden. Anhand von Sequenzhomologien konnte in *P. putida* KT2440 nun eines der ersten Autotransporterproteine aus einem nicht-pathogenen Bakterium identifiziert werden. Das Protein, das der offene Leserahmen PP0418 kodiert, ist der Esterase EstA aus *P. aeruginosa* sehr ähnlich und wurde als EstP bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde EstP charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Passagierdomäne, im Gegensatz zu den meisten anderen bekannten Autotransporterproteinen, auf der Zelloberfläche verbleibt. Folglich ist es möglich, basierend auf dem Transportmechanismus, EstP auch als Autodisplaysystem einzusetzen, um heterologe Proteine auf der Oberfläche zu präsentieren. Bei der Charakterisierung der Esterase EstP konnte neben einer esterolytischen Aktivität auch eine Phospholipase B-Aktivität beschrieben werden.

Um die physiologische Bedeutung des ersten Autotransportproteins in einem avirulenten Stamm analysieren zu können, wurde der *estP*-defiziente Stamm *P. putida* KT0418 konstruiert. Es wurde eine Auswahl an Phänotypen der *estP*-Negativmutante untersucht, wobei es nicht gelang, unter den gewählten Bedingungen, Hinweise auf die physiologische Funktion von EstP in *P. putida* KT2440 zu finden.

Esterasen gewinnen in der organischen Chemie und Biotechnologie zunehmend an Bedeutung durch ihr breites Substratspektrum, Stabilität in organischen Lösungsmitteln und insbesondere durch ihre Kofaktorunabhängigkeit. Obwohl die Gewinnung von enantiomeren-reinen Verbindungen für die Pharmaindustrie von großem Interesse ist, existieren nur wenige Beispiele für erfolgreich durchgeführte Modifikationen von Esterasen zur Steigerung der Enantioselektivität. EstP zeigte keine Präferenz gegenüber den Enantiomeren der 2-Methyldekansäure. Durch gerichtete Evolution konnte in dieser Arbeit eine enantioselektive Variante der Esterase EstP erzeugt werden. Die Variante EstP W173R führte zu einer Verschiebung der Enantioselektivität mit einer Präferenz gegenüber dem *R*-Enantiomer der 2-Methyldekansäure mit einem E_{true} -Wert von 20.

Da die Interpretationen der Auswirkungen von Aminosäureveränderungen aufgrund der fehlenden Kristallstruktur von EstP höchst spekulativ sind, wurde die Effizienz der Expression und Reinigung von EstP_N sowie deren enantioselektiver Variante EstP_N W173R optimiert. Somit konnte gereinigtes Protein in homogener Form für Kristallisationsexperimente zur Strukturaufklärung zur Verfügung gestellt werden.

Interessanterweise ergab sich aus den Analysen zur Enantioselektivität von EstP ein Unterschied bei den optimalen Hydrolysebedingungen zwischen Volllängenprotein und der katalytisch aktiven Domäne. Dies ist einer der ersten experimentellen Hinweise darauf, dass die Interaktionen zwischen beiden Autotransporterdomänen zu Veränderungen der Enzymaktivität führen können.

Bislang gibt es keine Strukturdaten, womit mögliche molekulare Interaktionen zwischen Passagier- und Transportdomäne erklärt werden können. Um weitere experimentelle Hinweise für potenzielle Struktur-Funktions-Beziehungen zu bekommen, wurden in dieser Arbeit Chimäre zwischen den beiden Autotransporterproteinen EstA und EstP konstruiert und analysiert.

Sowohl in *P. putida* als auch in *P. aeruginosa* wurden nach der Expression Unterschiede zwischen den Chimären EstA_NEstP_C und EstP_NEstA_C im Vergleich zu den Wildtypproteinen EstA und EstP bezüglich der Sekretion und Aktivität beobachtet. Die vier Enzyme zeigten auch nach einer *in vitro*-Faltung unterschiedliche Aktivitäten gegenüber *p*-Nitrophenol-Estern

mit verschiedenen Kettenlängen. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die potenziellen molekularen Interaktionen zwischen der Passagier- und der Transportdomäne von Autotransporterproteinen zur Modulation der Funktionalität führen.

SUMMARY

The esterase EstA from *Pseudomonas aeruginosa* is an autotransporter protein. Its translocator domain forms a β -barrel in the outer membrane to transport its passenger domain to the cell surface. Based on a structural model it was postulated that after transport the passenger domain remains connected by an α -helix in the lumen of the pore. Indeed, in this study it could be shown that an amino acid sequence encoding a potential α -helix is essential for EstA production and activity. The construction of the deletion mutant estA Δ H was only possible under conditions without any expression. The production of the protein EstA Δ H was successful only when the cells deposited the protein in inclusion bodies.

Another common characteristic structural feature of autotransporter proteins are two cysteines located in close vicinity with the passenger domain. Despite the extreme diversity of these domains, which reflect a variety of functions, these cysteine residues are present in almost all autotransporter proteins, so that they might have special relevance. These cysteines are located at positions 258 and 264 in EstA and could neither be related to the secretion process nor to the EstA activation *in vivo*. Nevertheless, it was shown that the mutants which carried cysteine substitutions influenced EstA *in vitro* refolding.

Almost all autotransporter proteins described so far originated from pathogenic organisms and they are associated with virulence. But the autotransporter proteins are not limited to virulent microorganisms. On the basis of sequence homologies we could identify for the first time an autotransporter protein from the non pathogenic bacterium *P. putida* KT2440. The protein, which is encoded by the open reading frame PP0418, is very similar to the esterase EstA from *P. aeruginosa* and was named EstP. In this study EstP has been characterized and it could be shown that the passenger domain remains attached on the cell surface in contrast to most of the other known autotransporter proteins. Therefore, based on the transport mechanism, it is possible to adopt EstP as display system to present heterologous proteins on the cell surface. During the characterization it was found that EstP exhibits, beside its esterase activity, also phospholipase B activity.

The *estP*-deficient strain *P. putida* KT0418 was generated to analyse the physiology. A range of phenotypes of the *estP*-negative mutant are analyzed, but under the chosen conditions it was not possible to find any phenotypic alterations.

Esterases are of increasing importance for organic chemistry and biotechnology applications due their broad substrate specificity, stability in organic solvents and independence of essential cofactors. There are only few examples of successful modifications of esterases to increase the enantioselectivity, although the production of pure enantiomeric compounds is of great interest for the pharmaceutical industry.

EstP showed no preference towards one of the enantiomers of the substrate 2-methyldecanoic acid. In this study, an enantioselective variant of the esterase EstP was created successfully. The variant EstP W173R generated by directed evolution showed a shift to preferential hydrolysis the *R*-enantiomer of the 2-methyldecanoic acid with an E_{true} -value of 20.

Since the interpretations of amino acid exchange effects are highly speculative due to the lack of a crystal structure of EstP, the efficiency of expression and purification of EstP_N and the enantioselective variant EstP_N W173R were optimized. Thus, purified protein was provided for crystallization experiments and structure determinations.

Interestingly, the analysis of the enantioselectivity of EstP resulted in a difference between the whole protein and the catalytic active domain with respect to the optimal conditions for their hydrolysis. This is the first experimental evidence that interactions between the two autotransporter domains could change the enzyme activity. So far, there are no structural data, that could explain the possible molecular interactions between the passenger and transport domain. In this study, chimeras between the autotransporter proteins EstA and EstP were constructed and analyzed to get further experimental evidence for potential structure-function-relationship. After expression in both *P. putida* and *P. aeruginosa*, differences were observed between the chimeras EstA_NP_C and EstP_NA_C concerning the secretion and activity.

The four enzymeconstructs vary in the specific activities towards *p*-nitrophenol esters with different chain lengths, according to a production in form of inclusion bodies and *in vitro* folding. These results clearly show that the potential molecular interactions between the passenger and transport domain of the autotransporter proteins result in a modulation of their functionality.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abramic, M., Lescic, I., Korica, T., Vitale, L., Saenger, C., and Pigac, J. (1999) Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzym Microbiol Technol* **25**: 522-529.
- Akoh, C.C., Lee, G.C., Liaw, Y.C., Huang, T.H., and Shaw, J.F. (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* **43**: 534-552.
- Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., and T.P., C. (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Arpigny, J.L., and Jaeger, K.E. (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343 Pt 1**: 177-183.
- Artursson, V., Finlay, R.D., and Jansson, J.K. (2006) Interactions between *arbuscular mycorrhizal* fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol* **8**: 1-10.
- Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F.C., Bagdasarian, M.M., Frey, J., and Timmis, K.N. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
- Banerji, S., Aurass, P., and Flieger, A. (2008) The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int J Med Microbiol* **298**: 169-181.
- Barnard, T.J., Dautin, N., Lukacik, P., Bernstein, H.D., and Buchanan, S.K. (2007) Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1214-1220.
- Barton, M.J., Hamman, J.P., Fichter, K.C., and Calton, G.J. (1990) Enzymatic Resolution of (R,S)-2-(4-Hydroxy)Propionic-Acid. *Enzyme Microb Technol* **12**: 577-583
- Barua, S., Yamashino, T., Hasegawa, T., Yokoyama, K., Torii, K., and Ohta, M. (2002) Involvement of surface polysaccharides in the organic acid resistance of *Shigella* Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **43**: 629-640.
- Becker, S., Schmoldt, H.U., Adams, T.M., Wilhelm, S., and Kolmar, H. (2004) Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 323-329.
- Becker, S., Theile, S., Heppeler, N., Michalczyk, A., Wentzel, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., and Kolmar, H. (2005) A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett* **579**: 1177-1182.
- Becker, S. (2007) Neue Zugänge zu enantioselektiven lipolytischen Enzymen durch fluoreszenzbasierte Durchmusterung kombinatorischer Bibliotheken. *Dissertation*: Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Becker, S., Michalczyk, A., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., and Kolmar, H. (2007) Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. *Chembiochem* **8**: 943-949.
- Becker, S., Hobenreich, H., Vogel, A., Knorr, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.E., Reetz, M.T., and Kolmar, H. (2008) Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 5085-5088.

- Benkovic, S.J., and Hammes-Schiffer, S. (2003) A perspective on enzyme catalysis. *Science* **301**: 1196-1202.
- Berthiaume, F., Rutherford, N., and Mourez, M. (2007) Mutations affecting the biogenesis of the AIDA-I autotransporter. *Res Microbiol* **158**: 348-354.
- Bessette, E.E., Fasco, M.J., Pentecost, B.T., and Kaminsky, L.S. (2005) Mechanisms of arsenite-mediated decreases in benzo[k]fluoranthene-induced human cytochrome P4501A1 levels in HepG2 cells. *Drug Metab Dispos* **33**: 312-320.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917.
- Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J., and Meyer, H.H. (1999) Directed evolution of an esterase: screening of enzyme libraries based on pH-indicators and a growth assay. *Bioorg Med Chem* **7**: 2169-2173.
- Bornscheuer, U.T. (2002a) Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 543-547.
- Bornscheuer, U.T. (2002b) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 73-81.
- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., and Krishna, S.H. (2002) Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol* **20**: 433-437.
- Bosch, v.d.H. (1982) Phospholipases. In *Phospholipids*. edited by Hawthorne J. N. and Ansell G.N., Elsevier Biomedical **4**: 313-351.
- Brandon, L.D., and Goldberg, M.B. (2001) Periplasmic transit and disulfide bond formation of the autotransported *Shigella* protein IcsA. *J Bacteriol* **183**: 951-958.
- Brockhoff, H. (1969) Action of pancreatic lipase on emulsions of water-soluble esters. *Arch Biochem Biophys* **134**: 366-371.
- Burrows, L.L., Chow, D., and Lam, J.S. (1997) *Pseudomonas aeruginosa* B-band O-antigen chain length is modulated by Wzz (Ro1). *J Bacteriol* **179**: 1482-1489.
- Carrio, M.M., and Villaverde, A. (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol* **96**: 3-12.
- Cases, I., and de Lorenzo, V. (1998) Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **1**: 303-310.
- Cassaing, S., Fauvel, J., Bessieres, M.H., Guy, S., Seguela, J.P., and Chap, H. (2000) *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A(2). *Int J Parasitol* **30**: 1137-1142.
- Ceroni, A., Passerini, A., Vullo, A., and Frascioni, P. (2006) DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res* **34**: 177-181.
- Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., and Sih, C.J. (1982) Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *J Am Chem Soc* **104**: 7294-7299.
- Chirumamilla, R.R., Muralidhar, R., Marchant, R., and Nigam, P. (2001) Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol Cell Biochem* **224**: 159-168.
- Collet, J.F., and Bardwell, J.C. (2005) The Catalysis of Disulfide Bond Formation in Prokaryotes. In *Protein Folding Handbook*. edited by Buchner J. und Kiefhaber T. Wiley-VCH, Weinheim: 358-357.
- Daugherty, P.S., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (2000) Flow cytometric screening of cell-based libraries. *J Immunol Methods* **243**: 211-227.
- Dautin, N., and Bernstein, H.D. (2007) Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**: 89-112.

- Davey, H.M., and Kell, D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev* **60**: 641-696.
- De Angelis, M., and Gobetti, M. (2004) Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* **4**: 106-122.
- de Weger, L.A., van Loosdrecht, M.C., Klaassen, H.E., and Lugtenberg, B. (1989) Mutational changes in physiochemical cell surface properties of plant-growth-stimulating *Pseudomonas* spp. do not influence the attachment properties of the cells. *J Bacteriol* **171**: 2756-2761.
- Dejonghe, W., Boon, N., Seghers, D., Top, E.M., and Verstraete, W. (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. *Environ Microbiol* **3**: 649-657.
- Desvaux, M., Parham, N.J., and Henderson, I.R. (2004) Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* **6**: 111-124.
- Dos Santos, V.A., Heim, S., Moore, E.R., Stratz, M., and Timmis, K.N. (2004) Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **6**: 1264-1286.
- Dunn, S.D. (1986) Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western blots by monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **157**: 144-153.
- Duong, F., Lazdunski, A., Cami, B., and Murgier, M. (1992) Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationships to other secretory pathways. *Gene* **121**: 47-54.
- Eggert, T. (1998) Klonierung, Expression und Charakterisierung des Gens einer Disulfid-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Diplomarbeit*: Ruhr-Universität Bochum.
- Emsley, P., Charles, I.G., Fairweather, N.F., and Isaacs, N.W. (1996) Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature* **381**: 90-92.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., and Ramos, J.L. (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J Bacteriol* **182**: 2363-2369.
- Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., and Ramos, J.L. (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiol* **148**: 341-343.
- Espinosa-Urgel, M., and Ramos, J.L. (2004) Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5190-5198.
- Essar, D.W., Eberly, L., and Crawford, I.P. (1990) Evolutionary differences in chromosomal locations of four early genes of the tryptophan pathway in fluorescent *pseudomonads*: DNA sequences and characterization of *Pseudomonas putida* *trpE* and *trpGDC*. *J Bacteriol* **172**: 867-883.
- Fagerstrom, A., Nilsson, M., Berg, U., and Isaksson, R. (2007) pH dependency of ligand binding to cellobiohydrolase 1 (Cel7A). Affinity, selectivity and inhibition for designed propranolol analogues. *J Chromatogr A* **1138**: 276-283.
- Fahnert, B., Lilie, H., and Neubauer, P. (2004) Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **89**: 93-142.
- Farn, J.L., Strugnell, R.A., Hoyne, P.A., Michalski, W.P., and Tennent, J.M. (2001) Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *J Bacteriol* **183**: 6717-6720.
- Federal-Register (1982) Certified host-vector systems., pp. 17197.
- Fersht, A.R. (1998) Structure and Mechanism in Protein Sciences: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding: Freeman, New York.

- Filloux, A., Michel, G., and Bally, M. (1998) GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 177-198.
- Flieger, A., Neumeister, B., and Cianciotto, N.P. (2002) Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infect Immun* **70**: 6094-6106.
- Freudl, R., MacIntyre, S., Degen, M., and Henning, U. (1986) Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **188**: 491-494.
- Galan, B., Diaz, E., and Garcia, J.L. (2000) Enhancing desulphurization by engineering a flavin reductase-encoding gene cassette in recombinant biocatalysts. *Environ Microbiol* **2**: 687-694.
- Gangwer, K.A., Mushrush, D.J., Stauff, D.L., Spiller, B., McClain, M.S., Cover, T.L., and Lacy, D.B. (2007) Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16293-16298.
- Garcia-Viloca, M., Gao, J., Karplus, M., and Truhlar, D.G. (2004) How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science* **303**: 186-195.
- Gdynia, A. (2006) Untersuchungen zur physiologischen Funktion der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Dissertation* Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Genevrois, S., Steeghs, L., Roholl, P., Letesson, J.J., and van der Ley, P. (2003) The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *Embo J* **22**: 1780-1789.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R., and Lithgow, T. (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J Cell Biol* **164**: 19-24.
- Gentle, I.E., Burri, L., and Lithgow, T. (2005) Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol* **58**: 1216-1225.
- Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **13**: 122-143.
- Gilbert, E.S., Walker, A.W., and Keasling, J.D. (2003) A constructed microbial consortium for biodegradation of the organophosphorus insecticide parathion. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 77-81.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2005) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* **7**: 894-906.
- Grandjean, D., Pale, P., and Chucho, J. (1991) Synthesis of Optically Pure cis Epoxyalcohols via an Enzymatic Route; An Alternative to the SharplessAsymmetric Epoxidation. *Tetrahedron Lett* **32**: 3043-3046.
- Graumann, K., and Premstaller, A. (2006) Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* **1**: 164-186.
- Gross, D.C., and Cody, Y.S. (1985) Mechanism of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. *Can J Microbiol* **31**: 403-410.
- Gupta, S.K., and Ghosh, T.C. (2001) Gene expressivity is the main factor in dictating the codon usage variation among the genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **273**: 63-70.
- Hallsworth, J.E., Heim, S., and Timmis, K.N. (2003) Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **5**: 1270-1280.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hauser, A.R., Kang, P.J., and Engel, J.N. (1998) PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol Microbiol* **27**: 807-818.

- Hauser, A.R., Cobb, E., Bodi, M., Mariscal, D., Valles, J., Engel, J.N., and Rello, J. (2002) Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* **30**: 521-528.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., and Nataro, J.P. (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**: 370-378.
- Henderson, I.R., and Nataro, J.P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**: 1231-1243.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C., and Ala'Aldeen, D. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Camara, M., Williams, P., and Haas, D. (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **186**: 2936-2945.
- Hirshfield, I.N., Terzulli, S., and O'Byrne, C. (2003) Weak organic acids: a panoply of effects on bacteria. *Sci Prog* **86**: 245-269.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Hobson, A.H., Buckley, C.M., Jorgensen, S.T., Diderichsen, B., and McConnell, D.J. (1995) Interaction of the *Pseudomonas cepacia* DSM3959 lipase with its chaperone, LimA. *J Biochem* **118**: 575-581.
- Holloway, B., W., Krishnapillai, V., and Morgan, A.F. (1979) Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* **43**: 73-102.
- Huang, Y.T., Liaw, Y.C., Gorbatyuk, V.Y., and Huang, T.H. (2001) Backbone dynamics of *Escherichia coli* thioesterase/protease I: evidence of a flexible active-site environment for a serine protease. *J Mol Biol* **307**: 1075-1090.
- Ieva, R., Skillman, K.M., and Bernstein, H.D. (2008) Incorporation of a polypeptide segment into the beta-domain pore during the assembly of a bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* **67**: 188-201.
- Ivancic, M., Valinger, G., Gruber, K., and Schwab, H. (2007) Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. *J Biotechnol* **129**: 109-122.
- Jacob-Dubuisson, F., Locht, C., and Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol* **40**: 306-313.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., and Coutte, L. (2004) Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 235-257.
- Jaeger, K.E., Kharazmi, A., and Hoiby, N. (1991) Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function in vitro. *Microb Pathog* **10**: 173-182.
- Jaeger, K.E., Adrian, F.J., Meyer, H.E., Hancock, R.E., and Winkler, U.K. (1992) Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochim Biophys Acta* **1120**: 315-321.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., and Misset, O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 29-63.
- Jaeger, K.E., and Reetz, M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**: 396-403.

- Jaeger, K.E., and Reetz, M.T. (2000) Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 68-73.
- James, J.J., Lakshmi, B.S., Raviprasad, V., Ananth, M.J., Kanguane, P., and Gautam, P. (2003) Insights from molecular dynamics simulations into pH-dependent enantioselective hydrolysis of ibuprofen esters by *Candida rugosa* lipase. *Protein Eng* **16**: 1017-1024.
- Janes, L.E., and Kazlauskas, R.J. (1997) Quick E. A fast spectrophotometric method to measure the enantioselectivity of hydrolases. *J Org Chem* **62**: 4560-4561.
- Jong, W.S., ten Hagen-Jongman, C.M., den Blaauwen, T., Slotboom, D.J., Tame, J.R., Wickstrom, D., de Gier, J.W., Otto, B.R., and Luirink, J. (2007) Limited tolerance towards folded elements during secretion of the autotransporter Hbp. *Mol Microbiol* **63**: 1524-1536.
- Jose, J., Jahnig, F., and Meyer, T.F. (1995) Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* **18**: 378-380.
- Jose, J., Kramer, J., Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1996) Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga(beta) autotransporter pathway. *Gene* **178**: 107-110.
- Jose, J., and von Schwichow, S. (2004) Autodisplay of active sorbitol dehydrogenase (SDH) yields a whole cell biocatalyst for the synthesis of rare sugars. *Chembiochem* **5**: 491-499.
- Jose, J., Betscheider, D., and Zangen, D. (2005) Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. *Analytical Biochemistry* **346**: 258-267.
- Jose, J., and Zangen, D. (2005) Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **333**: 1218-1226.
- Jose, J., and Meyer, T.F. (2007) The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 600-619.
- Junker, M., Besingi, R.N., and Clark, P.L. (2009) Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Mol Microbiol* **71**: 1323-1332.
- Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J.C., and Beckwith, J. (2004) Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science* **303**: 534-537.
- Kelley, L.A., and Sternberg, M.J. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**: 363-371.
- Khalid, S., and Sansom, M.S. (2006) Molecular dynamics simulations of a bacterial autotransporter: NalP from *Neisseria meningitidis*. *Mol Membr Biol* **23**: 499-508.
- Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1990) Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *Embo J* **9**: 1991-1999.
- Klauser, T., Kramer, J., Otzelberger, K., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1993) Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J Mol Biol* **234**: 579-593.
- Kleinschmidt, J.H. (2003) Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1547-1558.
- Koga, Y., Kato, K., Nakano, H., and Yamane, T. (2003) Inverting enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* KWI-56 lipase by combinatorial mutation and high-throughput screening using single-molecule PCR and in vitro expression. *J Mol Biol* **331**: 585-592.

- Kojima, Y., Fujisawa, H., Nakazawa, A., Nakazawa, T., Kanetsuna, F., Taniuchi, H., Nozaki, M., and Hayaishi, O. (1967) Studies on pyrocatechase. I. Purification and spectral properties. *J Biol Chem* **242**: 3270-3278.
- Kok, R.G., Christoffels, V.M., Vosman, B., and Hellingwerf, K.J. (1993) Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**: 2329-2342.
- Konieczny, M.P.J., Benz, I., Hollinderbaumer, B., Beinke, C., Niederweis, M., and Schmidt, M.A. (2001) Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal beta1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane beta2-domain. *Antonie Van Leeuwenhoek* **80**: 19-34.
- Konig, B., Jaeger, K.E., Sage, A.E., Vasil, M.L., and Konig, W. (1996) Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immun* **64**: 3252-3258.
- Koster, M., Bitter, W., and Tommassen, J. (2000) Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol* **290**: 325-231.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. (1994) pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**: 800-802.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lambert, L.A., Abshire, K., Blankenhorn, D., and Slonczewski, J.L. (1997) Proteins induced in *Escherichia coli* by benzoic acid. *J Bacteriol* **179**: 7595-7599.
- Lattemann, C.T., Maurer, J., Gerland, E., and Meyer, T.F. (2000) Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol* **182**: 3726-3733.
- Lee, C.A. (1997) Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol* **5**: 148-156.
- Lee, S.Y., Choi, J.H., and Xu, Z. (2003) Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol* **21**: 45-52.
- Leipelt, M. (1997) Bildung von Disulfidbrücken in *Pseudomonas aeruginosa*: Klonierung und Sequenzanalyse eines *dsbA*-homologen Gens. *Diplomarbeit*: Ruhr-Universität Bochum.
- Letley, D.P., Rhead, J.L., Bishop, K., and Atherton, J.C. (2006) Paired cysteine residues are required for high levels of the *Helicobacter pylori* autotransporter VacA. *Microbiol* **152**: 1319-1325.
- Létoffé, S., Redeker, V., and Wandersman, C. (1998) Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol Microbiol* **28**: 1223-1234.
- Liao, C.H. (1989) Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent. *Plant disease* **73**: 223-226.
- Liebeton, K., Zacharias, A., and Jaeger, K.E. (2001) Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J Bacteriol* **183**: 597-603.
- Lipski, S.L., Akimana, C., Timpe, J.M., Wooten, R.M., and Lafontaine, E.R. (2007) The *Moraxella catarrhalis* autotransporter McaP is a conserved surface protein that mediates adherence to human epithelial cells through its N-terminal passenger domain. *Infect Immun* **75**: 314-324.
- Liu, Y.Y., Xu, J.H., Xu, Q.G., and Hu, Y. (1999) Significant enhancement of lipase enantioselectivity toward (S)-Ketoprofen ester at pH 2. *Biotechnol Lett* **21**: 143-146

- Lo, Y.C., Lin, S.C., Shaw, J.F., and Liaw, Y.C. (2003) Crystal structure of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/lysophospholipase L1: consensus sequence blocks constitute the catalytic center of SGNH-hydrolases through a conserved hydrogen bond network. *J Mol Biol* **330**: 539-551.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M., and Saier, M.H., Jr. (2003) Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* **1611**: 223-233.
- Matilla, M.A., Ramos, J.L., Duque, E., de Dios Alche, J., Espinosa-Urgel, M., and Ramos-Gonzalez, M.I. (2007) Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **9**: 1842-1850.
- Matsuzawa, Y., and Hostetler, K.Y. (1980) Inhibition of lysosomal phospholipase A and phospholipase C by chloroquine and 4,4'-bis(diethylaminoethoxy) alpha, beta-diethyldiphenylethane. *J Biol Chem* **255**: 5190-5194.
- Maurer, J., Jose, J., and Meyer, T.F. (1997) Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 794-804.
- Maurer, J., Jose, J., and Meyer, T.F. (1999) Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* **181**: 7014-7020.
- Meng, G., Surana, N.K., St Geme, J.W., 3rd, and Waksman, G. (2006) Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *Embo J* **25**: 2297-2304.
- Merril, C.R. (1990) Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**: 477-488.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics: Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Missiakas, D., and Raina, S. (1997) Protein folding in the bacterial periplasm. *J Bacteriol* **179**: 2465-2471.
- Mogensen, J.E., and Otzen, D.E. (2005) Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol* **57**: 326-346.
- Mogensen, J.E., Tapadar, D., Schmidt, M.A., and Otzen, D.E. (2005) Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *Biochem* **44**: 4533-4545.
- Molgaard, A., Kauppinen, S., and Larsen, S. (2000) Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* **8**: 373-383.
- Molina, L., Ramos, C., Ronchel, M.C., Molin, S., and Ramos, J.L. (1998) Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2072-2078.
- Molina, M.A., Ramos, J.L., and Espinosa-Urgel, M. (2006) A two-partner secretion system is involved in seed and root colonization and iron uptake by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **8**: 639-647.
- Nakai, K., and Horton, P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**: 34-36.
- Nakamoto, H., and Bardwell, J.C. (2004) Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 111-119.
- Nakazawa, T. (2002) Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* **4**: 782-786.

- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., Brinkac, L., Beanan, M., DeBoy, R.T., Daugherty, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., White, O., Peterson, J., Khouri, H., Hance, I., Chris Lee, P., Holtzapple, E., Scanlan, D., Tran, K., Moazzez, A., Utterback, T., Rizzo, M., Lee, K., Kosack, D., Moestl, D., Wedler, H., Lauber, J., Stjepandic, D., Hoheisel, J., Straetz, M., Heim, S., Kiewitz, C., Eisen, J.A., Timmis, K.N., Dusterhoft, A., Tummeler, B., and Fraser, C.M. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- Nguyen, L., Paulsen, I.T., Tchieu, J., Hueck, C.J., and Saier, M.H., Jr. (2000) Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 125-144.
- Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M., and Goldman, A. (2004) The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *Embo J* **23**: 701-711.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304.
- Ochsner, U.A., Snyder, A., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8312-8317.
- Oliver, D.C., Huang, G., Nodel, E., Pleasance, S., and Fernandez, R.C. (2003) A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* **47**: 1367-1383.
- Olivera, E.R., Carnicero, D., Jodra, R., Minambres, B., Garcia, B., Abraham, G.A., Gallardo, A., Roman, J.S., Garcia, J.L., Naharro, G., and Luengo, J.M. (2001) Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ Microbiol* **3**: 612-618.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., and et al. (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**: 197-211.
- Oomen, C.J., van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004) Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* **23**: 1257-1266.
- Ostroff, R.M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (1990) Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **172**: 5915-5923.
- Otto, B.R., Sijbrandi, R., Luirink, J., Oudega, B., Heddle, J.G., Mizutani, K., Park, S.Y., and Tame, J.R. (2005) Crystal structure of hemoglobin protease, a heme binding autotransporter protein from pathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 17339-17345.
- Paetzel, M., Strynadka, N.C., Tschantz, W.R., Casareno, R., Bullinger, P.R., and Dalbey, R.E. (1997) Use of site-directed chemical modification to study an essential lysine in *Escherichia coli* leader peptidase. *J Biol Chem* **272**: 9994-10003.
- Palleroni, N.J. (1984) *Pseudomonaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* edited by Krieg, N.R. and Hold, J.G. Williams and Wilkins, Baltimore **1**: 141-199
- Palleroni, N.J. (1986) Section 4, family I, *Pseudomonaceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* edited by Sneath, P.H., Mair, N.S., Sharpe, E. M. and Holt J. G. Williams and Wilkins, Baltimore **1**.
- Palleroni, N.J. (1993) *Pseudomonas* classification : a new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*: 231-251.

- Palleroni, N.J., and Moore, E.R.B. (2004) Taxonomy of the Pseudomonads: experimental approaches. In *Pseudomonads* edited by Ramos, J.-L. Academic/Plenum Publishers, New York **1**: 3-44.
- Panda, T., and Gowrishankar, B.S. (2005) Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 160-169.
- Pedrotta, V., and Witholt, B. (1999) Isolation and characterization of the cis-trans-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *J Bacteriol* **181**: 3256-3261.
- Phadtare, S. (2004) Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* **6**: 125-136.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462.
- Potvin, E., Lehoux, D.E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K.L., Sanschagrin, F., Lau, G.W., and Levesque, R.C. (2003) In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environ Microbiol* **5**: 1294-1308.
- Pugsley, A.P. (1992) Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 12058-12062.
- Ramos, J.L., Wasserfallen, A., Rose, K., and Timmis, K.N. (1987) Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. *Science* **235**: 593-596.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marques, S., Ramos-Gonzalez, M.I., Espinosa-Urgel, M., and Segura, A. (2001) Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr Opin Microbiol* **4**: 166-171.
- Reetz, M.T., Carballeira, J.D., Peyralans, J., Hobenreich, H., Maichele, A., and Vogel, A. (2006) Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by CASTing. *Chemistry* **12**: 6031-6038.
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D.U., Strompl, C., Moore, E.R., and Timmis, K.N. (2002) Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 912-915.
- Reineke, W. (1998) Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. *Annu Rev Microbiol* **52**: 287-331.
- Reva, O.N., Weinel, C., Weinel, M., Bohm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J.D., and Tummeler, B. (2006) Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* **188**: 4079-4092.
- Riedel, K., Talker-Huiber, D., Givskov, M., Schwab, H., and Eberl, L. (2003) Identification and characterization of a GDSL esterase gene located proximal to the *swr* quorum-sensing system of *Serratia liquefaciens* MG1. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3901-3910.
- Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C.A., Truelzsch, K., Hoffmann, H., and Heesemann, J. (2003) Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**: 3735-3744.
- Ruiz-Albert, J., Yu, X.J., Beuzon, C.R., Blakey, A.N., Galyov, E.E., and Holden, D.W. (2002) Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol Microbiol* **44**: 645-661.
- Rutherford, N., Charbonneau, M.E., Berthiaume, F., Betton, J.M., and Mourez, M. (2006) The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation. *J Bacteriol* **188**: 4111-4116.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sauer, K., and Camper, A.K. (2001) Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* **183**: 6579-6589.
- Schäfer, M. (1998) Ein neues lipolytisches Enzym von *Pseudomonas aeruginosa*: Überexpression, Reinigung und physiologische Charakterisierung. *Diplomarbeit*: Ruhr-Universität Bochum.
- Schell, S. (2005) Untersuchungen zur physiologischen Funktion und Struktur-Funktionsbeziehung der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Diplomarbeit*.
- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., and Witholt, B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.
- Schmid, R.D., and Verger, R. (1998) Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angew Chem Int Ed Engl* **37**: 1608-1633.
- Schmidt, M., and Bornscheuer, U.T. (2005) High-throughput assays for lipases and esterases. *Biomol Eng* **22**: 51-56.
- Schmiel, D.H., and Miller, V.L. (1999) Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes Infect* **1**: 1103-1112.
- Schultheiss, E., Weiss, S., Winterer, E., Maas, R., Heinzle, E., and Jose, J. (2008) Esterase autodisplay: enzyme engineering and whole-cell activity determination in microplates with pH sensors. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4782-4791.
- Schweizer, H.P., and Chuanchuen, R. (2001) Small broad-host-range *lacZ* operon fusion vector with low background activity. *Biotechniques* **31**: 1258, 1260, 1262.
- Shiell, B.J., Tachedjian, M., Bruce, K., Beddome, G., Farn, J.L., Hoyne, P.A., and Michalski, W.P. (2007) Expression, purification and characterization of recombinant phospholipase B from *Moraxella bovis* with anomalous electrophoretic behavior. *Protein Expr Purif* **55**: 262-272.
- Shimazu, M., Nguyen, A., Mulchandani, A., and Chen, W. (2003) Cell surface display of organophosphorus hydrolase in *Pseudomonas putida* using an ice-nucleation protein anchor. *Biotechnol Prog* **19**: 1612-1614.
- Shinoda, S., Matsuoka, H., Tsuchie, T., Miyoshi, S., Yamamoto, S., Taniguchi, H., and Mizuguchi, Y. (1991) Purification and characterization of a lecithin-dependent haemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J Gen Microbiol* **137**: 2705-2711.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio Technol* **1**: 784-791.
- Sitkiewicz, I., Stockbauer, K.E., and Musser, J.M. (2007) Secreted bacterial phospholipase A(2) enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends Microbiol* **15**: 63-69.
- Skillman, K.M., Barnard, T.J., Peterson, J.H., Ghirlando, R., and Bernstein, H.D. (2005) Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. *Mol Microbiol* **58**: 945-958.
- Songer, J.G. (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* **5**: 156-161.
- St Geme, J.W., 3rd, and Cutter, D. (2000) The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol* **182**: 6005-6013.
- Stonehouse, M.J., Cota-Gomez, A., Parker, S.K., Martin, W.E., Hankin, J.A., Murphy, R.C., Chen, W., Lim, K.B., Hackett, M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* **46**: 661-676.

- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warren, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
- Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.
- Studier, F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**: 207-234.
- Suzuki, T., Lett, M.C., and Sasakawa, C. (1995) Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. *J Biol Chem* **270**: 30874-30880.
- Szabady, R.L., Peterson, J.H., Skillman, K.M., and Bernstein, H.D. (2005) An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 221-226.
- Szczesny, P., and Lupas, A. (2008) Domain annotation of trimeric autotransporter adhesins - daTAA. *Bioinformatics* **24**: 1251-1256.
- Talker-Huiber, D., Jose, J., Glieder, A., Pressnig, M., Stubenrauch, G., and Schwab, H. (2003) Esterase EstE from *Xanthomonas vesicatoria* (Xv_EstE) is an outer membrane protein capable of hydrolyzing long-chain polar esters. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 479-487.
- Tan, J.T., and Bardwell, J.C. (2004) Key players involved in bacterial disulfide-bond formation. *Chembiochem* **5**: 1479-1487.
- Thanassi, D.G., Stathopoulos, C., Karkal, A., and Li, H. (2005) Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review). *Mol Membr Biol* **22**: 63-72.
- Timmis, K.N., and Pieper, D.H. (1999) Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol* **17**: 200-204.
- Timmis, K.N. (2002) *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* **4**: 779-781.
- Timpe, J.M., Holm, M.M., Vanlerberg, S.L., Basrur, V., and Lafontaine, E.R. (2003) Identification of a *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesin and lipolytic activities. *Infect Immun* **71**: 4341-4350.
- Tommassen, J. (2007) Biochemistry. Getting into and through the outer membrane. *Science* **317**: 903-904.
- Tsai, C.M., and Frasch, C.E. (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119**: 115-119.
- Upton, C., and Buckley, J.T. (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem Sci* **20**: 178-179.
- Urban, A. (2000) Die Rolle der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase DsbA und DsbC bei der Proteinsekretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dissertation*: Ruhr-Universität Bochum.
- Van Gelder, P., Dumas, F., Bartoldus, I., Saint, N., Prilipov, A., Winterhalter, M., Wang, Y., Philippsen, A., Rosenbusch, J.P., and Schirmer, T. (2002) Sugar transport through maltoporin of *Escherichia coli*: role of the greasy slide. *J Bacteriol* **184**: 2994-2999.
- Veiga, E., de Lorenzo, V., and Fernandez, L.A. (1999) Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol Microbiol* **33**: 1232-1243.
- Veiga, E., de Lorenzo, V., and Fernandez, L.A. (2004) Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains. *Mol Microbiol* **52**: 1069-1080.

- Velarde, J.J., and Nataro, J.P. (2004) Hydrophobic residues of the autotransporter EspP linker domain are important for outer membrane translocation of its passenger. *J Biol Chem* **279**: 31495-31504.
- Villaverde, A., and Carrio, M.M. (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* **25**: 1385-1395.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M.L., Lazdunski, A., Wu, L.F., and Filloux, A. (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* **20**: 6735-6741.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**: 262-265.
- Voulhoux, R., and Tommassen, J. (2004) Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol* **155**: 129-135.
- Wagner, J.K., Heindl, J.E., Gray, A.N., Jain, S., and Goldberg, M.B. (2009) Contribution of the periplasmic chaperone Skp to efficient presentation of the autotransporter IcsA on the surface of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **191**: 815-821.
- Walsh, U.F., Morrissey, J.P., and O'Gara, F. (2001) *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 289-295.
- Warren, S.M., and Young, G.M. (2005) An amino-terminal secretion signal is required for YpIA export by the Ysa, Ysc, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *J Bacteriol* **187**: 6075-6083.
- Wei, Y., Schottel, J.L., Derewenda, U., Swenson, L., Patkar, S., and Derewenda, Z.S. (1995) A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat Struct Biol* **2**: 218-223.
- Wernerus, H., and Stahl, S. (2004) Biotechnological applications for surface-engineered bacteria. *Biotechnol Appl Biochem* **40**: 209-228.
- Wilhelm, S., Tommassen, J., and Jaeger, K.E. (1999) A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**: 6977-6986.
- Wilhelm, S. (2001) Identifizierung und Charakterisierung des Sekretionsweges der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Dissertation*: Ruhr-Universität Bochum.
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., and Jaeger, K.E. (2007) The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* **189**: 6695-6703.
- Williams, P.A., and Murray, K. (1974) Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J Bacteriol* **120**: 416-423.
- Williams, V., and Fletcher, M. (1996) *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 100-104.
- Wilson, K.J., and Yuan, P.M. (1989) Protein and peptide purification. In *Protein sequencing, a practical approach* edited by Findley, J. B. C. and Geisow, M. J. Oxford, IRL Press.
- Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M., Kingma, J., Heerikhuizen, H.V., and Leij, L.D. (1976) An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **74**: 160-170.
- Wong, K.R., Green, M.J., and Buckley, J.T. (1989) Extracellular secretion of cloned aerolysin and phospholipase by *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol* **171**: 2523-2527.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of

- Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J., and Kahne, D. (2005) Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell* **121**: 235-245.
- Yahr, T.L., Goranson, J., and Frank, D.W. (1996) Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* **22**: 991-1003.
- Yahr, T.L., Mende-Mueller, L.M., Friese, M.B., and Frank, D.W. (1997) Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* **179**: 7165-7168.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13899-13904.
- Yang, T.H., Pan, J.G., Seo, Y.S., and Rhee, J.S. (2004) Use of *Pseudomonas putida* EstA as an anchoring motif for display of a periplasmic enzyme on the surface of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6968-6976.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H., and Saier, M.H. (2002) Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1562**: 6-31.
- Yen, Y.T., Kostakioti, M., Henderson, I.R., and Stathopoulos, C. (2008) Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol* **16**: 370-379.
- Yeo, H.J., Cotter, S.E., Laarmann, S., Juehne, T., St Geme, J.W., 3rd, and Waksman, G. (2004) Structural basis for host recognition by the *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter. *Embo J* **23**: 1245-1256.
- Zha, D., Wilensek, S., Hermes, M., Jaeger, K. E., and Reetz, M.T. (2001) Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chem Commun* **24**: 2664-2665.
- Zhang, R., Hatzos, C., Clancy, S., Collart, F., and Joachimiak, A. (unveröffentlicht) Crystal structure of the lipase/acylhydrolase from *Enterococcus faecalis*.
<http://pd-beta.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1YZF>

7 ANHANG

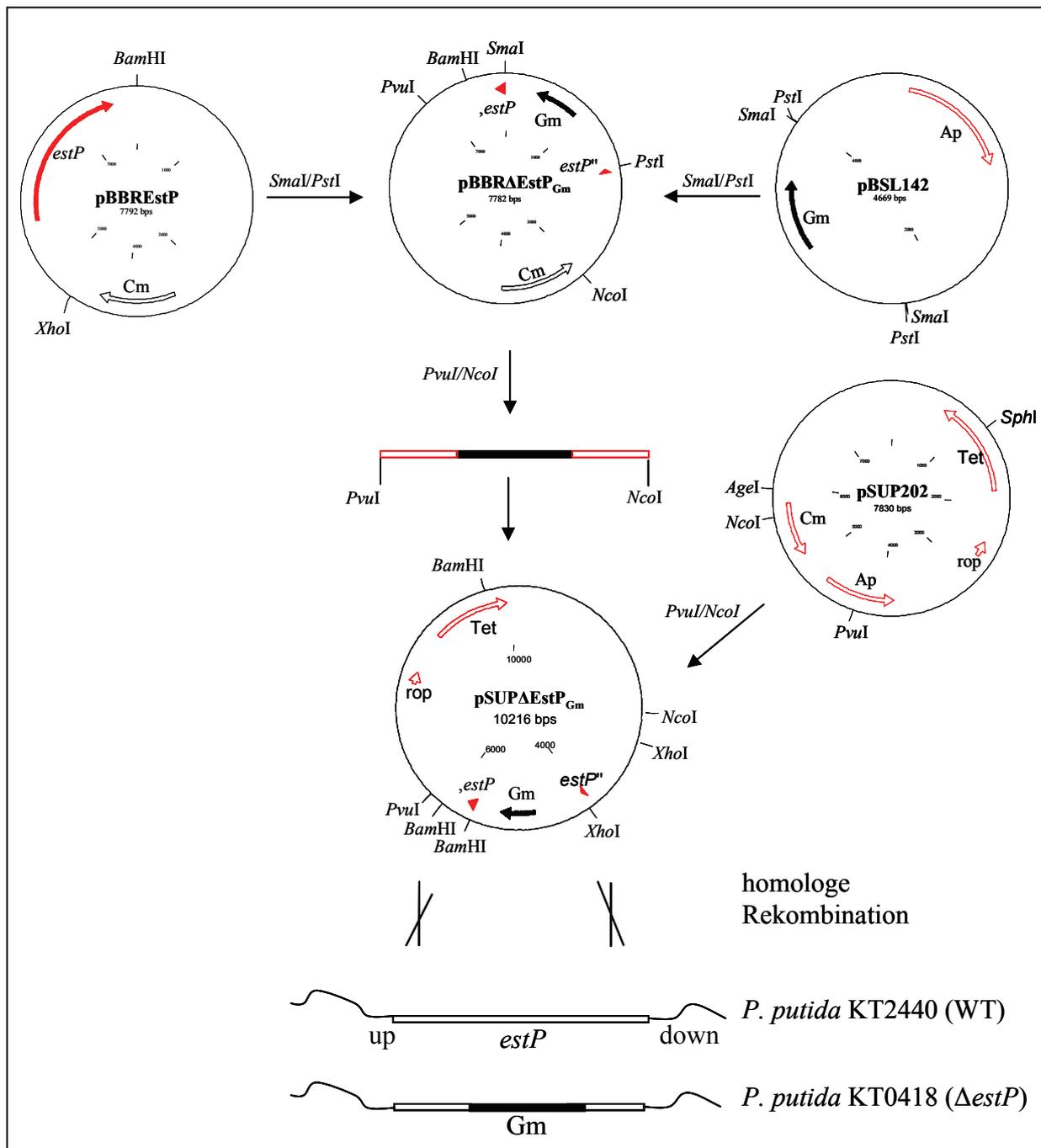


Abb. 7.1: Schematische Darstellung der Konstruktion eines *estP*-defizienten Stammes von *P. putida* KT2440. Zuerst wurde durch *Sma*I/*Pst*I-Hydrolyse ein 1,7 kb-Fragment von *estP* im Expressionsplasmid pBBREstP durch eine *Gm*^r-Kassette, die aus dem Vektor pBSL142 isoliert wurde, ersetzt. Daraufhin wurde durch *Pvu*I/*Nco*I-Hydrolyse die flankierenden stromaufwärts- (up) und stromabwärts- (down) Regionen von *estP* mit der inserierten *Gm*^r-Kassette in den Suizidvektor pSUP202 kloniert und der entstandene Mutagenesevektor pSUPΔ*EstP*_{Gm} wurde durch Konjugation in *P. putida* KT2440 transferiert. Durch homologe Rekombination (*double crossover*) wurde ein 1,7 kb-Fragment von *estP* durch eine *Gm*^r-Kassette ersetzt.

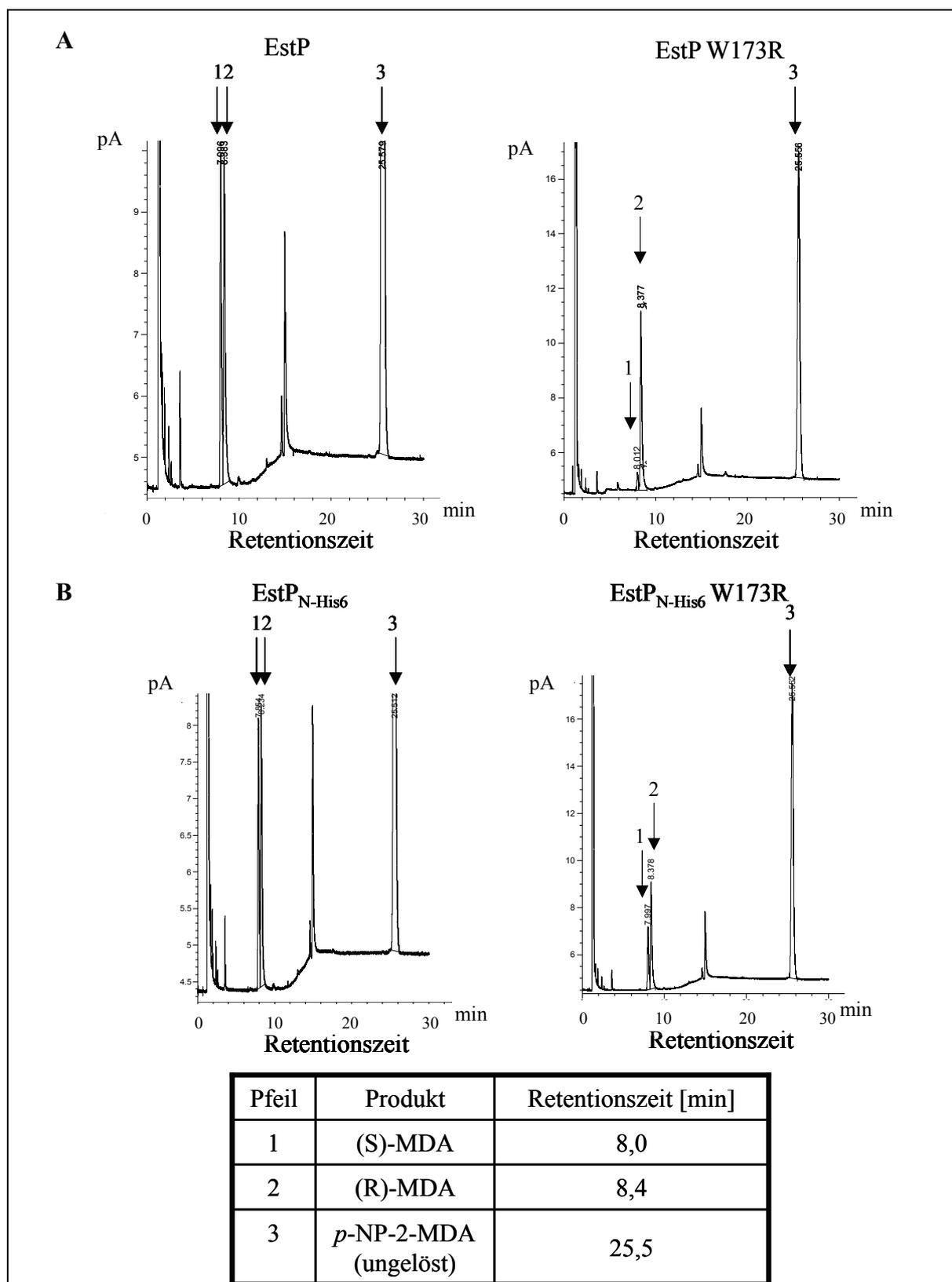


Abb. 7.2: Gaschromatographische Analyse nach Racematspaltung der 2-Methyldekansäure durch (A) EstP bzw. EstP W173R und (B) EstP_{N-His6} bzw. EstP_{N-His6} W173R in Phosphatpuffer [pH 7,2]. In den Diagrammen ist jeweils die Leitfähigkeit des Detektors [pA] gegen die Retentionszeit [min] aufgetragen. Die zu den Endprodukten bzw. zum ungelösten Substratgemisch zugehörigen Signale sind je mit einem Pfeil gekennzeichnet. In der Tabelle werden die Diagramme erklärt, indem den Pfeilen das entsprechende Produkt mit den Retentionszeiten zugeordnet wurde.

Tab. 7.1: Detaillierte Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung der E_{true} -Werte von EstP, EstP W173R, EstP_{N-His6} und EstP_{N-His6} W173R. Die Hydrolyse der 2-Methyldekansäure wurde in unterschiedlichen Puffern durchgeführt.

Protein	Puffer	Produkt	Retentionzeit [min]	Fläche	Höhe	Fläche [%]
EstP	Phosphat [pH 7,2]	(S)-MDA	7.996	59.90642	5.39583	8.82384
		(R)-MDA	8.383	65.88995	5.37566	9.70518
		2-MDA	25.579	553.11926	29.88601	81.47099
EstP W173R	Phosphat [pH 7,2]	(S)-MDA	8.016	6.50030	6.21225	1.11096
		(R)-MDA	8.382	93.02717	7.64117	15.89923
		2-MDA	25.579	485.57739	26.05451	82.98981
EstP_{N-His6}	Phosphat [pH 7,2]	(S)-MDA	7.854	39.13741	3.67379	9.61486
		(R)-MDA	8.234	44.89350	3.76412	11.02895
		2-MDA	25.512	323.02048	16.76220	79.35619
EstP_{N-His6} W173R	Phosphat [pH 7,2]	(S)-MDA	7.997	29.78930	2.65671	9.38220
		(R)-MDA	8.378	56.33258	4.54503	17.74206
		2-MDA	25.552	231.38676	12.40734	72.87574
EstP_{N-His6} W173R	Zitrat pH [5,2]	(S)-MDA	8.031	2.71144	2.51417	0.60773
		(R)-MDA	8.386	40.27560	3.01009	9.02721
		2-MDA	25.561	403.17056	21.54190	90.36505

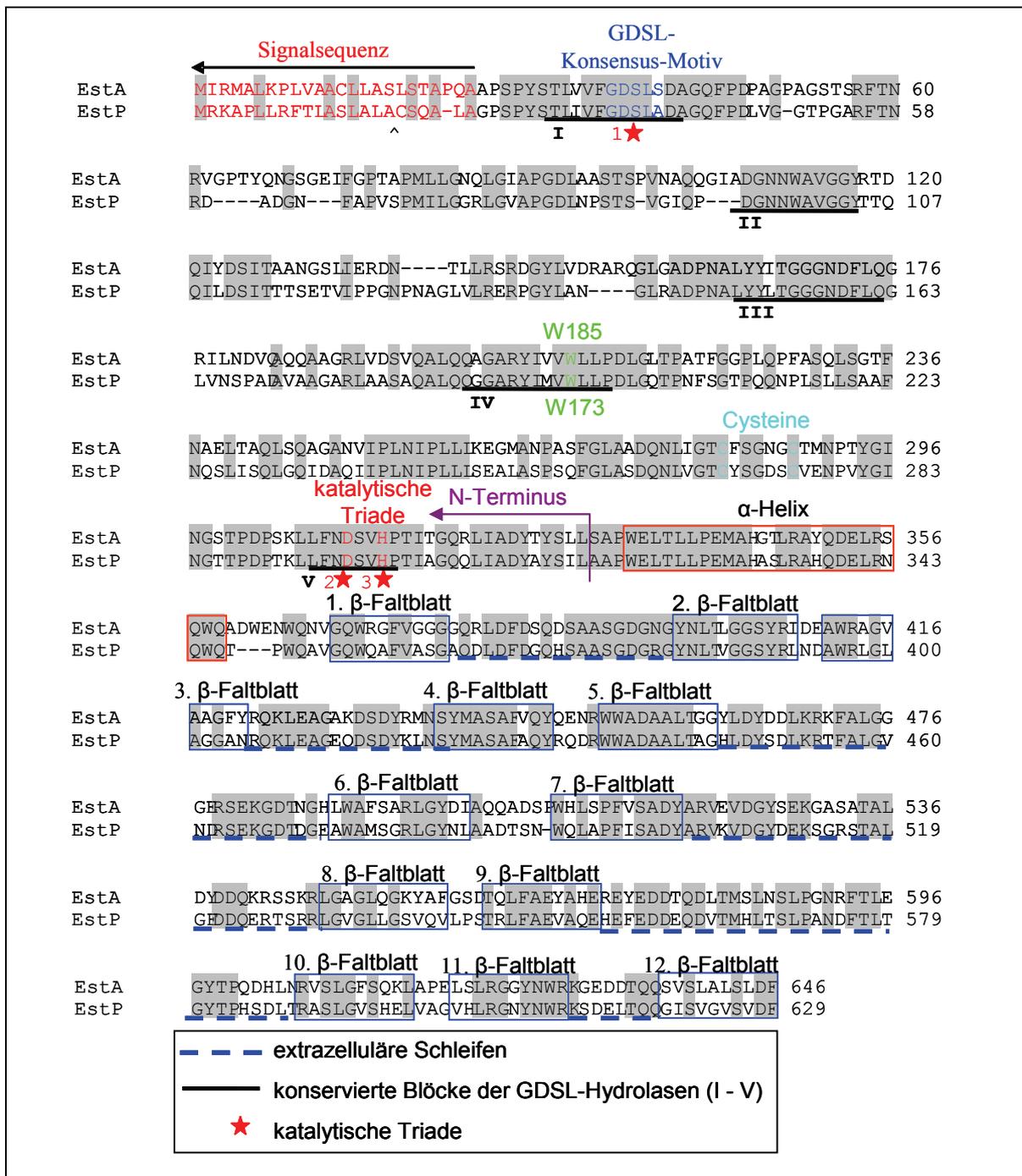


Abb. 7.3: Homologievergleich der Esterasen EstA aus *P. aeruginosa* PAO1 und EstP aus *P. putida* KT2440. Die identischen Aminosäuren sind grau unterlegt. Alle weiteren Charakteristika der Autotransporterproteine sind aus der Abbildung zu entnehmen.

LEBENS LAUF**Persönliche Daten**

Name: Schell
Vorname: Sabrina
Geburtsdatum: 02.12.1980
Geburtsort: Hagen
Familienstand: ledig

Studium und Berufliche Ausbildung

- 08/2005-06/2009 Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität im Forschungszentrum Jülich
Thema: Physiologie, Sekretion und Biotechnologie zweier Autotransporterproteine aus *Pseudomonas* Spezies
- 11/2004-07/2005 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität im Forschungszentrum Jülich
Thema: Untersuchungen zur physiologischen Funktion und Struktur-Funktionsbeziehung der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*.
Studienabschluss: Diplom-Biologin
- 10/2000-07/2005 Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Schulbildung

- 08/1991-06/2000 Städtisches Gymnasium Gevelsberg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 07/1987-06/1991 Grundschule Pestalozzi in Gevelsberg

Anstellungen

- 10/2005 - 12/2008 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 08/2005 – 10/2005 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 02/2005 – 05/2005 Studentische Hilfskraft am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 10/2004 – 12/2004 Studentische Hilfskraft am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich, Ruhr-Universität-Bochum
- 05/2004 - 12/2004 Studentische Hilfskraft am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 18.05.2009



Sabrina Schell