



**Physiologie eines industriellen Produktionsstammes:
Proteinsekretion, Regulation und Produktion von Biotensiden in
*Burkholderia glumae***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Ingenieurin
Janina Knorr
aus Linnich

Düsseldorf, Mai 2010

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
Koreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst
Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2010

Meinen Eltern

Hoffnung ist nicht die Überzeugung,
dass etwas gut ausgeht.
Sondern die Gewissheit,
dass etwas Sinn ergibt,
egal wie es ausgeht.
Vaclav Havel

Veröffentlichungen während der Promotion

Becker, S., Höbenreich, H., Vogel, A., Knorr, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Reetz, M., Kolmar, H. (2008): Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. *Angewandte Chemie International Edition* 47 (27), 5085-5088.

Leščić Ašler, I., Iveć, N., Kovačić, F., Schell, S., Knorr, J., Wilhelm, S., Kojić-Prodić, B., Jaeger, K.-E. (2010): Probing enzyme promiscuity of SGNH hydrolases. *ChemBioChem* (accepted).

Knorr, J., Voget, S., Hofmann, D., Santiago-Schübel, B., Wilhelm, S., Rosenau, F. (2010): The plant pathogen *Burkholderia glumae* produces rhamnolipids with anti-bacterial properties. *FEMS Microbiology Letters* (submitted).

Voget, S., Liesegang, H., Poehlein, A., Knorr, J., Hornung, C., Wilhelm, S., Rosenau, F., Streit, W., Jaeger, K. E. (2010): The genome sequence of *Burkholderia glumae* PG1. (in preparation).

Posterpräsentationen während internationalen Tagungen

Knorr, J., Isenhardt, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Rosenau, F. (2008): The extracellular proteome of *Burkholderia glumae* PG1: Analysis of *gsp*-secretion. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Frankfurt am Main.

Becker, S., Höbenreich, H., Vogel, A., Knorr, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Reetz, M., Kolmar, H. (2008): Tailor made esterases: Ultra high throughput screening for enzyme enantioselectivity. *The International Enzyme Engineering Symposium*, Kusadasi, Türkei.

Knorr, J., Isenhardt, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Rosenau, F. (2009): Analysis of an extracellular biofilm inducing factor in *Burkholderia glumae* PG1. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Bochum.

Knorr, J., Isenhardt, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Rosenau, F. (2009): Identification and analysis of an extracellular biofilm inducing factor in the secretome of *Burkholderia glumae* PG1. *Proteomic Forum*, Berlin.

Knorr, J., Isenhardt, S., Wilhelm, S., Jaeger, K.-E., Rosenau, F. (2009): The Gsp-System of *Burkholderia glumae* PG1 influences biotenside production and biofilm formation. *Pseudomonas Conference*, Hannover.

Knorr, J., Isenhardt, S., Wilhelm, S., Voget, S., Jaeger, K.-E., Rosenau, F. (2009): Biotenside production and biofilm formation of *Burkholderia glumae* depends on a functional type II secretion system. *ProkaGENOMICS*, Göttingen.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas, die sehr guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie, sowie sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

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

Mein Dank gilt außerdem Dr. Diana Hofmann und Dr. Beatrix Santiago-Schübel, Jülich Forschungszentrum GmbH, des weiteren Dr. Sonja Voget, Universität Göttingen, für die konstruktiven Kooperationen. Dr. Silke Isenhardt danke ich für die Überlassung der *gsp*-Mutanten.

Ich danke Frau Dr. Susanne Wilhelm und Dr. Frank Rosenau für die engagierte Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die vielen Ratschläge während der letzten Jahre.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMET (L206 und L306), im speziellen Dr. Silke Isenhardt, Dipl.-Biol. Viola Fuchs, Dipl.-Biol. Nina Richter und Martina Paul, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung. Insbesondere danke ich Dr. Achim Heck für seine wertvollen Ratschläge und für das Lesen des Manuskripts.

Ebenso bedanke ich mich bei meinen Freundinnen, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten. Meinem Freund Volker danke ich für seine Geduld und für so manche Umarmung.

Auch Sven und Sabrina möchte ich an dieser Stelle für einige Dinge danken.

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Zuspruch wäre ich nicht so weit gekommen.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	1
1	Die Gattung <i>Burkholderia</i>	1
1.1	Das phytopathogene Bakterium <i>Burkholderia glumae</i>	1
1.2	Die Lipase LipA von <i>Burkholderia glumae</i>	2
2	Proteinsekretion bei Gram-negativen Bakterien	3
2.1	Allgemeiner Überblick	3
2.2	Sekretion der Lipase LipA über die innere Membran ins Periplasma.....	5
2.3	Transport der Lipase LipA in den extrazellulären Raum	5
3	Das „Quorum Sensing“ (QS)-System	8
3.1	QS-Regulation in <i>P. aeruginosa</i>	8
3.2	Das PQS-System	10
3.3	QS-Regulation in <i>Burkholderia</i>	11
4	Biofilme	12
5	Rhamnolipide	13
5.1	Rhamnolipide bei <i>P. aeruginosa</i>	13
5.2	Rhamnolipide bei <i>Burkholderia</i>	15
6	Ziele der Arbeit.....	15
II	Material und Methoden	17
1	Bakterienstämme	17
2	Vektoren und rekombinante Plasmide.....	17
3	Oligonukleotide und Sequenzierungen	18
3.1	Verwendete Oligonukleotide.....	18
3.2	Sequenzierungen	19
4	Nährmedien und Zusätze	19
4.1	Nährmedien	19
4.2	Antibiotika	21
5	Enzyme und Chemikalien.....	22
5.1	Verwendete Enzyme	22
5.2	Verwendete Chemikalien	22
6	Mikrobiologische Methoden.....	22
6.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien.....	22

6.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	23
6.3	Konjugation von <i>E. coli</i> S17-1 mit <i>B. glumae</i> PG1.....	23
7	RNA-Techniken.....	23
7.1	Isolierung von RNA.....	23
7.2	Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration.....	23
7.3	Reverse Transkription von RNA mit anschließender <i>RealTime</i> -PCR.....	23
8	DNA-Techniken.....	24
8.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	24
8.2	Isolierung von chromosomaler DNA.....	24
8.3	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	24
8.4	<i>In-vitro</i> -Rekombination von DNA.....	25
8.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
9	Proteintechniken.....	25
9.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
9.2	2-D-Gelelektrophorese.....	25
9.3	MALDI-TOF.....	26
9.4	Größenausschluss-Chromatographie.....	27
10	Techniken zur Untersuchung von physiologischen Eigenschaften.....	28
10.1	Enzymaktivitätstests.....	28
10.2	Kultivierung von Biofilmen.....	28
10.3	Rhamnolipidnachweis.....	29
10.4	Extraktion von <i>N</i> -Acyl-L-Homoserinlactonen (HSL).....	30
10.5	Extraktion und Detektion des <i>Pseudomonas-quinolone</i> -Signals (PQS).....	31
10.6	(Fluoreszenz)-Mikroskopie.....	31
11	Computerprogramme und Datenbanken.....	31
III	Ergebnisse.....	33
1	Genomanalysen.....	33
1.1	Allgemeine Daten.....	33
1.2	Sequenzen des Typ II-Sekretionssystems.....	34
2	Untersuchung der lipolytischen Aktivität der <i>gsp</i> -Mutanten.....	38
3	Untersuchung des extrazellulären Proteoms von <i>B. glumae</i>	39
3.1	2-D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF.....	39
3.2	Das Wachstumsverhalten von <i>B. glumae</i>	42
4	Ausschüttung von Signalmolekülen in <i>B. glumae</i>	46

4.1	Homoserinlactone in <i>B. glumae</i>	46
4.2	<i>B. glumae</i> besitzt ein „PQS-ähnliches“ Signalmolekül.....	48
5	Produktion von Rhamnolipiden in <i>B. glumae</i>	51
5.1	<i>B. glumae</i> besitzt <i>rhl</i> -homologe Gene und produziert Rhamnolipide.....	51
5.2	Untersuchung der Eigenschaften der Rhamnolipide.....	54
5.3	Untersuchung der Rhamnolipid-Produktion in den <i>gsp</i> -Mutanten.....	56
5.4	Wirkung des PQS-ähnlichen Signals auf die Rhamnolipide.....	59
6	Biofilmbildung.....	61
6.1	Untersuchung der Biofilm-bildenden Eigenschaften von <i>B. glumae</i>	61
6.2	Der Überstand von <i>B. glumae</i> PG1 enthält einen Biofilm-induzierenden Faktor.....	65
6.3	Aufreinigung des Biofilm-induzierenden Faktors.....	69
6.4	Herstellung und Untersuchung von Deletionsmutanten.....	71
6.5	Ölsäure löst die Biofilmbildung in <i>B. glumae</i> aus.....	75
7	Komplementation der <i>gsp</i> -Mutanten.....	77
IV	Diskussion.....	81
1	Physiologische Eigenschaften von <i>B. glumae</i>	81
2	Untersuchung der Rhamnolipid-Produktion.....	85
2.1	Rhamnolipid-Bildung in <i>B. glumae</i> Wildtyp.....	85
2.2	Rhamnolipid-Bildung in <i>B. glumae</i> PG1 Δ <i>gspD</i>	87
3	Untersuchung der Biofilmbildung.....	88
3.1	Die Lipase LipA liegt im Überstand von <i>B. glumae</i> als Komplex vor.....	89
3.2	Induktion der Biofilmbildung durch Ölsäure in <i>B. glumae</i>	92
V	Zusammenfassung.....	96
VI	Summary.....	98
VII	Literatur.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer enzymatischen Reaktion der Lipase.	2
Abbildung 2: Übersicht über das Typ II-Sekretionssystem.	7
Abbildung 3: Schema zum „Quorum sensing“ bei <i>P. aeruginosa</i>	9
Abbildung 4: Struktur von Rhamnolipiden in <i>P. aeruginosa</i>	14
Abbildung 5: Das Genom von <i>Burkholderia glumae</i> PG1	33
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Typ II-Sekretion und der dafür verantwortlichen Gene im Genom.	35
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung der <i>gsp</i> -Mutanten.	36
Abbildung 8: Transkriptnachweis der Gene <i>gspE</i> und <i>gspF</i> in <i>B. glumae</i> PG1Δ <i>gspD</i>	37
Abbildung 9: Nachweis der lipolytischen Aktivität von <i>B. glumae</i> PG1 und der <i>gsp</i> -Mutanten.	38
Abbildung 10: Nachweis der lipolytischen Aktivität in Rohzellextrakten von <i>B. glumae</i>	39
Abbildung 11: Das extrazelluläre Proteom von <i>B. glumae</i> PG1.	41
Abbildung 12: Wachstum von <i>B. glumae</i>	43
Abbildung 13: Aktivität des periplasmatischen Enzyms β -Lactamase im Überstand von <i>B. glumae</i>	44
Abbildung 14: Wachstum von <i>B. glumae</i> PG1 unter Lipase-exprimierenden Bedingungen.	45
Abbildung 15: Ausschüttung von HSL im Überstand von <i>B. glumae</i> unter Lipase-exprimierenden Bedingungen.	47
Abbildung 16: Quantifizierung von C ₈ -HSL im Überstand von <i>B. glumae</i> bei Glycerolzugabe.	48
Abbildung 17: Dünnschichtchromatographie des PQS-ähnlichen Signals aus <i>B. glumae</i> PG1.	49
Abbildung 18: Dünnschichtchromatographie des PQS-ähnlichen Signals von <i>B. glumae</i> PG1 im Vergleich mit den <i>gsp</i> -Mutanten.	50
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Genbereichs um <i>rhIA</i> , <i>rhIB</i> und <i>rhIC</i>	51
Abbildung 20: Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>RhIA</i> (PA3479) von <i>P. aeruginosa</i> und dem <i>RhIA</i> -homologen Protein RBGB066062 von <i>B. glumae</i>	52
Abbildung 21: Nachweis von Rhamnolipiden mittels Dünnschichtchromatographie (A) und der mRNA des <i>rhIA</i> -homologen Gens (B).	53
Abbildung 22: Identifizierung der Rhamnolipide von <i>B. glumae</i> PG1 mittels HPLC-MS.	54
Abbildung 23: Rhamnolipidnachweis mittels Dünnschichtchromatographie von <i>B. glumae</i> PG1Δ <i>gspD</i> und PG1Δ <i>gspDEF</i> im Vergleich zu <i>B. glumae</i> PG1.	56
Abbildung 24: Rhamnolipidkonzentrationen im Überstand von <i>B. glumae</i>	57
Abbildung 25: Transkriptnachweis der Gene <i>rhIA</i> und <i>rhIB</i> in den <i>gsp</i> -Mutanten nach 24 h.	58
Abbildung 26: Transkriptnachweis des Gens <i>rhIA</i> in den <i>gsp</i> -Mutanten nach 48 h.	59
Abbildung 27: Dünnschichtchromatographie der Rhamnolipide nach Zugabe des PQS-Analogs.	60
Abbildung 28: Nachweis der Biofilmbildung von <i>B. glumae</i> PG1 unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.	61
Abbildung 29: Biofilmbildung von <i>B. glumae</i>	62
Abbildung 30: Mikroskopie des Biofilms von <i>B. glumae</i>	63
Abbildung 31: Wachstum von <i>B. glumae</i> unter Biofilmbildenden Bedingungen.	64
Abbildung 32: Biofilmbildung der <i>gsp</i> -Mutanten.	65
Abbildung 33: Mikroskopie des wiederhergestellten Biofilms der <i>gsp</i> -Mutanten.	66

Abbildung 34: Visualisierung des Biofilm-induzierenden Faktors nach der Größenausschlusschromatographie.	70
Abbildung 35: Schematische Darstellung zur Herstellung einer Deletionsmutante anhand eines Beispiels für die Herstellung der Lipase-Mutante.....	72
Abbildung 36: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach RealTime-PCR.	73
Abbildung 37: Biofilmmassay von <i>B. glumae</i> PG1 Δ lipA.	73
Abbildung 38: Biofilmbildung der komplementierten Lipase-Mutante.	74
Abbildung 39: Biofilmbildung von <i>B. glumae</i> PG1 Δ gspDEF mit Ölsäure.....	75
Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopie von <i>B. glumae</i>	76
Abbildung 41: Aktivitätsassay der Überstände der komplementierten <i>gsp</i> -Mutanten.	77
Abbildung 42: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der RealTime-PCR der komplementierten <i>gspDEF</i> -Mutante.....	78
Abbildung 43: Biofilmbildung der komplementierten <i>gspD</i> -Mutante.	79
Abbildung 44: Dünnschichtchromatographie der Rhamnolipide der komplementierten <i>gspD</i> -Mutante.	80
Abbildung 45: Struktur der humanen Pankreas-Lipase.	90
Abbildung 46: Struktur der <i>B. glumae</i> Lipase LipA.	92
Abbildung 47: Schematische Darstellung der Anlagerung von Zellen an eine hydrophobe Oberfläche mit Hilfe von Fettsäuren.	93
Abbildung 48: Strukturen der verschiedenen Fettsäuren, die als Signalmoleküle agieren.	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Nomenklatur der Proteine des Xcp-Systems und der entsprechenden Proteine des Gsp-Systems..... 6

Tabelle 2: Genotypen aller verwendeten Bakterienstämme. 17

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Vektoren und rekombinanter Plasmide. 17

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide. 18

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika..... 21

Tabelle 6: Übersicht über die Komponenten und die angewendeten Einstellungen bei der (Fluoreszenz)-Mikroskopie. 31

Tabelle 7: Übersicht Vergleich der Eigenschaften von Chromosom 1 und Chromosom 2..... 34

Tabelle 8: Übersicht über die prozentualen Volumenanteile der einzelnen Proteine, die eine veränderte Proteinmenge zeigen. 41

Tabelle 9: Übersicht über die bakterizide Wirkung der Rhamnolipide von B. glumae. 55

Tabelle 10: Auflistung der zur Identifizierung des Biofilm-induzierenden Faktors durchgeführten Experimente. 68

Abkürzungen

A _{405nm}	Absorption bei 405 nm
A _{410nm}	Absorption bei 410 nm
A _{421nm}	Absorption bei 421 nm
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDSF	DSF von <i>B. cenocepacia</i>
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
CF	Cystische Fibrose
CM	Cytoplasmamembran
Cm	Chloramphenicol
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSF	<i>diffusible signal molecule</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FZ	Zentrifuge für Falcon-Gefäße
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gm	Gentamycin
Gsp	<i>general secretory pathway</i>
HAQ	4-Hydroxy-2-Akylquinolon(e)
HHQ	4-Hydroxy-2-Heptylquinolon(e)
HMAQ	4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinolon(e)
HSL	N-Acyl-Homoserinlacton
Hxc	<i>Homologous to xcp</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
kPa	Kilopascal
l	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
M	Mol/Liter
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Time-of-Flight</i>
Mbp	Mega-Basenpaar(e)
MIC	<i>minimal inhibition concentration</i>
mM	Millimol/Liter
MME	Minimalmedium E
Mol	Stoffmenge
mTB	<i>minor terminal branch</i>
MTB	<i>main terminal branch</i>
O.D. _{580nm}	optische Dichte bei 580 nm

ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenolpalmitat
PQS	<i>Pseudomonas</i> -Quinolone Signal
QS	Quorum Sensing
RBS	Ribosomenbindestelle
Rha	Rhamnose
Rhl	Rhamnolipid(e)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymeinheit
ÜK	Übernachtkultur
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
Xcp	Gsp-orthologes Sekretionssystem in <i>P. aeruginosa</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

I Einleitung

1 Die Gattung *Burkholderia*

Über 300 Jahren nach der ersten Beschreibung von Bakterien ist die Mehrheit der auf der Erde existierenden Bakterienarten noch nicht bekannt. Daher ist es nicht erstaunlich, dass immer wieder neue Entdeckungen gemacht werden. Yabuuchi identifizierte 1992 das neue Genus *Burkholderia* aus der RNA-Homologiegruppe II der Gattung *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1992). Beruhend auf 16S rRNA Sequenzen, DNA-Homologien, der zellulären Lipid- und Fettsäurekomposition, sowie phänotypischen Charakteristika wurden dem Genus *Burkholderia* sieben Arten der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet: *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia caryophylli*, *Burkholderia gladioli*, *Burkholderia pickettii* und *Burkholderia solanacearum* (Yabuuchi *et al.*, 1992). Seit 1994 gehören auch *Burkholderia glumae* und *Burkholderia plantarii* zu der neuen Gattung (Urakami *et al.*, 1994).

Mittlerweile umfasst die Gattung *Burkholderia* über 30 Arten. Durch ihre hohe Anpassungsfähigkeit besiedeln sie eine Vielzahl von ökologischen Nischen (Coenye & Vandamme, 2003). Die Gattung *Burkholderia* enthält nützliche Arten, wie *B. vietnamensis*, das zu den Rhizobakterien zählt und gesundheitsfördernd auf Pflanzen wirkt. Es ist in der Lage, atmosphärischen Stickstoff zu binden und hat damit einen förderlichen Einfluss auf Pflanzen, wie z. B. Reispflanzen (Van *et al.*, 2000).

Einige Spezies dieser Gattung sind humanpathogene Bakterien wie z. B. *B. cepacia*, das bei Patienten mit cystischer Fibrose Lungenzellen besiedelt und durch z. B. Biofilmbildung den Krankheitszustand des Patienten verschlechtern kann (Govan *et al.*, 1996, Vandamme *et al.*, 1997). Ein weiterer humanpathogener Organismus ist *B. pseudomallei*, der Auslöser der akuten und chronischen Melioidose (Dance *et al.*, 1991). Des Weiteren umfasst die Gattung *Burkholderia* phytopathogene Bakterien, wozu auch *B. glumae* zählt.

1.1 Das phytopathogene Bakterium *Burkholderia glumae*

B. glumae wurde erstmals von Kurita und Tabei als bewegliches Stäbchenbakterium *Pseudomonas glumae* beschrieben (Kurita & Tabei, 1967). Dieses Bakterium ist pathogen für Reispflanzen, indem es Fäulnis der Jungpflanzen in den Gärtnereien und Fäulnis der Samenkörner in den Reisfeldern verursacht (Jeong *et al.*, 2003). Es befällt die Pflanzen im Blütestadium, wo Temperatur und Luftfeuchtigkeit besonders hoch sind (Iiyama *et al.*, 1995). *B. glumae* ist in der Lage, bei 11-48°C zu wachsen, die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 30-35°C. In Reis-kultivierenden Ländern wie Japan, Taiwan und Korea führt die durch *B. glumae* ausgelöste Fäulnis zu Ernteeinbußen von bis zu 34 % (Tsushima *et al.*, 1996).

Des Weiteren kann *B. glumae* das Welken von Tomaten-, Tabak-, Auberginen- und Sesampflanzen auslösen (Jeong *et al.*, 2003). Hauptverantwortlich dafür ist das Toxin

Toxoflavin, das von *B. glumae* synthetisiert wird. Dabei handelt es sich um ein 7-Azepteridinantibiotikum mit bakterizider, fungizider und herbizider Wirkung, das sogar bei Mäusen Hämaturie, Diarrhö und Tränenfluss auslösen kann (Nagamatsu & Yamasaki, 2001). Die Synthese des Toxins unterliegt der Kontrolle durch Quorum sensing (Kim *et al.*, 2004). Quorum sensing ist ein Zell-Zell Kommunikationssystem, das in vielen Bakterien die Expression von Virulenzfaktoren durch transkriptionelle Regulatoren kontrolliert. Der transkriptionelle Regulator ToxR aktiviert sowohl das *toxABCDE*-Operon der Biosynthesegene, als auch das *toxFGHI*-Operon, welches die Komponenten für den Transport kodiert (Kim *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2004). Neben dem Toxoflavin wurde ein weiterer Pathogenitätsfaktor in *B. glumae* identifiziert: die Lipase LipA (Devescovi *et al.*, 2007). Weitere Virulenzfaktoren könnten zudem zwei extrazelluläre Polygalacturonasen sein, die identifiziert und charakterisiert wurden (Degrassi *et al.*, 2008). Obwohl *B. glumae* verschiedene Virulenzfaktoren aufweist und auch in Lungenzellen eines Patienten mit granulomatöser Entzündung gefunden werden konnte (Weinberg *et al.*, 2007), gibt es keinen Hinweis darauf, dass *B. glumae* zu den humanpathogenen Bakterien zugeordnet werden muss.

Als biotechnologisch interessant wurde *B. glumae* aufgrund der Sekretion der Lipase LipA deklariert. Während über das Bakterium nur wenig bekannt ist, wurde die Lipase bereits eingehend untersucht und charakterisiert.

1.2 Die Lipase LipA von *Burkholderia glumae*

Die Lipase LipA hat eine molekulare Menge von 33 kDa (Frenken *et al.*, 1993). Die Serinproteasen-typische katalytische Triade setzt sich aus den Aminosäuren Serin (Ser₈₇), Histidin (His₂₈₅) und Asparaginsäure (Asp₂₆₃) zusammen (Noble *et al.*, 1993).

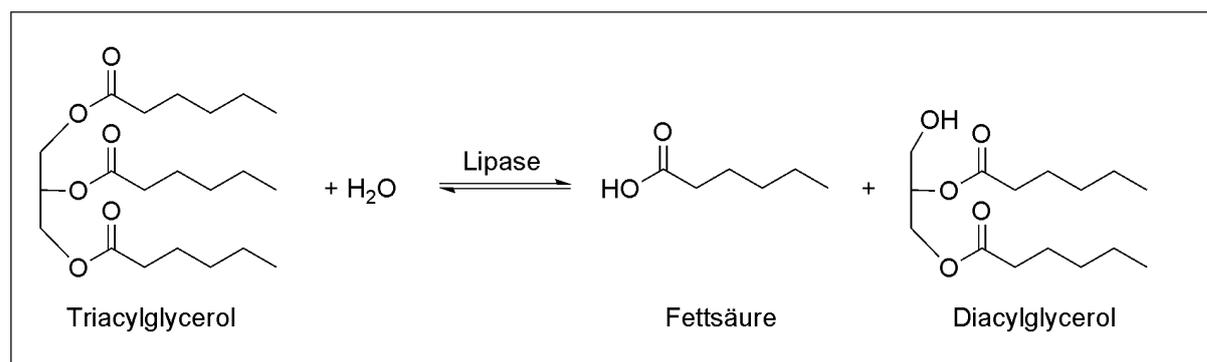


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer enzymatischen Reaktion der Lipase.

Die von der Lipase katalysierte Reaktion ist die Spaltung von Triacylglycerol zu einem Diacylglycerol und einer Fettsäure (Abbildung 1), weshalb die Lipase auch zu den Triacylglycerollipasen (EC 3.1.1.3) zählt. Die von *B. glumae* produzierte extrazelluläre Lipase

zeigt ein hohes biotechnologisches Potential für viele industrielle Anwendungen, wie z. B. in der Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen oder chiralen Aminen (Schmid *et al.*, 2001). Wie bei vielen Gram-negativen Bakterien ist das Lipase-kodierende Gen *lipA* in einem bicistronischen Operon mit der Lipase-spezifischen Foldase *lipB* organisiert. Der Lipase-spezifische Promotor P_{lip} in *B. glumae* wird durch Zugabe von Olivenöl induziert, zeigt aber eine deutliche Repression bei Zusatz von Glukose (Boekema *et al.*, 2007). Der GC-Gehalt beider Gene ist sehr hoch, mit 70 % bei *lipA* und 78 % bei *lipB*, was typisch für *Pseudomonas*- und *Burkholderia*-Arten ist. Anders als bei *P. aeruginosa*, wo beide Gene durch eine intergenische Region getrennt sind (Rosenau & Jaeger, 2000), überlappt das Stopcodon von *lipA* mit dem Startcodon von *lipB* bei *B. glumae*. Diese überlappenden Genbereiche sind daher essentiell für die Regulation der Expression (Krakauer, 2000). Die Regulation der Expression der Lipase von *B. glumae* wurde weitgehend untersucht und es konnten Parallelen zu dem *lipAH*-Operon von *P. aeruginosa* festgestellt werden. Unterschiede zeigen sich bei der Katabolitrepression der Lipase von *B. glumae*, die sich nicht bei der Lipase von *P. aeruginosa* zeigt (Frenken *et al.*, 1993). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression der Lipase durch Quorum sensing reguliert wird (Devescovi *et al.*, 2007).

Um die katalytische Aktivität zu erlangen, benötigt LipA die spezifische Foldase LipB. Dieses Protein gehört zu der Familie II der vier bekannten Familien der Lipase-spezifischen Foldasen (Rosenau *et al.*, 2004). Das Protein besteht aus 353 Aminosäuren, wobei der größte Teil in das Periplasma ragt. 76 Aminosäuren des N-Terminus bilden einen Membrananker aus und fixieren die Foldase an der inneren Membran. Im Periplasma faltet LipB die Lipase LipA in die enzymatisch aktive Konformation (El Khattabi *et al.*, 1999; Frenken *et al.*, 1993). Der Transport der aktiven Lipase erfolgt anschließend über den Typ II Sekretionsweg in die extrazelluläre Umgebung.

2 Proteinsekretion bei Gram-negativen Bakterien

2.1 Allgemeiner Überblick

Während bei Gram-positiven Bakterien bei der Sekretion extrazellulärer Proteine nur eine Membran überwunden werden muss, besitzen Gram-negative Bakterien zwei Membranen: die Cytoplasmamembran und die äußere Membran. Um extrazelluläre Enzyme und Toxine zu sekretieren, nutzen Gram-negative Bakterien viele verschiedene Mechanismen: Ein- und Zwei-Schritt-Mechanismen, wobei man diese in Sec-abhängige und Sec-unabhängige Sekretionswege unterteilt (Ma *et al.*, 2003; Koster *et al.*, 2000; Filloux *et al.*, 1998; Filloux *et al.*, 1990).

Die **Typ I-Sekretion**, auch als ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) bezeichnet, ist ein Ein-Schritt-Sekretionsmechanismus, bei dem das zu sekretierende Protein Sec-unabhängig

und unter Verbrauch von ATP vom Cytoplasma durch eine Pore direkt in das extrazelluläre Milieu transportiert wird (Henderson *et al.*, 2004). Ein Beispiel für diesen Transport ist die Sekretion von α -Hämolysin in *E. coli* (Koster *et al.*, 2000).

Ebenfalls zu den Ein-Schritt-Mechanismen zählt das **Typ III-Sekretionssystem**, bei dem der Transport vom Kontakt eines N-terminalen Erkennungssignals des Zielproteins mit der Wirtszelle abhängig ist (Warren & Young, 2005; Hauser *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 1998), wie z. B. bei der Sekretion von Yop-Proteinen bei *Yersinia* (Cornelis *et al.*, 1998). Bei diesem System wird Sekretion von Flagellen und die pathogenitätsbezogene Sekretion unterschieden (Nguyen *et al.*, 2000). Bei der Sekretion der Flagellen werden die Untereinheiten der Flagellen (Flagelline) transportiert. Bei den Pathogenitätsfaktoren erfolgt eine direkte Injektion der Zielproteine vom Cytoplasma des Bakteriums in die eukaryotische Wirtszelle, indem der komplexe Sekretionsapparat eine nadelähnliche Struktur bildet, die in der Lage ist, drei Membranen in einem Schritt zu überwinden (Nguyen *et al.*, 2000).

Bei dem Zwei-Schritt-Sekretionsmechanismus erfolgen zwei Transportschritte, zunächst über die Cytoplasmamembran in das Periplasma und anschließend über die äußere Membran in die extrazelluläre Umgebung. Dabei wird das Protein entweder ungefalteten über den Sec- oder gefalteten über den Tat-Signalweg (*twin-arginin-translocation*) in das Periplasma transportiert (Voulhoux *et al.*, 2001). Bei dem Sec-abhängigen Transport leitet eine N-terminale Signalsequenz, bestehend aus 20-25 Aminosäuren, den Transport vom Cytoplasma in das Periplasma ein und wird dort durch eine Signalpeptidase abgespalten (Paetzel *et al.*, 1997). Die Erkennungssequenz für den Tat-Transportweg enthält ein „*twin-Arginin-Motiv*“ (S/TRRXFLK), wodurch das zu transportierende Proteine erkannt und der Transport in die Wege geleitet wird (Ochsner *et al.*, 2002). Das Protein wird komplexartig gegebenenfalls mit Kofaktoren in das Periplasma transportiert.

Nach dem Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran wird das Protein im Periplasma in die native Konformation gefaltet, für den weiteren Transport durch die äußere Membran gibt es weitere Mechanismen, die meist Protein-spezifisch sind.

Die sogenannten Autotransporterproteine (**Typ V-Sekretionsmechanismus**) besitzen alle erforderlichen Komponenten, um den eigenen energieunabhängigen Transport zu gewährleisten. Dabei setzt sich das Protein aus drei Domänen zusammen: (i) eine N-terminale Signalsequenz, die den Sec-abhängigen Transport über die Cytoplasmamembran initiiert und anschließend proteolytisch abgespalten wird; (ii) eine funktionelle Domäne, die diverse Eigenschaften besitzen kann (Aktivität einer Protease, Lipase, Esterase und Peptidase, als Adhäsion oder Toxin); und (iii) die C-terminale Domäne, die Charakteristika eines integralen Membranproteins aufweist und eine hydrophile Pore bestehend aus 12 β -Strängen bildet, durch die das zu sekretierende Protein hindurchgeschleust wird (Henderson *et al.*, 2004; Oomen *et al.*, 2004). Ein Beispiel für ein Autotransporterprotein ist die Esterase EstA aus *P. aeruginosa* (Wilhelm *et al.*, 2007).

Ein weiterer Transportmechanismus durch die äußere Membran ist die **Typ II-Sekretion**, wobei die Sekretion des Proteins vom Periplasma in die extrazelluläre Umgebung in einem zweiten, unabhängigen Schritt erfolgt. Dieses Sekretionssystem konnte bei einer Vielzahl von Bakterien identifiziert werden (Filloux *et al.*, 1998; Pugsley, 1993). Es wird postuliert, dass die Lipase LipA aus *B. glumae* über diesen Transportweg vom Periplasma in die extrazelluläre Umgebung transportiert wird. Im Periplasma werden die Proteine zunächst durch spezifische Faltungsmediatoren, wie inter- und intramolekulare Chaperone, korrekt gefaltet. Ein Beispiel dafür ist die Lipase-spezifische Foldase LipB, die die korrekte Faltung der Lipase LipA aus *B. glumae* vermittelt (Frenken *et al.*, 1993b; Frenken *et al.*, 1993a). Außerdem werden durch das periplasmatische Dsb-(*disulfide bond formation*)-System Disulfidbrücken gebildet, die wichtig für die korrekte Faltung und Stabilität der Proteine sind (Missiakas & Raina, 1997, Pugsley, 1992).

2.2 Sekretion der Lipase LipA über die innere Membran ins Periplasma

Der Transport der Lipase LipA über die cytoplasmatische Membran erfolgt über den Sec-abhängigen Transportweg, der in *E. coli* eingehend studiert wurde. An diesem Transport sind einige konservierte Proteine beteiligt (SecY, SecE, SecG, FtsY und Ffh) und Proteine, die nicht ubiquitär verbreitet sind (SecA, SecB, SecD, SecF, YafC) (Cao & Saier, 2003). Die Sec-abhängig transportierten Proteine besitzen eine N-terminale Signalsequenz mit einem positiv geladenen N-Terminus, einem hydrophoben Kern und einer Erkennungssequenz für die Signalsequenzpeptidase (Fekkes & Driessen, 1999). Bei dem ersten Schritt des Transportwegs bindet das ATP-abhängige Chaperon SecB das zu transportierende ungefaltene Protein und transportiert es zu SecA. Das Protein SecA ist eine ATPase und durch die ATP Hydrolyse transportiert SecA das ungefaltene Protein durch einen Tunnel in der cytoplasmatischen Membran, der durch die Proteine SecYEG gebildet wird (Manting *et al.*, 2000). Eine Signalpeptidase, die in der inneren Membran lokalisiert ist, trennt die N-terminale Signalsequenz des transportierten Proteins ab, bevor das Protein in das Periplasma entlassen wird.

2.3 Transport der Lipase LipA in den extrazellulären Raum

Nach der Faltung des Proteins, die bei der Lipase LipA durch das Chaperon LipB durchgeführt wird, wird die Lipase über den Typ II-Sekretionsmechanismus in den extrazellulären Raum transportiert. Dieser Vorgang wird zusammen mit der Sec-abhängigen Translokation über die Cytoplasmamembran als Gsp (*general secretory pathway*) bezeichnet. Man unterscheidet zwischen verschiedenen Wegen der Sekretion, wobei die Nebenwege als *minor terminal branch* (mTB) bezeichnet werden. Der Hauptweg, die Typ II-Sekretion, wird auch als *main terminal branch* (MTB) des Gsp bezeichnet.

Das Gsp-System ist in Gram-negativen Bakterien weitgehend konserviert. *P. aeruginosa* besitzt zwei Gsp-orthologe Transportsysteme: (i) das Xcp-System und (ii) das Hxc-System (Ball *et al.*, 2002). Bei *P. aeruginosa* unterscheidet sich die Nomenklatur des Xcp-Systems zu dem herkömmlichen Gsp-System (siehe Tabelle 1). Um die Nomenklatur des Gsp-Systems für alle Bakterien zu vereinheitlichen, wurden nachfolgend identifizierte Systeme nach der Nomenklatur des Gsp-Systems benannt. Die angegebene Literatur bezieht sich jedoch häufig auf *P. aeruginosa*, weshalb sich die Nomenklatur unterscheiden kann (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Nomenklatur der Proteine des Xcp-Systems und der entsprechenden Proteine des Gsp-Systems.

Nomenklatur der Proteine des Xcp-Systems	Nomenklatur der Proteine des Gsp-Systems
XcpA	GspO
XcpP	GspC
XcpQ	GspD
xcpR	GspE
XcpS	GspF
XcpT	GspG
XcpU	GspH
XcpV	GspI
XcpW	GspJ
XcpX	GspK
XcpY	GspL
XcpZ	GspM

Das Gsp-System setzt sich aus 12 identifizierten Proteinen zusammen, die als GspO und GspC-M bezeichnet werden und sowohl in der inneren als auch in der äußeren Membran lokalisiert sind (Filloux *et al.*, 1998) (siehe Abbildung 2). Der eigentliche Transport findet durch das Protein GspD statt, das in der äußeren Membran einen Tunnel bildet (Abbildung 2). Einige innere Membranproteine des Gsp-Systems (GspG, GspH, GspI, GspJ, vgl. Tabelle 1) sind homolog zu Pil-Proteinen, die an der Biosynthese von Typ 4-Pili beteiligt sind (Koster *et al.*, 2000; Nunn, 1999; Bleves *et al.*, 1998; Lory, 1998; Lory & Strom, 1997). So zeigen die N-Termini der Proteine des Gsp-Systems Ähnlichkeit zum N-Terminus der Typ 4-Pilus Untereinheit PilA und die Signalpeptide dieser Proteine werden von einer Prepilinpeptidase abgetrennt, die von *gspO*, auch *pilD* genannt, kodiert wird (Lory & Strom, 1997; Bally *et al.*, 1992). Wegen ihrer Ähnlichkeit zu Pilin-Untereinheiten werden die fünf Proteine GspG-K als Pseudopiline bezeichnet, die vermutlich in einer Art Pilus-Struktur konstruiert sind und den Transport auf eine direkt oder indirekte Art fördern (Bleves *et al.*, 1998; Lory, 1998; Lory & Strom, 1997). Weitere innere Membranproteine des Gsp-Systems sind die Proteine GspC, GspF, GspL und GspM (Filloux *et al.*, 1998) (Abbildung 2). GspC und GspM besitzen lange, bitopische C-terminale Domänen, die in das Periplasma hineinragen (Bleves *et al.*, 1996).

Bei GspL ragt eine große N-terminale Domäne in das Cytoplasma und stabilisiert damit GspE (Bleves *et al.*, 1996) (siehe Abbildung 2). Für das Protein GspF wurde vorhergesagt, dass es ein polytopisches Protein ist, das in die innere Membran integriert ist (Filloux *et al.*, 1998). Es zeigt eine Interaktion mit GspE und GspL (Arts *et al.*, 2007), die Funktion des Proteins konnte jedoch bisher nicht geklärt werden.

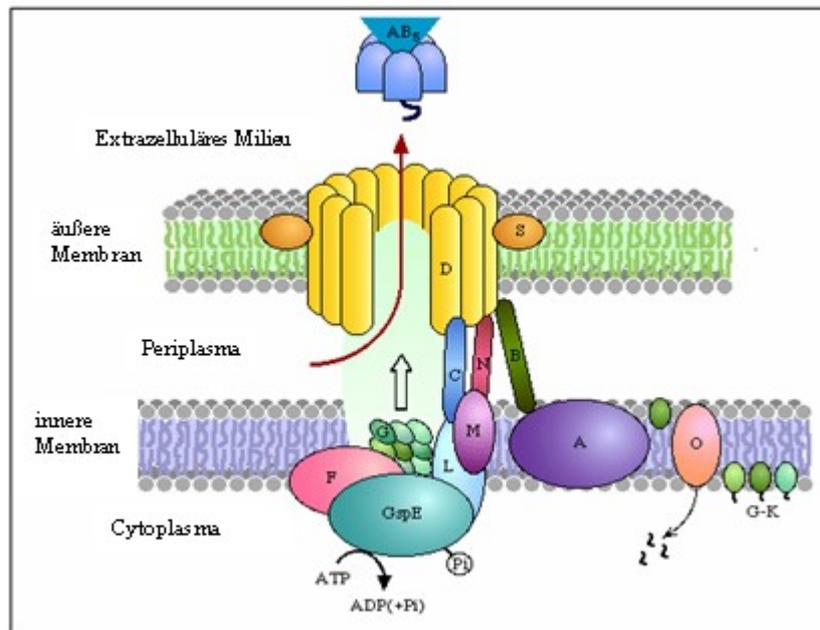


Abbildung 2: Übersicht über das Typ II-Sekretionssystem. Die Proteine des Systems sind sowohl in der inneren Membran, als auch in der äußeren Membran lokalisiert. Das gefaltene Protein wird vom Periplasma durch die Pore (GspD) in die extrazelluläre Umgebung transportiert. Das porenbildende Protein GspD besteht aus 12 stabilen homo-oligomeren Untereinheiten, wodurch die Ringstruktur gebildet wird. Energie erhält dieses ATP-abhängige System durch das Protein GspE.

Das GspE-Protein ist durch die Interaktion mit der cytoplasmatischen, N-terminalen Domäne von GspL mit der inneren Membran assoziiert. Außerdem zeigt es ein ATP-bindendes Motiv (Walker A Box), das für die Energiezufuhr in das Gsp-System sorgt und damit essentiell für die Sekretion ist (Koster *et al.*, 2000). Ein weiterer essentieller Bestandteil des Systems ist das äußere Membranprotein GspD (siehe Abbildung 2) (Bitter *et al.*, 1998). Dieses Protein besteht aus homo-oligomeren Komplexen, die aus 12 Untereinheiten aufgebaut sind. Die Komplexe besitzen eine Ringstruktur und somit ist das Protein in der Lage, einen Tunnel in der äußeren Membran zu bilden (Koster *et al.*, 2000; Filloux *et al.*, 1998; Akrim *et al.*, 1993), wodurch die gefalteten Proteine letztendlich transportiert werden (siehe Abbildung 2). Es wird vermutet, dass es eine Interaktion des LipA-LipB-Komplexes und den Komponenten des Gsp-Systems gibt, wobei LipB nach der korrekten Faltung von LipA dissoziiert und die Lipase anschließend sekretiert werden kann (Martínez *et al.*, 1999). Die einzige Komponente, die in der äußeren Membran lokalisiert ist und an der Interaktion teilnehmen könnte, wäre das GspD-Protein (Martínez *et al.*, 1999). Die Expression der *gsp*-Gene wird durch das Regulationssystem Quorum sensing kontrolliert (Chapon-Herve *et al.*, 1997), wodurch viele Eigenschaften der Bakterien, wie z. B. die Expression von Virulenzfaktoren

reguliert wird. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das Gsp-System physiologische Eigenschaften wie die Schwämbewegung der Zellen oder die Biofilmbildung beeinflussen kann (Overhage *et al.*, 2007).

3 Das „Quorum Sensing“ (QS)-System

Die einzellige Lebensweise von Mikroorganismen ist selten, eher werden multizelluläre Lebensgemeinschaften gebildet, die durch interzelluläre Kommunikation organisiert werden (Crespi, 2001, Parsek & Greenberg, 2005). Diese Zell-Zell-Kommunikation wird als „Quorum sensing“ (QS) bezeichnet, bei dem niedermolekulare Substanzen („Autoinducer“ oder Signalmoleküle) als eine Art Pheromone zum Informationsaustausch über die Zelldichten der Mikroorganismen verwendet werden. Die Bakterien setzen die Signalmoleküle in die Umgebung frei und sind zusätzlich in der Lage, die Konzentration dieser Moleküle zu messen. Durch die Akkumulation der Signalmoleküle kann eine einzelne Zelle die Anzahl weiterer Zellen (die Zelldichte) wahrnehmen und daraufhin die Expression spezifischer Gene veranlassen. Viele physiologische Eigenschaften werden durch QS reguliert, wie die Sekretion von Pathogenitätsfaktoren, die Beweglichkeit und die Biofilmbildung. Als Modellorganismus für die QS-Regulation dient die Zelldichten-abhängige Regulation der Biolumineszenz von *Vibrio fischeri*. Es gibt zwei Hauptkomponenten des Systems: (i) die Signalsynthetase LuxI und (ii) den Transkriptionsaktivator LuxR. Die Signalsynthetase LuxI synthetisiert die Signalmoleküle, die durch die Membran diffundieren und außerhalb der Zelle akkumulieren. Sobald eine so genannte Schwellenwertkonzentration erreicht wird, binden die Signalmoleküle an den Transkriptionsaktivator LuxR. Dieser Komplex bindet an die Promotorregion des Biolumineszenz-Operons und aktiviert dessen Transkription (Swartzman *et al.*, 1990; Engebrecht *et al.*, 1983).

Bei anschließend identifizierten QS-Systemen zeigte sich ein Lux-typischer Aufbau mit einer LuxI-ähnlichen Signalsynthetase und einem LuxR-ähnlichen Transkriptionsaktivator.

3.1 QS-Regulation in *P. aeruginosa*

Eines der bestuntersuchten Zell-Zell Kommunikationssysteme ist die QS-Regulation in *P. aeruginosa*, bei dem die Expression von 3-7 % der ORFs über QS-reguliert werden (Arevalo-Ferro *et al.*, 2003, Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Dazu zählen z. B. die Elastase LasB, das Exotoxin A, die Phospholipase C, das Pyocyanin und die Produktion von Rhamnolipiden (Whitehead *et al.*, 2001; Winzer & Williams, 2001), die über zwei QS-Systeme reguliert werden: (i) das Rhl-System und (ii) das übergeordnete Las-System (siehe Abbildung 3). Das Las-System reguliert durch die Signalsynthetase LasI und den Transkriptionsregulator LasR die Expression der Haupt-Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*, die Elastase LasB, das Exotoxin A, so wie Komponenten des Typ II-Sekretionssystems

(XcpR (GspE), XcpP (GspC)) (Gambello *et al.*, 1993). Durch die Signalmolekül-Synthetase LasI wird das langkettige *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-*L*-Homoserinlacton (3-oxo-C₁₂-HSL) gebildet, das durch Diffusion sowie einer aktiven MexAB-OprM Pumpe transportiert wird (Pearson *et al.*, 1999). Das 3-oxo-C₁₂-HSL bindet an den Transkriptionsaktivator LasR, wodurch einerseits die Transkription der Zielgene aktiviert wird und andererseits eine verstärkte Transkription von *lasI* bewirkt wird, um die Anzahl der Signalmoleküle zusätzlich zu erhöhen (Abbildung 3).

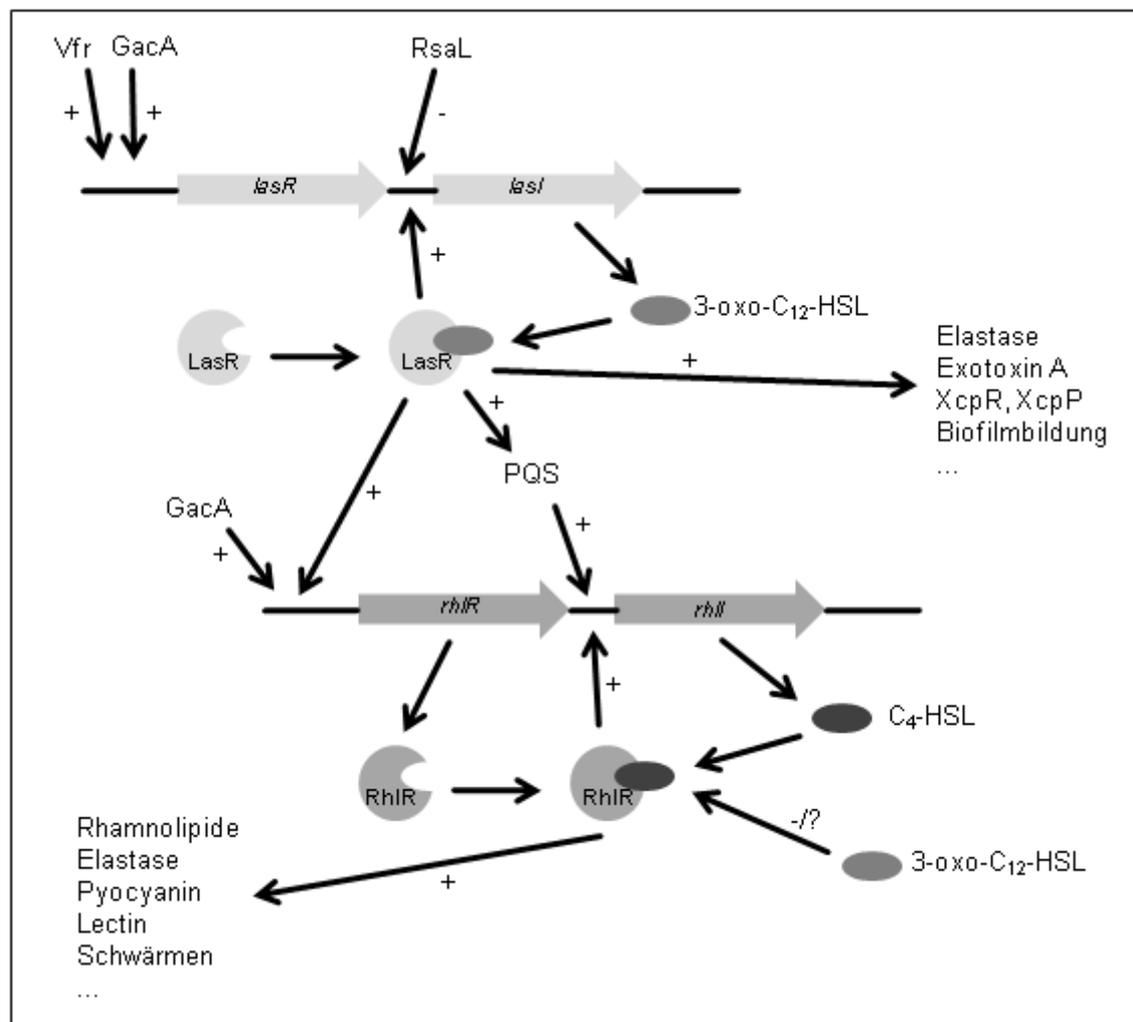


Abbildung 3: Schema zum „Quorum sensing“ bei *P. aeruginosa* (modifiziert nach Whitehead *et al.*, 2001 und Juhas *et al.*, 2005). Durch die Signalmoleküle *N*-(3-oxo-dodecanoyl)-*L*-Homoserinlacton (3-oxo-C₁₂-HSL) und *N*-Butanoyl-*L*-Homoserinlacton (C₄-HSL) wird die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren durch die hierarchisch angeordneten QS-Systeme Las und Rhl reguliert. Die Signalmolekül-Synthetasen LasI bzw. RhlI synthetisieren die Signalmoleküle, die akkumulieren und beim Erreichen eines Schwellenwertes an die Transkriptionsregulatoren LasR bzw. RhIR binden. Die aktivierten Komplexe induzieren die Expression verschiedener Virulenzfaktoren und verstärken die Synthese der Signalmoleküle (Autoinduktion). Das Las-System ist dem Rhl-System übergeordnet, eine weitere Verbindung entsteht durch das Signalmolekül *Pseudomonas-quinolone*-Signal (PQS). Globale Regulatoren, wie z. B. die hier dargestellten Aktivatoren GacA und Vfr oder der reprimierende Regulator RsaL, kontrollieren die QS-Systeme.

Das Rhl-System beruht auf der Herstellung von *N*-Butanoyl-*L*-Homoserinlacton (C₄-HSL) (Pearson *et al.*, 1995), das frei durch die Membranen diffundieren kann, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer Konzentration einstellt (Pearson *et al.*,

1999). Dieses System reguliert die Expression des *rhIAB*-Operons, das für eine Rhamnosyltransferase kodiert und für die Herstellung von Rhamnolipiden benötigt wird (Ochsner & Reiser, 1995a, vgl. Abbildung 3). Außerdem beeinflusst das System die Expression der Pathogenitätsfaktoren Elastase LasA, Elastase LasB, das Lectin LecA und die Pyocyanin-Herstellung (Winzer *et al.*, 2000; Brint & Ohman, 1995; Latifi *et al.*, 1995). Die Systeme agieren nicht unabhängig voneinander, da das Rhl-System durch das Las-System reguliert wird (Abbildung 3). Eine Aktivierung des Las-Systems aktiviert auch das Rhl-System, da das durch 3-oxo-C₁₂-HSL aktivierte LasR-Protein neben der Transkription von *lasI* auch die *rhIR*-Expression aktiviert (Abbildung 3). Ferner inhibiert 3-oxo-C₁₂-HSL die Bindung von C₄-HSL an das RhlR-Protein, woraus sich eine weitere Kontrolle des Las-Systems über das Rhl-System ergibt (Pesci *et al.*, 1997).

3.2 Das PQS-System

Eine weitere Verbindung zwischen den Systemen ergibt sich durch ein drittes Signalmolekül, das *Pseudomonas-quinolone*-Signal (PQS). Anders als die beiden Homoserinlacton-Signalmoleküle wird PQS in der frühen Stationärphase gebildet. Als 2-Heptyl-3-Hydroxyl-4-Quinolon, das den Quinolon-Antibiotika ähnelt und zu der Familie der 4-Hydroxy-2-Alkylquinolone (HAQs) zählt, unterscheidet es sich auch strukturell von den Homoserinlactonen. Für die Synthese von PQS wird eine Reihe an Enzymen benötigt, die durch die Operons *pqsABCDE*, *phnAB* und das Gen *pqsH* kodiert werden. Das Operon *phnAB* kodiert eine Anthranilat-Synthetase, die aus Chorismat Anthranilat bildet (Deziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2001). In einem weiteren Schritt wird Anthranilat durch die Genprodukte des zweiten Operons *pqsABCDE* in 4-Hydroxy-2-Heptylquinolon (HHQ) umgewandelt. Da das HHQ von einer Bakterienzelle ausgeschüttet wird und von einer anderen Zelle aufgenommen werden kann, wird schon das HHQ als interzelluläres Signalmolekül angesehen (Deziel *et al.*, 2004). Das HHQ wird letztendlich von der FAD-abhängigen Monooxygenase PqsH durch Hydroxylierung in das Endprodukt PQS umgewandelt (Deziel *et al.*, 2004). Für die Zellantwort auf PQS wird eine aktive MexGHI-OpmD-Effluxpumpe benötigt (Aendekerk *et al.*, 2005).

Die Synthese von PQS ist von dem Verhältnis von 3-oxo-C₁₂-HSL und zu C₄-HSL abhängig und unterliegt einer komplexen Regulation (McGrath *et al.*, 2004; Pesci *et al.*, 1999). Die PQS-Synthese und die Transkription des *pqsABCDE*-Operons werden vom Las-System positiv und vom Rhl-System negativ reguliert (McGrath *et al.*, 2004). In der frühen stationären Phase erhöht PQS die Expression von *lasB*, *rhIR* und *rhII*, zeigt aber keine Beteiligung an der Wahrnehmung der Zelldichte (Diggle *et al.*, 2003; McKnight *et al.*, 2000). Verschiedene Rhl-regulierte Phänotypen zeigen eine strikte Abhängigkeit von PQS, wie die Produktion von Pyocyanin und LectinA (Diggle *et al.*, 2003). Des Weiteren werden die

Biofilmbildung und die Produktion verschiedener QS-abhängiger Pathogenitätsfaktoren, wie z. B. die Elastase LasB durch die exogene Zugabe von PQS verstärkt (Diggle *et al.*, 2003; Calfee *et al.*, 2001; McKnight *et al.*, 2000; Pesci *et al.*, 1999).

3.3 QS-Regulation in *Burkholderia*

Bei der Gattung *Burkholderia* wurde ein ähnliches QS-System wie in *P. aeruginosa* gefunden (Devescovi *et al.*, 2007; Aguilar *et al.*, 2003b; Lewenza *et al.*, 1999). Bei den Mitgliedern des *B. cepacia*-Komplexes wird die Expression der extrazellulären Proteasen, Chitinasen und Polygalacturonasen, sowie die Biofilmbildung und die Schwämbewegungen der Zellen durch die Lux-typischen Regulatoren CepR und CepI kontrolliert (Eberl, 2006; Aguilar *et al.*, 2003a; Lewenza *et al.*, 1999). Bei *B. glumae* konnten die Lux-typischen Regulatoren TofI und TofR identifiziert werden (Devescovi *et al.*, 2007). Auch in diesem Bakterium werden Virulenzfaktoren über das QS-System reguliert, wie die Produktion des Toxins Toxoflavin, die Expression der extrazellulären Lipase LipA, die Expression zweier Polygalacturonasen und die Bildung der polaren Flagellen (Kim *et al.*, 2009; Degraasi *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004). Jedoch unterscheiden sich die Signalmoleküle von *B. glumae* strukturell von den Signalmolekülen von *P. aeruginosa*. *B. glumae* produziert das Signalmolekül N-Octanoyl-L-Homoserinlacton (C₈-HSL) und das geringer konzentrierte N-Hexanoyl-L-Homoserinlacton (C₆-HSL). Dabei scheint C₈-HSL das hauptregulatorische Signalmolekül zu sein, da es die Synthese des Haupt-Virulenzfaktors Toxoflavin und die Synthese der polaren Flagellen reguliert (Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004).

In vielen Bereichen scheint die QS-Regulation von *Burkholderia* der QS-Regulation von *P. aeruginosa* zu ähneln. Ein Hinweis auf die Ähnlichkeit der Systeme gibt die Aufdeckung der PQS-Vorstufen in *B. thailandensis*, *B. ambifaria* und *B. pseudomallei* (Vial *et al.*, 2008; Diggle *et al.*, 2006). Sie unterscheiden sich strukturell wenig von den HAQs von *P. aeruginosa*. Da sie eine zusätzliche Methylgruppe besitzen, werden sie HMAQs (4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinolone) genannt (Vial *et al.*, 2008).

Diese Art der Kommunikation ist nicht Spezies-spezifisch. Durch Zugabe von zellfreiem Kulturüberstand von *P. aeruginosa* zu *B. cepacia* konnte die Proteaseaktivität, die Lipaseaktivität und die Bildung von Siderophoren in *B. cepacia* stark erhöht werden (McKenney *et al.*, 1995). Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass *B. cepacia* auf die Signalmoleküle von *P. aeruginosa* reagiert und es konnte erstmals gezeigt werden, dass zwischen *P. aeruginosa* und *B. cepacia* eine unidirektionale Kommunikation erfolgt und dadurch die Infektion von CF-Patienten koordiniert werden kann, wie z. B. durch Bildung von Biofilmen (Riedel *et al.*, 2001; McKenney *et al.*, 1995).

4 Biofilme

Der größte Teil der in der Natur vorkommenden Bakterien existiert in sogenannten Biofilmen. Ein Biofilm ist eine strukturierte Zellgemeinschaft, die in einer selbstproduzierten Matrix eingelagert ist und einer abiotischen oder biotischen Oberfläche anhaftet (Whitchurch *et al.*, 2002). Die physiologische Struktur der Biofilme kann von dünnen Biofilmen bis hin zu stark-strukturierten pilzförmigen Biofilmen variieren. In manchen Fällen besteht die Population eines Biofilms aus einer Spezies, sie kann aber auch aus verschiedenen Spezies bestehen (Tomlin *et al.*, 2001). Ein Biofilm bietet den Bakterien einen enormen Vorteil, da sie durch die Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) vor Bioziden (Antibiotika oder Desinfektionsmittel) und vor Austrocknung geschützt sind (Stoodley *et al.*, 2002; Watnick & Kolter, 2000). Des Weiteren bietet ein Biofilm einen perfekten Lebensraum mit konstanten Lebensbedingungen für die angepassten Bakterien sogar in schwer zu erschließenden Habitaten. Durch den engen Kontakt zwischen den Individuen des Biofilms wird der Austausch von genetischem Material ermöglicht, durch den die Bakterien erhebliche Selektionsvorteile erlangen können (Watnick & Kolter, 2000).

Die Entstehung von Biofilmen lässt sich in fünf verschiedene Phasen aufteilen (Sauer *et al.*, 2002). (i) Die initiale Adhäsion, (ii) die irreversible Bindung, (iii/iv) die Reifungsphase, die in aufeinander zuwachsen und übereinander wachsen der Zellen unterteilt wird und (v) die Ablösungs-Phase. Bei der initialen Adhäsion kontaktieren die Zellen reversibel die Phasengrenze über schwache Bindungskräfte wie elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Im Wesentlichen ist der Anhaftungsprozess von der Oberflächenbeschaffenheit der Zelle (Bruinsma *et al.*, 2001), aber auch von den Zelloberflächen-exponierten Flagellen und Pili abhängig (Klausen *et al.*, 2003; O'Toole & Kolter, 1998). In der zweiten Phase haften die Zellen irreversibel an der Oberfläche. Durch Akkumulation der Zellen werden sogenannte Mikrokolonien gebildet. Der Stoffwechsel wird der Lebensweise in der Mikrokolonie angepasst, wodurch es neben der Produktion von EPS zu vielen weiteren Unterschieden in der Expression verschiedener Gene im Vergleich zur planktonischen Lebensweise kommt (Sauer *et al.*, 2002). In der 3. Phase nähern sich die Mikrokolonien durch das logarithmische Wachstum aneinander an, um in Phase 4 schließlich übereinander zu wachsen, wobei ein Gleichgewicht zwischen Wachstum und Ablösen der Zellen besteht. Mit der Zeit differenziert sich der Biofilm zu einer dreidimensionalen, heterogenen Struktur mit Bereichen von hohen Zelldichten und Kanälen, die der Nährstoffversorgung und der Entsorgung von Abfallprodukten dienen (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Dabei ist das Biodetergenz Rhamnolipid essentiell für die Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Kanäle (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). In Phase 5 kommt es zum Ablösen von einzelnen Zellen oder Zellaggregaten durch aktive Bewegung oder passiv, wodurch Löcher in der Biofilmstruktur entstehen (Sauer *et al.*, 2002). Als

Regulator dient hier das Zelldichte-abhängige QS-System, das auch für die Differenzierung des Biofilms essentiell ist (De Kievit, 2009; Parsek & Greenberg, 2005).

Das Bakterium *P. aeruginosa* dient bei der Untersuchung von Biofilmen als Modellorganismus (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole & Kolter, 1998). Das humanpathogene Bakterium ist der Haupterreger von Lungeninfektionen bei CF-Patienten, wobei es zu Biofilmbildung in den Lungen der Patienten kommt. Die Gattungen, die zu dem *B. cepacia* Komplex zählen, sind neben *P. aeruginosa* weitere Erreger der Lungeninfektionen und können mit *P. aeruginosa* die Infektion koordinieren und gemischte Biofilme bilden (Eberl & Tummler, 2004; Tomlin *et al.*, 2001).

Die Biofilmbildung bietet jedoch auch hohes biotechnologisches Potential und kann in vielfacher Weise genutzt werden (Boltz & Daigger, 2010; Tian *et al.*, 2010; Macias-Flores *et al.*, 2009; Wang & Chen, 2009). Mit Hilfe des Biofilms können Mikroorganismen oder Enzyme Oberflächen-gebunden fermentiert werden (Boltz & Daigger, 2010), was verschiedene Vorteile bringt, wie z. B. Erreichen von höheren Zelldichten oder vereinfachte Isolierung der entstandenen Produkte. Weit verbreitet ist außerdem die Abwasserreinigung mit Biofilm-Reaktoren oder die Abfallbehandlung durch den biologischen Abbau von kontaminierenden Substanzen, wie Atrazin (Macias-Flores *et al.*, 2009). Auch bei der Herstellung von Biokraftstoff oder biologisch-produziertem Wasserstoff hat sich der Biofilmreaktor bewährt (Tian *et al.*, 2010; Wang & Chen, 2009).

5 Rhamnolipide

5.1 Rhamnolipide bei *P. aeruginosa*

Rhamnolipide sind von Bakterien produzierte Biodetergenzien, die erstmals in *P. aeruginosa* von Jarvis & Johnson, 1949 beschrieben wurden. Aus chemischer Sicht sind Rhamnolipide (Rhl) Glykolipide, deren Lipidanteil aus Fettsäuren besteht, die durch Esterbindungen an einen Zucker geknüpft sind (Abbildung 4). Der Zuckeranteil setzt sich aus einem oder zwei glykosidisch verknüpften Rhamnosemolekülen zusammen (Abbildung 4). Durch den lipophilen Fettsäureanteil und dem hydrophilen Kohlenhydratanteil besitzen Rhamnolipide einen amphipatischen Charakter. Generell lassen sich Rhamnolipide in zwei Gruppen einteilen: Mono-Rhamnolipide mit einem Rhamnosemolekül und Di-Rhamnolipide mit zwei Zuckermolekülen (Abbildung 4).

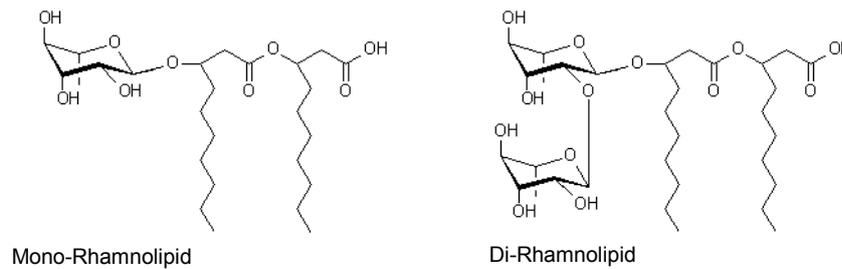


Abbildung 4: Struktur von Rhamnolipiden in *P. aeruginosa*. Man unterscheidet bei den Rhamnolipiden zwischen Mono-Rhamnolipiden mit nur einem Zuckermolekül und den Di-Rhamnolipiden mit zwei Rhamnosemolekülen. *P. aeruginosa* produziert Rhamnolipide mit β -Hydroxydekanensäuren, die Kettenlängen der Fettsäuren der Rhamnolipide variieren.

In *P. aeruginosa* werden die für die Rhl-Synthese zuständigen Rhamnosyltransferasen von *rhlA*, *rhlB* und *rhlC* kodiert, wobei *rhlA* und *rhlB* in einem Operon liegen (Ochsner *et al.*, 1994). Das *rhlC*-Gen befindet sich stromabwärts von *rhlAB* und bildet dem ORF PA1131 ein Operon (Rahim *et al.*, 2001). Die Funktion von PA1131 konnte bisher nicht näher geklärt werden (Rahim *et al.*, 2001). RhlA ist an der Synthese der Rhamnolipid-Vorstufen 3-(3-Hydroxyalkanoyl)-Hydroxyalkansäure (HAA) und an der Verknüpfung der Fettsäure-Dimere beteiligt (Soberon-Chavez *et al.*, 2005; Deziel *et al.*, 2003). Anschließend katalysieren die Rhamnosyltransferasen RhlB und RhlC den Rhamnosyl-Transfer an das HAA und die Mono- (Rha-C₁₀-C₁₀) bzw. Di-Rhamnolipide (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) werden synthetisiert (Rahim *et al.*, 2001; Ochsner, 1993, siehe Abbildung 4).

P. aeruginosa nutzt dieses Biodetergenz zur Erschließung wasserunlöslicher Verbindungen als Nährstoffe, womit die Rhamnolipide essentiell sind um aliphatische Kohlenstoffe aufzunehmen (Zhang & Miller, 1992). Sie sind nachweislich an der Biofilmbildung beteiligt, indem sie an dem Aufbau der Kanäle für die Nährstoffversorgung beteiligt sind (Davey *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2003). Rhamnolipide gelten auch als Virulenzfaktoren bei *P. aeruginosa*, da sie eine hämolytische Wirkung besitzen und die Lyse verschiedener Komponenten des Wirts-Immunsystems bewirken, wie z. B. von Makrophagen und polymorphen Leukozyten (Alhede *et al.*, 2009; Van Gennip *et al.*, 2009).

Zusätzlich besitzen Rhamnolipide hohe biotechnologische Relevanz (Banat *et al.*, 2000a), da sie eine antimikrobielle Wirkung aufweisen und in der Herbizid-, Fungizid- und Bakteriozidindustrie eingesetzt werden können (Benincasa *et al.*, 2004; Haba *et al.*, 2003; Abalos *et al.*, 2001; Maier & Soberón-Chávez, 2000). Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz als Detergenz, wobei das Biodetergenz einige Vorteile gegenüber den chemisch hergestellten Detergenzien besitzt. Aufgrund der schlechten biologischen Abbaubarkeit chemischer Detergenzien führen diese zu Kontamination von Böden und Wasser (Sponza & Gok, 2010; Banat, 2000b; Poremba *et al.*, 1991). Die Rhamnolipide hingegen werden sogar bei der Öltankerreinigung oder der Sanierung von Xenobiotika-kontaminierten Böden eingesetzt, da sie die aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffe wie Hexadekan,

Paraffin, Anthracen und Phenathren in die wässrige Phase überführen und die Bioverfügbarkeit für natürliche Bodenbakterien erhöhen (Sandrin *et al.*, 2000; Herman *et al.*, 1997).

5.2 Rhamnolipide bei *Burkholderia*

Haussler und Mitarbeiter beschrieben erstmals die Aufreinigung und Charakterisierung eines Glykolipids in *B. pseudomallei* (Haussler *et al.*, 1998). Das Glykolipid, das als 2-O- α -L-Rhamnopyranosyl- α -L-Rhamnopyranosyl- β -hydroxytetradecanoyl- β -hydroxytetradecanoat (Rha-Rha-C₁₄-C₁₄) identifiziert wurde, ist als cytotoxisches Exolipid beschrieben, das eukaryotische Zellen morphologisch verändern kann (Haussler *et al.*, 2003; Haussler *et al.*, 1998). Weitere Rhamnolipide konnten in *B. plantarii* gefunden werden, welches ein Gemisch aus drei Rhamnolipiden produziert. Das dominante Rhamnolipid war identisch zu dem Rhamnolipid von *B. pseudomallei*. Es zeigte endotoxische Aktivität und löst in Humanzellen die Bildung von proinflammatorischen Cytokinen aus (Andra *et al.*, 2006). Als dritte Spezies von Rhamnolipid-produzierenden *Burkholderia*-Stämmen wurde *B. thailandensis* identifiziert, das neben anderen Di-Rhamnolipiden überwiegend ein Di-Rhamnolipid mit zwei C₁₄-Ketten herstellt (Dubeau *et al.*, 2009), was charakteristisch für *Burkholderia* zu sein scheint. *B. thailandensis* zeigt jedoch die Besonderheit, dass es zwei identische Gencluster mit den funktionellen Genen *rhIA*, *rhIB* und *rhIC* aufweist (Dubeau *et al.*, 2009).

Die Gattung *Burkholderia* besitzt Rhamnolipid-produzierende Stämme, die im Gegensatz zu *P. aeruginosa* insbesondere Di-Rhamnolipide mit zwei C₁₄-Ketten produzieren. Auch diese längerkettigen Rhamnolipide zeigen Oberflächen-aktive Eigenschaften und werden an biotechnologischer Relevanz sicherlich noch zunehmen.

Die Rhamnolipid-Bildung in *B. glumae* wurde bisher nicht näher untersucht. Dieses Bakterium würde sich jedoch eher für die industrielle Produktion eignen als die schon untersuchten *Burkholderia*-Gattungen, die zu den humanpathogenen Bakterien zählen.

6 Ziele der Arbeit

Das Bakterium *Burkholderia glumae* zeichnet sich, obwohl es bisher noch relativ unbekannt ist, durch verschiedene interessante Eigenschaften aus. Es sekretiert eine Lipase, die in vielen industriellen Bereichen Anwendung findet. Daher wurde diese Lipase im Gegensatz zum Bakterium bereits charakterisiert (Boekema *et al.*, 2007; El Khattabi *et al.*, 2003; El Khattabi *et al.*, 2000; Jaeger *et al.*, 1994; Noble *et al.*, 1994; Frenken *et al.*, 1993b; Frenken *et al.*, 1993a; Frenken *et al.*, 1993; Noble *et al.*, 1993; Frenken *et al.*, 1992). Durch chemische Mutagenese wurde außerdem ein Lipase-Produktionsstamm hergestellt, der sich durch Sekretion einer höheren Lipasemengen auszeichnet (Boekema *et al.*, 2007).

Anhand der Homologien der Sequenzen ihrer Lipasen und deren Organisation zeigt sich die Ähnlichkeit von *P. aeruginosa* und *B. glumae*. Dadurch ist es möglich, viel von dem Wissen über das gut charakterisierte Bakterium *P. aeruginosa* auf *B. glumae* zu übertragen. Dennoch eignet sich *B. glumae* aus biotechnologischer Sicht besser für industrielle Anwendungen, da *B. glumae* nach der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) in die Sicherheitsstufe 1 eingeordnet wird, womit keine bekannten Risiken für die menschliche Gesundheit oder Umwelt beim Umgang mit diesem Bakterium bestehen. *P. aeruginosa* hingegen ist als potentiell humanpathogener Organismus der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet. Bakterien der Sicherheitsstufe 2 sind in der biotechnologischen Anwendung begrenzt, da sie in großen Bereichen der europäischen Industrie, wie z. B. Lebensmittelindustrie, Pharmaindustrie oder Kosmetikindustrie nicht eingesetzt werden dürfen.

Das wirkliche biotechnologische Potential von *B. glumae* konnte bisher nicht vollständig gezeigt werden, da die Genomsequenz noch unbekannt ist. Die Vergleiche mit *P. aeruginosa* oder anderen humanpathogenen *Burkholderia*-Stämmen zeigen jedoch, dass *B. glumae* näherer Untersuchungen wert ist, da *B. glumae* sicherlich noch weitere biotechnologisch relevante Eigenschaften besitzt.

Am Genom-Sequenzierungslabor der Universität Göttingen wurde zunächst das Genom von *B. glumae* sequenziert und in Kooperation annotiert werden. Es wird postuliert, dass der Transport der biotechnologisch relevanten Lipase über ein Typ II-Sekretionssystem erfolgt. Da dieses System bereits ein biotechnologisch interessantes Protein transportiert, sollte überprüft werden, ob weitere interessante Proteine über dieses System sekretiert werden. Daher sollte ein *gspD*-defizienter *B. glumae*-Stamm näher untersucht werden, der das essentielle Porenprotein nicht synthetisiert. Da bei *P. aeruginosa* die Deletion des Porenproteins GspD durch den Einsatz anderer Porenproteine aufgehoben werden kann, sollte eine zweite Mutante von *B. glumae* untersucht werden, bei der das System vollständig funktionsunfähig ist (*gspDEF*-defiziente Mutante).

Des Weiteren sollten physiologische Eigenschaften, die biotechnologische Relevanz zeigen, wie z. B. die Biofilmbildung oder die Rhamnolipid-Produktion, in *B. glumae* näher untersucht werden. Im Hinblick auf die Homologie zu *P. aeruginosa* sollte überprüft werden, wo Homologien zwischen den Gattungen bestehen und wo Unterschiede auftreten.

Bei diesen Untersuchungen sollte sich zeigen, ob *B. glumae* neben der Sekretion einer Lipase noch andere biotechnologisch relevante Proteine sekretiert oder relevante physiologische Eigenschaften aufweist und damit die biotechnologische Bedeutsamkeit des Bakteriums steigt.

II Material und Methoden

1 Bakterienstämme

Tabelle 2: Genotypen aller verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
PG1	Wildtyp	Urakami <i>et al.</i> , 1994
PG1 Δ <i>gspD</i>	PG1, <i>gspD</i> ::Km ^R	S. Isenhardt, unveröffentlicht
PG1 Δ <i>gspDEF</i>	PG1, <i>gspDEF</i> ::Km ^R	S. Isenhardt, unveröffentlicht
PG1 Δ <i>lipA</i>	PG1, <i>lipA</i> ::Gm ^R	diese Arbeit
<i>B. plantarii</i> DSM 9509	Wildtyp	Urakami <i>et al.</i> , 1994
DH5 α	F-, ϕ 80 <i>dlacZ</i> M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrAB</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
S17-1	Ec294::[RP4-2(<i>Tc</i> ::Mu)(<i>Km</i> ::Tn7)], <i>pro</i> , <i>res</i> , <i>recA</i> , T ^r , Sm ^r	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4	<i>traG</i> :: <i>lacZ traR</i> (pZLR4); HSL-Sensorstamm	Cha <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus subtilis</i>	Wildtyp	Laborstamm, IMET
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	mini Tn5; HSL-Sensorstamm	McClellan <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Wildtyp	Holloway <i>et al.</i> , 1979
<i>Serratia marcescens</i> W838	Wildtyp <i>pig</i> ⁺	Laborstamm, IMET
<i>Staphylococcus aureus</i>	Wildtyp	Laborstamm, IMET

2 Vektoren und rekombinante Plasmide

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Vektoren und rekombinanter Plasmide.

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
pBBR1MCS	<i>rep mob lacZ</i> α P _{lac} P _{T7} Cm ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pSUP202	ColE1 <i>rep mob</i> Cm ^R Tc ^R Amp ^R	Simon <i>et al.</i> , 1983
pBSL142	Ap ^R , Gm ^R , ColE1	Alexeyev, 1995a
pBBR <i>gfp</i>	<i>Xho</i> I/ <i>Sac</i> I-Fragment mit <i>gfp</i> in pBBR1MCS	S. Schell, unveröffentlicht
pBBR Δ <i>lipA</i>	3200 bp <i>Xho</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment mit 750 bp homologen Bereichen up-/downstream von <i>lipA</i> mit Gm ^R -Kassette aus pBSL142 in pBBR1MCS	diese Arbeit
pSUP Δ <i>lipA</i>	3200 bp <i>blunt-end</i> Fragment aus pBBR Δ <i>lipA</i> in pSUP202	diese Arbeit
pBBR <i>lipA</i>	1076 bp <i>Xho</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment mit <i>lipA</i> in pBBR1MCS	diese Arbeit

pBBR <i>gspD</i>	2349 bp <i>KpnI/HindIII</i> Fragment mit <i>gspD</i> in pBBR1MCS	diese Arbeit
pBBR <i>gspDEF</i>	5052 bp <i>KpnI/HindIII</i> Fragment mit <i>gspDEF</i> in pBBR1MCS	diese Arbeit

3 Oligonukleotide und Sequenzierungen

3.1 Verwendete Oligonukleotide

Als Startermoleküle (*Primer*) für Polymerasekettenreaktionen (8.5) wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Diese wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'→3')	Tm (°C)	Länge (bp)	Verwendung
lipA-Xba-1-up	AATCTAGATGCTCGGCATCGCGTT CGTCAACAT	69,5	33	Up-Primer für Fragment 1 zur Herstellung der LipA-Mutante, mit <i>XbaI</i> -Schnittstelle
lipA-PstMlu-1-dwn	AACTGCAGACGCGTGTATTATCTCC ATCGTTATCGGTTA	70,5	38	Down-Primer für Fragment 1 zur Herstellung der Lipase-Mutante, mit <i>PstI/MluI</i> -Schnittstelle
lipA-PstMlu-2-up	AACTGCAGACGCGTACGTGAACC GGCTCAAGCTGCA	75,2	36	Up-Primer für Fragment 2 zur Herstellung der LipA-Mutante, mit <i>PstI/MluI</i> -Schnittstelle
lipA-Hind-2-dwn	CCCAAGCTTTGCTCA GGGCTCAGCGTGGTGTCGTT	71,9	34	Down-Primer für Fragment 2 zur Herstellung der LipA-Mutante, mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle
lipA-Xho-RBS-up	AAGCTCGAGAAGAAGGAGATATA ATGGTCAGAT	65,8	33	Up-Primer für <i>lipA</i> mit RBS und <i>XhoI</i> -Schnittstelle
lipA-Hind-dwn	ATTAAGCTTTCACACGCCCTGCAG	62,7	24	Down-Primer für <i>lipA</i> mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle
GspD-Kpn-up	AAGGGTACCTCGGATACGGTCAC AT	64,6	25	Up-Primer für <i>gspD</i> mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
GpsD-Hind-dwn	CCCAAGCTTAGCTCGCTCACGGT T	66,1	24	Down-Primer für <i>gspD</i> mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle
GspDEF-Kpn-RBS-up	AAGGGTACCAAGAAGGAGATATA ATGACAACCAT	65,9	34	Up-Primer für <i>gspDEF</i> mit RBS und <i>KpnI</i> -Schnittstelle
GspDEF-Hind-dwn	CCCAAGCTTCTACTGCACCATGTT	61,0	24	Down-Primer für <i>gspDEF</i> mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle

RT-rpoD-up	ATCTCGATCGCGAAGAAGTA	55,3	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-rpoD-dwn	CGCATAGGTTCCGGAGAACTTGT	57,3	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-rhlA-up	CGCATCATGAAGCTCTACAA	59,4	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-rhlA-dwn	CGTGAAGTGGTCGAGATAGG	55,3	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-rhlB-up	CTACGTGTCGGTGCAGGT	58,2	18	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-rhlB-dwn	GTGATGAGCCCCGTCTTC	58,2	18	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-rhlC-up	TGTTCCGACCAGGACTCGAC	58,8	19	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-rhlC-dwn	AGGTAGCGCTGTTTCGTTCT	56,7	19	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-lipA-up	CTATCCGGTGATCCTCGTC	58,8	19	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-lipA-dwn	GAGAGATTCGCGACGTACAC	59,4	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-gspD-up	AACTACCAGATCGGCAACAA	55,3	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-gspD-dwn	CACCATCAGGTTGGTCTTCT	57,3	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-gspE-up	GTGCAGTTCGACAAGCTGAT	57,3	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-gspE-dwn	CGTCATGATGTTGGTGGTC	56,7	19	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-gspF-up	CGACTTCCCCGAGATCTAT	56,7	19	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse
RT-gspF-dwn	AGCACGATCTTCTGCTTCAG	57,3	20	<i>RealTime</i> -PCR-Analyse

3.2 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden als Auftragsarbeit von der Firma Sequiserve GmbH (Vaterstetten) durchgeführt.

4 Nährmedien und Zusätze

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Medien 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm) und dem Medium nachträglich zugesetzt (T < 60 °C).

4.1 Nährmedien

4.1.1 LB-Flüssigmedium

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

4.1.2 LB-Agar

Agar	15 g
------	------

LB-Flüssigmedium ad 1000 ml

4.1.3 Minimalmedium MME (50x) (Vogel & Bonner, 1956)

K ₂ HPO ₄	500 g
Na(NH ₄)HPO ₄ × 4 H ₂ O	175 g
Citrat	100 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10 g
A. dest.	ad 670 ml

Das Medium wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt und anschließend autoklaviert. Vor der Nutzung wurde das Medium 1:50 verdünnt und 0,5 % (w/v) Glukose als Kohlenstoffquelle zugesetzt.

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 15 g/l Agar zugesetzt.

4.1.4 Minimalmedium M9

Lösung 1	40 g/l Glukose
Lösung 2	25 g/l MgSO ₄ × 7 H ₂ O
Lösung 3	2 g/l CaCl ₂ × 2 H ₂ O
Lösung 4	70 g/l Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O
	30 g/l KH ₂ PO ₄
	5 g/l NaCl
	10 g/l NH ₄ Cl

Die Komponenten wurden getrennt autoklaviert und in folgendem Verhältnis eingesetzt:

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

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 15 g/l Agar zugesetzt.

4.1.5 Minimalmedium M63 (10x)

KH ₂ PO ₄	136 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg/l
Citrat	20 g/l

Das Medium wurde auf pH 7,2 eingestellt. Nach dem Autoklavieren und vor dem Gebrauch des Mediums wurde es 1:10 verdünnt und 1 ml einer 1 molaren MgSO₄ × 7H₂O-Lösung zugesetzt.

4.1.6 ABG-Medium

AB Salz (x20)	20 g/l NH ₄ Cl
	6 g/l MgSO ₄

	3 g/l KCl
	0,2 g/l CaCl ₂
	0,05 g/l FeSO ₄
AB Puffer (x20)	60 g/l K ₂ HPO ₄
	23 g/l NaH ₂ PO ₄

Die Komponenten wurden getrennt autoklaviert und in folgendem Verhältnis eingesetzt:

AB Salz (x20)	5 % (v/v)
AB Puffer (x20)	5 % (v/v)
Glukose	0,2 % (w/v)

4.1.7 Plattentests zur Untersuchung der Beweglichkeit

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.

Twitching motility:

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

4.1.8 Plattentest zur Untersuchung von enzymatischen Aktivitäten

Tributylin-Indikator-Platten (Kok *et al.*, 1993):

7,5 ml Tributyrin m, 0,75 g Gummi arabicum mit 15 ml A. dest. mischen, emulgieren und zu 500 ml autoklaviertem LB-Agar (60 °C) geben.

Protease-Indikator-Platten (Magermilch-Platten):

Für die Herstellung der Platten wird LB-Agar mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (30 min, 105 °C) versetzt.

4.2 Antibiotika

Tabelle 5: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration in <i>E. coli</i> -Medien (µg/ml)	Konzentration in <i>B. glumae</i> -Medien (µg/ml)
Chloramphenicol (Cm)	50	200
Gentamycin (Gm)	10	10
Kanamycin (Km)	50	50
Tetracyclin (Tc)	10	40

5 Enzyme und Chemikalien

5.1 Verwendete Enzyme

Enzym	Bezugsfirma
<i>Pfu</i> -Polymerase	Isoliert und gereinigt im IMET
Trypsin	Promega GmbH (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Phusion High-Fidelity-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
RNase-freie DNase	Promega GmbH (Mannheim)

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie deren zugehörige Enzympuffer wurden von der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) bezogen.

5.2 Verwendete Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika, Chemikalien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen in p.A.-Qualität bezogen:

Antibiotika: AppliChem (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Sternheim)

Chemikalien: Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein), Amersham Pharmacia (Freiburg), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt)

Medienkomponenten: Difco (Detroit, USA), Fluka (Sternheim), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen)

6 Mikrobiologische Methoden

6.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Flüssigmedium bei 37°C (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *B. subtilis*, *S. aureus*) bzw. in MME-Minimalmedium unter Zugabe einer Kohlenstoffquelle bei 30°C (*Burkholderia*). Übernachtkulturen (ÜK) wurden für mindestens 24 h inkubiert. Kulturen mit einem Volumen bis zu 5 ml wurden im Reagenzglas auf einem Brutroller, größere Kulturen im Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen: max. 1/5 - 1/10 des Gefäßvolumens) auf einem Inkubationsschüttler bei 120 UpM bebrütet. Vorkulturen wurden in dem entsprechendem Flüssigmedium angelegt und entweder mit einer Einzelkolonie oder mit 1/100 Volumen aus einer Gefrierkultur inokuliert. Hauptkulturen wurden aus einer ÜK auf eine Zelldichte, die einer O.D._{580 nm} von 0,05 entsprach, angeimpft. Die Zelldichten von Kulturen wurden durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Eine O.D._{580 nm} von 1 entspricht einer Zellzahl von etwa 2×10^9 pro ml Kultur. Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedium ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7,5% (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C gelagert. Stämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzen wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tab. 7) kultiviert.

6.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Transformation sowie die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan, 1983 durchgeführt.

6.3 Konjugation von *E. coli* S17-1 mit *B. glumae* PG1

Zum konjugativen Transfer von mobilisierbaren Plasmiden wurde die Methode des „biparentalen matings“ genutzt. Der als Donor verwendete *E. coli*-Stamm S17-1 trägt die *tra*-Gene des RP4-Plasmids Simon *et al.*, 1983 stabil im Genom integriert.

Als Rezipient diente der *B. glumae*-Stamm PG1. Die Anzucht der *B. glumae*- und *E. coli*-Stämme erfolgte in den entsprechenden Medien (4.1) unter entsprechendem Selektionsdruck μ N bei 30°C (*B. glumae*) bzw. 37°C (*E. coli*).

Je 2 ml der Rezipientenkultur und je 1 ml der Donorkultur wurden in einem EPG gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml LB-Medium gewaschen, um die Zellen von den entsprechenden Antibiotika zu befreien. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (7870 × g, EZ, RT) und dekantiert. Anschließend wurden sie in ihrem Restüberstand resuspendiert und auf einen Kreuzungsfilter auf LB-Medium gegeben. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden bei 30°C wurde der Filter in ein EPG mit LB-Medium gegeben und die Zellen wurden durch vortexen von dem Filter gelöst. Verdünnungen von 10⁻¹⁰ dieser Zellen wurden auf entsprechendem MME-Agar (4.1.3) ausplattiert. Zur Kontraselektion des *E. coli*-Donorstamms genügte der MME-Agar.

7 RNA-Techniken

7.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde ein Aliquot der Bakterienkultur (~ 2 ml) in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Das Zellpellet wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Isolierung von RNA aus *B. glumae* erfolgte durch die Verwendung des RNeasy Mini-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller. Die Entfernung der DNA aus den Proben erfolgte mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets der Firma Qiagen und der RQ1 RNase-Free DNase der Firma Promega nach Angaben der Hersteller.

Die präparierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

7.2 Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte photometrisch mit Hilfe des BioPhotometers der Firma Eppendorf nach Herstellerangaben in einer TrayCell Kuvette der Firma Hellma.

7.3 Reverse Transkription von RNA mit anschließender *RealTime*-PCR

Zur Bestimmung der Menge spezifischen Transkripts in der Gesamt-RNA einer Probe wurde dieses Transkript mit Hilfe von Reverser Transkriptase in cDNA transkribiert und anschließend mittels *RealTime*-PCR quantifiziert. Dazu wurde das QuantiTect SYBR-Green One Step PCR Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden für die *RealTime*-PCR jeweils Ansätze zu 20 μ l Gesamtvolumen eingesetzt. Die notwendigen

Oligonukleotidstartermoleküle (*Primer*, Tabelle 6) für die reverse Transkription der RNA sowie für die anschließende *RealTime*-PCR mit der gebildeten cDNA als Matrize wurden mit Hilfe der „Primer3“-Software ermittelt.

Die Programmeinstellungen waren folgende:

Produktlänge: 100 – 150 bp

Primerlänge: 18 – 30 bp (optimal: 25 bp)

GC-Gehalt: 45 – 65 % (optimal: 60 %)

Schmelztemperatur der Primer: 63 – 67 °C (optimal: 64 °C)

Schmelztemperatur des Produkts: 65 – 85 °C (optimal: 75 °C)

Die *RealTime*-PCR-Reaktionen wurden in einem ep gradient S realplex⁴ Automaten der Firma Eppendorf durchgeführt.

Die relative Quantifizierung erfolgte über die vergleichende $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode (Schmittgen & Livak, 2008):

$$\text{Ct}_{\text{Probe}} - \text{Ct}_{\text{Kontrolle}} = \Delta\text{ct}_{\text{Probe, genormt}}$$

$$\Delta\text{ct}_{\text{Probe, genormt}} - \Delta\text{ct}_{\text{Referenzgen, genormt}} = \Delta\Delta\text{ct}$$

$$2^{-(\Delta\Delta\text{ct})} = \text{Expression des betrachteten Gens im Vergleich zu einem Referenzgen}$$

8 DNA-Techniken

8.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *B. glumae* erfolgte nach der von Birnboim & Doly, 1979 beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung von Mini- und Midiprep-Kits der Firmen Analytik Jena (Jena), Macherey-Nagel (Düren) und Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller.

Die Konzentration von DNA-Präparationen wurde durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

8.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus *E. coli* oder *B. glumae* wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen (Hilden) isoliert.

8.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,6 % - 2 % (w/v) nach Sambrook *et al.*, 1989 elektrophoretisch getrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 x TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA, pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurde die „1kb-ladder“ der Firma Fermentas eingesetzt. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde das Videodokumentationssystem „EagleEye II“ der Firma Stratagene (Heidelberg) zusammen mit der Software „Gel Jet Imager Plus“ der Firma Intas (Göttingen) genutzt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep Gelcleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Angaben des Herstellers.

8.4 *In-vitro*-Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikation von DNA-Enden und Ligation von DNA Fragmenten wurden nach Sambrook *et al.*, 1989 sowie nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des jeweiligen Enzyms in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

8.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Saiki *et al.*, 1988 durchgeführt. 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 pro Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Pfu*- oder Phusion-Polymerase im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten „Mastercycler Gradient“ der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem jeweiligen von den Herstellern empfohlenen Programm durchgeführt. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des „Perfectprep Gelcleanup“-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg).

9 Proteintechniken

9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli, 1970 bestehend aus einem 5 % Sammel- und einem 12 % 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 99°C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung in der Gelapparatur „Mini Protean II Dual Slap Cell“ der Firma BioRad (München) erfolgte bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merrill (1990) mit Coomassie Blue R-250 (Serva, Heidelberg) oder mittels „SimplyBlue SafeStain“ (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt.

9.2 2-D-Gelelektrophorese

9.2.1 Proteinfällung von Kulturüberstand

Der Kulturüberstand wurde mit 40 % (w/v) Trichloressigsäure in Aceton versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden anschließend bei einer Zentrifugation (40 min, 25199 × g, Sorvall Zentrifuge RC5B Plus, SS34) geerntet. Die Proteine wurden zweimal mit eiskalten 100 % Aceton gewaschen und bei Raumtemperatur einige Minuten getrocknet. Zur weiteren Verwendung wurden die ausgefällten Proteine in einem Rehydrierungspuffer (12 g Harnstoff, 0,5 g CHAPS, 500 µl IPG-Puffer, 50 µl 1 % (w/v) Bromphenolblau, 16 ml A. dest) gelöst.

9.2.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte unter Verwendung des „2-D Quant“-Kits der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) nach Angaben des Herstellers.

9.2.3 Rehydrierung der Proteine

Die mit Gel beschichtete Seite der IPG-Streifen für die isoelektrische Fokussierung wurden mit der Probe benetzt, um eine Austrocknen des Gels zu verhindern, wurde der IPG-Streifen außerdem mit Mineralöl benetzt. Die Rehydrierung der Proteine erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

9.2.4 Isoelektrische Fokussierung der Proteine (1. Dimension)

Die IPG-Streifen wurden mit der Gel beschichteten Seite an die Anode gelegt. Auf die IPG-Streifen wurden mit A. dest befeuchtete Papiere gelegt und darauf die Elektroden befestigt. Die Laufkonditionen wurden folgendermaßen eingestellt:

1. <i>Step and hold</i>	500 V	3030 kWh
2. <i>Gradient</i>	1000 V	808 kWh
3. <i>Gradient</i>	8000 V	11311 kWh
4. <i>Step and hold</i>	8000 V	1414 kWh
5. <i>Step and hold</i>	500 V	24 h

Es wurden 50 µM pro IPG-Streifen angelegt.

9.2.5 SDS-PAGE (2. Dimension)

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Streifen equilibriert. Dazu wurde 150 mg Dithiothreitol (DTT) in Equilibrierungspuffer (6 M Harnstoff, 75 mM Tris-HCl (pH 8,8), 84,2 g Glycerol, 4 g SDS, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau, 200 ml A. dest) gelöst und die IPG-Streifen 15 min inkubiert. Anschließend wurden 375 mg Iodacetamid in Equilibrierungspuffer gelöst und die IPG-Streifen weitere 15 min inkubiert.

Für die Gelelektrophorese wurden die Streifen auf die Geloberseite des SDS-Gels (21 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 12,5 Tris-HCl (pH 8,8), 16 ml A. dest, 500 µl 10 % (w/v) SDS, 16,5 µl Temed, 250 µl APS) gelegt und mit Agarose-Lösung (20 ml SDS-Laufpuffer nach Laemmli, 1970, 0,1 g Agarose, 0,002 % (w/v) Bromphenolblau) überschichtet. Die Laufkonditionen betragen 15 min bei 150 V zum Einlaufen der Proteine, anschließend wurde die Spannung auf 200 V hochgesetzt.

9.3 MALDI-TOF

9.3.1 Trypsinverdau der Proteine

Der gewünschte Spot oder die gewünschte Bande wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette aus dem SDS-Gel ausgestochen und in ein Eppendorfgefäß (EPG) übertragen. Es wurden 350 µl einer Lösung (30 % (v/v) Acetonitril, 0,1 M Bicarbonat) zu den gefärbten SDS-Gelstücken gegeben und 20 min bei RT geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und die ersten Schritte wiederholt, bis die Gelstücke nicht mehr gefärbt waren. Die Gelstücke wurde nach der Entfärbung 20 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurden 3 µl einer Trypsinlösung (3 M Tris-HCl (pH 8,8), 20 ng/µl Trypsin) dazu gegeben und der Ansatz 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut 6 µl der Tris-HCl-Lösung ohne Trypsin zugegeben und der Ansatz über Nacht bei RT inkubiert.

Die Peptide wurden nach der Inkubation über Nacht extrahiert. Dazu wurden zunächst 2 µl A. dest hinzugefügt und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 5 µl einer Lösung (30 % (v/v) Acetonitril, 1 % (v/v) TFA) beigefügt und 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

9.3.2 Auftragen der Peptide zur MALDI-TOF-Messung

Zur Messung wurde 1 µl des Peptid-Extrakts auf eine *pre-spotted Anchor-Chip* (PAC)-Platte (Bruker Daltonics, Bremen) aufgetragen und 3 min inkubiert. Anschließend wurden durch Zugabe von 7 µl einer Waschlösung (10 mM Ammoniumphosphat, 0,2 % (v/v) TFA) überschüssige Bestandteile ausgewaschen, 5 s inkubiert und mit einem Wattestäbchen getrocknet.

Die anschließende MALDI-TOF-Messung wurde von Dr. Melanie Brocker, Christina Mack oder Dr. Tino Polen des IBT-1 des Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

9.4 Größenausschluss-Chromatographie

Für die Größenausschluss-Chromatographie wurde eine 500 ml Kultur in einem 5 l-Erlenmeyerkolben für 24 h bei 30°C angezogen. Als Kohlenstoffquelle wurde Olivenöl (Roth) zugefügt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (20 min, 13689 × g, Sorvall Zentrifuge RC5B Plus, SLC-4000, 4°C) abgetrennt und der Überstand filtriert (0,2 µm). Der Überstand wurde mit einem Konzentrator (cut off 50 kDa) auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Dieser wurde per Injektion auf die Säule Superdex 200 (GE Healthcare) aufgetragen. Das Laufmittel bestand aus 100 mM Kpi Puffer (pH 6,5) mit 150 mM NaCl und 1 mM MgCl. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 1 ml/min eingestellt und 2,5 ml wurden pro Fraktion aufgefangen.

Da die Säule vor dem Lauf mit Proteinen mit definierter Größe geeicht wurde, konnte die Größe der Proteine mit folgender Formel ermittelt werden:

V_e = Elutionsvolumen der Probe

V_o = Totvolumen der Säule = 52,23

V_t = Bettvolumen der Säule = 120,6 ml

K_{av} = Verteilungskoeffizient eines Proteins

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Mit Hilfe der K_{av} -Werte der Eichproteine konnte eine Eichgerade erstellt werden:

$$y = -0,3556 x + 2,095$$

Daraus ergibt sich $x = \frac{y - 2,095}{-0,3556}$

Mit 10^x lässt sich anschließend das Molekulargewicht errechnen.

10 Techniken zur Untersuchung von physiologischen Eigenschaften

10.1 Enzymaktivitätstests

10.1.1 Bestimmung der Lipaseaktivität (Winkler & Stuckmann, 1979)

In basischer Lösung adsorbiert abgespaltenes *p*-Nitrophenol Licht der Wellenlänge $\lambda = 410$ nm. Die Absorption von 410 nm ist somit ein Maß für die Aktivität der Lipase. Pro Reaktion wurden 1 ml Substratemulsion (207 mg Natriumdesoxycholat, 100 mg Gummi arabicum, 90 ml Sörensen Phosphatpuffer pH 8,0 (Lösung A: 8,9 g/l Na_2HPO_4 , Lösung B: 0,68 g/l KH_2HPO_4 [A:B \rightarrow 17:1]; 30 mg pNPP in 10 ml Isopropanol) mit 8 μl Probe vermischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 410 nm der einzelnen Ansätze im Spektralphotometer (Thermo Genesis10_{vis}) gemessen. Angegeben werden die Werte als relative Aktivität, wobei die $A_{410\text{nm}}$ auf 1 ml Probenvolumen und auf die Zelldichte ($\text{O.D.}_{580\text{nm}}$) bezogen ist ($A_{410\text{nm}}/\text{O.D.}_{580\text{nm}} \times \text{ml}$).

10.1.2 β -Lactamase-Aktivität

Das Substrat CENTA ist ein chromophores Cephalosporin, das durch β -Lactamasen hydrolysiert wird. Für den Aktivitätstest wurde 1 ml Substratlösung (25 mM KPi -Puffer (pH 7), 5,36 mg CENTA) mit 70-300 μl Probe vermischt, 15 min bei 30°C inkubiert und die einzelnen Ansätze bei $A_{405\text{nm}}$ im Spektralphotometer (Thermo Genesis10_{vis}) gemessen.

10.2 Kultivierung von Biofilmen

10.2.1 Kultivierung von Biofilmen in Mikrotiterplatten (modifiziert nach Peeters *et al.*, 2008)

Die Kultivierung von Biofilmen erfolgte in Mikrotiterplatten der Firma Nunc (Langenselbold). Es wurde 1 ml MME-Medium (4.1.3) mit 1 % (v/v) Olivenöl mit einer $\text{O.D.}_{580\text{nm}} = 0,01$ aus einer 24 h-Kultur ohne Antibiotika-Selektion angeimpft und für 24 h statisch bei 30°C inkubiert. Zum Abstoppen der Biofilmbildung wurden 100 μl Kristallviolett zu den Kulturen zugefügt und 15 min bei RT inkubiert. Das geladene Kristallviolett färbt negativ geladene Bestandteile des Biofilm an. Der Überstand aus Kristallviolett und Medium wurde nach der Inkubation abgenommen und das überschüssige Kristallviolett mit A. dest ausgewaschen. Die Mikrotiterplatte wurde 20 min bei RT getrocknet. Zur Quantifizierung des Biofilms wurden 200 μl Ethanol (reinst.) dazugegeben und die Mikrotiterplatte 10 min leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Ethanol mit dem ausgewaschenen Biofilm in ein EPG übertragen, mit A. dest auf 1 ml aufgefüllt und die Absorption bei 600 nm gemessen.

10.2.2 Kultivierung von Biofilmen auf Objektträgern aus Polystyrol

Zur Kultivierung der Biofilme auf Objektträgern aus Polystyrol wurden die Objektträger zunächst auf die entsprechende Größe gekürzt. Dann wurden sie senkrecht in die Kulturen (10.2.1) platziert und inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Objektträger entnommen und mikroskopiert (10.6) werden.

10.3 Rhamnolipidnachweis

10.3.1 Gewinnung von Kulturüberständen

Die Zelldichte einer Flüssigkultur wurde bestimmt ($O.D._{580nm}$) und die Zellen durch Zentrifugation (3 min, $24100 \times g$, EZ, $4^\circ C$) geerntet. Der Überstand wurde abgenommen und sofort für Orcinol-Tests (10.3.2), TLC (10.3.3), „Autoinducer“-Nachweistests (10.4.1) oder PQS-Extraktion (10.5) verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei $-20^\circ C$ gelagert.

10.3.2 Drop-collapsing Test

10 μl des Kulturüberstands einer 24h Kultur, die in 20 ml MME-Medium bei $30^\circ C$ inkubiert wurde, wurde auf den Deckel einer Petrieschale pipettiert (Lindum *et al.*, 1998). Die Form eines Tropfens gibt Aussage über das Vorhandensein an Biodetergenz. Je mehr Detergenz im Kulturüberstand vorhanden ist umso geringer die Oberflächenspannung und umso geringer der Halt des Tropfens in Kugelform.

10.3.3 Orcinol-Test (Chandrasekaran & Bemiller, 1980, modifiziert nach Ochsner, 1993)

Der Orcinol-Test ist ein photometrischer Test zum Nachweis von 3-Desoxy-Hexosen (z. B. Rhamnose) und somit ein indirekter Test zur Rhamnolipid-Quantifizierung. Im sauren Medium entsteht beim Erhitzen durch Fettsäure-Hydrolyse und Furfural-Bildung der 3-Desoxy-Hexose eine Chromophor-Formation des Zuckers. Das Furfural kondensiert mit dem Orcinol (3,5-Dihydroxytoluene) und es entsteht ein orange-brauner Farbumschlag, der bei einer A_{421nm} photometrisch detektiert werden kann. In diesem Versuch erfolgte eine Probenabnahme nach 24 und 48 h von MME-Flüssigkulturen, die bei $30^\circ C$ schüttelnd (120 UpM) bebrütet worden waren. Es wurden 300 μl der gewonnenen Kulturüberstände mit 300 μl A. dest. versetzt. Durch zweimalige Extraktion mit je 600 μl Ethylacetat wurden die Rhl aus der Probe isoliert. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden in einer Vakuumzentrifuge vollständig evakuiert. Nach Zugabe von 100 μl A. dest., 100 μl 1,6 % Orcinol und 800 μl H_2SO_4 (60 %) wurden die Proben gemischt und 30 min bei $80^\circ C$ schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert und die A_{421nm} gegenüber einer Testlösung ohne Probe photometrisch bestimmt. Parallel zu den Messproben wurde eine Konzentrationsreihe des Rhamnolipid-Standards (0,01 % (w/v) Rhamnolipid) gemessen. Mit Hilfe einer Eichgerade für den Standard wurde die Rhl-Konzentration der Proben ermittelt.

10.3.4 Dünnschichtchromatographie (Syldatk *et al.*, 1985)

Die TLC-Chromatographie wurde mit den Rhl aus den Kulturüberständen (10.3.1) der *B. glumae* MME-Kulturen durchgeführt. Eine Probenentnahme erfolgte nach 24 und 48 h. Die Rhl aus den Kulturüberständen wurden direkt mit Ethylacetat extrahiert (10.3.2). Nach vollständiger Evakuierung der Ethylacetat-Phasen wurden die Rhl in 10 μl Ethanol aufgenommen und punktuell mit einer Eppendorf-Pipette auf die Kieselgelplatte (Kieselgel 60 F₂₅₄ (Macherey-Nagel)) aufgetragen. Die Platte wurde in einen mit dem Laufmittel (Chloroform:Methanol:Essigsäure (65:15:2) gesättigten Tank gestellt und wieder entnommen, sobald die Lauffront 2 cm von dem oberen Plattenrand entfernt war. Die bei RT getrocknete TLC-Platte wurde mit dem Farbreagens (0,15 g Orcinol, 42 ml A. dest., 8,4 ml H_2SO_4) besprüht und mit einem Heißluftfön getrocknet. Die Rhl-Spots färbten sich braun und

wurden sofort visualisiert (11). Als Standard wurde 0,1 % (w/v) aufgereinigtes Rhl aus *P. aeruginosa* in A. dest, das von S. Bukavaz zur Verfügung gestellt wurde, verwendet.

10.3.5 Aufreinigung von Rhamnolipiden (Deziel *et al.*, 1999)

Die Rhamnolipide wurden nach Deziel *et al.*, 1999 mit leichten Modifikationen aufgereinigt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (30 min, 8281 × g, Sorvall Zentrifuge RC5B Plus, SLC-4000, 10°C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit HCl (37 %) auf einen pH-Wert von 3 angesäuert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Das Präzipitat wurde mittels Zentrifugation (45 min, 13173 × g, Sorvall Zentrifuge RC5B Plus, GSA, 10°C) geerntet und in Wasser (pH 3) gelöst. Die Lösung wurde dreimal gegen Ethylacetat extrahiert und die kombinierten organischen Fraktionen mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend evaporiert. Die eingetrockneten Reste wurde in 0,05 M Natriumhydrogenphosphat gelöst und filtriert. Die Lösung wurde zu einem pH 2 angesäuert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Das Präzipitat wurde mit Zentrifugation (60 min, 9960 × g, EZ, 10°C) geerntet. Anschließend wurden die isolierten Rhamnolipide von Dr. Diana Hofmann und Dr. Beatrix Santiago-Schübel vom Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre (Jülich Forschungszentrum GmbH) mittels HPLC-MS gemessen.

10.4 Extraktion von *N*-Acyl-L-Homoserinlactonen (HSL)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten synthetischen HSL-Moleküle wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dyker (Lehrstuhl Organische Chemie, Ruhr-Universität Bochum) nach der von Eberhard *et al.*, 1981 beschriebenen Methode hergestellt (C₄-HSL, 3-oxo-C₆-HSL, 3-oxo-C₁₂-HSL) oder von der Firma Fluka, Sternheim (C₆-HSL) bezogen. Gelöst wurden HSL stets in Ethylacetat (versetzt mit 0,01 % Essigsäure).

10.4.1 Extraktion von HSL-Signalmolekülen aus Kulturüberständen

Die Extraktion von HSL-Signalmolekülen erfolgte nach einer Kultivierung für 24 h bei 30°C in MME-Medium ohne Antibiotika-Selektion. Dazu wurden 400 µl (oder 20 ml für die HPLC-Messung) der zellfreien Kulturüberstände zweimal mit 400 µl (oder 20 ml für die HPLC-Messung) Dichlormethan versetzt und geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurden die vereinigten Dichlormethanextrakte in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Rückstand für die chromatographische Auftrennung wurde in 10 µl Ethylacetat aufgenommen. Die Proben für die HPLC-Messung wurden bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die Quantifizierung der HSL-Signalmoleküle erfolgte durch HPLC-MS-Analyse (durchgeführt von der Arbeitsgruppe von Prof. Miguel Cámara, School of Molecular Medical Sciences, Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, England).

10.4.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung von HSL-Signalmolekülen

Für den Nachweis und die Identifizierung von HSL-Signalmolekülen nach Shaw *et al.*, 1997 wurden 10 µl der aus Kulturüberständen extrahierten HSL (2.17.1) in geeigneter Verdünnung auf Dünnschichtchromatographie-Platten (RP-18 F_{254S}, 20 × 20 cm, Merck, Darmstadt) aufgebracht und als Laufmittel 60 % Methanol in Wasser verwendet. Als Standards wurden synthetische HSL aufgetragen. Nach der Auftrennung der Proben wurden die DC-Platten für 1 h bei 30°C getrocknet.

10.4.3 Detektion von HSL-Signalmolekülen mit Indikatorbakterien

Der Nachweis von HSL-Signalmolekülen erfolgte nach McClean *et al.*, 1997 bzw. Shaw *et al.*, 1997 mit Hilfe der HSL-Biosensoren *Chromobacterium violaceum* CV026 bzw. *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), die durch gentechnische Veränderungen keine HSL-Signalmoleküle produzieren, aber auf diese Moleküle in detektierbarer Weise reagieren. Bei Anwesenheit geeigneter HSL-Moleküle produziert *C. violaceum* CV026 Violacein, *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) produziert β -Galaktosidase, so dass violette bzw. hellblaue (durch Zugabe des Substrates X-Gal) Spots detektiert werden können. DC-Platten bzw. Agarplatten wurden mit 150 ml bzw. 4 ml Indikatorbakterien in Weichagar überschichtet (für *C. violaceum*: 33 % ÜK in LB, 66 % LB-Agar (1,12 % (w/v) Agar), für *A. tumefaciens*: 33 % ÜK in ABG-Medium, 66 % Agar (1,12 % (w/v)), 100 μ g/ml X-Gal). Nach 24 h Inkubation bei 30°C konnten die entstandenen violetten bzw. hellblauen Spots mit denen der Standard-Moleküle verglichen werden und somit HSL identifiziert und ihre Konzentration abgeschätzt werden.

10.5 Extraktion und Detektion des *Pseudomonas-quinolone*-Signals (PQS)

Die PQS-Extraktion erfolgte nach einer Kultivierung für 24 h bei 30°C in MME-Medium ohne Antibiotika-Selektion. Jeweils 10 ml Kultur wurden mit dem gleichen Volumen Ethylacetat für 30 Sekunden stark gemischt und anschließend zentrifugiert (20 min, 1800 \times g, Hettich Rotina 35R). Die organische Phase wurde in der Vakuumzentrifuge verdampft und der Rückstand in 50 μ l Methanol aufgenommen. Die dünnenschichtchromatographische Auftrennung erfolgte auf Kieselgel-Platten (Kieselgel 60 F₂₅₄ (Macherey-Nagel)). Die DC-Platten wurden zuvor 30 min in 5 % (w/v) KH₂PO₄ inkubiert und nach dem Trocknen 1 h bei 100°C im Hybridisierungssofen erhitzt. Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l der Proben, als Laufmittel wurde Dichlormethan:Methanol (95:5) verwendet. Die DC-Platten wurden unter UV-Licht (254 nm und 365 nm) betrachtet.

10.6 (Fluoreszenz)-Mikroskopie

Tabelle 6: Übersicht über die Komponenten und die angewendeten Einstellungen bei der (Fluoreszenz)-Mikroskopie.

Komponenten	
Mikroskop	Axioplan 2 imaging e
Objektiv	Plan Apochromat 100x/1.40 Oil (DIC III)
Reflektor-Fluoreszenz	37 WtGfp 450/
Reflektor-Phasenkontrast	[8]
Kamera	AxioCamMR3
Belichtungszeit (ms)	1,6 (Phasenkontrast)-15792,8 (Fluoreszenz)

11 Computerprogramme und Datenbanken

Die Erstellung von Klonierungsstrategien erfolgte unter Verwendung des Programms Clone Manager 7.03 (Scientific & Educational Software).

Die Dokumentation und Verarbeitung von SDS-PAGEs sowie Western-Blots erfolgte mit Hilfe der STELLA- sowie AIDA-Software der Firma Raytest.

Die Verarbeitung der Gele der 2-D-Gelelektrophorese erfolgte mit der Software Delta 2D der Firma Decodon.

Die Visualisierung der Dünnschichtplatten erfolgte mit dem CanoScan LiDE 100 und der entsprechenden Software der Firma Canon.

RealTime-PCR-Ergebnisse wurde mit Hilfe der realplex-Software der Firma Eppendorf ausgewertet.

Für die Sequenz- und Datenbankrecherchen sowie Primerdesign im Internet wurden die folgenden Adressen verwendet:

National Center for Biotechnological Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
ISI Web of Knowledge	http://apps.isiknowledge.com
<i>Pseudomonas</i> Genome Database _{v2}	http://www.pseudomonas.com
<i>Burkholderia</i> Genome Database	http://www.burkholderia.com/
ExpASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.org
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu

Für die Annotierung des Genoms von *B. glumae* wurde folgende Datenbank verwendet:

ERGO G2L <http://gl-ergo3.migen.bio.uni-goettingen.de:8080>

III Ergebnisse

1 Genomanalysen

1.1 Allgemeine Daten

Obwohl bekannt ist, dass *B. glumae* PG1 eine extrazelluläre Lipase produziert und damit potentiell großes biotechnologisches Potential aufweist (Boekema *et al.*, 2007), wurde *B. glumae* PG1 bislang weder auf Genom-, noch auf Transkriptom- und Proteinebene charakterisiert. Bisher wurde nur das Genom von *Burkholderia glumae* BGR1 sequenziert und veröffentlicht (Lim *et al.*, 2009). Die Untersuchungen von *B. glumae* BGR1 zielen auf die Charakterisierung der Reispathogenität von *B. glumae* BGR1 ab (Chun *et al.*, 2009; Devescovi *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004), die biotechnologische Relevanz wurde nicht betrachtet. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit dem Göttinger Genomlabor zunächst das Genom von *B. glumae* PG1 vollständig sequenziert und die vorhergesagten Gene annotiert.

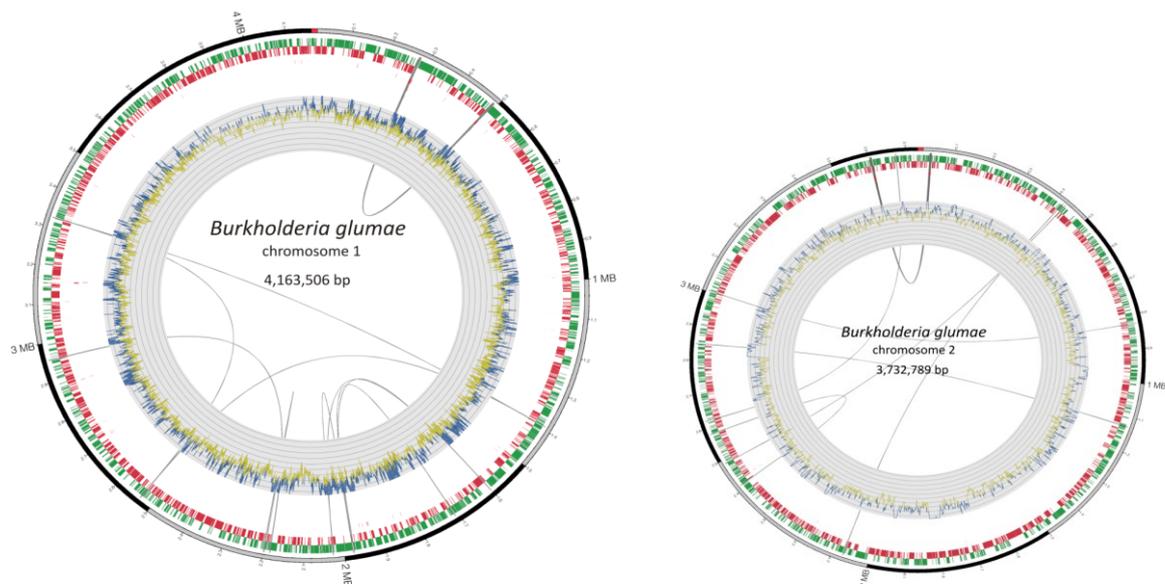


Abbildung 5: Das Genom von *Burkholderia glumae* PG1 (Voget *et al.*, 2010). Das Genom von *B. glumae* besteht aus zwei Chromosomen mit 4,16 Mbp und 3,73 Mbp. Die Protein-kodierenden Gene des Leitstrangs sind in grün, die des Folgestrangs in rot angegeben. Repetitive Bereiche innerhalb der Chromosomen werden durch verbindende Linien angezeigt.

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der Sanger-Methode und mit der, nach dem *shot-gun*-Prinzip eine Vielzahl von Genbanken hergestellt und verwendet wurde. Dazu wurde zunächst die chromosomale DNA physikalisch gesichert und Genbanken mit Insertgrößen von 2-5 kb bzw. 35-40 kb erstellt. Die Endsequenzierung der Inserts wurde mit den Sequenziergeräten MegaBACE 4000 (GE Healthcare) und ABI Prism 3730xl (Applied Biosystems) unter der Verwendung der BigDye Terminator v3.1 Sequenzierchemie automatisiert durchgeführt. Die Software-Module Phred und Phrap wurden anschließend für

die Umschreibung der erhaltenen Rohdaten in Sequenzen und die Assemblierung der Einzel-Sequenzen zu größeren DNA-Abschnitten verwendet. Nach der Assemblierung von über 87000 generierten Sequenzläufen betrug die Abdeckung 9,28, d.h. jede Base ist statistisch in 9,28 Einzelsequenzen abgedeckt. Die Schließung der Lücken, sowie die Qualitätsverbesserung der gesamten Genomsequenz erfolgten nach der Rohsequenzierung durch PCR-basierte Techniken sowie *primer-walking* auf den vorhandenen Genbänken.

Anhand dieser Daten konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass *B. glumae* PG1 wie andere Spezies der *Burkholderia*-Gattung über zwei Chromosome unterschiedlicher Größen verfügt (4,16 und 3,73 Mbp; siehe Abbildung 5). Der GC-Anteil der genomischen DNA ist wie bei der Gattung *Pseudomonas* und anderen Spezies der Gattung *Burkholderia* sehr hoch (Vanlaere *et al.*, 2008; Yabuuchi *et al.*, 2000) und liegt bei 68,36 % (Chromosom 1) bzw. 69,23 % (Chromosom 2) (Tabelle 7). Weitere allgemeine Daten über das Genom von *B. glumae* PG1 sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Übersicht Vergleich der Eigenschaften von Chromosom 1 und Chromosom 2 (Voget *et al.*, 2010).

Funktionen	Chromosom 1	Chromosom 2
Größe (Mbp)	4,16	3,73
GC-Gehalt (mol%)	68,36 %	69,23 %
Anzahl rRNA-Operons	3	2
tRNA	57	9
Anzahl ORFs, gesamt	3558	2932
Anzahl hypothetischer Proteine	603	606
Anzahl regulatorischer Proteine	249	359
Anzahl Transport- und Sekretionsproteine	396	371
Anzahl übriger Proteine	2310	1596

Das Genom von *B. glumae* PG1 enthält eine Vielzahl ORFs, die für Transport- und Sekretionsproteine kodieren. Im Vergleich zu anderen Organismen wie z. B. *P. aeruginosa* ist die Anzahl der ORFs kodierend für Transport- und Sekretionsproteine hoch (Stover *et al.*, 2000), was ein weiteres Indiz für die potenzielle biotechnologische Bedeutung von *B. glumae* PG1 ist (Tabelle 7).

1.2 Sequenzen des Typ II-Sekretionssystems

Durch die Sequenzierung des Genoms war erstmals ein direkter Zugriff auf die Sequenzen der Gene des Typ II-Sekretionssystems von *B. glumae* PG1 möglich. Durch Homologie-Vergleiche zu den Typ II-Sekretionssystemen von anderen *Burkholderia*-Stämmen konnten die Gene des Typ II-Systems auf dem ersten Chromosom identifiziert werden. Bei weiteren

Analysen konnte auf dem 2. Chromosom ein unvollständiges, zweites Typ II-System festgestellt werden. Das unvollständige System verfügt über die Gene *gspE*, *gspF*, *gspC*, *gspG*, *gspH*, *gspL* und *gspM* (Abbildung 6). Außerdem liegt *gspK* stromaufwärts in entgegengesetzter Richtung vor. Stromabwärts befinden sich die Gene *gspI* und *gspJ*. Das Gen, das für das porenbildende Genprodukt GspD kodiert, fehlt vollständig (vgl. Abbildung 6).

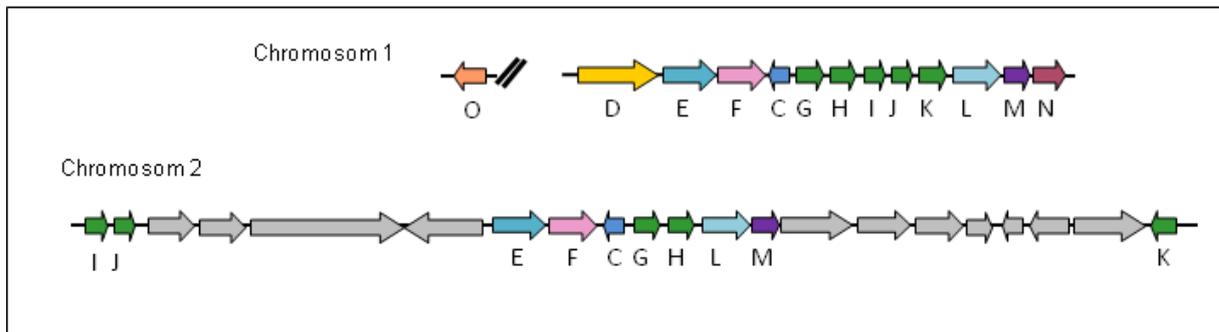


Abbildung 6: Schematische Darstellung der verantwortlichen Gene für das Typ II-Sekretionssystem im Genom von *B. glumae*. Auf Chromosom 1 wurden alle Komponenten des Typ II-Systems identifiziert. Auf Chromosom 2 konnte ein zweites, aber unvollständiges System identifiziert werden. Vergleiche mit Abbildung 2.

Homologie-Vergleiche der beiden Gsp-Systeme untereinander zeigen, dass sich die Systeme zwar ähneln, jedoch nicht gleichen. Die Strukturen variieren stark, so dass z. B. *gspJ* vom ersten System nur 40 % Ähnlichkeit zu *gspJ* des zweiten Chromosoms besitzt. Bei *gspK* liegt die Ähnlichkeit bei 34 %, bei *gspI* bei 51 %, bei *gspH* bei 56 %, bei *gspF* bei 81 % und bei *gspC* bei 43 %. Die höchste Ähnlichkeit besteht zwischen dem *gspG*-Gen des Chromosom 1 kodierten Systems und dem entsprechenden Gen des zweiten Chromosoms mit 84 %. Die stärkste Varianz zeigen die *gspE*-Gene. Es besteht zwar eine Ähnlichkeit von 97 %, das zweite *gspE*-Gen (*rbg05876*) ist jedoch stark verkürzt im Gegensatz zu *gspE* des ersten Systems (*rbg08380*).

ORF *rbg05876* umfasst 1482 bp, während *rbg08083* nur 414 bp lang ist. Durch die verkürzte Sequenz entsteht vermutlich kein funktionsfähiges Protein, daher fehlt dem zweiten System das Genprodukt für die Energiezufuhr für den Transport, da das *gspE*-Gen für die ATPase kodiert. Dem Typ II-System auf Chromosom 2 fehlen somit zwei essentielle Bestandteile.

Es wurden so genannte *gsp*-Mutanten konstruiert, die durch Deletion bzw. Insertion ein defizientes Typ II-Sekretionssystem auf dem 1. Chromosom besitzen. Damit sollte zum einen überprüft werden, ob *B. glumae* funktionsfähige, homologe Systeme besitzt, die die Deletionen komplementieren können. Zum anderen sollte im Folgenden das extrazelluläre Proteom im Hinblick auf die Typ II-Sekretion näher analysiert werden.

Das Prinzip der Mutanten beruht auf der Integration einer Antibiotika (AB)-Kassette und dem Austausch des Zielgens durch homologe Rekombination. Die verwendete Antibiotika-Kassette ist eine Kanamycin-Kassette, die durch das Gen *aphII* codiert wird. Diese Kassette besitzt einen *aphII*-Promotor, der konstitutiv abgelesen wird (Katzke *et al.*, 2010). Mit Hilfe

dieser Kasette konnten zwei Mutanten hergestellt werden: *B. glumae* PG1 Δ *gspD* und PG1 Δ *gspDEF* (siehe Abbildung 7). Bei PG1 Δ *gspD* wurde die *aphII*-Kassette mit dem *gspD*-Gen ausgetauscht. Da die Kasette in der gleichen Leserichtung wie *gspD* integriert wurde und die Km-Kassette den *aphII*-Promotor besitzt, werden die nachfolgenden Gene *gspE* und *gspF* weiter konstitutiv abgelesen (Abbildung 7). In der PG1 Δ *gspDEF*-Mutante wurde die Km-Kassette konträr gegen das *gspD*-Gen ausgetauscht, d. h. die Leserichtung der Km-Kassette verläuft in die entgegengesetzte Richtung. Da das Gen *gspD* mit *gspE* und *gspF* in einem Operon organisiert ist, wird zusätzlich zu der Deletion von *gspD* die Transkription von *gspE* und *gspF* verhindert. In *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* wird somit die Transkription des gesamten *gspDEF*-Operons verhindert werden (vgl. Abbildung 7).

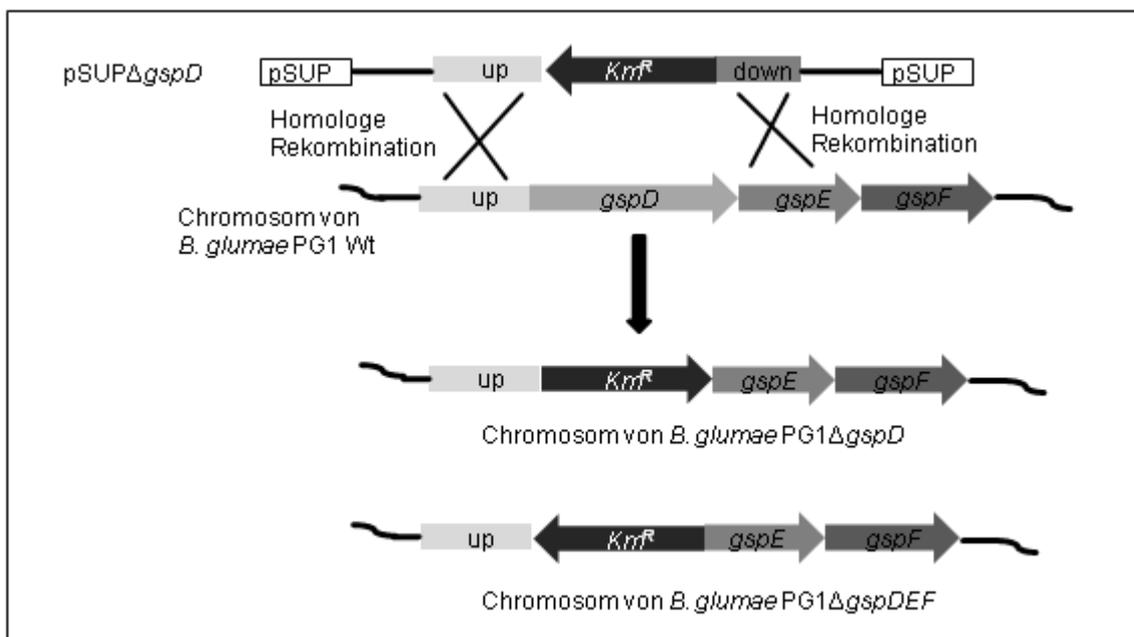


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Herstellung der *gsp*-Mutanten (Konstruiert von Dr. Silke Isenhardt). Eine Kanamycin-Kassette wurde in Leserichtung und gegen die Leserichtung (hier nicht dargestellt) zwischen die homologen Bereiche stromaufwärts und stromabwärts des *gspD*-Gens kloniert. Durch homologe Rekombination der angrenzenden homologen Bereiche wird das *gspD*-Gen durch die Kanamycin-Kassette ersetzt, bei PG1 Δ *gspD* wird dadurch das *gspD* deletiert. Bei PG1 Δ *gspDEF* wird durch die polare Integration der Kasette zusätzlich zur *gspD*-Deletion, die Transkription von *gspE* und *gspF* verhindert.

Die erfolgreiche Integration der Kanamycin-Kassette und die Deletion von *gspD* wurden mittels PCR überprüft. Um jedoch die Transkription auch im Hinblick auf den *aphII*-Promotor in der *gspD*-Mutante und die fehlende Transkription des *gspDEF*-Operons in der *gspDEF*-Mutante näher zu untersuchen, wurde die Transkription der Gene *gspE* und *gspF* in den beiden sekretionsdefizienten Mutanten mit *RealTime*-PCR untersucht. Dazu wurden Proben zu Beginn der stationären Phase (O.D.₅₈₀ 0,8-1,1) abgenommen und die Transkription der Gene quantitativ analysiert. Aus 100 ng Gesamt-RNA wurde das Transkript mit Hilfe geeigneter Primern und reverser Transkriptase in cDNA transkribiert. Diese cDNA wurde anschließend als Matrize in der quantitativen *RealTime*-PCR verwendet und so die Menge

des ursprünglichen Transkripts bestimmt. Als Mengenstandard diente dabei gereinigte genomische DNA. Als interner Standard diente der Nachweis von *rpoD* mit spezifischen Primern. Das Gen *rpoD* ist ein sogenanntes *housekeeping*-Gen und wird konstitutiv abgelesen.

Die Transkriptmengen von *gspE* und *gspF* der *gsp*-Mutanten wurden mit den entsprechenden Transkripten des Wildtyps *B. glumae* PG1 verglichen. Bei *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* wurde zusätzlich überprüft, ob die Transkription der beiden Gene aufgrund der Mutation verhindert wird. Die *RealTime*-PCR von *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* im Vergleich zu *B. glumae* PG1 zeigte deutlich, dass kein Transkript der Gene *gspE* und *gspF* nachgewiesen werden konnte.

Die *RealTime*-PCR von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* im Vergleich zu *B. glumae* PG1 zeigt, dass Transkript von beiden Genen vorhanden ist und der *aphII*-Promotor auf die Transkriptmenge von *gspE* und *gspF* nur wenig Einfluss nimmt (siehe Abbildung 8).

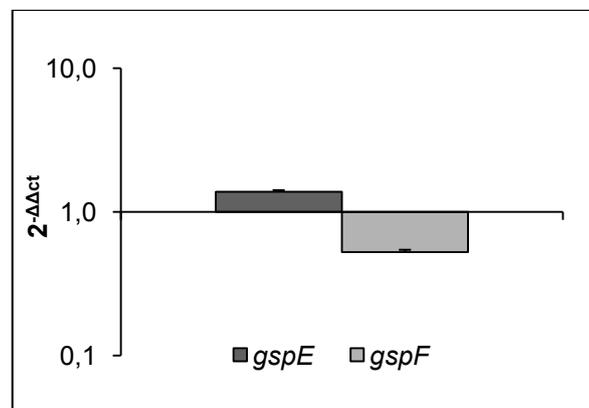


Abbildung 8: Transkriptnachweis der Gene *gspE* und *gspF* in *B. glumae* PG1 Δ *gspD*. Logarithmische Darstellung von $2^{-\Delta\Delta ct}$ der Gene *gspE* und *gspF* in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* im Vergleich zu *B. glumae* PG1. Mit $2^{-\Delta\Delta ct}$ wird die Transkription des betrachteten Gens (hier: *gspE* und *gspF*) im Vergleich zu einem Referenzgen angegeben. Als Referenzgen diente das konstitutiv abgelesene *housekeeping*-Gen *rpoD*. Um die Werte der *gspD*-Mutanten mit *B. glumae* PG1 vergleichen zu können, wurden die Werte auf *B. glumae* PG1 bezogen. Damit gilt $2^{-\Delta\Delta ct} = 1,0$ für das Transkript von *B. glumae* PG1. Wegen der logarithmischen Darstellung sind nur die positiven Standardabweichungen angegeben, die innerhalb von 10 % lagen. Die Transkriptmengen variieren nur leicht im Vergleich zu *B. glumae* PG1. Der Transkriptnachweis erfolgte in Dreifachbestimmung.

Die Abbildung zeigt, dass Transkript von beiden Genen vorhanden ist und die Transkription von *gspE* eine 0,4 fache Erhöhung, die Transkription von *gspF* eine 0,5 fache Verringerung im Vergleich zu *B. glumae* PG1 zeigt (siehe Abbildung 8). Das bedeutet, die bakterielle Polymerase von *B. glumae* PG1 erkennt den *aphII*-Promotor und Transkripte der beiden Gene *gspE* und *gspF* werden in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* gebildet. Die Transkription der Gene wird durch den *aphII*-Promotor im Vergleich zum natürlichen Promotor nur wenig beeinflusst (siehe Abbildung 8).

***Burkholderia glumae* PG1 verfügt über zwei Chromosomen. Jedes Chromosom kodiert für ein Typ II-Sekretionssystem. Nur das System auf Chromosom 1 ist vollständig. Das Typ II-System auf Chromosom 2 ist unvollständig. Es wurden zwei *gsp*-Mutanten konstruiert: *B. glumae* PG1 Δ *gspD* und *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF*.**

2 Untersuchung der lipolytischen Aktivität der *gsp*-Mutanten

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass *B. glumae* eine Lipase LipA produziert und sekretiert (Boekema *et al.*, 2007; Devescovi *et al.*, 2007; Jaeger *et al.*, 1994; Noble *et al.*, 1994; Frenken *et al.*, 1993; Frenken *et al.*, 1992). Lipolytische Aktivitätstests sollten im Rahmen dieser Arbeit nun zeigen, ob der Transport in den extrazellulären Raum über das Gsp-System in *B. glumae* PG1 erfolgt. Nach dem Transkriptnachweis (III.1.2) sollte nun die Funktionalität der Typ II-Sekretion anhand der lipolytischen Aktivität der Mutanten im Vergleich zu *B. glumae* PG1 überprüft werden. Dafür wurden einzelne Kolonien des Wildtyps und der Mutanten auf Tributyrinplatten (II.4.1.7) geimpft und bei 30° C über Nacht inkubiert. Die lipolytische Aktivität zeigt sich durch die hydrolytische Spaltung des Tributyrins, auf den trüben Platten bildet sich um die Kolonie ein Klärhof. Bei den Tributyrinplatten zeigte sich bei *B. glumae* PG1 um die Kolonie ein charakteristischer Klärhof (siehe Abbildung 9), während sich bei beiden Mutanten kein Klärhof bildete (siehe Abbildung 9).

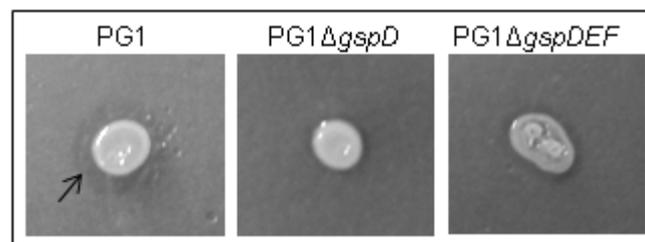


Abbildung 9: Nachweis der lipolytischen Aktivität von *B. glumae* PG1 und der *gsp*-Mutanten. Durch die enzymatische Reaktion der Lipase bildet sich ein Klärhof. Bei *B. glumae* PG1 zeigt sich deutlich die Bildung des Klärhofes (siehe Pfeil), der auf lipolytische Aktivität zurückzuführen ist.

Da bei den *gsp*-Mutanten keine lipolytische Aktivität auf den Tributyrinplatten feststellbar ist, wird der Transport der Lipase offensichtlich durch die Mutationen im Typ II-Sekretionssystem verhindert. Das wiederum bedeutet, dass die Lipase über das Typ II-System transportiert wird.

Des Weiteren wurde die lipolytische Aktivität im Überstand und im Rohzellextrakt mit einem Enzymassay (II.10.1.1) mit *p*-Nitrophenylpalmitat als Substrat getestet. Dazu wurde als Kohlenstoffquelle Olivenöl zu den Kulturen zugesetzt, da die Zugabe von Öl die Expression der Lipase induziert (Boekema *et al.*, 2007). Der Aktivitätstest zeigte, dass die lipolytische Aktivität im Überstand von *B. glumae* PG1 sehr hoch ist (~ 110 U/ml), während bei beiden Mutanten keine Aktivität im Überstand nachgewiesen werden konnte (ohne Abbildung). Bei

dem Enzymassay des Rohzelleextrakts zeigte sich, dass die lipolytische Aktivität in den Mutanten höher ist als bei *B. glumae* PG1 (Abbildung 10). Die Aktivität bei *B. glumae* PG1 Δ *gspD* ist im Vergleich zu *B. glumae* PG1 2,67-fach höher, bei *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* ist es ein Faktor von 2,57 (Abbildung 10).

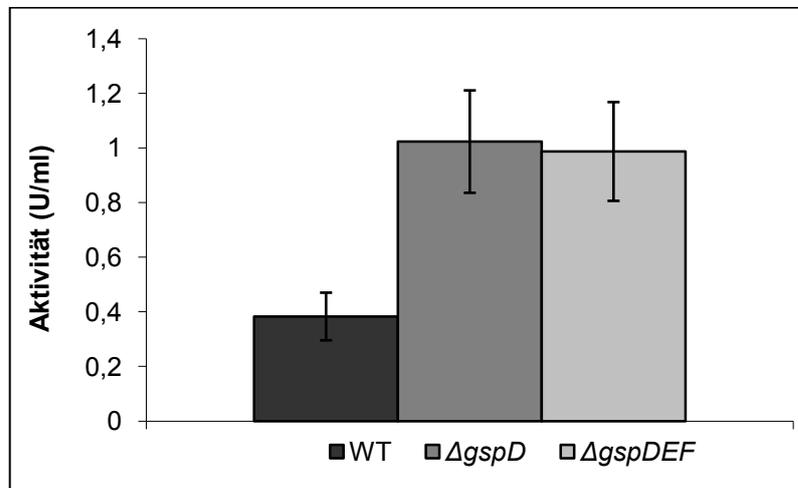


Abbildung 10: Nachweis der lipolytischen Aktivität in Rohzelleextrakten von *B. glumae*. Die Aktivität wurde in Rohzelleextrakten von drei unabhängigen Kulturen von *B. glumae* PG1 (WT) und der *gsp*-Mutanten (Δ *gspD* und Δ *gspDEF*) mittels des Substrats *p*-Nitrophenylpalmitat gemessen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Eine defiziente Typ II-Sekretion führt bei *B. glumae* PG1 dazu, dass die Lipase scheinbar im Zellinneren akkumuliert. Beide *gsp*-Mutanten zeigen eine höhere lipolytische Aktivität im Rohzelleextrakt als *B. glumae* PG1. Auch bei anderen Bakterien wie z. B. *Legionella pneumophila* ist bekannt, dass die lipolytische Aktivität im Rohzelleextrakt bei einem defizienten Typ II-Transport steigt und die Lipase, sowie weitere extrazelluläre Proteine im Zellinnern akkumulieren (Aragon *et al.*, 2000).

Die Lipase LipA wird über das Typ II-Sekretionssystem in das extrazelluläre Milieu transportiert. Bei einem defizienten Typ II-Sekretionssystem akkumuliert die Lipase in der Zelle.

3 Untersuchung des extrazellulären Proteoms von *B. glumae*

3.1 2-D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF

Durch den Nachweis der fehlenden lipolytischen Aktivität im Überstand der *gsp*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Lipase LipA durch die Mutationen in der Typ II-Sekretion nicht mehr transportiert wird. Die Lipase ist jedoch wahrscheinlich nur ein Protein des extrazellulären Proteoms, das über das Gsp-System in den extrazellulären Raum transportiert wird. Um weitere Proteine zu identifizieren, deren Transport über das Gsp-

System erfolgt, wurde das extrazelluläre Proteom von *B. glumae* WT im Vergleich zu den *gsp*-Mutanten unter spezifischen Bedingungen mit 2-D-Gelelektrophorese visualisiert.

Der Nachweis des extrazellulären Proteoms von *B. glumae* erfolgte mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese. Die 2-D-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, wie in Kapitel II.9.2 beschrieben. Die anschließende Analyse der verschiedenen Gele von *B. glumae* PG1 und den Mutanten wurde mit Hilfe der Software Delta 2D (Decodon, Greifswald) durchgeführt. Diese Software vereint mehrere Gele einer Gruppe, z. B. alle Wildtyp-Gele, zu einem Bild, so dass verschiedene Gele zu einem Gel normiert und die eventuellen Veränderungen der Proteincharakteristika sind wirklich auf die veränderten Bedingungen wie z. B. auf die Mutationen im Typ II-Sekretionssystem zurückführbar.

Bei dem Vergleich von *B. glumae* PG1 mit den *gsp*-Mutanten konnten Unterschiede in der Menge der detektierten Proteine festgestellt werden. So zeigten beide *gsp*-Mutanten eine Verringerung der Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp (siehe Tabelle 8). Bei dem Vergleich *B. glumae* PG1 mit *B. glumae* PG1 Δ *gspD* konnten sieben Spots und bei dem Vergleich *B. glumae* PG1 mit *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* konnten fünf Spots mit Veränderungen in der Proteinmenge detektiert werden.

Die Unterschiede wurden anhand von relativen Volumen berechnet. Bei der Vereinigung der Gele zu einem Gel wird anhand der Färbung das relative Volumen jedes einzelnen Spots bestimmt, diese Werte wurden in dem fusionierten Gel zu einem relativen Volumen zusammengefasst. Anschließend wurden diese zusammengefassten Werte von *B. glumae* PG1 mit den zusammengefassten, relativen Volumen der fusionierten Gele der *gsp*-Mutanten verglichen. Anhand der berechneten Werte ließen sich die Proteine mit veränderter Akkumulation identifizieren (Abbildung 11, Tabelle 8). Die Proteine mit veränderter Menge wurden anschließend für die MALDI-TOF-Analyse vorbereitet (II.9.3.1) und damit zum Teil identifiziert (vgl. Tabelle 8 und Abbildung 11).

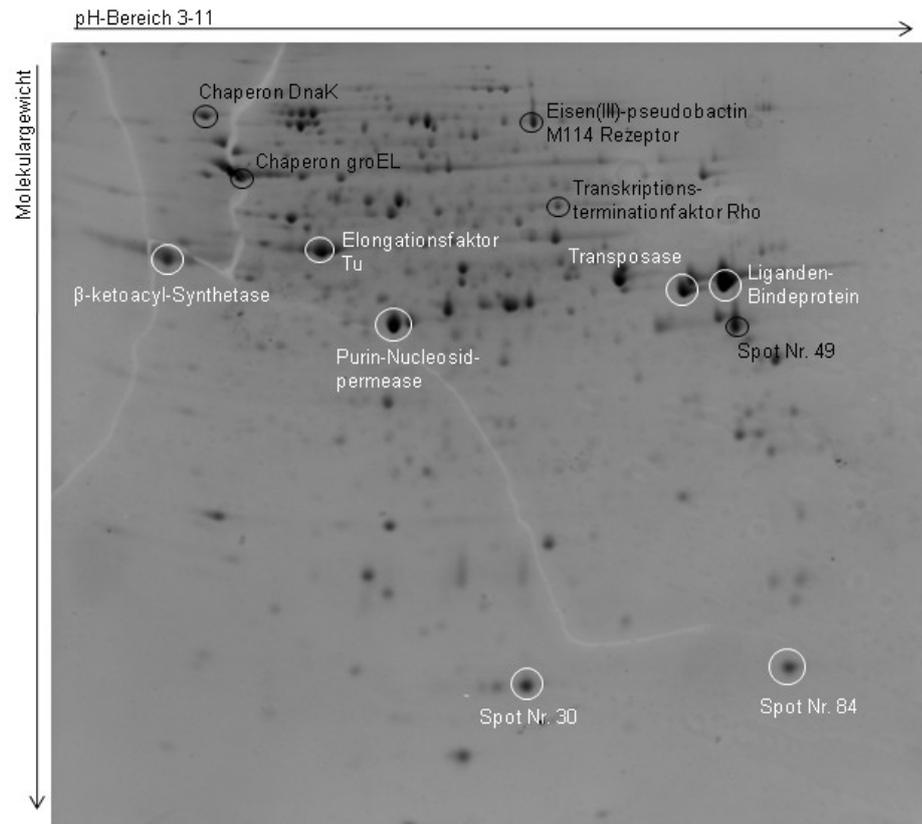


Abbildung 11: Das extrazelluläre Proteom von *B. glumae* PG1. Übersicht über die Proteine, die bei den *gsp*-Mutanten eine veränderte Proteinmenge zeigen. Die weiß markierten Spots zeigen die Proteine an, die bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* eine verringerte Menge zeigen. Die schwarz markierten Spots zeigen die Proteine, die bei der *gspDEF*-Mutante eine veränderte Menge zeigen.

Insgesamt konnten von 12 Spots neun eindeutig identifiziert werden, während drei nicht identifiziert werden konnten. Aus Abbildung 11 geht hervor, dass sowohl kleine als auch große Proteine unterschiedliche Mengen aufwiesen. Bei näherer Betrachtung der Proteine fällt jedoch auf, dass von neun identifizierten Proteinen sechs cytoplasmatisch, zwei periplasmatisch sind und ein Protein ein äußeres Membranprotein ist (vgl. Abbildung 11, Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht über die relativen Volumina der einzelnen Proteine, die eine veränderte Proteinmenge zeigen. Das relative Volumen (% V) ist das Ergebnis nach Hintergrundabzug, Quantifizierung und Normalisierung. Als signifikanter Unterschied wurde ein Wert von 0,5 festgelegt. Bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* zeigen sieben Spots ein verändertes Verhalten im Vergleich zu *B. glumae* PG1, bei *B. glumae* PG1Δ*gspDEF* sind es fünf Spots. Die Proteine konnten zum Teil durch MALDI-TOF identifiziert werden.

Spot Nr.	% Vol in PG1	% Vol in PG1Δ <i>gspD</i>	% Vol in PG1Δ <i>gspDEF</i>	Identifiziert als
30	1,32	0	-	nicht identifiziert
84	1,25	0	-	nicht identifiziert
142	3,54	0,74	-	β-ketoacyl-Synthetase
171	1,08	0,13	-	Elongationsfaktor Tu
243	2,66	0,45	-	Liganden-Bindeprotein
495	2,91	0,42	-	Purin-Nucleosidpermease
688	1,68	0,88	-	Transposase

49	2,04	-	1,49	nicht identifiziert
150	0,64	-	0	Transkriptionsterminationsfaktor Rho
101	3,18	-	1,63	Chaperon groEL
509	0,80	-	0,07	Chaperon Dna K
649	0,60	-	0	Eisen(III)-pseudobactin M114 Rezeptor

Der Nachweis der intrazellulären Proteine (siehe Tabelle 8) im extrazellulären Proteom von *B. glumae* PG1 könnte jedoch ein Indiz für andere Phänomene aufgrund der Mutationen im Typ II-Sekretionsystem sein, wie z. B. erhöhte Sekretion von Proteasen oder auch Zellyse. Die erhöhte lipolytische Aktivität im Rohzelleextrakt bei den *gsp*-Mutanten (III.2.) zeigt an, dass die Lipase nicht durch Proteasen im Zellinnern abgebaut wird. Durch das defiziente Transportsystem akkumulieren die Typ II-sekretierten Proteine im Zellinnern. Um den Stress der Zelle durch die Akkumulation der Proteine zu verringern, könnte die Zelle die Funktionalität anderer Transportsysteme erhöhen, um die Menge der vorhandenen Proteine im Cytoplasma zu verringern. Durch die erhöhte Funktionalität eines oder mehrerer Transportsysteme könnte es zu einer erhöhten Sekretion von Proteasen kommen.

Durch die erhöhte Menge der Proteasen in der extrazellulären Umgebung werden die intrazellulären Proteine, die in der extrazellulären Umgebung auftreten können, direkt proteolytisch abgebaut. Daher wären diese Proteine bei den *gsp*-Mutanten im Überstand nicht nachweisbar.

Um diese Hypothese zu testen, wurden Magermilch-Platten (II.4.1.7) zum Nachweis von Proteasen hergestellt. Durch die Zugabe von Magermilch ist der Agar milchig getrübt, bei Protease-Aktivität wird die Magermilch gespalten, die ein herkömmliches Substrat für eine Vielzahl von Proteasen darstellt, und es kommt zu einer Klärung des Agars rund um die Kolonie. Es konnte keine proteolytische Aktivität bei *B. glumae* PG1 oder den *gsp*-Mutanten festgestellt werden. Da das veränderte Transportverhalten einer Protease ausgeschlossen werden kann, müssen weitere Möglichkeiten wie z. B. Zellyse in Betracht gezogen werden.

Bei der Untersuchung des extrazellulären Proteoms von *B. glumae* PG1 im Vergleich zu den *gsp*-Mutanten zeigen insgesamt 12 Proteine eine veränderte Menge.

3.2 Das Wachstumsverhalten von *B. glumae*

Das Vorhandensein intrazellulärer Proteine im extrazellulären Milieu könnte durch Zellyse von *B. glumae* verursacht werden, daher wurde das Wachstum von *B. glumae* PG1 näher untersucht. Dazu wurde das Wachstum durch Trübungsmessung (O.D._{580nm}) in regelmäßigen Zeitabständen (2 h) aufgenommen. Die Wachstumskurven wurden bei 30° C in 1 L-Erlenmeyerkolben mit 1/10-Kulturvolumen durchgeführt. Die Wachstumsbedingungen entsprachen den Bedingungen für die 2-D-Gelelektrophorese (III.3.1). Abbildung 12 zeigt,

dass das Wachstum der Stämme unter diesen Bedingungen nicht vergleichbar ist. Während *B. glumae* PG1 in 24 h eine Zelldichte erreicht, die einer O.D._{580nm} von ca. 1 entspricht und bereits in der stationären Phase vorliegt, erlangen sowohl *B. glumae* PG1 Δ *gsp*, wie auch *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* im gleichen Zeitraum eine O.D._{580nm} von 3,5-4 (vgl. Abbildung 12).

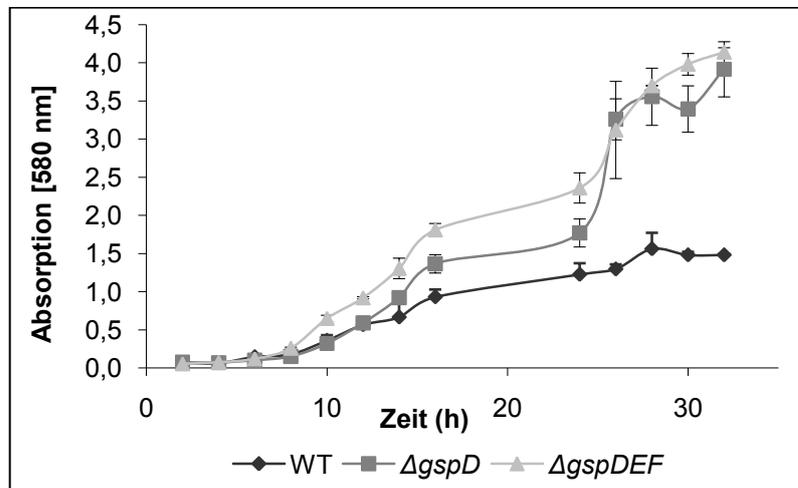


Abbildung 12: Wachstum von *B. glumae*. Als Kohlenstoffquelle wurde Glukose eingesetzt. Das Wachstum wurde anhand der O.D._{580nm} aufgenommen. Es wurde das Wachstum von *B. glumae* PG1 (WT), PG1 Δ *gspD* (Δ *gspD*) und PG1 Δ *gspDEF* (Δ *gspDEF*) beobachtet. Die Standardabweichungen werden durch Fehlerbalken angegeben.

B. glumae PG1 erreicht nach bereits 16 h bei relativ niedriger Zelldichte die stationäre Phase, während die *gsp*-Mutanten im gleichen Zeitraum höhere Zelldichten erreichen (Abbildung 12). In der stationären Phase besteht ein Gleichgewicht zwischen lysierenden Zellen und Zellteilung. Daher sollte in *B. glumae* PG1 nach 16 h Zellyse nachweisbar sein, wenn *B. glumae* PG1 zu diesem Zeitpunkt schon in der stationären Phase ist.

Aufgrund dieser Hinweise sollte der Zeitpunkt des Zellysebeginns in *B. glumae* PG1 zeitlich eingegrenzt werden. Das Enzym β -Lactamase ist ein periplasmatisches Protein, dessen Anwesenheit im extrazellulären Milieu ein Hinweis auf Zellyse darstellt. Daher wurde im Überstand von *B. glumae* PG1 die Aktivität des Proteins β -Lactamase mit dem chromogenen Substrat CENTA, einem Cephalosporin, zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 8 h, 16 h, 20 h, 24 h) bestimmt (Abbildung 13). Die Aktivität wird anhand eines Farbumschlags sichtbar, der photometrisch messbar ist.

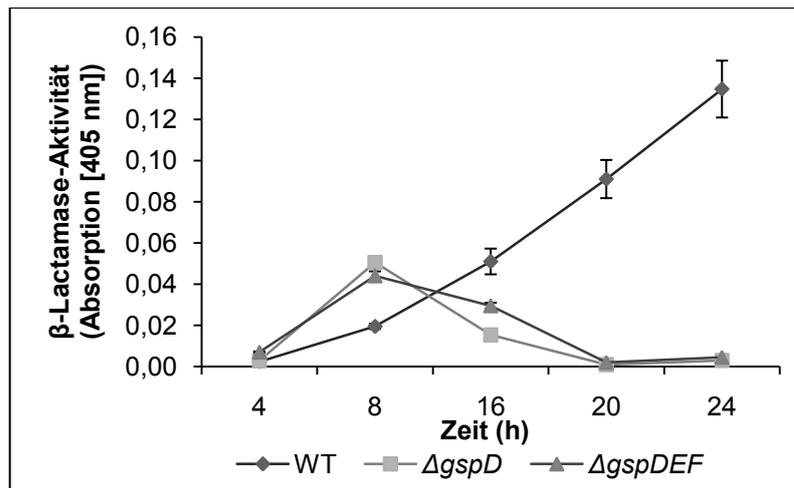


Abbildung 13: Aktivität des periplasmatischen Enzyms β -Lactamase im Überstand von *B. glumae*. Die Aktivität von β -Lactamase wurde mittels des chromogenen Substrats CENTA gemessen, dessen Umsetzung zu einer Gelbfärbung führt, die photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann. Der Nachweis des periplasmatischen Enzyms β -Lactamase im extrazellulären Milieu ist ein Hinweis für Zellyse. Der Überstand von jeweils drei unabhängigen Kulturen von *B. glumae* PG1 (WT), PG1 $\Delta gspD$ ($\Delta gspD$) und PG1 $\Delta gspDEF$ ($\Delta gspDEF$) wurden gemessen.

Wie aus Abbildung 13 eindeutig zu erkennen, steigt die β -Lactamase-Aktivität im Überstand von *B. glumae* PG1 bereits nach 8 h leicht an und zeigt ab 16 h deutlich höhere Aktivität als bei beiden *gsp*-Mutanten. Bei den *gsp*-Mutanten kommt es nach 8 h zu einem leichten Ansteigen der Aktivität, diese flacht aber nach 16 h wieder stark ab (Abbildung 13). Nach 20 h und 24 h ist bei den *gsp*-Mutanten kaum Aktivität der β -Lactamase messbar, während bei *B. glumae* PG1 die Aktivität weiter ansteigt. Dies bestätigt die Vermutung, dass *B. glumae* PG1 die stationäre Phase nach 16 h erreicht. Bei der 2-D-Gelelektrophorese (III.3.1) kommt es zu dem Nachweis der cyto- und periplasmatischen Proteine im extrazellulären Proteom, da die Probenabnahme für die 2-D-Gelelektrophorese nach 24 h erfolgte. Die Zellyse beginnt nach 16 h, d. h. zum Zeitpunkt der Probenahme der 2-D-Gelelektrophorese sind viele Zellen schon lysiert.

Als Kohlenstoffquelle wurde Glukose eingesetzt. Dieses Substrat reprimiert in *B. glumae* PG1 die Expression der Lipase (Boekema *et al.*, 2007). Das bedeutet, dass bei der Zugabe von Glukose das Wachstum ohne die Expression der Lipase beobachtet werden kann.

Aus Abbildung 12 ist ersichtlich, dass *B. glumae* PG1, PG1 $\Delta gspD$ und PG1 $\Delta gspDEF$ unterschiedliches Wachstum zeigen. Anhand der Daten kann man eine Beeinflussung des Wachstums erkennen. Die *gsp*-Mutanten zeigen ein anderes Wachstum und vergleichsweise zu *B. glumae* PG1 kaum Zellyse zu den gemessenen Zeitpunkten (Abbildung 12/13). Dieser Effekt tritt bei den sekretionsdefizienten Mutanten nicht auf.

Aus der Literatur ist bekannt, dass durch Zugabe von Olivenöl die Lipase-Expression induziert wird (Boekema *et al.*, 2007). Da beiden *gsp*-Mutanten die Lipase im extrazellulären Raum fehlt und es zu einer Akkumulation der Lipase im Zellinnern kommt (III.2), sollten sich

unter diesen Bedingungen deutliche Wachstumsunterschiede zeigen. Daher wurde als nächster Schritt das Wachstum der verschiedenen Stämme unter Bedingungen der Lipase-Expression beobachtet, d. h. unter Zugabe von Öl (Abbildung 14).

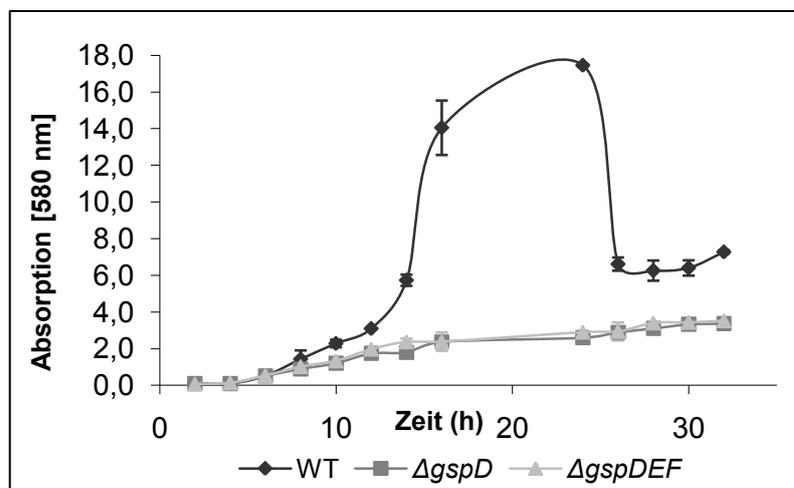


Abbildung 14: Wachstum von *B. glumae* PG1 unter Lipase-exprimierenden Bedingungen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 580 nm beobachtet. Um die Lipase-Expression zu induzieren, wurde den Kulturen von *B. glumae* PG1 (WT) und den *gsp*-Mutanten ($\Delta gspD$ und $\Delta gspDEF$) Olivenöl als Kohlenstoffquelle zugesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an, die innerhalb von 10 % lagen.

Wie zu erwarten zeigt die Wachstumskurve in Abbildung 14, dass die *gsp*-Mutanten im Vergleich zu *B. glumae* PG1 im Wachstum mit Olivenöl als Kohlenstoffquelle benachteiligt sind. Sie erlangen zwar ähnliche Zelldichten im Vergleich zum Wachstum mit Glukose (siehe Abbildung 12), dennoch erreicht *B. glumae* PG1 im gleichen Zeitraum eine deutlich höhere Zelldichte, die einer O.D._{580nm} von 14 entsprach. Nach 24 h aggregieren die Zellen stark, so dass es zu einer Entstehung von Zellklumpen führt und eine akkurate photometrische Messung nicht mehr gewährleistet werden kann. Damit zeigt sich, dass die *gsp*-Mutanten im Vergleich zu *B. glumae* PG1 teilweise erhebliche Unterschiede im Wachstum aufweisen. Da den sekretionsdefizienten Mutanten die extrazelluläre Lipase fehlt, können sie das Olivenöl nicht gut verstoffwechseln.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde an Stelle von Glukose den Hauptkulturen Glycerol als Kohlenstoffquelle zugesetzt, da die verschiedenen Stämme bei Glycerol ein vergleichbares Wachstumsverhalten zeigten.

***B. glumae* PG1 erreicht mit Glukose als Kohlenstoffquelle schon nach 16 h die stationäre Phase und Zelllyse setzt ein. Die *gsp*-Mutanten erreichen die stationäre Phase wesentlich später.**

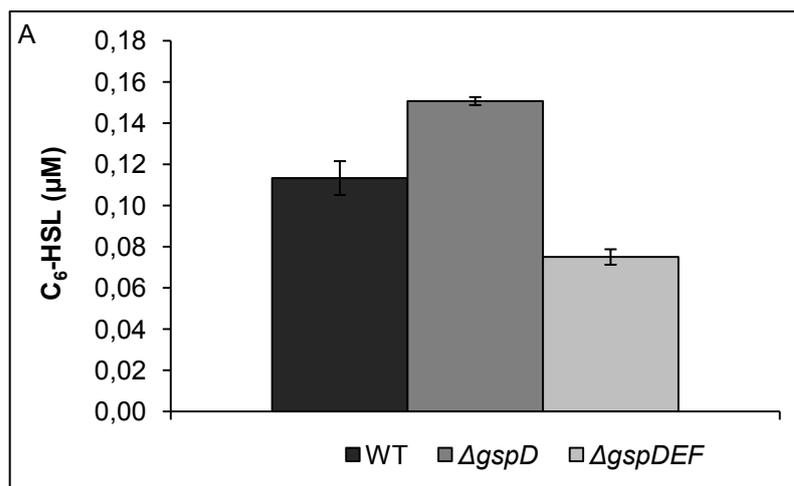
Bei der Kohlenstoffquelle Olivenöl zeigen die *gsp*-Mutanten die erwarteten niedrigeren Zelldichten, da sie ohne extrazelluläre Lipase Olivenöl nicht gut verstoffwechseln können.

4 Ausschüttung von Signalmolekülen in *B. glumae*

4.1 Homoserinlactone in *B. glumae*

Quorum sensing ist ein Zelldichten-abhängiges Regulationssystem, das Prozesse koordiniert, die ineffizient wären, wenn sie nur von einzelnen Zellen durchgeführt werden würden, wie z. B. die Sekretion von Pathogenitätsfaktoren. Die Signalmoleküle, oder auch Autoinducer genannt, sind in Gram-negativen Bakterien N-Acyl-Homoserinlactone (HSL).

B. glumae produziert hauptsächlich N-Hexyl-Homoserinlacton (C_6 -HSL) und N-Oktanoyl-Homoserinlacton (C_8 -HSL) (Kim *et al.*, 2004). In Abschnitt III.3.2 konnte gezeigt werden, dass die Mutationen im Typ II-System Einfluss auf das Wachstum der Bakterien nehmen. Da Quorum sensing von der Zelldichte abhängig ist und damit vom Wachstum der Zellen, ist es naheliegend, das QS-System in den *gsp*-Mutanten näher zu untersuchen. Um dies zu überprüfen, wurden aus dem Überstand einer Kultur die Homoserinlactone mittels Dichlormethan extrahiert. Die Messung der HSL erfolgte durch HPLC-MS in Kooperation mit dem Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, England. Die Quantifizierung der Proben erfolgte anhand von definierten Standards, deren Retentionszeiten und Peakflächen mit denen der Proben verglichen wurden. Durch die definiert eingesetzte Menge des Standards und der daraus entstehenden Peakfläche konnte die Konzentration der HSL in den Proben ermittelt werden. Zunächst wurde sich die Sekretion der HSL im Überstand der verschiedenen Stämme unter Lipase exprimierenden Bedingungen überprüft. Dazu wurde den Kulturen Olivenöl als Kohlenstoffquelle zugegeben. Unter diesen Bedingungen sollten Unterschiede wie beim Wachstum am deutlichsten auftreten.



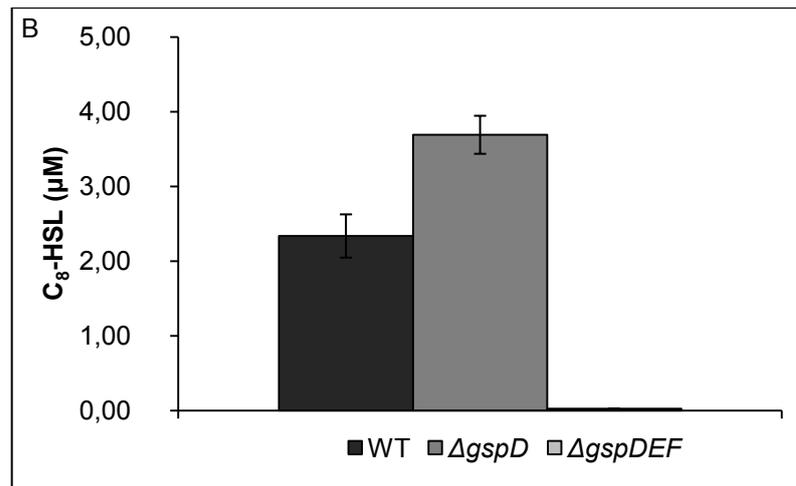


Abbildung 15: Ausschüttung von HSL im Überstand von *B. glumae* unter Lipase-exprimierenden Bedingungen. Es wurde C₆-HSL (A) und C₈-HSL (B) bei *B. glumae* PG1 (WT), PG1ΔgspD (ΔgspD) und PG1ΔgspDEF (ΔgspDEF) betrachtet. Die Messungen wurden von Extraktionen aus drei unabhängigen Kulturen durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Wie aus Abbildung 15 ersichtlich, zeigen sich in den Überständen von *B. glumae* PG1, PG1ΔgspD und PG1ΔgspDEF verschiedene Konzentrationen der HSL. Während die Ausschüttung von C₆-HSL im Überstand keine signifikanten Unterschiede bei den gsp-Mutanten im Vergleich zu *B. glumae* PG1 aufweist (Abbildung 15 A), zeigt der Anteil von C₈-HSL im Überstand jedoch deutliche Unterschiede. Im Überstand von *B. glumae* PG1ΔgspD ist die C₈-Konzentration 1,6-fach erhöht im Vergleich zu *B. glumae* PG1, bei *B. glumae* PG1ΔgspDEF ist dieser Autoinducer nahezu verschwunden (siehe Abbildung 15 B). Die Autoinducer zeigen die gleichen Effekte, nur sind die Effekte bei C₈-HSL wesentlich deutlicher (vgl. Abbildung 15 A/B). Das QS-System reguliert in *P. aeruginosa* die Transkription einer Vielzahl von Proteinen. Aufgrund der fehlenden QS-Moleküle könnte die Expression verschiedener Proteine bei *B. glumae* PG1ΔgspDEF deutlich verringert sein, während bei *B. glumae* PG1ΔgspD unter diesen Bedingungen eine höhere Menge der QS-regulierten Proteine exprimiert werden könnte. Die *B. glumae*-Stämme mit defizientem Typ II-Sekretionssystem zeigen Veränderungen der HSL-Mengen im Überstand unter Lipase-exprimierenden Bedingungen. Während bei der Porenmutante die Autoinducer erhöht sind, kommt es bei *B. glumae* PG1ΔgspDEF zu einer Verringerung der Autoinducer.

In einem anschließenden Versuch sollte überprüft werden, ob die Effekte der unterschiedlichen HSL-Mengen auch unter Bedingungen auftreten, bei denen die Lipase nicht exprimiert wird. In Voruntersuchungen zeigte sich, dass Glycerol eine alternative Kohlenstoffquelle zu Glukose darstellt. Es wurde sowohl der Anteil von C₆-HSL als auch C₈-HSL im Überstand bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei C₆-HSL keine signifikanten Unterschiede zwischen *B. glumae* PG1, PG1ΔgspD und PG1ΔgspDEF feststellbar sind. Die Quantifizierung von C₈-HSL zeigt ein anderes Bild, da bei beiden Mutanten die Konzentration

von C₈-HSL nur noch minimal ist (Abbildung 16). Abbildung 16 zeigt, dass der Autoinducer C₈-HSL bei den *gsp*-Mutanten im Vergleich zu *B. glumae* PG1 dezimiert ist.

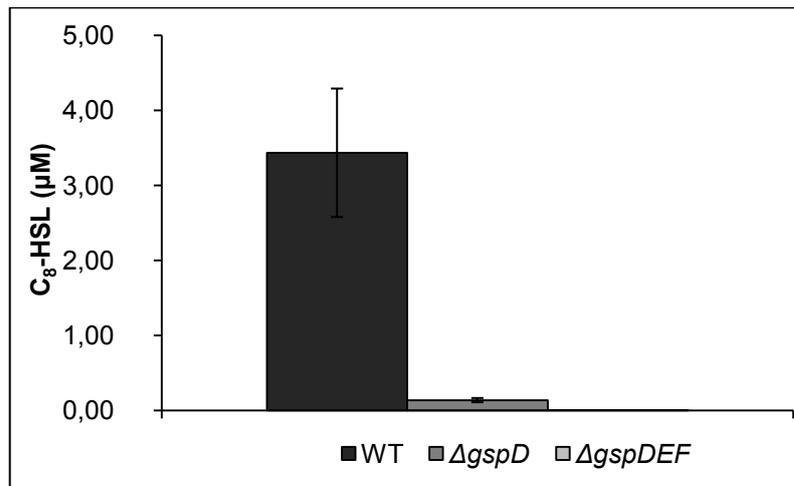


Abbildung 16: Quantifizierung von C₈-HSL im Überstand von *B. glumae* bei Glycerolzugabe. Die Messungen wurden von Extraktionen aus drei unabhängigen Kulturen von *B. glumae* PG1 (WT), PG1Δ*gspD* (Δ*gspD*) und PG1Δ*gspDEF* (Δ*gspDEF*) durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Vergleicht man nun die Effekte auf die Autoinducer unter den zwei verschiedenen Bedingungen, stellt man dort gravierende Unterschiede fest. Unter Lipase-exprimierenden Bedingungen ist die Konzentration von C₈-HSL bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* im Vergleich zu *B. glumae* PG1 leicht erhöht (Abbildung 15).

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich ein defizientes Typ II-Sekretionssystem auf das Quorum sensing auswirkt.

Beide Mutanten mit defizientem Typ II-Sekretionssystem zeigen veränderte Mengen an Autoinducern im Überstand im Vergleich zu *B. glumae* PG1.

4.2 *B. glumae* besitzt ein „PQS-ähnliches“ Signalmolekül

Bei verschiedenen *Burkholderia*-Stämmen wurden Vorstufen eines weiteren Signalmoleküls entdeckt, dem *Pseudomonas-quinolone*-Signal (PQS). Es unterscheidet sich strukturell von den HSL-Signalmolekülen, da es ein Quinolon-Derivat ist. Anders als die genannten Homoserinlactone ist es nicht abhängig von der Zelldichte, sondern wird in der frühen stationären Phase gebildet (Diggle *et al.*, 2003). Die Vorstufen des PQS sind sogenannte 4-Hydroxy-2-Alkylquinolone (HAQs) (Vial *et al.*, 2008). Da bei *Burkholderiaceae* eine zusätzliche Methylgruppe nachgewiesen wurde, werden sie auch 4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinolone (HMAQs) genannt. Für die Synthese ist eine Reihe von verschiedenen Enzymen nötig.

Das *B. glumae* Genom wurde auf homologe Sequenzen zu Genen, die für PQS-Syntheseenzyme kodieren, untersucht.

Zu dem Gen *pqsA*, dem ersten Gen des *pqs*-Operons, konnten 55 homologe Sequenzen gefunden werden. Bei näherer Betrachtung der gefundenen Sequenzen konnte dabei ein homologes Gen zu dem Gen *phnA*, das für die Anthranilat Synthetase Komponente I kodiert, gefunden werden. Außerdem wurde ein weiteres Gen als *phnB* identifiziert, das für die Anthranilat Synthetase Komponente II kodiert. Die Genprodukte von *phnAB* sind für den Aufbau der Vorstufe Anthranilat zuständig. Zu dem Gen *pqsD* konnten vier homologe Sequenzen gefunden werden. Für *pqsB*, *pqsC* und *pqsE* konnten jedoch keine homologen Sequenzen gefunden werden. Die Varianz der Sequenz könnte bei diesen Genen zu hoch sein, als das sie durch Homologievergleiche identifiziert werden können. Zu dem Gen *pqsH*, dessen Genprodukt letztendlich für die PQS-Synthese verantwortlich ist, konnten vier homologe Sequenzen gefunden werden. *B. glumae* besitzt MexGHI-homologe Transporter, womit ein Transport des PQS möglich wäre.

Ausgehend von der Tatsache, dass bei anderen *Burkholderia*-Stämmen HMAQs nachgewiesen werden konnten und homologe Gene für die PQS-Synthesepoteine teilweise in *B. glumae* gefunden werden konnten, wurde eine Extraktion des PQS-Signals aus dem Überstand durchgeführt. Bei der Extraktion mittels Ethylacetat (II.10.5) konnte nach der entsprechenden Behandlung ein Signal auf den Dünnschichtplatten im Vergleich zu einem PQS-Standard von *P. aeruginosa* festgestellt werden (Abbildung 17).

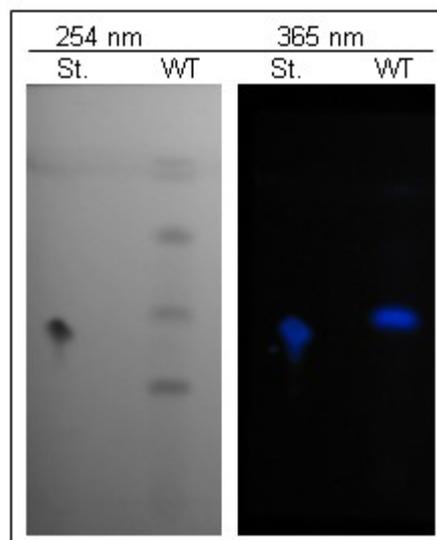


Abbildung 17: Dünnschichtchromatographie der Extrakte des Überstands von *B. glumae* PG1. Die TLC-Platte wurde mit Licht der Wellenlängen von 254 nm und 365 nm bestrahlt, dabei wurden Signale sichtbar. Bei *B. glumae* PG1 (WT) werden bei 254 nm fünf Signale sichtbar, bei 365 nm ein Signal. Der Standard (St.) bestand aus aufgereinigtem PQS aus *P. aeruginosa*. Der Nachweis wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Bei der Dünnschichtchromatographie konnten bei 254 nm fünf Spots bei *B. glumae* PG1 festgestellt werden, doch nur ein signifikantes Signal wurde auch bei 365 nm sichtbar (siehe Abbildung 17). Dieses Signal lag ungefähr auf der Höhe des PQS von *P. aeruginosa*, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass es sich um ein PQS-ähnliches Signal handelt. Der leichte Unterschied in der Höhe des Signals könnte auf strukturelle Unterschiede

zurückzuführen sein. Bei den anderen vier Signalen, die bei 254 nm sichtbar werden, könnte es sich um Vorstufen des PQS handeln, die keine Eigenfluoreszenz besitzen.

Die Struktur des PQS-ähnlichen Signals aus *B. glumae* konnte den Strukturen anderer *Burkholderia*-Stämme angenähert werden. Das PQS-ähnliche Signal von *B. glumae* besitzt voraussichtlich eine weitere Methylgruppe, deren Lokalisation nicht eindeutig möglich war.

Die Quantifizierung der Homoserinlactone zeigte bei den Mutanten mit defizientem Typ II-Sekretionssystem Veränderungen. Daher wurden auch die *gsp*-Mutanten auf das PQS-ähnliche Signal untersucht.

Aus dem Überstand der beiden *gsp*-Mutanten wurde das PQS-ähnliche Signal mittels Ethylacetat extrahiert (II.10.5). Auf den entsprechenden Dünnschichtplatten wurde bei 365 nm jedoch kein fluoreszierendes Signal wie bei *B. glumae* PG1 sichtbar (siehe Abbildung 18).

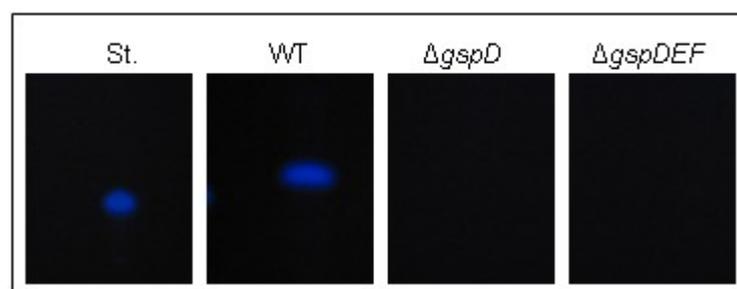


Abbildung 18: Dünnschichtchromatographie der Extrakte der Überstände von *B. glumae* PG1 im Vergleich mit den *gsp*-Mutanten. Die Dünnschichtplatten wurden bei 365 nm untersucht, da das Signal bei der Wellenlänge am deutlichsten auftritt. Der Nachweis erfolgte in drei unabhängigen Kulturen von *B. glumae* PG1 (WT), PG1 Δ *gspD* (Δ *gspD*) und PG1 Δ *gspDEF* (Δ *gspDEF*).

Aus Abbildung 18 geht eindeutig hervor, dass die *gsp*-Mutanten kein PQS-ähnliches Signal aufweisen, ihnen fehlt offensichtlich dieses Signalmolekül. Bei den Mutanten mit defizienter Typ II-Sekretion ist das PQS-Analog im Überstand nicht nachweisbar. Offensichtlich werden die Bedingungen im extrazellulären Raum durch die Mutationen im Typ II-Apparat so verändert, dass es sich auch auf das PQS-ähnliche Signal auswirkt.

Der Transport des PQS erfolgt über MexGHI-OpmD Pumpen. Daher kann man vermutlich ausschließen, dass der Transport des PQS-ähnlichen Signals durch die *gsp*-Mutationen verhindert wird. Man kann aber vermuten, dass ein extrazellulärer Faktor oder ein Protein nicht mehr sekretiert wird, das im Zusammenhang mit dem PQS steht.

***B. glumae* besitzt ein PQS-ähnliches Signalmolekül. Dieses ist bei beiden sekretionsdefizienten Mutanten im Überstand nicht nachweisbar.**

5 Produktion von Rhamnolipiden in *B. glumae*

5.1 *B. glumae* besitzt *rhl*-homologe Gene und produziert Rhamnolipide

Die Produktion von Rhamnolipiden konnte bei einigen *Burkholderia*-Stämmen nachgewiesen werden (Haussler *et al.*, 2003, Andra *et al.*, 2006). Bei *B. glumae* PG1 wurde die Rhamnolipidproduktion bislang nicht untersucht. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das Genom nach *rhl*-homologen Genen durchsucht. Zum Vergleich wurden andere *Burkholderia*-Stämme, wie z. B. *B. thailandensis* und auch *P. aeruginosa* herangezogen. Demnach weist *B. glumae* *rhl*-homologe Gene auf, die in einem Operon kodiert sind (siehe Abbildung 19). *B. thailandensis* besitzt zwei *rhl*-Genkluster (Dubeau *et al.*, 2009), bei *B. glumae* PG1 konnte nur ein einzelnes *rhl*-Genkluster identifiziert werden. Bei *Burkholderia*-Stämmen liegen die Gene *rhIA*, *rhIB* und *rhIC* direkt hintereinander. Die Genfolge wird nur durch ein putatives Gen unterbrochen, das zwischen den Genen *rhIB* und *rhIC* liegt. Bei *P. aeruginosa* ist *rhIC* in einem anderen Bereich des Genoms mit einem 2. Gen in einem Operon kodiert, dessen Genprodukt eine nicht bekannte Funktion besitzt.

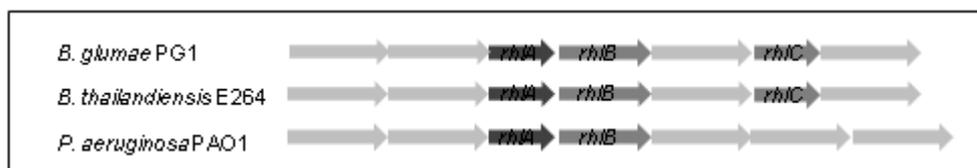


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Genbereichs um *rhIA*, *rhIB* und *rhIC*. Als Vergleich zu *B. glumae* PG1 wurden zwei Rhamnolipid-produzierende Bakterienstämme ausgewählt und die Genbereiche miteinander verglichen. *B. thailandensis* ist ein Rhamnolipid-produzierendes Bakterium der Gattung *Burkholderia*, während *P. aeruginosa* ein Modellorganismus zur Untersuchung der Herstellung der Rhamnolipide dient. Das Gen *rhIC* von *P. aeruginosa* ist in einem anderen Genbereich kodiert und daher hier nicht dargestellt.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der Rhl-homologen Proteine von *B. glumae* mit *P. aeruginosa*, variieren die Identitäten zwischen 40-50 %. RhIA zeigt eine Identität von 45 % (vgl. Abbildung 21), RhIB von 44 % und RhIC von 46 %.

Stromaufwärts der Strukturgene konnten im Genom von *B. glumae* homologe Gene zu *rhIR* und *rhII* gefunden werden, deren Genprodukte die Transkription der *rhl*-Gene kontrollieren. Der Aminosäuresequenzvergleich des RhIR-homologen Proteins zu RhIR von *P. aeruginosa* zeigt eine 38 %ige Identität, während das RhII-homologe Protein eine Identität von 42 % zu RhII von *P. aeruginosa* aufweist.

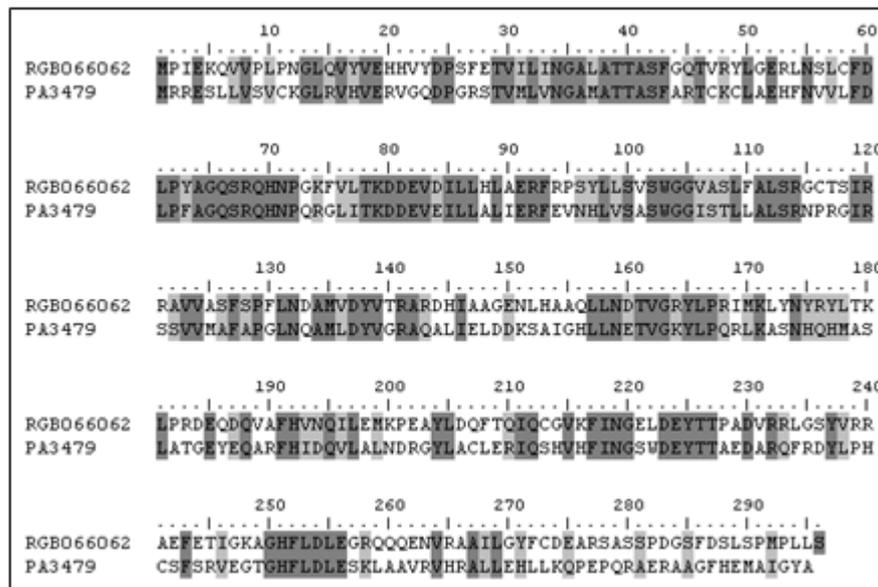


Abbildung 20: Vergleich der Aminosäuresequenzen von RhIA (PA3479) von *P. aeruginosa* und dem RhIA-homologen Protein RGB066062 von *B. glumae*. Die dunkelgrau hinterlegten Aminosäuren (AS) sind identisch, ähnliche AS sind hellgrau. Es besteht eine Identität von 45 % zwischen den Proteinen.

Da bei *B. glumae* PG1 die Gene für eine Rhamnolipid-Produktion nötigen Proteine vorhanden sind, wurden die Rhamnolipid-Synthese in *B. glumae* PG1 überprüft. Dazu wurden zwei verschiedene Kohlenstoffquellen eingesetzt: Glycerol und Olivenöl. Sowohl Öl, als auch Glycerol sind als gute Kohlenstoffquellen zur Rhamnolipid-Herstellung bekannt (Dubeau *et al.*, 2009). Die Extrakte aus den jeweiligen Überständen wurden durch Dünnschichtchromatographie und anschließender Zucker-Färbung überprüft (II.10.3).

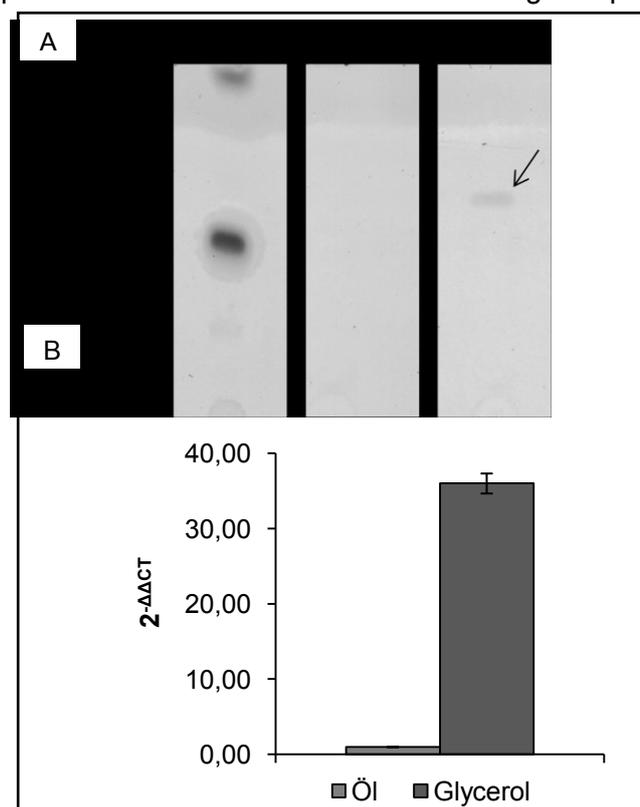


Abbildung 21: Nachweis von Rhamnolipiden mittels Dünnschichtchromatographie und der mRNA des *rhlA*-homologen Gens. (A) Als Standard wurde für die Dünnschichtchromatographie ein aufgereinigtes Rhamnolipidgemisch aus Mono- und Di-Rhamnolipiden von *P. aeruginosa* genutzt. Bei Glycerol als einziger Kohlenstoffquelle ist ein schwaches Signal (Pfeil) zu erkennen, das höher als die Di-Rhamnolipide von *P. aeruginosa* liegt. (B) Transkriptnachweis des *rhlA*-homologen Gens bei den verschiedenen Anzuchtbedingungen. Der Transkriptnachweis wurde in einer Dreifachbestimmung ausgeführt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an, die innerhalb von 10 % lag.

Unter den gewählten Anzuchtbedingungen und der Zugabe von Glycerol als Kohlenstoffquelle zeigte sich ein Signal bei *B. glumae* PG1, das in Höhe der Di-Rhamnolipide von *P. aeruginosa* liegt (siehe Abbildung 21 A). Unter diesen Bedingungen wurden außerdem Proben für einen Transkriptnachweis mittels *RealTime*-PCR isoliert. Mit spezifischen Primern wurden die Transkripte der *rhl*-homologen Gene nachgewiesen. Abbildung 21 B zeigt deutlich, dass bei dem Zusatz von Glycerol eindeutig mehr Transkript des *rhlA*-homologen Gens nachgewiesen werden kann, im Vergleich zu den beiden anderen Kohlenstoffquellen (Glucose und Öl).

Demzufolge scheint das Signal in Abbildung 21 A, Spur 3 ein putatives Rhamnolipid von *B. glumae* darzustellen, das, ableitend aus der Position auf der Dünnschichtplatte, ein anderes hydrophobes Laufverhalten wie die Di-Rhamnolipide von *P. aeruginosa* besitzt (vgl. Abbildung 21 A). Daher wurde aus dem Überstand von *B. glumae* das putative Rhamnolipid gereinigt (Deziel *et al.*, 1999) und mittels HPLC-MS (ProntoSIL 120-C8-SH, Bischoff Chromatographie, Leonberg) in Kooperation mit der Abteilung für zentrale Analytik des Forschungszentrums Jülich identifiziert. Bei der Messung zeigten sich drei dominierende Peaks zu verschiedenen Retentionszeiten, deren Massen Rhamnolipiden zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 22). Das Rhl mit einer Retentionszeit von 12,65 min und einem Masse-Ladungs-Verhältnis von 733,5 m/z wurde als Di-Rhamnolipid Rha-C₁₄-C₁₂ oder Rha-Rha-C₁₂-C₁₄ identifiziert (Abbildung 22 B). Das zweite Rhl mit einer Retentionszeit von 16,58 min und einem Masse-Ladungs-Verhältnis von 761,7 m/z konnte dem Di-Rhamnolipid Rha-Rha-C₁₄-C₁₄ zugeordnet werden (Abbildung 22 C). Dieser Peak zeigte auch die höchste Intensität und scheint damit das signifikante Rhamnolipid zu sein. Das Rhl mit dem höchsten Masse-Ladungs-Verhältnis von 789,6 m/z und einer Retentionszeit von 20,11min entsprach dem Di-Rhamnolipid von Rha-Rha-C₁₄-C₁₆ oder Rha-Rha-C₁₆-C₁₄ (Abbildung 22 D). Bei der Fragmentierung der einzelnen Rhamnolipide mit unterschiedlichen Kettenlängen, konnte die Reihenfolge der verknüpften Ketten nicht geklärt werden.

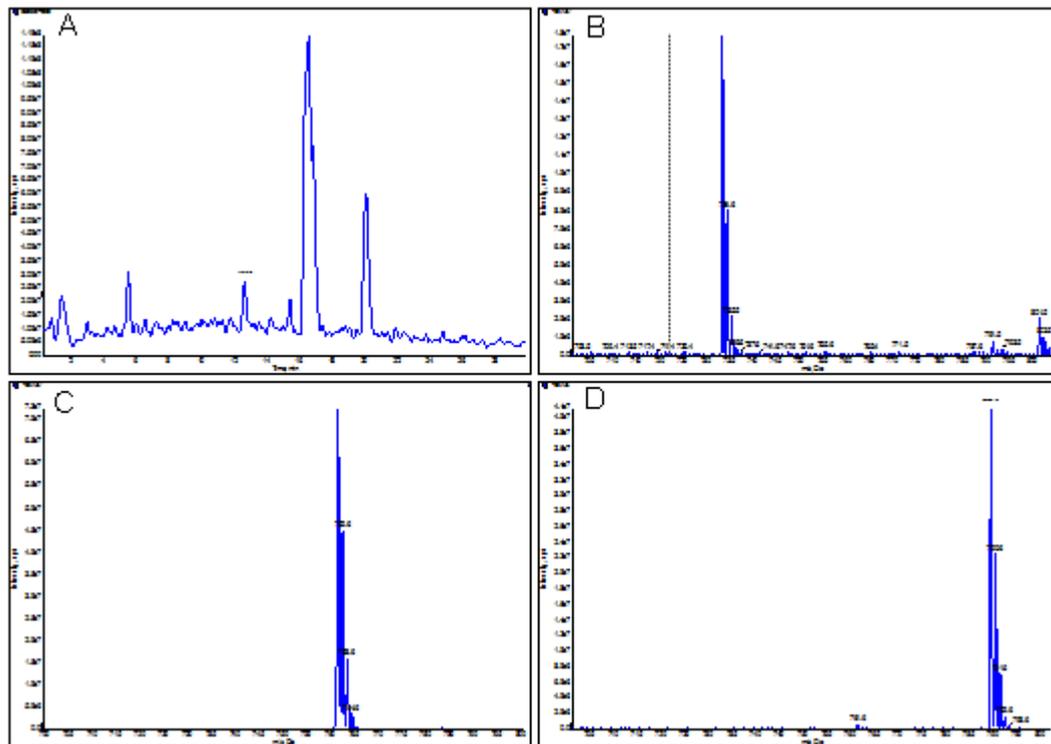


Abbildung 22: Identifizierung der Rhamnolipide von *B. glumae* PG1 mittels HPLC-MS. Es konnten drei dominierende Signale gemessen werden (A), deren Retentionszeiten dem Di-Rhamnolipid Rha-Rha-C₁₄-C₁₂ oder Rha-Rha-C₁₂-C₁₄ (B: 12,65 min), dem Di-Rhamnolipid Rha-Rha-C₁₄-C₁₄ (C: 16,58 min) und dem Di-Rhamnolipid Rha-Rha-C₁₄-C₁₆ oder Rha-Rha-C₁₆-C₁₄ (D: 20,11 min) entsprechen.

B. glumae produziert somit eine Mischung von Rhamnolipiden bestehend aus Rha-C₁₄-C₁₂ oder Rha-Rha-C₁₂-C₁₄, Rha-Rha-C₁₄-C₁₄ und Rha-Rha-C₁₄-C₁₆ oder Rha-Rha-C₁₆-C₁₄, wobei das Di-Rhamnolipid Rha-Rha-C₁₄-C₁₄ das überwiegende Rhamnolipid zu sein scheint (Knorr *et al.*, 2010).

***B. glumae* besitzt *rhl*-homologe Gene, deren Transkription mittels *RealTime*-PCR nachgewiesen werden konnte. Dünnschichtchromatographisch konnte putatives Rhamnolipid gefunden werden, das als ein Gemisch bestehend aus Rha-C₁₄-C₁₂ (Rha-Rha-C₁₂-C₁₄), Rha-Rha-C₁₄-C₁₄ und Rha-Rha-C₁₄-C₁₆ (Rha-Rha-C₁₆-C₁₄) identifiziert werden konnte.**

5.2 Untersuchung der Eigenschaften der Rhamnolipide

Da *B. glumae* durch die Produktion der Rhamnolipide eine neue biotechnologische nutzbare Eigenschaft zeigt, wurden die Eigenschaften der Rhamnolipide von *B. glumae* näher untersucht. Rhamnolipide von *P. aeruginosa* setzen die Oberflächenspannung von Wasser herab und wirken wie Tenside (Leitermann *et al.*, 2009; Lourith & Kanlayavattanukul, 2009). Diese Eigenschaft kann mit einem *Drop-collapsing* Test nachgewiesen werden (II.10.3.2). Dazu wird ein Tropfen Kulturüberstand auf eine hydrophobe Fläche gegeben. Wenn in dem

Überstand Rhamnolipide mit hohen tensidischen Eigenschaften vorhanden sind, breitet sich der Tropfen durch die niedrige Oberflächenspannung immer weiter aus. Auch der Kulturüberstand von *B. glumae* PG1 wurde durch einen *Drop-collapsing* Test untersucht, es konnte aber keine tensidische Wirkung der Rhamnolipide im Überstand nachgewiesen werden. Da *B. glumae* im Vergleich zu *P. aeruginosa* wesentlich weniger Rhamnolipide produziert und diese Rhamnolipide andere Kettenlängen besitzen, könnte die tensidische Wirkung der Rhamnolipide von *B. glumae* anders ausfallen.

Ausgehend von Abalos und Kollegen wurde eine weitere bekannte Eigenschaft von Rhamnolipiden untersucht: die bakterizide Wirkung auf andere Bakterien (Abalos *et al.*, 2001). Dazu wurden verschiedene Bakterienkulturen, sowohl Gram-positive wie Gram-negative Bakterien mit verschiedenen Konzentrationen des Rhamnolipidgemischs versetzt, das aus dem Überstand von *B. glumae* PG1 isoliert wurde. Als Kontrolle dienten Kulturen ohne Zusatz von Rhamnolipiden. Nach einer Kultivierung von 24 h wurde eine Trübungsmessung bei 580 nm durchgeführt. Das Wachstum wurde anhand der O.D._{580nm} im Vergleich zu der Kontrollkultur beurteilt. (siehe Tab. 9). Die Rhamnolipidkonzentration, bei der die Kulturen kein Wachstum zeigten, wurde als *minimal inhibition concentration* (MIC) festgelegt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht über die bakterizide Wirkung der Rhamnolipide von *B. glumae*. Es wurden sowohl Gram-positive, wie Gram-negative Bakterien getestet. Als MIC (*minimal inhibition concentration*) wurde die Konzentration der Rhamnolipide bezeichnet, bei der kein Wachstum festgestellt werden konnte.

Gram	Bakterienstamm	MIC (µg/ml)
-	<i>P. aeruginosa</i>	>500
-	<i>S. marcescens</i>	>500
-	<i>E. coli</i>	>500
+	<i>B. subtilis</i>	42
+	<i>S. aureus</i>	10

Tabelle 9 zeigt, dass die Gram-negativen Bakterien trotz hoher Konzentrationen des Rhamnolipidgemischs im Wachstum nicht inhibiert werden. Die Gram-positiven Bakterien zeigen jedoch schon bei Zugabe von niedrigen Konzentrationen der Rhamnolipide ein gehemmtes Wachstum (siehe Tabelle 9). Offensichtlich wirken die Rhamnolipide von *B. glumae* bakterizid auf Gram-positive Bakterien, während sie bei Gram-negativen Bakterien bis 500 µg/ml wirkungslos sind (Knorr *et al.*, 2010).

Die Rhamnolipide von *B. glumae* wirken bakterizid auf Gram-positive Bakterien.

5.3 Untersuchung der Rhamnolipid-Produktion in den *gsp*-Mutanten

Nach der Identifizierung der Rhamnolipide in *B. glumae* PG1 wurden auch die *gsp*-Mutanten von *B. glumae* auf ihre Rhamnolipidproduktion untersucht. Da die Rhamnolipidproduktion in *P. aeruginosa* über das QS-System reguliert wird und die Ausschüttung der Autoinducer den *gsp*-Mutanten im Vergleich zu *B. glumae* PG1 verändert war, sollten auch die eventuell vom QS-System regulierten Eigenschaften näher untersucht werden. Dazu wurden Kulturen der *gsp*-Mutanten angezogen und nach 24 h und 48 h auf ihren Rhamnolipidgehalt im Vergleich zu *B. glumae* PG1 analysiert (II.10.3) (siehe Abbildung 23).

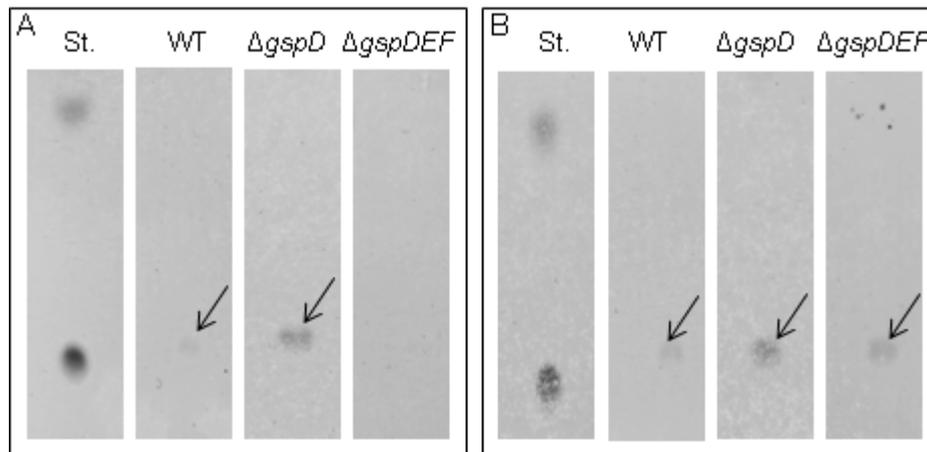


Abbildung 23: Rhamnolipidnachweis mittels Dünnschichtchromatographie von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* und PG1 Δ *gspDEF* im Vergleich zu *B. glumae* PG1. Die Rhamnolipide (siehe Pfeile) wurden nach 24 h (A) und 48 h (B) isoliert. Als Standard dienten Mono- und Di-Rhamnolipide von *P. aeruginosa*. Der Rhamnolipidnachweis von *B. glumae* PG1 (WT), PG1 Δ *gspD* (Δ *gspD*) und PG1 Δ *gspDEF* (Δ *gspDEF*) erfolgte in Dreifachbestimmung.

Die Rhamnolipide wurden nach der Extraktion aus dem Überstand dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt und mit dem zuckerspezifischen Färbemittel Orcinol nachgewiesen. Als Standard wurde das aufgereinigte Rhamnolipidgemisch von *P. aeruginosa* genutzt. Aus Abbildung 23 ist ersichtlich, dass *B. glumae* PG1 Δ *gspD* eine deutlich größere Rhamnolipidmenge im Überstand aufweist als *B. glumae* PG1, sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h. *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* zeigt auf der Dünnschichtplatte erst nach 48 h Rhamnolipid, aber ein anschließend durchgeführter Orcinoltest zeigt, dass zu beiden Zeitpunkten die gleiche Rhamnolipidmenge wie in *B. glumae* PG1 vorhanden ist (Abbildung 24 A).

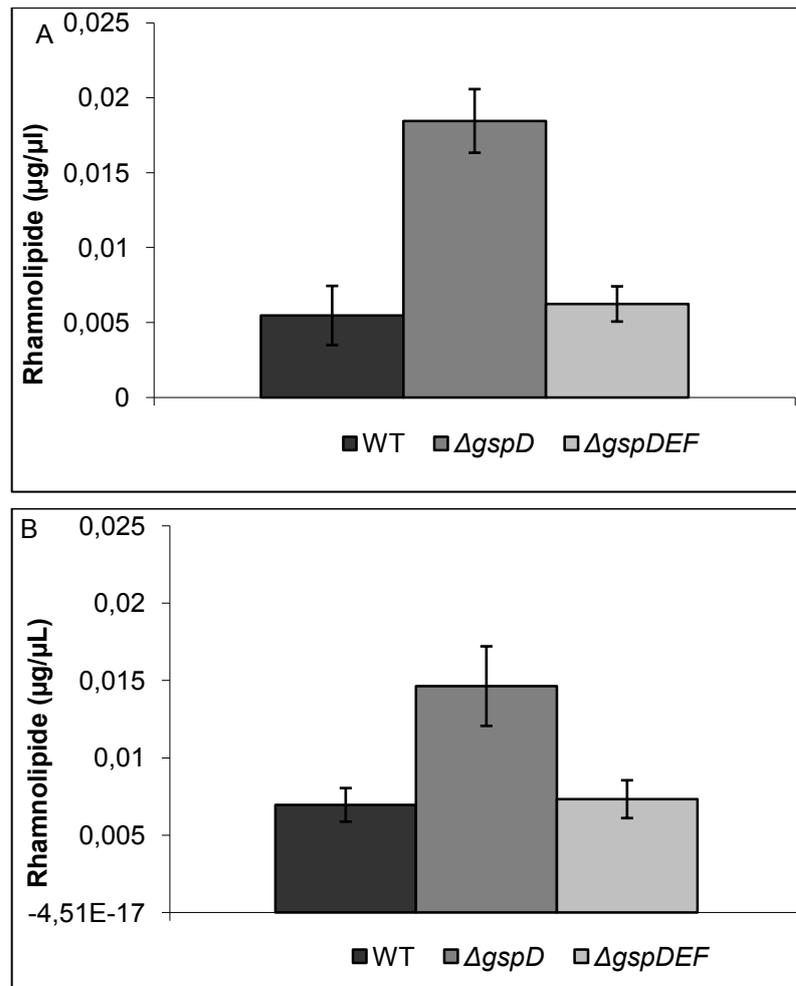


Abbildung 24: Rhamnolipidkonzentrationen im Überstand von *B. glumae*. Die Messungen wurden nach 24 h (A) und 48 h (B) durchgeführt. Es wurden die Rhamnolipide aus mind. drei unabhängigen Kulturen von *B. glumae* PG1 (WT), PG1 ΔgspD . (ΔgspD) und PG1 ΔgspDEF (ΔgspDEF) quantifiziert. Die Standardabweichung lag innerhalb von 10 %.

B. glumae PG1 ΔgspD zeigt nach 24 h eine ca. 3-fach höhere Menge von Rhamnolipiden und nach 48 h eine ca. 2-fach höhere Menge (siehe Abbildung 24 A/B) als *B. glumae* PG1. Die Rhamnolipidproduktion der *gspDEF*-Mutante ist vergleichbar zu *B. glumae* PG1 (Abbildung 24 A/B). Die Rhamnolipidkonzentration im Überstand von *B. glumae* PG1 ΔgspD ist unter gleichen Bedingungen deutlich höher als in *B. glumae* PG1, während die *gspDEF*-Mutante keine Beeinflussung der Rhamnolipidproduktion zeigt. Um nun zu analysieren, ob auch die Gene stärker exprimiert werden, wurden unter den Anzuchtbedingungen der Rhamnolipidproduktion nach 24 h und 48 h Proben für einen Transkriptnachweis mit Hilfe von *RealTime*-PCR genommen und für diese vorbereitet (II.7). Es wurden Primer gewählt, die in dem nachzuweisenden Gen (*rhIA*, *rhIB* und *rhIC*) ein Fragment von 100-150 bp nach der reversen Transkription amplifizieren. Die *RealTime*-PCR zeigte, dass die Transkriptmenge aller drei Gene zu den gewählten Zeitpunkten in *B. glumae* PG1 ΔgspD höher ist als bei *B. glumae* PG1 (vgl. Abbildung 25 und 26). Transkript von *rhIC* konnte nach

24 h nur in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* nachgewiesen werden, da weder *B. glumae* PG1, noch *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* zu den gewählten Zeitpunkten über Transkript von *rhIC* verfügten. Bei *rhIA* und *rhIB* konnte in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* die doppelte Transkriptmenge als in *B. glumae* PG1 gezeigt werden (Abbildung 26). *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* zeigte nur bei *rhIA* eine Erhöhung der Transkriptmenge im Vergleich zu *B. glumae* PG1. Durch die zu *B. glumae* PG1 vergleichbare Transkriptmenge von *rhIB* und das Fehlen von *rhIC* zu dem gewählten Zeitpunkt, hat die erhöhte Menge des Gens *rhIA* vermutlich keine Auswirkung auf die Produktion der Rhamnolipide in *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* (vgl. Abbildung 23,24 und 25).

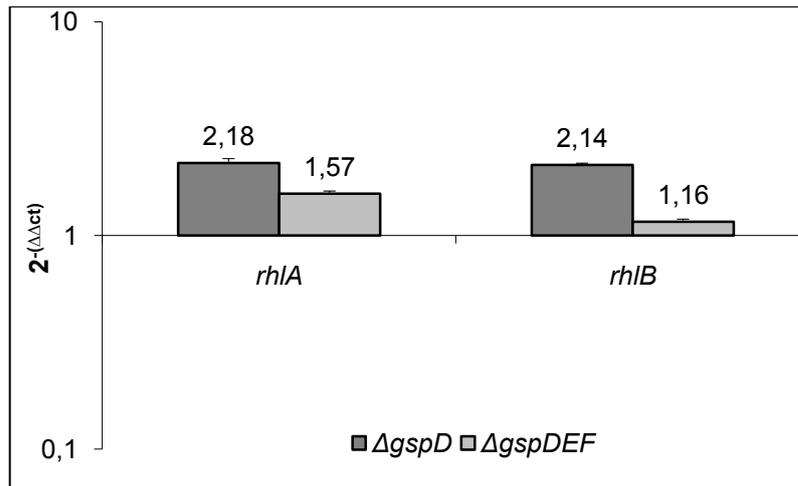


Abbildung 25: Transkriptnachweis der Gene *rhIA* und *rhIB* in den *gsp*-Mutanten nach 24 h. Aufgetragen wurde der Logarithmus von $2^{-(\Delta\Delta ct)}$, die Transkriptmenge von *B. glumae* PG1 wurde auf 1 eingestellt. Mit $2^{-\Delta\Delta ct}$ wird die Transkription des betrachteten Gens (hier: *rhIA* und *rhIB*) im Vergleich zu einem Referenzgen angegeben. Wegen der logarithmischen Auftragung wird nur der positive Fehlerbalken angegeben.

Der Transkriptnachweis für die *rhl*-Gene nach 48 h-stündigen Wachstum zeigte, dass *B. glumae* PG1 Δ *gspD* im Vergleich zu *B. glumae* PG1 die doppelte Menge an Transkript von *rhIA* aufweist (Abbildung 26). Transkript von *rhIB* ist nach 48 h zwar noch in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* nachweisbar, jedoch ist wegen Fehlen des Transkripts in *B. glumae* PG1 zu diesem Zeitpunkt ein Vergleich nicht möglich. Das Transkript von *rhIC* fehlte bei beiden Stämmen zu diesem Zeitpunkt. Bei *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* zeigt der Transkriptnachweis der verschiedenen *rhl*-Synthesegene deutlich eine Abnahme der Transkriptmenge. Die Transkriptmenge von *rhIA* ist 0,59 fach reduziert im Vergleich zu *B. glumae* PG1 (siehe Abbildung 26).

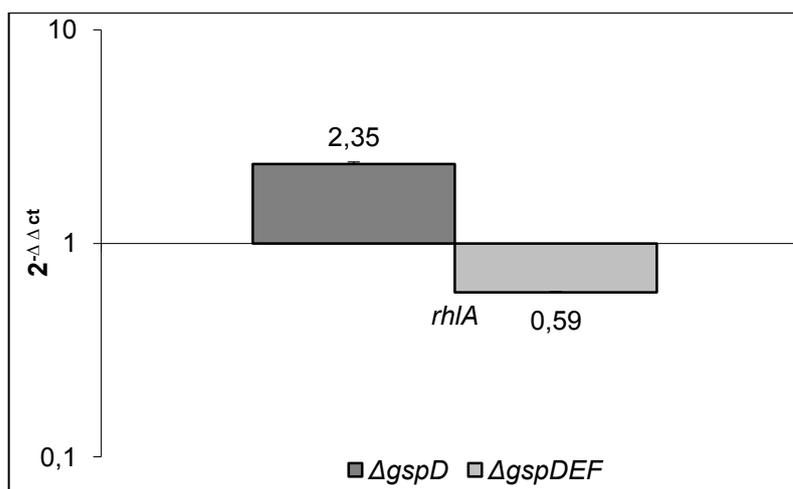


Abbildung 26: Transkriptnachweis des Gens *rhIA* in den *gsp*-Mutanten nach 48 h. Aufgetragen wurde der Logarithmus von $2^{-(\Delta\Delta ct)}$, die Transkriptmenge von *B. glumae* PG1 wurde auf 1 eingestellt. Wegen der logarithmischen Auftragung wird nur der positive Fehlerbalken angegeben.

Transkript von *rhIB* war zwar vorhanden, durch das Fehlen des Transkripts bei *B. glumae* PG1 war ein Vergleich zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Transkript von *rhIC* war nach 48 h bei *B. glumae* PG1Δ*gspDEF* nicht nachweisbar.

Die erhöhte Rhamnolipidproduktion in *B. glumae* PG1Δ*gspD* im Vergleich zu *B. glumae* PG1 lässt sich damit auf die erhöhte Transkription der *rhl*-Synthesegene zurückführen. Aufgrund der erhöhten Transkriptmenge werden vermutlich mehr Rhamnolipid-produzierende Proteine als in *B. glumae* PG1 hergestellt. Durch die höhere Menge an Rhl- Proteinen werden letztendlich mehr Rhamnolipide hergestellt. Worauf nun die erhöhte Transkription der *rhl*-Synthesegene zurückzuführen ist, kann man an dieser Stelle nur vermuten, da die Rhamnolipidproduktion in *Burkholderiaceae* noch nicht vollständig charakterisiert wurde. Für eine genaue Einschätzung müsste die Rhamnolipid-Produktion in *B. glumae* PG1 eingehend begutachtet werden, um zum einen die genauen Zeitpunkte der Transkription der *rhl*-Synthesegene bestimmen zu können und auch die Regulation der *rhl*-Synthesegene näher zu untersuchen.

***B. glumae* PG1Δ*gspD* produziert nach 24 h die 3 fache und nach 48 h die 2 fache Menge an Rhamnolipiden im Vergleich zu *B. glumae* PG1. Die erhöhte Produktion der Rhamnolipide lässt sich auf eine höhere Transkription der Rhl-Synthesegene zurückführen.**

5.4 Wirkung des PQS-ähnlichen Signals auf die Rhamnolipide

In *P. aeruginosa* ist bekannt, dass zwischen der Herstellung der Rhamnolipide und der Bildung von PQS ein nicht ganz geklärter Zusammenhang besteht. Es scheint, dass das PQS-Signal die Induktionsfähigkeit des RhlR-Regulators erhöht (Diggle *et al.*, 2003). Es

konnte außerdem gezeigt werden, dass das PQS-Signal und die Rhamnolipide kooperativ bei *Pseudomonas* Infektionen agieren können (Calfée *et al.*, 2005). Dabei erhöhen Rhamnolipide die Löslichkeit und die Bioaktivität des Signalmoleküls PQS (Calfée *et al.*, 2005). Da die *gspD*-Mutante eine erhöhte Rhamnolipidproduktion zeigt, sollte nun untersucht werden, inwiefern das PQS-ähnliche Signal aus *B. glumae* PG1 Einfluss auf die erhöhte Rhamnolipidproduktion von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* nimmt. Daher wurden Kulturen von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* mit dem PQS-ähnlichen Molekül (siehe III.4.2), die aus *B. glumae* PG1 isoliert wurden, in verschiedenen Mengen (10 μ l, 20 μ l, 30 μ l) zugesetzt und die Rhamnolipidproduktion nach 24 h überprüft. Die anschließende Dünnschichtchromatographie der Extrakte zeigte, dass das PQS-ähnliche Signal hier keinen Einfluss auf die Rhamnolipidproduktion in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* hat (siehe Abbildung 27).

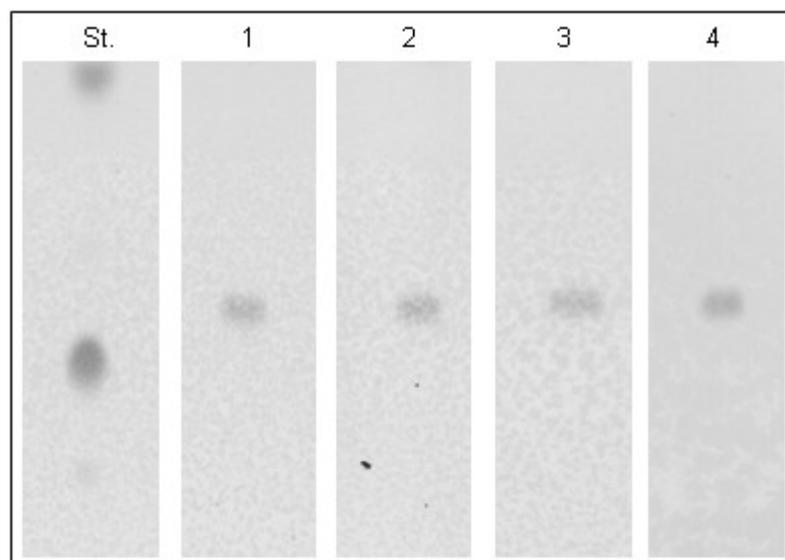


Abbildung 27: Dünnschichtchromatographie der Rhamnolipide nach Zugabe des PQS-Analogs. Als Standard wurde ein Rhamnolipidgemisch von *P. aeruginosa* eingesetzt. Als Kontrolle diente *B. glumae* PG1 Δ *gspD* ohne Zusatz (1). Außerdem wurden zugesetzt 10 μ l (2), 20 μ l (3) und 30 μ l (4) des PQS-ähnlichem Signals.

Obwohl das PQS-Analog in verschiedenen Mengen zugegeben wurde, ändert sich die Menge der Rhamnolipide im Vergleich zu der Kultur ohne Zusatz nach 24 h nicht (Abbildung 27). Das PQS-ähnliche Signal hat somit keinen Einfluss auf die Rhamnolipidproduktion.

Das PQS-ähnliche Signal hat keinen Einfluss auf die erhöhte Rhamnolipidproduktion in *B. glumae* PG1 Δ *gspD*.

6 Biofilmbildung

6.1 Untersuchung der Biofilm-bildenden Eigenschaften von *B. glumae*

Biofilme kommen ubiquitär im Boden, im Wasser, auf Pflanzen, in Tieren und auch bei Menschen vor und bieten den Organismen viele Vorteile. Von verschiedenen pathogenen *Burkholderia*-Arten ist bekannt, dass sie Biofilme bilden können (Lewenza & Sokol, 2001). *B. cepacia* bildet gemischte Biofilme mit *P. aeruginosa* und ist in der Lage, durch QS-Systeme Virulenzfaktoren zu regulieren und diese in den Lungenepithelzellen von CF-Patienten zu steuern. (Riedel *et al.*, 2001). Die Biofilmbildung ist eine weitere QS-abhängige Eigenschaft von Bakterien, die nun in *B. glumae* PG1 näher untersucht wurde.

Um Bedingungen für die Biofilmbildung in *B. glumae* PG1 definieren zu können, wurde in Mikrotiterplatten der Firma Nunc die Biofilmbildung mit zwei verschiedenen Minimalmedien (MME und M63 (II.4.1)) und verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Glycerol, Olivenöl), statisch oder schüttelnd mit verschiedenen Inkubationszeiten getestet. Der Nachweis des Biofilms erfolgte mit Kristallviolett, das negativ geladene Moleküle anfärbt. Um den Biofilm zu quantifizieren, wird der gefärbte Biofilm mit Hilfe von Ethanol (reinst.) abgewaschen und die Absorption bei 520 nm gemessen. Es zeigte sich, dass sich besonders die Zugabe von Olivenöl zur Biofilmbildung bei *B. glumae* eignet (siehe Abbildung 28), da bei anderen Kohlenstoffquellen kein Biofilm beobachtet werden konnte.

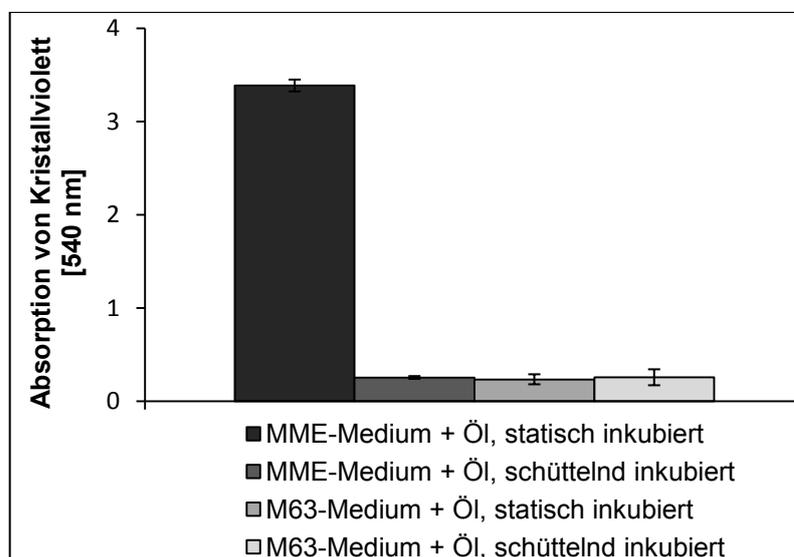


Abbildung 28: Nachweis der Biofilmbildung von *B. glumae* PG1 unter verschiedenen Anzuchtbedingungen durch Zugabe von Olivenöl. Die Kulturen wurden für 24 h statisch oder schüttelnd inkubiert. Der Nachweis der Biofilmbildung erfolgte mittels Kristallviolett in drei unabhängigen Kulturen.

Es zeigte sich die ausgeprägteste Biofilmbildung mit dem Minimalmedium MME und statischer Inkubation (vgl. Abbildung 28). Bei den Inkubationszeiten bewährte sich 24 h, da nach 16 h die Biofilmbildung noch sehr gering war und sie ab 24 h deutlich sichtbar wurde.

Somit wurde als Methodik für die Biofilmbildung bei *B. glumae* das Minimalmedium MME mit Olivenöl als Zusatz, eine statische Inkubation bei 30° C und einer Inkubationszeit von 24 h festgelegt.

Im Anschluss wurden die *gsp*-Mutanten unter den gleichen Bedingungen auf ihren biofilmbildenden Phänotyp untersucht. Dabei zeigte sich, dass beide *gsp*-Mutanten keinen Biofilm bilden (Abbildung 29). Abbildung 29 zeigt, dass bei *B. glumae* PG1 die gefärbten Ablagerungen des Biofilms deutlich zu erkennen sind, während bei beiden *gsp*-Mutanten keine gefärbten Ablagerungen sichtbar sind.

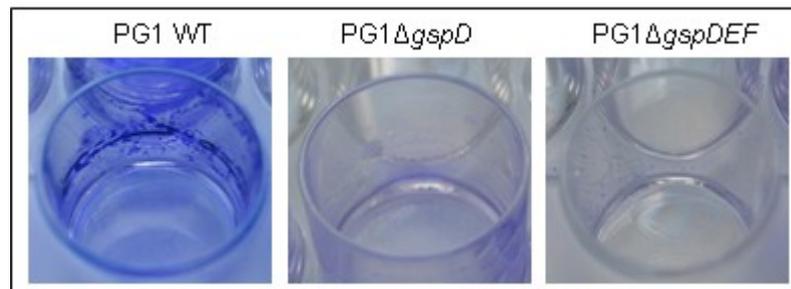


Abbildung 29: Biofilmbildung von *B. glumae*. Der Biofilm in Mikrotiterplatten angezogen und mit Hilfe des Farbstoffs Kristallviolett angefärbt. Dieser Nachweis wurde in Dreifachbestimmung mit *B. glumae* PG1, PG1Δ*gspD* und PG1Δ*gspDEF* durchgeführt.

Damit zeigt sich, dass *B. glumae* PG1 im Gegensatz zu den *gsp*-Mutanten in der Lage ist Biofilm zu bilden (Abbildung 29). Nach dem Nachweis mittels Kristallvioletts wurde die Biofilmbildung von *B. glumae* PG1, PG1Δ*gspD* und PG1Δ*gspDEF* außerdem mikroskopisch untersucht. Dazu wurde ein Plasmid mit dem für Gfp (*green fluorescent protein*) kodierenden Gens unter dem konstitutiven *lac*-Promotor in *B. glumae* PG1, PG1Δ*gspD* und PG1Δ*gspDEF* eingebracht. Es wurde sichergestellt, dass das Protein in *B. glumae* in den Mikrotiterplatten exprimiert wird und auch ohne Selektionsdruck im Bakterium verbleibt. Durch die Gfp-Markierung ist es möglich, Zellen in den Ablagerungen nachweisen zu können. Für die Biofilm-Mikroskopie wurden Plastikstücke bestehend aus Polystyrol in die Kultur getaucht und in der Kultur 24 h inkubiert. Das Plastikstück wurde aus der Kultur entnommen und zusammen mit einem Objektträger auf dem Mikroskopie-Plättchen fixiert. Die Mikroskopie erfolgte mit Phasen-Kontrast-Einstellungen, wie auch mit dem Fluoreszenz-Reflektor (Abbildung 30). Als Kontrolle diente das Medium mit Kohlenstoffquelle ohne Zusatz von Zellen.

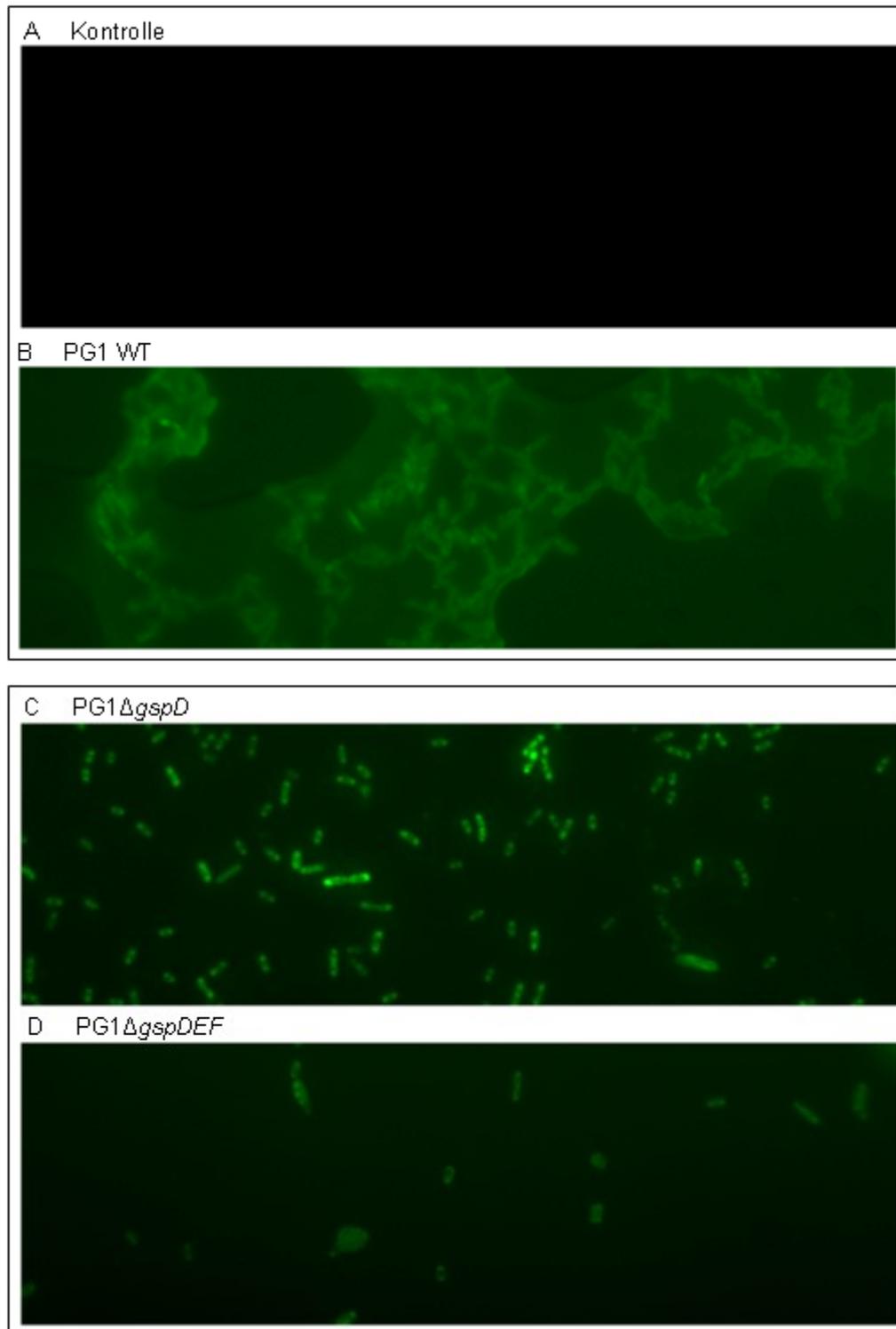


Abbildung 30: Mikroskopie des Biofilms von *B. glumae*. Es wurden sowohl *B. glumae* PG1 (B), als auch *B. glumae* PG1 Δ gspD (C) und *B. glumae* PG1 Δ gspDEF (D) mikroskopiert. Als Kontrolle diente das Medium mit der Kohlenstoffquelle Olivenöl ohne Zellen (A).

Abbildung 30 macht deutlich, dass bei *B. glumae* PG1 um einen wirklichen Biofilm handelt, da die Zellen in Zellverbänden eingegliedert und in einer Matrix eingebettet sind (Abbildung 30). Bei *B. glumae* PG1 Δ gspD und PG1 Δ gspDEF zeigt sich ein anderes Bild, dort sind eindeutig einzelne Zellen bzw. Zellverbände von 2-3 Zellen zu sehen, die nicht vergleichbar

mit den Zellverbänden von *B. glumae* PG1 sind (Abbildung 30). Auch eine Matrix ist bei beiden *gsp*-Mutanten nicht zu erkennen. Damit sind die durch Kristallviolett gefärbten Ablagerungen bei *B. glumae* PG1 nicht auf die Produktion oder den Transport von negativ geladenen Sekundärmetaboliten zurückzuführen, sondern auf tatsächliche Biofilmbildung, die bei den *gsp*-Mutanten fehlt.

Die *gsp*-Mutanten können die Kohlenstoffquelle Olivenöl wegen der fehlenden Lipase im Überstand schlechter verstoffwechseln als *B. glumae* PG1. Daher kann man vermuten, dass die *gsp*-Mutanten niedrigere Zelldichten erreichen und daher keine Biofilmbildung möglich ist. Da Biofilm erst bei höheren Zelldichten gebildet wird, wurde das Wuchsverhalten von *B. glumae* PG1, PG1 Δ *gspD* und PG1 Δ *gspDEF* in Mikrotiterplatten durch Trübungsmessung bei 580 nm analysiert.

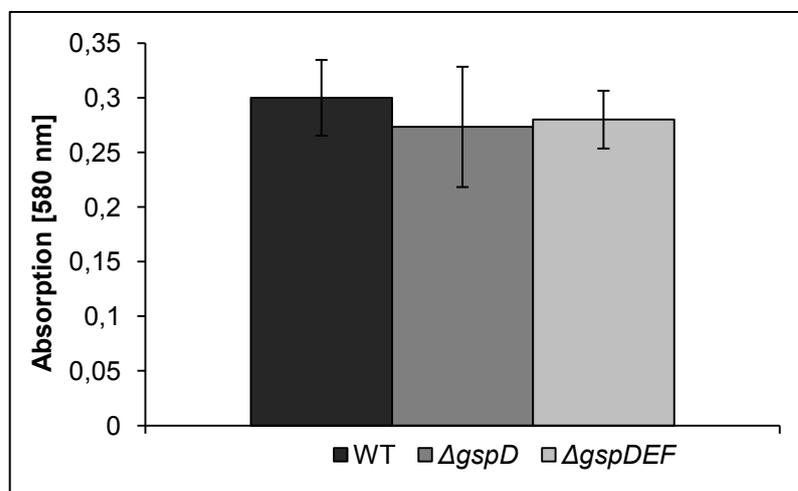


Abbildung 31: Wachstum von *B. glumae* unter biofilmbildenden Bedingungen. In den Mikrotiterplatten zeigen die Kulturen vergleichbare Zelldichten. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte anhand der Trübungsmessung (O.D._{580nm}) in drei unabhängigen Kulturen von *B. glumae* PG1 (WT), PG1 Δ *gspD* (Δ *gspD*) und PG1 Δ *gspDEF* (Δ *gspDEF*). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

Die Zellen von *B. glumae* PG1 erreichen in den Mikrotiterplatten nach 24 h niedrigere Zelldichten, diese sind aber vergleichbar zu *B. glumae* PG1 Δ *gspD* und PG1 Δ *gspDEF* (Abbildung 31). Hierbei zeigt sich außerdem, dass sich das planktonische Wachstum in Schüttelkolben nicht mit dem adhäsiven Wachstum unter statischen Bedingungen in Mikrotiterplatten vergleichen lässt (Abbildung 31).

Die Biofilmbildung des Wildtyps lässt sich nicht auf besseres Wachstum zurückzuführen. Aufgrund des defizienten Typ II-Systems werden verschiedene Proteine oder Faktoren bei den *gsp*-Mutanten nicht transportiert. Anscheinend ist durch die Mutationen der Transport eines Proteins oder Faktors betroffen, der in die Biofilmbildung involviert ist.

***B. glumae* PG1 bildet Biofilme. Die Mutanten mit defizientem Typ II-Sekretionssystem bilden trotz vergleichbarer Zelldichten keinen Biofilm.**

6.2 Der Überstand von *B. glumae* PG1 enthält einen Biofilm-induzierenden Faktor

Nachdem die *gsp*-Mutanten keine Biofilmbildung im Biofilmmassay zeigten, wurde untersucht, ob die Biofilmbildung wiederherstellbar ist. Dazu wurde den Kulturen der *gsp*-Mutanten zellfreier Überstand von *B. glumae* PG1 in verschiedenen Mengen zugesetzt. Der Überstand von *B. glumae* PG1 wurde nach 24 h mittels Zentrifugation von den Zellen getrennt und anschließend filtriert (Porengröße 0,2 µm). Es wurden 100 µl des Überstands auf Agarplatten ausplattiert und für 24 h bei 30° C inkubiert. Auf den Agarplatten konnte kein Wachstum festgestellt werden und somit galt die Präparation als zellfrei.

Für den Biofilmtest wurde der zellfreie Überstand in verschiedenen Mengen den Kulturen der *gsp*-Mutanten bei der Inokulation zugesetzt und für 24 h inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die Biofilmbildung von beiden *gsp*-Mutanten wiederhergestellt werden kann (Abbildung 32). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die wiederhergestellte Biofilmbildung abhängig von der zugesetzten Menge des Überstands ist (Abbildung 32).

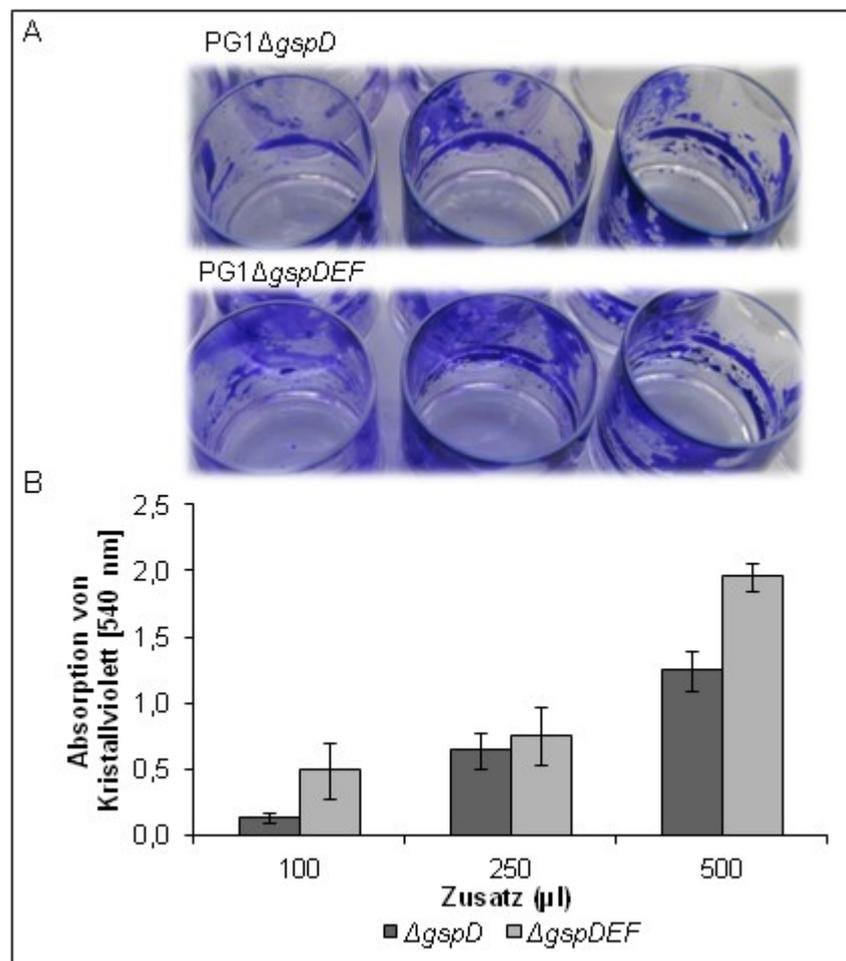


Abbildung 32: Biofilmbildung der *gsp*-Mutanten. Die wiederhergestellte Biofilmbildung wurde mittels Kristallviolett färbung nachgewiesen (A). Das Kristallviolett wurde anschließend abgewaschen und photometrisch bei 540 nm gemessen. Der Nachweis und die Quantifizierung wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken im Diagramm geben die Standardabweichung an.

Da sich die Biofilmbildung durch die Zugabe des zellfreien Überstands wiederherstellen lässt (Abbildung 32), ist zu vermuten, dass der Überstand einen Faktor enthält, der die

Biofilmbildung wieder ermöglicht. Da die Menge des Biofilms mit der Menge des zugesetzten Überstand korreliert, ist das ein weiterer Hinweis auf einen Biofilm-induzierenden Faktor. Die wiederhergestellte Biofilmbildung der *gsp*-Mutanten zusätzlich mikroskopisch untersucht, um festzustellen, ob sie vergleichbar mit der Biofilmbildung von *B. glumae* PG1 WT ist (Abbildung 33).

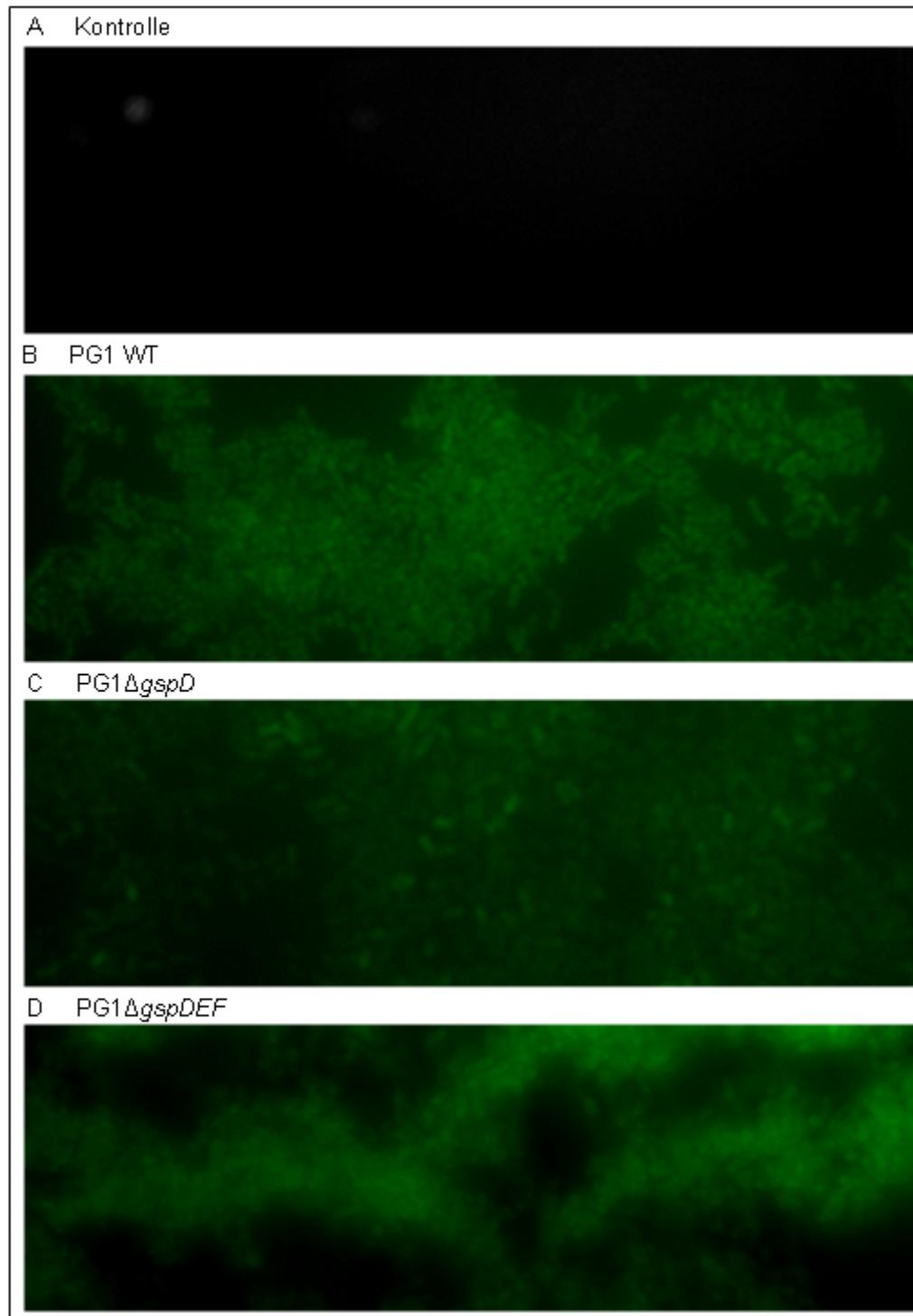


Abbildung 33: Mikroskopie des wiederhergestellten Biofilms der *gsp*-Mutanten. Es wurde Kulturen von *B. glumae* PG1 (B), PG1Δ*gspD* (C) und PG1Δ*gspDEF* (D) mikroskopiert, denen zellfreier Überstand von *B. glumae* PG1 zugesetzt wurde. Als Kontrolle diente das Medium MME mit zugesetztem zellfreiem Überstand (A). Die Fluoreszenzmikroskopie wurde durch ein plasmid-kodiertes Gfp ermöglicht.

Aus Abbildung 33 geht hervor, dass die Biofilme von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* und PG1 Δ *gspDEF* vergleichbar sind mit dem Biofilm von *B. glumae* PG1. Die Zellen aggregieren sehr stark und sind in einer Matrix eingebettet. Selbst der Biofilm von *B. glumae* PG1 wird durch die Zugabe des zellfreien Überstands verstärkt (Abbildung 33). Der Überstand von *B. glumae* PG1 scheint einen Biofilm-induzierenden Faktor zu enthalten. Dieser Faktor stellt nicht nur den Biofilm bei den *gsp*-Mutanten wieder her, sondern verstärkt auch den Biofilm bei *B. glumae* PG1.

Aus diesem Grund wurde der Biofilm-induzierende Faktor im Überstand von *B. glumae* PG1 im Anschluss näher charakterisiert (Tab.10). Bei *P. aeruginosa* ist freie DNA ein Bestandteil des Biofilms (Whitchurch *et al.*, 2002), daher wurde der Überstand auf seinen Gehalt an extrazellulärer DNA und ihre Wirkung auf den Biofilm untersucht. Dazu wurde freie DNA im Überstand mit Isopropanol gefällt und ein Teil gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei zeigte sich, dass keine bzw. nur geringe Mengen an freier DNA im Überstand enthalten sind. Der andere Teil der gefällten DNA wurde in Medium gelöst und dann den *gsp*-Mutanten zugesetzt. Nach einer Inkubation von 24 h zeigte ein anschließender Biofilmmassay, dass die Biofilmbildung der *gsp*-Mutanten nicht beeinflusst wurde. Zusätzlich wurde der Überstand mit einer DNase behandelt und anschließend dem Biofilmmassay zugefügt. Auch damit konnten die *gsp*-Mutanten Biofilm bilden. Damit scheint extrazelluläre DNA nicht der auslösenden Faktor für die Biofilmbildung zu sein (Tab. 10).

In weiteren Analysen wurde der Überstand für 10 min bei 100° C hitzebehandelt, um alle Hitze-empfindlichen Faktoren zu denaturieren. Der behandelte Überstand wurde dem Biofilmmassay erneut zugefügt und auch in diesem Fall zeigten die *gsp*-Mutanten keine Biofilmbildung. Damit ist der Biofilm-induzierende Faktor durch Hitze inaktivierbar.

Um weitere Komponenten zu identifizieren, die den Biofilm-induzierenden Faktor inhibieren können, wurden u. a. auch zwei verschiedene Proteasen eingesetzt. Der Überstand wurde sowohl mit Trypsin als auch mit Proteinase K inkubiert, was ebenfalls dazu führte, dass der Biofilm nicht ausgebildet werden konnte. Damit zeigt sich, dass der Biofilm-induzierende Faktor sowohl durch Hitze als auch durch Proteasen inaktivierbar ist und damit Protein-spezifische Merkmale aufweist (Tab. 10).

Da der Biofilm-induzierende Faktor diese Protein-spezifische Charakteristika zeigt, wurde der Überstand anschließend mit Größenausschluss-Zentrifugation in verschiedene Fraktionen aufgeteilt und die Biofilmbildung überprüft. Die so genannten *cut off*-Zentrifugationen erfolgten in den Konzentratoren Vivaspin 20 (Sartorius, Göttingen), die eine Membran mit einem *cut off* von z. B. 10 kDa, 30 kDa oder 50 kDa enthalten. Durch Zentrifugation werden Bestandteile die kleiner als der *cut off* sind, unterhalb der Membran gesammelt. Größere Bestandteile können die Membran nicht passieren und werden oberhalb der Membran

gesammelt. Aus den gesammelten Fraktionen oberhalb der Membran wurden Proben entnommen und diese in den Biofilmmassay eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass der Biofilmbildende Faktor eine Größe < 50 kDa umfassen muss (siehe Tab. 10).

Tabelle 10: Auflistung der zur Identifizierung des Biofilm-induzierenden Faktors durchgeführten Experimente. Das + kennzeichnet Biofilmbildung, während das - die fehlende Biofilmbildung kennzeichnet.

Behandlung des Überstands	Biofilmbildung
DNA-spezifische Behandlung	
Isopropanolfällung	+
DNase-Behandlung	+
Protein-spezifische Behandlung	
Kochen des Überstands	-
Trypsin-Behandlung	-
Proteinase K-Behandlung	-
Größenausschluss der Proteine < 10 kDa	+
Größenausschluss der Proteine < 30 kDa	+
Größenausschluss der Proteine < 50 kDa	+
Lipase-spezifische Behandlung	
Zugabe von Lipase	+
Glycerol als Kohlenstoffquelle	-
Ölsäure als Kohlenstoffquelle	+
Tributyryn als Kohlenstoffquelle	-

Die vorherigen Untersuchungen zeigten, dass der Biofilm nur unter Zugabe von Öl gebildet wird. Da Öl die Expression der Lipase bei *B. glumae* induziert, wurde außerdem untersucht, ob die Lipase in die Biofilmbildung involviert ist. Da der Transport der Lipase bei den *gsp*-Mutanten gestört ist, wurde aufgereinigte Lipase in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt und die Biofilmbildung überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Biofilmbildung bei beiden *gsp*-Mutanten wieder einsetzt, nachdem die Lipase zugesetzt wurde. Damit wurde erstmals nachgewiesen, dass die Lipase an der Biofilmbildung in *B. glumae* beteiligt ist. Um eingrenzen zu können, inwieweit die Lipase an der Biofilmbildung beteiligt ist, wurden die verschiedenen Produkte aus der lipolytischen Spaltung von Öl zu dem Biofilmmassay zugesetzt. Olivenöl besteht aus an Glycerol gebundenen Fettsäuren, die in unterschiedlicher Kettenlängen vorliegen. In Olivenöl findet sich neben weiteren Fettsäuren, Palmitin- (Hexadecansäure) und Linolsäure ((*cis,cis*)-Octadeca-9,12-diensäure), hauptsächlich aber Ölsäure (9-*cis*-Octadecensäure). Somit wurden Glycerol und Ölsäure den *gsp*-Mutanten in dem Biofilmmassay zugefügt und die Biofilmbildung überprüft. Bei Glycerol als Kohlenstoffquelle konnte keine Biofilmbildung bei den *gsp*-Mutanten nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Zugabe von Ölsäure jedoch sehr starke Biofilmbildung (vgl. Tab. 10). Außerdem wurde ein Triglycerid, Tributyrin, den *gsp*-Mutanten im Biofilmmassay zugesetzt. Tributyrin löst jedoch keine Biofilmbildung bei den *gsp*-Mutanten aus. Somit scheint die nur Ölsäure neben der Lipase die Biofilmbildung bei den *gsp*-Mutanten zu ermöglichen. Bei der eingesetzten Fettsäure Ölsäure und auch bei dem hydrophoben Tributyrin fiel jedoch auf, dass sie aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften durch Kristallviolett angefärbt werden. Die Biofilmbildung mit Ölsäure wurde zu einem späteren Zeitpunkt eingehender untersucht.

Bei der Größenausschluss-Zentrifugation zeigte sich, dass der Biofilm-induzierende Faktor größer als 50 kDa ist, die Lipase von *B. glumae* umfasst aber nur 33 kDa. Dies deutet zunächst daraufhin, dass nicht die Lipase der Biofilm-induzierende Faktor ist.

Der Überstand von *B. glumae* beinhaltet einen Biofilm-induzierenden Faktor, der Protein-spezifische Charakteristika aufweist. Die Lipase scheint an der Biofilmbildung beteiligt zu sein.

6.3 Aufreinigung des Biofilm-induzierenden Faktors

Nach diesen Ergebnissen sollte der Biofilm-induzierende Faktor identifiziert werden. Da dieser Biofilm-induzierende Faktor Protein-spezifische Merkmale aufweist und in der Größenausschluss-Zentrifugation gezeigt hat, dass er sich durch seine Größe von kleineren Komponenten trennen lässt, wurde der Überstand durch Größenausschluss-Chromatographie gereinigt (II.9.4). Bei der Chromatographie wurden die im Überstand enthaltenen Proteine in einzelne Fraktionen aufgeteilt. Das Chromatographie-Profil präsentierte ein dominierendes Signal im Bereich von großen Proteinen und ein deutlich kleineres Signal im Bereich kleinerer Proteine.

Alle Fraktionen im Bereich der Signale wurde auf ihre biofilmbildende Eigenschaften untersucht. Dazu wurden 100 µl in einem Biofilmmassay mit *B. glumae* PG1Δ*gspD* eingesetzt. Eine Fraktion ermöglichte bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* die Biofilmbildung. Da die Chromatographiesäule mit spezifischen Proteinen vor der Aufreinigung geeicht wurde, konnte die Größe der Proteine, die in der Biofilmbildenden Fraktion enthalten sind, berechnet werden (II.9.4). Die berechnete Größe der Proteine lag bei ~296 kDa. Bei dieser Größe könnte es sich bei dem Biofilm-induzierenden Faktor um ein sehr großes Protein oder ein Komplex aus verschiedenen Proteinen handeln. Da bei vorherigen Untersuchungen ein Einfluss der Lipase beobachtet wurde, wurde die Lipase-Aktivität der Biofilmbildenden Fraktion überprüft und tatsächlich konnte in dieser Fraktion Lipase-Aktivität festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass der Biofilm-induzierende Faktor aus einem Proteinkomplex besteht, wobei die Lipase ein Teil des Komplexes ist.

Zur Visualisierung der enthaltenen Proteine wurde die Fraktion aufkonzentriert und sowohl eine SDS-PAGE, als auch eine native Gelelektrophorese durchgeführt (Abbildung 34).

Bei der SDS-PAGE zeigten sich zwei dominierende Banden einer Größe von ~33 kDa und ~35 kDa (Abbildung 34 A). Die native Gelelektrophorese wies eine dominierende Bande kleiner als ~100 kDa auf (Abbildung 34 B). Die native Gelelektrophorese deutet tatsächlich auf eine Komplexbildung von Proteinen hin, da sich hier nur eine Bande zeigt, bei der SDS-PAGE jedoch zwei Banden (Vgl. Abbildung 34 A). Außerdem schmiert die Bande in der nativen Gelelektrophorese sehr, was wiederum ein Hinweis auf den Zerfall des Komplexes in kleinere Einheiten sein kann (Abbildung 34 B). Um die ermittelte Größe von ~296 kDa zu erreichen, müsste der Komplex aus der nativen Gelelektrophorese ein Dimer bilden und/oder aus 8-9 einzelnen Proteine gebildet werden.

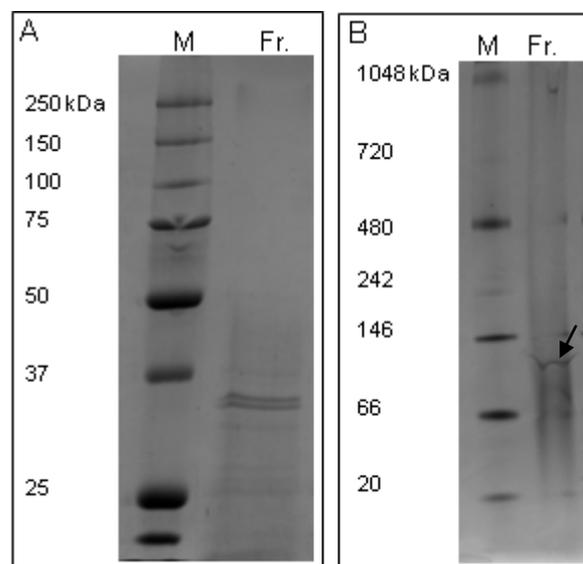


Abbildung 34: Visualisierung des Biofilm-induzierenden Faktors nach der Größenausschlusschromatographie. Abgebildet wurde der Biofilm-induzierende Faktor anhand der SDS-PAGE (A) und der nativen Gelelektrophorese (B) der Biofilmbildenden Fraktion (Fr.). Zur Größenorientierung wurden Größenmarker (M) aufgetragen.

Für die Identifizierung der Proteine wurden die Proteinbanden der SDS-PAGE für Massenanalyse mittels MALDI-TOF isoliert. Bei dieser Analyse wurden die Proteine als Lipase LipA und ein hypothetisches Protein RBG10325 identifiziert. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Lipase an der Biofilmbildung in *B. glumae* tatsächlich beteiligt ist.

Da über das Protein RBG10325 nichts Näheres bekannt ist, wurde mittels verschiedener Datenbanken versucht mit Vorhersagen mehr über das Protein zu erfahren. Das Protein umfasst 8552 Da und ist damit wesentlich kleiner als die angezeigte Größe bei der SDS-PAGE. Vorhersagen über die Lokalisation des Proteins oder dessen Funktion waren nicht möglich. In *P. aeruginosa* konnte ein orthologes Gen (PA1218, hypothetisches Protein) zu RBG10325 gefunden werden, während in anderen *Burkholderia*-Stämmen keine Homologien festgestellt werden konnten. Die Homologie zu dem Gen in *P. aeruginosa* steigt, wenn man ein Gen stromaufwärts von RBG10325, kodierend für RBG03787, zu der Homologie-

Untersuchung zufügt und die beiden Proteine als ein Protein betrachtet. Dies deutet auf einen möglichen Rasterschub zwischen RBG10325 und RBG03787 hin, da die Größe von RBG10325 (8,5 kDa) und RBG03787 (24,7 kDa) zusammen ca. 33 kDa ergeben würde, was wiederum die Größe bei der SDS-PAGE erklären würde. Doch bei einer Überprüfung des Genoms an diesem Bereich konnte kein Rasterschub festgestellt werden (Voget, 2009), somit umfasst das Protein RBG10325 8,5 kDa. Das deutet daraufhin, dass die Komplexbildung zwischen der Lipase und RBG10325 so stark ist, dass die denaturierende Wirkung von SDS nicht ausreicht, um den Komplex vollständig zu lösen und das Protein RBG10325 in Höhe des Komplexpartners läuft. Zur Überprüfung wurden daher Deletionsmutanten dieser Proteine hergestellt.

Der Biofilm-induzierende Faktor scheint aus einem Proteinkomplex zu bestehen. In diesem Komplex wurden die beiden Proteine RBG10325 und LipA identifiziert. Damit zeigt sich erstmals, dass die Lipase von *B. glumae* als Teil eines Proteinkomplexes an der Biofilmbildung beteiligt ist.

6.4 Herstellung und Untersuchung von Deletionsmutanten

Die Proteine RBG10325 und LipA wurden bei der Aufreinigung des Biofilm-induzierenden Faktors identifiziert. Daher wurden Deletionsmutanten der entsprechenden Gene hergestellt, um die Beteiligung an der Biofilmbildung zu untersuchen. Die hier verwendete AB-Kassette war eine Ω -Gentamycinkassette, die den Vorteil hat, dass sie einen eigenen Transkriptionsstart und auch Transkriptionsstop enthält. Wird eine Ω -Kassette in das erste Gen eines Operons kloniert, wird auch die Transkription des restlichen Operons verhindert, wie z. B. die Transkription von *lipB* im *lipAB*-Operon. Basierend auf dem Suizidvektor pSUP202 wurde ein Vektor konstruiert, der die homologen Bereiche stromaufwärts und stromabwärts von LipA bzw. RBG10325 und an Stelle des deletierten Gens die Gentamycin-Kassette enthält (siehe Abbildung 35).

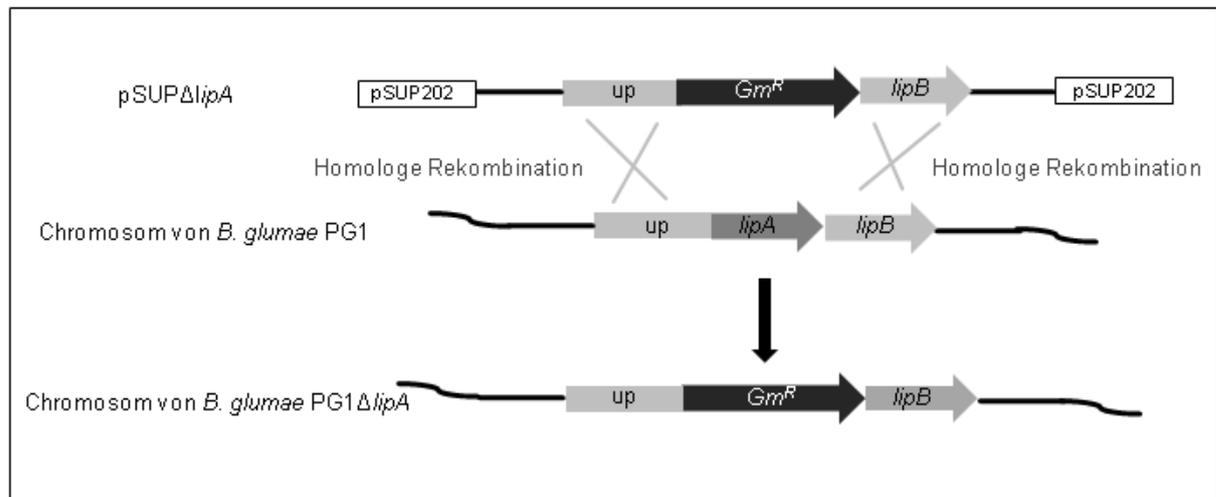


Abbildung 35: Schematische Darstellung zur Herstellung einer Deletionsmutante anhand eines Beispiels für die Herstellung der Lipase-Mutante. Durch homologe Rekombination wird das gewünschte Gen, hier *lipA*, mit der Gentamycinkassette ausgetauscht, dadurch wird die Lipase-Mutante PG1Δ*lipA* hergestellt. Da bei dem *lipAB*-Operon das Startcodon von *lipA* mit dem Stopcodon von *lipB* überlappt, wird die Transkription von *lipB* aufgrund der Ω-Kassette zusätzlich verhindert.

Per Konjugation wurde das konstruierte Plasmid zur Deletion von *lipA* in *B. glumae* eingebracht. Bei dem ersten *cross-over* lagern sich die homologen Bereiche stromaufwärts und stromabwärts von *lipA* aneinander, dabei wird zunächst das gesamte Plasmid in das Genom integriert. Beim zweiten *cross-over* lagern sich die homologen Bereiche wieder aneinander und der Vektoranteil wird aus dem Genom entlassen. Das Plasmid enthält neben der Gentamycin-Kassette eine weitere Resistenz, eine Tetrazyklinresistenz, die bei der zweiten Rekombination aus dem Genom entlassen wird. Dadurch wird eine Selektion der Deletionsmutanten aufgrund des Verlusts der Tc-Resistenz ermöglicht. Zurück bleibt die Gentamycinkassette, die an Stelle des gewünschten Gens sitzt.

Die Herstellung der Mutante des Gens *rbg10325* war nicht möglich. Nach der ersten Rekombination konnten Rekombinanten über die Tet/Gm-Selektion isoliert. Eine Deletionsmutante, die nur eine Gm-Resistenz besitzt und den Verlust der Tc-Resistenz zeigt, konnte jedoch nicht isoliert werden. Anscheinend sind die Deletionsmutanten von *rbg10325* nicht kultivierbar, wodurch die Vermutung naheliegt, dass das Protein RBG10325 essentiell für *B. glumae* PG1 ist.

Hingegen ließ sich die Deletionsmutante der Lipase (*B. glumae* PG1Δ*lipA*) durch Gm-Selektion und den Verlust der Tc-Resistenz schnell isolieren. Die Mutation wurde zunächst mit einem Aktivitätsassay überprüft, wobei keine Aktivität festgestellt werden konnte (ohne Abbildung). Ein aktives Protein konnte somit nicht mehr festgestellt werden. Mittels *RealTime*-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die Lipase-Mutante *B. glumae* PG1Δ*lipA* kein Transkript der Lipase mehr zeigt (Abbildung 36).

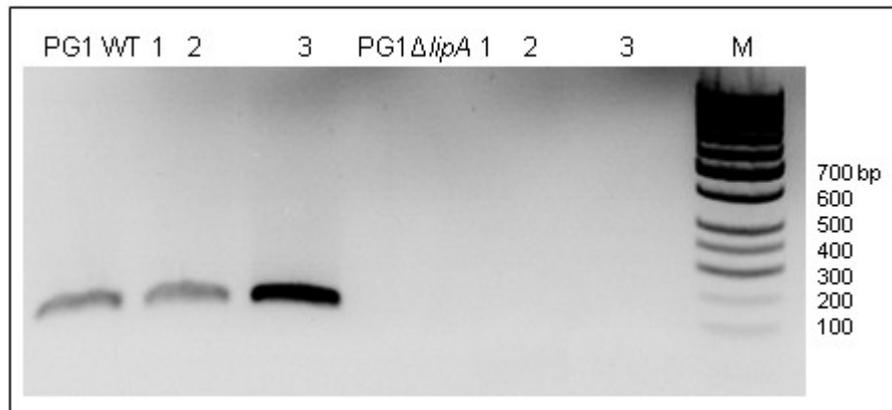


Abbildung 36: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte nach RealTime-PCR. Der Transkriptnachweis erfolgte in *B. glumae* PG1 und *B. glumae* PG1 Δ *lipA* mittels der Amplifikation eines 150 bp großen Fragments des Gens *lipA*. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt (Spur 1-3).

Damit ist *B. glumae* PG1 Δ *lipA* eine Lipase-Mutante, die weder Aktivität der Lipase, noch Transkript der Lipase aufweist.

Nachdem die Lipase-Mutante *B. glumae* PG1 Δ *lipA* konstruiert werden konnte, wurde die Biofilmbildung dieser Mutante in einem Biofilmmassay überprüft (Abbildung 37). Dabei zeigte sich, dass die Lipase-Mutante nicht in der Lage ist, Biofilm zu bilden (Abbildung 37).

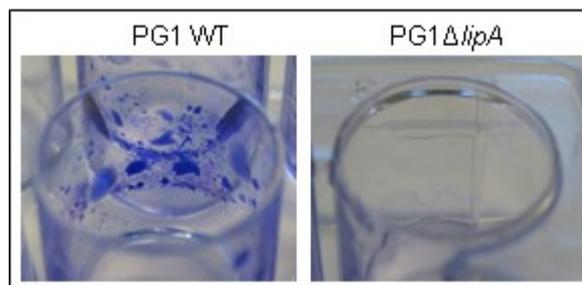


Abbildung 37: Biofilmmassay von *B. glumae* PG1 Δ *lipA*. Der Nachweis erfolgte mittels Färbung mit Kristallviolett in drei unabhängigen Kulturen. Zum Vergleich diente die Biofilmbildung von *B. glumae* PG1.

Damit ist bewiesen, dass die Lipase in die Biofilmbildung involviert ist. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob die Biofilmbildung in der Lipase-Mutante wiederhergestellt werden kann. Dazu wurde zum einen ein Plasmid mit einem Gen kodierend für die Lipase in *B. glumae* PG1 Δ *lipA* eingebracht und zum anderen gereinigte Lipase zum Biofilmmassay zugesetzt. Zur Kontrolle diente die Biofilmbildung von *B. glumae* PG1 mit einem Vektor, der *lipA* kodiert. Des Weiteren wurde eine Leervektorkontrolle durchgeführt, um ausschließen zu können, dass der Vektor einen Effekt auf die Biofilmbildung hat.

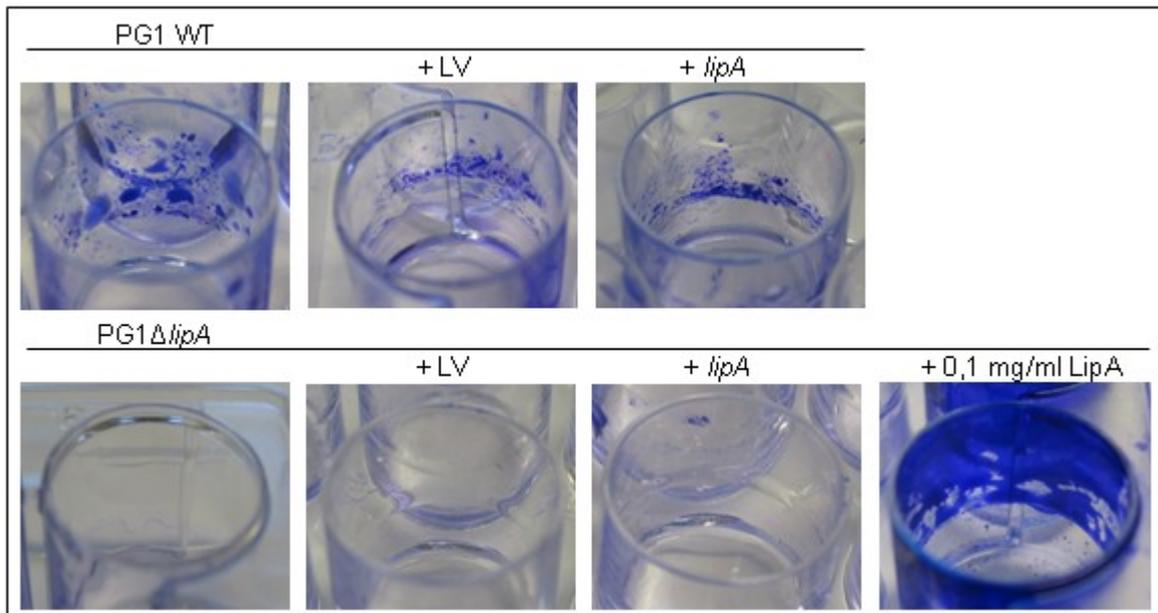


Abbildung 38: Biofilmbildung der komplementierten Lipase-Mutante. Zur Kontrolle wurden sowohl der Leervektor (LV), wie auch das Plasmid mit dem Gen *lipA* in *B. glumae* PG1 eingebracht. Neben dem Leervektor und dem plasmid-kodierten Gen *lipA* wurde *B. glumae* PG1Δ*lipA* außerdem gereinigtes Lipaseprotein in einer Konzentration von 0,1 mg/ml zugesetzt.

Abbildung 38 zeigt, dass die Biofilmbildung nur durch die Zugabe der gereinigten Lipase wiederherstellbar ist. Sowohl die Kulturen mit Leervektor, als auch die Kulturen mit dem Gen *lipA* zeigen keine Biofilmbildung. Die Mutation konnte nicht durch das Plasmid-kodierte *lipA* komplementiert werden (Abbildung 38). Durch den Austausch der Lipase gegen die Gentamycinkassette wurde auch das Startcodon des Lipase-Chaperons LipB entfernt, das für die richtige Faltung und die Funktionalität der Lipase verantwortlich ist. Ohne LipB ist ein funktionelles LipA im extrazellulären Milieu nicht zu erwarten und damit zeigt sich, dass eine funktionelle Lipase im Überstand für die Biofilmbildung gebraucht wird. Mit der gereinigten Lipase kann die Biofilmbildung bei der Lipase-Mutante wiederhergestellt (Abbildung 38).

Die Versuche zeigen, dass Lipase an der Biofilmbildung beteiligt ist und ohne eine funktionelle Lipase kein Biofilm gebildet wird. Die Komplementation mit der auf dem Plasmid kodierten Lipase zeigt außerdem, dass die Lipase in der natürlichen Konformation im Überstand vorhanden sein muss, da sonst kein Biofilm gebildet wird.

Es konnte eine Lipase-Mutante von *B. glumae* PG1Δ*lipA* konstruiert werden. Diese Lipase-Mutante zeigt keine Biofilmbildung. Durch Zugabe von aktiver Lipase lässt sich die Biofilmbildung bei PG1Δ*lipA* wiederherstellen.

Für die Biofilmbildung wird eine aktive Lipase im Überstand benötigt.

6.5 Ölsäure löst die Biofilmbildung in *B. glumae* aus

Die Untersuchungen von *B. glumae* PG1 Δ *lipA* zeigten, dass die Lipase an der Biofilmbildung beteiligt ist, da ohne funktionelle Lipase kein Biofilm vorhanden ist. Bei den Untersuchungen des Biofilmbildenden Faktors (siehe Tab. 11, III.6.2) wurde die Biofilmbildung bei den *gsp*-Mutanten schon durch Zugabe von Ölsäure wiederhergestellt. Dabei fiel jedoch auf, dass die Fettsäure allein schon von Kristallviolett angefärbt wird (Abbildung 39).

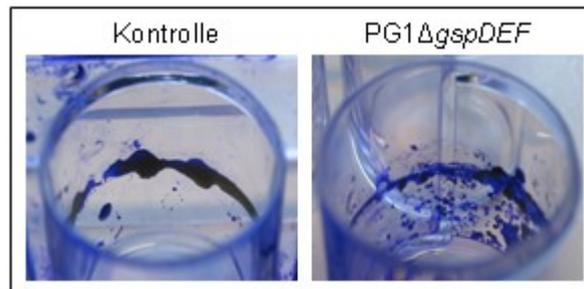


Abbildung 39: Biofilmbildung von *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* mit Ölsäure. Als Kontrolle diente das Medium mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle.

Wie aus Abbildung 39 ersichtlich ist die Färbung durch das Kristallviolett bei der Kontrolle, die nur Medium und Ölsäure ohne Zellen enthält, unterschiedlich zu der Färbung der Biofilme der *gsp*-Mutanten. Bei der Färbung der Kontrolle gibt es klare Linien in Höhe der Kultur, während es bei der Biofilmbildung eher partielle Färbungen gibt (Abbildung 39).

Zur weiteren Überprüfung, ob die Färbung bei den Kulturen der *gsp*-Mutanten auf die Biofilmbildung zurückzuführen ist, oder diese Färbung nur aufgrund der Ölsäure auftritt, wurde diese Kulturen mikroskopisch analysiert. Dazu wurden Plastikstücke in die Kulturen des Biofilmassays getaucht und für 24 h in der Kultur inkubiert. Durch Fluoreszenzmikroskopie sind die fluoreszierenden Zellen aufgrund des Plasmid-kodierten Gens *gfp* im Biofilm eindeutig zu erkennen. Das bedeutet wiederum, dass durch die Zugabe der Ölsäure die Biofilmbildung bei den *gsp*-Mutanten tatsächlich wieder hergestellt wird (Abbildung 40). Die Kontrolle zeigt eindeutig keine Zellen und auch keine Zusammenlagerung von Zellen. Die Färbung die bei der Kontrolle durch Kristallviolett auftritt (Abbildung 39) lässt sich auf die chemischen Eigenschaften der Ölsäure zurückführen, nicht auf die die Bildung von Biofilm (siehe Abbildung 40).

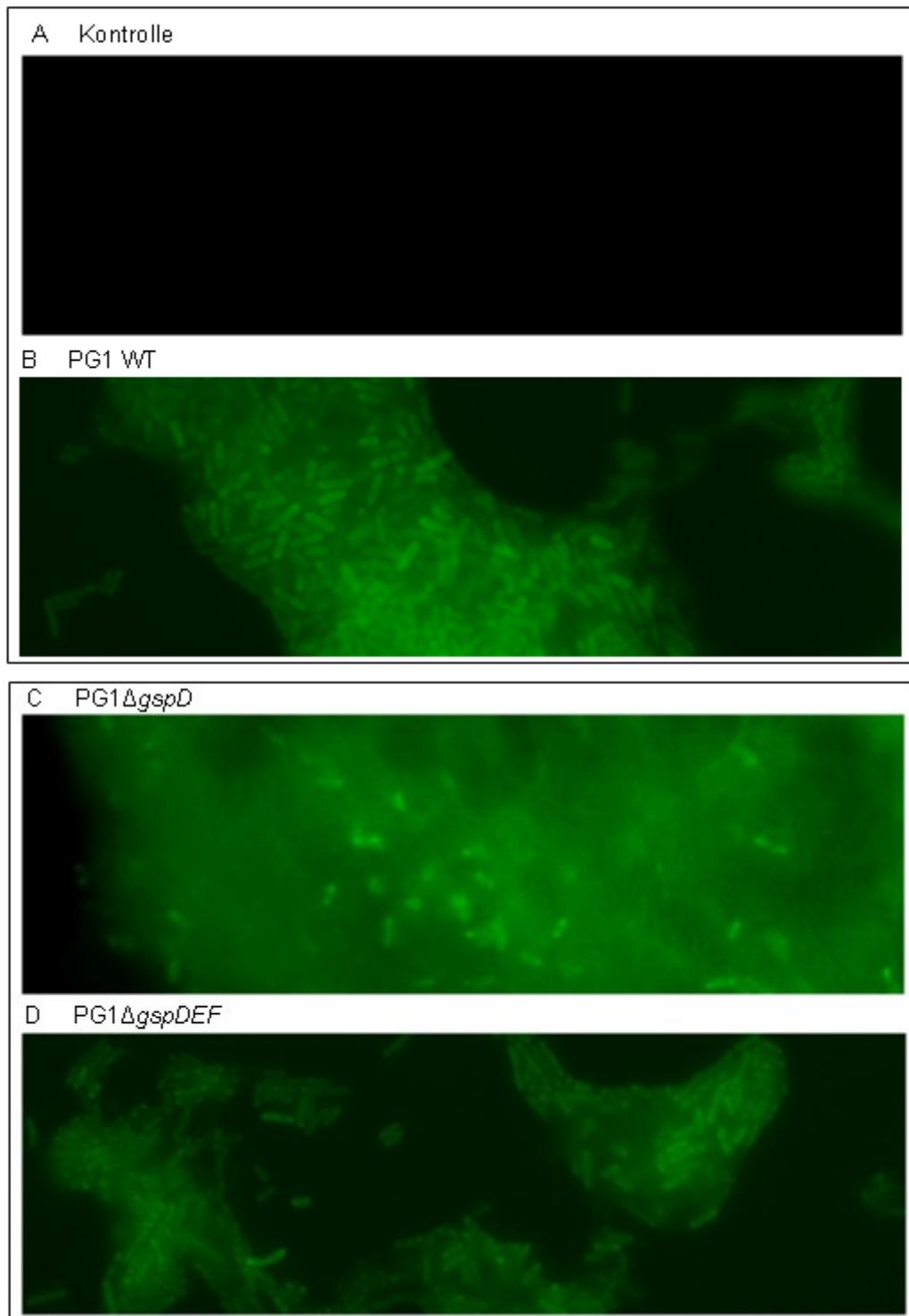


Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopie von *B. glumae*. Als Kontrolle diente das Medium mit der Kohlenstoffquelle Ölsäure (A). Es wurden Kulturen von *B. glumae* PG1 (B) mit den *gsp*-Mutanten von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* (C) und PG1 Δ *gspDEF* (D) verglichen. Als Kohlenstoffquelle wurde Ölsäure zugesetzt.

Die mikroskopische Untersuchung verdeutlicht, dass die Biofilmbildung bei den *gsp*-Mutanten durch Zugabe von Ölsäure wiederhergestellt wird (Abbildung 40). Dies weist wiederum daraufhin, dass die Lipase zwar an der Biofilmbildung beteiligt ist, aber das Spaltprodukt der Lipase, der Ölsäure, die Biofilmbildung wirklich auslöst.

Durch das Fehlen der Lipase in der extrazellulären Umgebung bei den *gsp*-Mutanten, wird das Öl nicht in Glycerol und Ölsäure hydrolysiert. Durch die fehlende Ölsäure im Überstand wird kein Biofilm bei den *gsp*-Mutanten gebildet.

Die Lipase ist an der Biofilmbildung beteiligt, indem sie durch die Hydrolyse des Öls Ölsäure produziert.

7 Komplementation der *gsp*-Mutanten

Bei der Untersuchung der physiologischen Eigenschaften von *B. glumae* und deren Änderungen in Bezug auf die Mutationen im Typ II-Sekretionssystem zeigte sich beim QS-System, der Produktion von Rhamnolipiden und der Biofilmbildung eine Veränderung des Phänotyps. Nun sollte festgestellt werden, ob die ursprünglichen Phänotypen wiederhergestellt werden können. Dazu wurden Vektoren konstruiert, die basierend auf dem Vektor pBBR1MCS, unter dem *lac*-Promotor das *gspD*-Gen bzw. das *gspDEF*-Operon enthalten. Die Vektoren wurden in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* und PG1 Δ *gspDEF* eingebracht. Als Kontrolle dienten sowohl die Konjuganten mit Leervektor, als auch die rekombinanten Plasmide in *B. glumae* PG1. Zunächst wurde die lipolytische Aktivität der komplementierten *gsp*-Mutanten überprüft. Dazu wurden die Kulturen für 24 h bei 30° C inkubiert. Als Kohlenstoffquelle diente Olivenöl, um die Lipase-Expression zu induzieren. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand durch Zentrifugation von den Zellen getrennt und in den Aktivitätstest (II.10.1.1) eingesetzt.

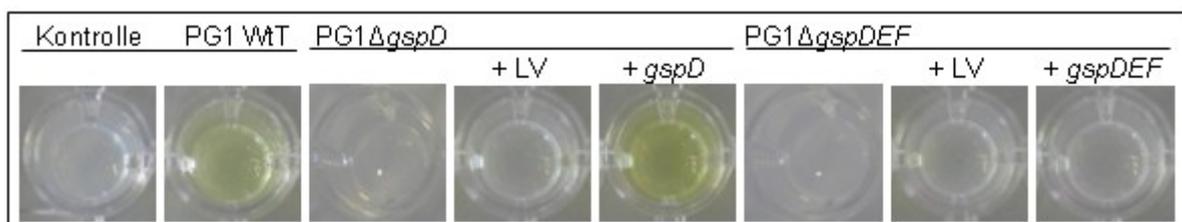


Abbildung 41: Aktivitätsassay der Überstände der komplementierten *gsp*-Mutanten. Die Aktivität zeigt sich anhand einer gelben Färbung. Bei *B. glumae* WT zeigt sich wie zu erwarten lipolytische Aktivität im Überstand. Die Mutation von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* lässt sich durch da Plasmid mit dem *gspD*-Gen komplementieren. Die komplementierte Mutante von *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* zeigt keine Aktivität.

Der Aktivitätstest zeigte, dass die lipolytische Aktivität von *B. glumae* PG1 Δ *gspD* durch das Plasmid mit dem *gspD*-Gen wiederhergestellt werden kann (Abbildung 41). Das Porenprotein in der äußeren Membran GspD wird wieder synthetisiert und die Lipase kann transportiert werden. Bei *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* kann der Transport der Lipase anscheinend nicht wiederhergestellt werden. Es kann keine lipolytische Aktivität im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 41). Die *gspDEF*-Mutante kann nicht durch ein plasmid-kodiertes *gspDEF*-Operon komplementiert werden. Das *gspDEF*-Operon besitzt eine Größe von 5052

bp. Bei dieser Größe ist es möglich, dass die bakterielle Polymerase nicht das gesamte Operon transkribiert, sondern die Transkription abgebrochen wird.

Um sicherzustellen, dass das Plasmid erfolgreich transkribiert wird und Transkript von allen Genen vorhanden ist, wurde daher ein Transkriptnachweis der Gene *gspD*, *gspE* und *gspF* mittels *RealTime*-PCR durchgeführt. Dafür wurden den verschiedenen Kulturen (*B. glumae* PG1, PG1 Δ *gspDEF*, PG1 Δ *gspDEF* +LV, PG1 Δ *gspDEF* + *gspDEF*) nach 24 h Proben abgenommen und für die *RealTime*-PCR vorbereitet (II.7).

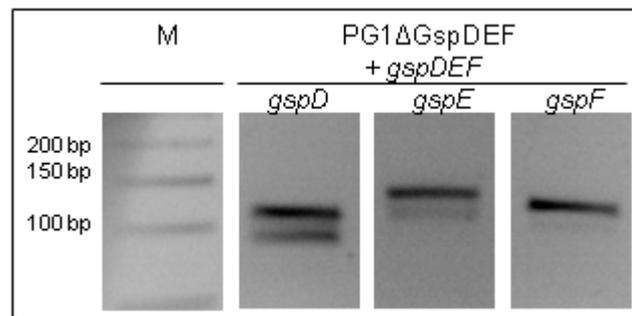


Abbildung 42: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte der *RealTime*-PCR der komplementierten *gspDEF*-Mutante. Zum Transkriptnachweis des *gspDEF*-Operons in der komplementierten *gspDEF*-Mutante wurde 100-150 bp Fragmente aus den Genen *gspD*, *gspE* und *gspF* amplifiziert.

Bei der *RealTime*-PCR zeigte sich dann, dass Transkript aller drei Gene in *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* + *gspDEF* vorhanden ist (Abbildung 42). Die Kontrollen *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* und *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* + LV zeigen kein Transkript der drei Gene.

Da Transkript aller drei Gene in der komplementierten Mutante von *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* vorhanden sind (Abbildung 42), wurde die Transkription nicht vorzeitig abgebrochen. Neben dem vorzeitigen Abbruch der Transkription gibt es weitere Möglichkeiten, weshalb die *gspDEF*-Mutante nicht komplementiert werden kann. Die Gene werden zwar transkribiert, aber die Kopienzahlen der Gene sind höher als in *B. glumae* PG1 wegen der Komplementierung mittels Plasmid. Dies könnte störend auf die Zellen wirken. Da Transkript der Gene vorhanden ist liegt die Vermutung nahe, dass die Translation verhindert wird.

Die Komplementierung der *gspD*-Mutante konnte jedoch erfolgreich nachgewiesen werden. Da die lipolytische Aktivität der *gspD*-Mutante wiederhergestellt werden konnte, wurde der in vorherigen Versuchen festgestellte Phänotyp der Biofilmbildung auch hier überprüft. In einem weiteren Versuch wurde daher die Biofilmbildung der komplementierten Stämme untersucht. Die Kulturen wurden 24 h in einer Mikrotiterplatte statisch inkubiert, als Kohlenstoffquelle diente Olivenöl. Die rekombinanten Plasmide zeigten keine Wirkung auf die Biofilmbildung von *B. glumae* PG1.

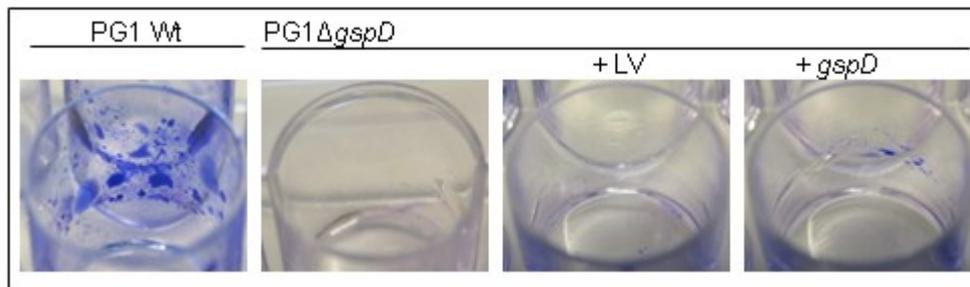


Abbildung 43: Biofilmbildung der komplementierten *gspD*-Mutante. Der Nachweis erfolgte mittels Kristallviolett färbung.

Die Biofilmbildung konnte bei der *gspD*-Mutante nicht komplementiert werden (Abbildung 43), obwohl bei *B. glumae* PG1 Δ *gspD* die lipolytische Aktivität im Überstand durch das plasmid-kodierte *gspD*-Gen wieder gewährleistet war (vgl. Abbildung 41/43). Da sich das Wachstum in der Mikrotiterplatte sehr von dem Wachstum in Schüttelkolben unterscheidet, wurde daher die lipolytische Aktivität der Kulturen in der Mikrotiterplatte überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Lipase im Überstand der komplementierten *gspD*-Mutante im Vergleich zu *B. glumae* PG1 wesentlich geringer war. Die Bedingungen in der Mikrotiterplatte sind offensichtlich nicht optimal für eine plasmid-kodierte Expression des Porenproteins GspD, um den Transport der Lipase zu gewährleisten und damit die Biofilmbildung wiederherzustellen. Da Lipase-Expression unter diesen Bedingungen zu gering ist, konnte die Biofilmbildung nicht komplementiert werden.

Bei der Rhamnolipid-Produktion zeigte sich bei *B. glumae* PG1 Δ *gspD* ein veränderter Phänotyp, da diese Mutante deutlich mehr Rhamnolipide herstellt als *B. glumae* PG1 (III.5.3). Daher wurde außerdem die Rhamnolipid-Produktion der komplementierten *gspD*-Mutante überprüft. Es wurden Kulturen für die Rhamnolipid-Produktion mit Glycerol als Kohlenstoffquelle angesetzt und nach 24 h bzw. 48 h die Rhamnolipid-Produktion mittels Dünnschichtchromatographie (II.10.3.4) nachgewiesen. Als Kontrolle wurde außerdem *B. glumae* PG1 mit Leervektor und mit dem Plasmid pBBR*gspD* eingesetzt. Die Kontrollen mit *B. glumae* PG1 zeigten eine gleichbleibende Rhamnolipidmenge (hier nicht abgebildet). Der Nachweis der Rhamnolipide bei der komplementierten *gspD*-Mutante zeigte keine Wiederherstellung des WT-Phänotyps (Abbildung 44).

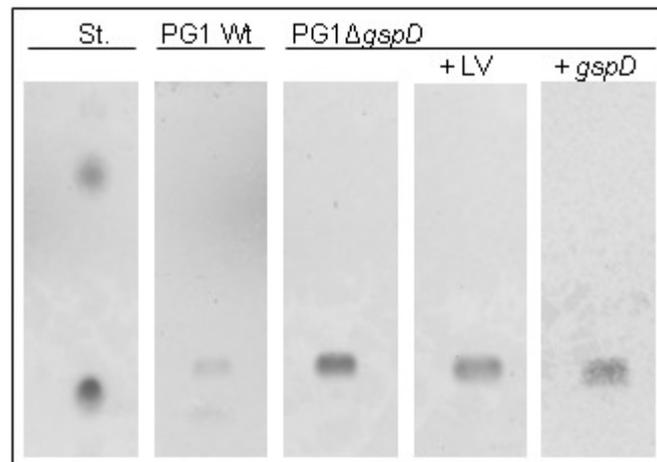


Abbildung 44: Dünnschichtchromatographie der Rhamnolipide der komplementierten *gspD*-Mutante. Die Rhamnolipide wurden aus Überständen der Kulturen nach 24 h Inkubation extrahiert. Die Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und anschließend die DC-Platten mit dem Zucker-spezifischen Färbemittel Orcinol gefärbt. Als Standard wurde ein Rhamnolipidgemisch von *P. aeruginosa* eingesetzt.

Trotz der Komplementierung zeigt sich bei *B. glumae* *PG1ΔgspD* ein veränderter Phänotyp bei der Rhamnolipid-Produktion (Abbildung 44). Die erhöhte Rhamnolipid-Produktion von *B. glumae* *PG1ΔgspD* scheint kein direkter Effekt aufgrund der Mutation im Typ II-System zu sein.

Die Versuche zeigen, dass die Komplementation des defizienten Typ II-Sekretionssystem nicht trivial ist. Obwohl bei der *gspD*-Mutante die Komplementierung gewährleistet war und der Transport der Lipase wiederhergestellt wurde, konnten andere Phänotypen nicht wiederhergestellt werden. Bei *B. glumae* *PG1ΔgspDEF* konnte zwar Transkript der relevanten Gene *gspD*, *gspE* und *gspF* nachgewiesen werden, das System war aber anscheinend nicht funktionsfähig. Daran erkennt man, dass viele weitere Faktoren die Funktionalität des Typ II-Systems beeinflussen können.

Bei *B. glumae* *PG1ΔgspD* kann die lipolytische Aktivität im Überstand komplementiert werden. Der Transport der Lipase wird wiederhergestellt.

IV Diskussion

1 Physiologische Eigenschaften von *B. glumae*

In Gram-negativen Bakterien müssen die extrazellulären Proteine oder Produkte über zwei Membranen der Zelle nach außen transportiert werden. Um die Cytoplasmamembran sowie die äußere Membran für Proteine oder andere Moleküle permeabel zu machen, haben diese Organismen diverse Transportmechanismen entwickelt. All diese Systeme sind in der Lage, die zu translozierende Proteine oder Signalmoleküle spezifisch zu erkennen und ihren Transport zu ermöglichen ohne die Zellbarriere zu stören. Der Typ II-Sekretionsmechanismus ist unter den Gram-negativen Bakterien weitverbreitet, wie z. B. bei der Sekretion der Pullulanase bei *Klebsiella oxytoca* (Koster *et al.*, 2000) oder der Lipase bei *P. aeruginosa* (Filloux *et al.*, 1998). Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sequenzierung und Annotierung des *B. glumae* PG1 Genoms konnten erstmals Sequenzen, welche für das Typ II-Sekretionssystem kodieren, in *B. glumae* PG1 identifiziert werden. Es sind insgesamt 12 Gene kodiert, die als *gspC-M* bezeichnet wurden und deren Genprodukte das Typ II-Sekretionssystem bilden. Des Weiteren zeigte sich, dass *B. glumae* ein zweites unvollständiges Typ II-System besitzt, indem das Gen für das wichtige Poren-bildende Protein GspD fehlt und das Gen für das Energie-liefernde Protein GspE nur stark verkürzt vorliegt. Dass das zweite System nicht transkribiert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Konstruktion zweier *gsp*-Mutanten gezeigt werden. Bei der Mutante *B. glumae* PG1 Δ *gspD* wurde eine Kanamycin-Antibiotika-Kassette mit dem *gspD*-Gen ausgetauscht. Da die Gene *gspD-F*, ein Operon bilden, wurde durch den konstitutiven *aphII*-Promotor der Kanamycinkassette (Katzke *et al.*, 2010) die Transkription von *gspE* und *gspF* gewährleistet. Bei der Mutante *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* wurde die Kanamycin-Kassette jedoch in die entgegengesetzte Richtung an Stelle des *gspD*-Gens eingesetzt. Damit wurde die Leserichtung des *aphII*-Promotors verändert und die Transkription von *gspE* und *gspF* verhindert. Die anschließende Transkriptanalyse mittels *RealTime*-PCR zeigte zum einen, dass das zweite System tatsächlich nicht transkribiert wird. In *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* konnte kein Transkript von *gspE* und *gspF* nachgewiesen werden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass *B. glumae* den *aphII*-Promotor erkennt und die Transkription der Gene *gspE* und *gspF* in *B. glumae* PG1 Δ *gspD* kaum Veränderungen im Vergleich zu *B. glumae* PG1 aufweist. Anschließend wurde die lipolytische Aktivität der *gsp*-Mutanten überprüft. *B. glumae* sekretiert eine extrazelluläre Lipase LipA (Frenken *et al.*, 1992), die eine hohe Ähnlichkeit zu der Lipase von *P. aeruginosa* zeigt. Da die Lipase von *P. aeruginosa* über das Xcp-System transportiert wird (Jaeger *et al.*, 1994), wird der Transport der Lipase von *B. glumae* über das Gsp-System vermutet. Der Nachweis der lipolytischen Aktivität wurde mittels Tributyrinplatten und mit dem photometrischen Nachweis der Umsetzung des Substrats *p*-Nitrophenolpalmitat überprüft und zeigte bei beiden *gsp*-Mutanten keine Aktivität

im extrazellulären Raum. Bei der Untersuchung der lipolytischen Aktivität im Rohextrakt zeigte sich, dass beide sekretionsdefizienten Mutanten eine erhöhte Aktivität der Lipase aufweisen. Das deutet darauf hin, dass die Lipase im Zellinnern akkumuliert. Denkbar ist, dass die Lipase hier nicht direkt von Proteasen abgebaut wird. Dieser Effekt konnte auch in *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Dort führt eine defiziente Typ II-Sekretion zu einer erhöhten Aktivität von Lipasen, Esterasen und Phosphatasen im Zellinnern (Aragon *et al.*, 2000).

Durch den Nachweis der lipolytischen Aktivität im Überstand der *gsp*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Lipase von *B. glumae* tatsächlich über das Gsp-System transportiert wird. Dieser Nachweis wurde durch die nun vorhandenen Genomdaten stark vereinfacht.

P. aeruginosa verfügt ähnlich wie *B. glumae* über ein zweites funktionsfähiges Typ II-Sekretionssystem. Es ist homolog zu dem Xcp-System und wird daher Hxc-System genannt (*homologous to xcp*) (Ball *et al.*, 2002). Außerdem besitzt *P. aeruginosa* mindestens ein homologes Protein zu XcpQ (GspD), das die Funktion des Poren-bildende Proteins des Sekretionsapparates übernehmen kann (Martínez *et al.*, 1998). Bei *B. glumae* gibt es im Genom Hinweise auf mindestens ein GspD-ähnliches Protein. Die Lipase wird bei der *gspD*-Mutante nicht transportiert. Daher kann man vermuten, dass dieses Protein die Funktion des defizienten Transportsystems in der *gspD*-Mutante nicht komplementieren kann.

Eine Komplementation erfolgte bei *B. glumae* PG1 Δ *gspD* durch ein rekombinantes Plasmid, das das Gen *gspD* enthält. Die *gspDEF*-Mutante zeigt bei der Komplementation trotz Transkript der relevanten Gene keine Wiederherstellung des Transports. Vermutlich werden durch die Komplementation der Gene mittels Plasmid zu viele Kopien der Gene hergestellt. Im Gegensatz zu der Transkription im Genom werden bei der Transkription vom Plasmid mehrere Kopien des Gens hergestellt. Das eingesetzte Plasmid pBBR1MCS ist ein so genannter *low-copy* Vektor, d. h. es werden nur wenige Kopien gemacht. Trotzdem kommt es durch das Plasmid zu einer konstitutiven Überexpression der Gene im Vergleich zu der Expression der Gene im Genom zum benötigten Zeitpunkt. Diese Überexpression der Gene hat vermutlich einen störenden Effekt auf die Zelle, wodurch die Translation verhindert wird. Aufgrund der Überexpression könnte es jedoch auch sein, dass das Verhältnis der hergestellten Proteine nicht stimmt und daher die Funktionalität des Typ II-Systems nicht wiederhergestellt wird.

Neben der lipolytischen Aktivität zeigen die *gsp*-Mutanten auch in anderen physiologischen Bereichen Beeinflussungen. In Abschnitt III.3 zeigte sich, dass Glukose bei *B. glumae* PG1 nachteilige Effekte hervorruft, wodurch *B. glumae* PG1 die stationäre Phase wesentlich früher als die *gsp*-Mutanten erreicht und keine hohen Zelldichten erlangt werden können. Zunächst wurden bei der 2-D-Gelelektrophorese nahezu nur intrazelluläre Proteine im extrazellulären Milieu identifiziert, deren Expression bei *B. glumae* PG1 höher ist als bei den

gsp-Mutanten. Des Weiteren zeigt *B. glumae* PG1 ein geringeres Wachstum im Vergleich zu *B. glumae* PG1 Δ *gspD* und PG1 Δ *gspDEF* in vergleichbaren Zeiträumen. Außerdem setzt die Zelllyse bei *B. glumae* PG1 wesentlich früher als bei den *gsp*-Mutanten. Von *B. cepacia* ist bekannt, dass Glukose über zwei Wege abgebaut wird: (i) den oxidativen und (ii) der phosphorylierende Weg (Allenza & Lessie, 1982). Der phosphorylierte Weg geht in den Entner-Doudoroff-Weg über. Da auch Gene für Glukose-abbauende Enzyme im Genom von *B. glumae* gefunden wurden, kann *B. glumae* Glukose verstoffwechseln. Die Glukose oder ein Abbauprodukt der Glukose scheint eine ungünstige Wirkung auf *B. glumae* zu haben, die bei den *gsp*-Mutanten nicht auftritt. Da bei *B. glumae* PG1 der Typ II-Transport funktionsfähig ist, wird das Enzym sekretiert und die nachteilige Komponente wird nicht abgebaut.

Auch einige physiologische Eigenschaften des Bakteriums zeigten durch das defiziente Transportsystem einen veränderten Phänotyp, wie z. B. das QS-System. Das Quorum sensing wurde bei zwei verschiedenen Bedingungen untersucht: (i) bei Glycerol als Kohlenstoffquelle und (ii) bei Olivenöl als Kohlenstoffquelle. Da Glukose sich als schlechte Kohlenstoffquelle erwiesen hatte, wurde Glycerol eingesetzt. Glukose beeinflusst das Wachstum und scheint zu Zelllyse zu führen. Bei Glycerol als Kohlenstoffquelle wuchsen die Stämme reproduzierbar.

Die Quantifizierung der Autoinducer im Überstand unter Lipase-exprimierenden Bedingungen unterlag technischen Schwierigkeiten. Dem Medium wurde eine hydrophobe Kohlenstoffquelle (Olivenöl) zugesetzt. Homoserinlactone können sich in hydrophoben Substanzen lösen, wodurch die Analytik enorm erschwert wurde. Daher wurden die Ergebnisse dieser Untersuchung kritisch betrachtet.

Bei *B. glumae* PG1 Δ *gspDEF* zeigte die Quantifizierung der HSL im Überstand unter beiden Bedingungen (Öl/Glycerol) den gleichen Effekt. Bei beiden Bedingungen war die Menge von C₈-HSL drastisch reduziert. Bei *B. glumae* PG1 Δ *gspD* zeigte sich, dass die Mengen des Autoinducers C₈-HSL variieren. *B. glumae* PG1 Δ *gspD* zeigt unter Lipase-exprimierenden Bedingungen, d. h. unter Zugabe von Öl, eine Erhöhung des C₈-Autoinducers. Bei der Kohlenstoffquelle Glycerol zeigt *B. glumae* PG1 Δ *gspD* eine drastische Reduzierung der C₈-HSL-Menge. Auffällig ist, dass bei beiden sekretionsdefizienten Mutanten die Menge von C₈-HSL im Überstand bei der Kohlenstoffquelle Glycerol drastisch reduziert ist.

Von *P. aeruginosa* ist bekannt, dass einige Komponenten des Xcp-Systems durch Quorum sensing reguliert werden (Chapon-Herve *et al.*, 1997). So besitzt *P. aeruginosa* zwei QS-Regulationssysteme, das Las- und das Rhl-System. Das Las-System ist hierarchisch höher angeordnet als das Rhl-System und ist für die Produktion von oxo-C₁₂-HSL verantwortlich (Pesci *et al.*, 1997), das Rhl-System nutzt C₄-HSL. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *xcpP* und *xcpR* in *E. coli* abhängig von LasR ist und eine indirekte Regulation durch das Rhl-System stattfindet (Chapon-Herve *et al.*, 1997). Die Ergebnisse

aus *B. glumae* lassen die Vermutung zu, dass auch hier eine Interaktion besteht zwischen dem Quorum sensing und dem Gsp-System besteht.

Eine Möglichkeit wäre, dass die Interaktion nicht nur einseitig besteht, d. h. das Quorum sensing wirkt nur auf das Gsp-System, sondern dass eine wechselseitige Interaktion zwischen den Systemen besteht. Dazu müsste das QS-System Veränderungen innerhalb oder außerhalb des Bakteriums erkennen und darauf reagieren können, wie z. B. das Fehlen eines Enzyms im Überstand oder eine Akkumulation von Proteinen im Zellinnern. Eine solche Interaktion konnte bisher aber nicht beschrieben werden.

Bei den Untersuchungen wurde nur die Menge der Autoinducer im Überstand betrachtet. Weitere Hinweise zur Klärung der verringerten Menge von C₈-HSL im Überstand, könnte die Betrachtung der HSL-Menge im Zellinnern bringen. Die Homoserinlactone werden langsam über Diffusion oder aktiv über MexAB-OprM-Pumpen transportiert. Falls im Zellinnern eine Anhäufung der Autoinducer feststellbar sein sollte, könnte das ein Indiz für einen erschwerten Transport sein. Eine geringe Autoinducer-Menge wäre hingegen ein Hinweis auf eine veränderte Regulation der HSL.

Bei der Untersuchung der Physiologie von *B. glumae* konnte ein PQS- (*Pseudomonas*-*quinolone* *S*ignal) ähnliches Signal gefunden werden, dass in den *gsp*-Mutanten fehlt. Die Gattung *Burkholderia* produziert so genannte HMAQs (4-Hydroxy-3-Methyl-2-Alkylquinolone), die sich durch eine zusätzliche Methylgruppe von den HAQs (4-Hydroxy-2-Alkylquinolone) (Vial *et al.*, 2008), den PQS-Vorstufen von *P. aeruginosa*, unterscheiden. Durch Extraktion mit Ethylacetat konnte bei *B. glumae* ein im UV-Licht fluoreszierendes Signal gefunden werden, dessen Struktur nicht ganz aufgeklärt werden konnte (III.4.2). Beide Typ II-defizienten Mutanten zeigen dieses Signal nicht. In *P. aeruginosa* ist PQS von dem Verhältnis von C₄- und oxo-C₁₂-HSL abhängig (McGrath *et al.*, 2004). Während oxo-C₁₂-HSL positiv auf die Expression der PQS-synthetisierenden Enzyme wirkt, wirkt C₄-HSL negativ auf die Expression der Synthese-Enzyme (McGrath *et al.*, 2004). Überträgt man diese Informationen auf *B. glumae* würde C₆-HSL die Herstellung von dem PQS-ähnlichen Signal reprimieren, während C₈-HSL die Synthese von PQS fördern würde. Die Betrachtung der Ergebnisse der Ausschüttung der Autoinducer bestätigt diese Aussage. Die Ausschüttung von C₆-HSL ist bei beiden *gsp*-Mutanten unter herkömmlichen Bedingungen (Glycerol als Kohlenstoffquelle) kaum beeinflusst, während die Ausschüttung von C₈-HSL drastisch reduziert ist. Damit ist bei den Typ II-defizienten Mutanten im Vergleich zu *B. glumae* PG1 das Verhältnis zwischen C₆-HSL und C₈-HSL verändert. Die reprimierende Wirkung von C₆-HSL überwiegt und die Expression der PQS-Synthesegene wird reprimiert. Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint die Regulation des PQS-ähnlichen Signals in *B. glumae* der Regulation von PQS in *P. aeruginosa* zu ähneln.

2 Untersuchung der Rhamnolipid-Produktion

2.1 Rhamnolipid-Bildung in *B. glumae* Wildtyp

Biodetergenzien sind von steigendem Interesse für die Industrie, da sie viele mögliche Anwendungsgebiete, wie z. B. in der Kosmetik- oder Pharmaziebranche besitzen (Lourith & Kanlayavattanakul, 2009; Banat *et al.*, 2000a). Der größte Markt für Biodetergenzien stellt die Ölindustrie dar (Banat *et al.*, 2000a). Gerade der Markt für den Abbau von Ölverschmutzungen oder der Dispersion von Öl bietet Anwendungsmöglichkeiten für Biodetergenzien (Vandyke *et al.*, 1993). Es gibt eine große Vielfalt von biologischen Oberflächen-aktiven Komponenten, die von Bakterien, Hefen oder Pilzen produziert werden. Sie haben gegenüber den chemisch produzierten Substanzen einige Vorteile, da sie aus nachwachsenden Rohstoffen produziert werden können und biologisch abbaubar sind. Außerdem ist eine Vielzahl Biodetergenz-produzierenden Organismen bekannt, wie z. B. *P. aeruginosa*, der Rhamnolipide produziert. Rhamnolipide wurden erstmals 1949 in *P. aeruginosa* beschrieben (Jarvis & Johnson, 1949) und seitdem dient *P. aeruginosa* als Modellorganismus für die Rhamnolipid-Produktion. Bei der Spezies *Burkholderia* wurden Rhamnolipide zunächst als Cytotoxin des humanpathogenen Bakteriums *B. pseudomallei* beschrieben (Haussler *et al.*, 2003). Auch in *B. plantarii* wurden die Rhamnolipide als Virulenzfaktoren beschrieben (Andra *et al.*, 2006). Bei den bisher beschriebenen Rhamnolipiden von *Burkholderia* sp. zeigte sich charakteristisch die Bildung von Di-Rhamnolipiden mit C₁₄-Ketten (Dubeau *et al.*, 2009; Andra *et al.*, 2006; Haussler *et al.*, 2003).

Bei dem phytopathogenen *B. glumae* PG1 war die Rhamnolipidbildung bislang nicht bekannt. Durch die Sequenzierung und Annotierung des Genoms war es möglich, homologe Gene zu den *rhl*-Genen von *P. aeruginosa* (*rhlA*, *rhlB* und *rhlC*) zu suchen und tatsächlich zu identifizieren. Indem verschiedene Kohlenstoffquellen verwendet wurden, die sich bei der Rhamnolipid-Herstellung in *P. aeruginosa* bewährt haben (wie Öl und Glycerol), wurde überprüft, ob Rhamnolipid produziert wird. Bei der Verwendung der Kohlenstoffquelle Glycerol konnte Transkript der *rhl*-homologen Gene nachgewiesen werden.

Der Überstand der Kulturen wurde extrahiert und der Extrakt dünnschicht-chromatographisch aufgetrennt. Die DC-Platten wurden mittels einer Orcinol-Färbelösung angefärbt, wobei nach 24 h bzw. 48 h ein Signal sichtbar wurde, das mögliches Rhamnolipid war. Zur Identifizierung des putativen Rhamnolipids wurde Überstand von *B. glumae* PG1 aufgereinigt und mittels HPLC-MS analysiert. *B. glumae* produziert ein Gemisch aus Di-Rhamnolipiden mit verschiedenen Kettenlängen (Rha-Rha-C₁₄-C₁₂ oder Rha-Rha-C₁₂-C₁₄; Rha-Rha-C₁₄-C₁₄; Rha-Rha-C₁₄-C₁₆ oder Rha-Rha-C₁₆-C₁₄), wobei das Di-Rhamnolipid Rha-Rha-C₁₄-C₁₄ das signifikante Rhamnolipid zu sein scheint. Damit produziert *B. glumae* Di-Rhamnolipide

ebenfalls vor allem mit C₁₄-Kettenlängen wie andere *Burkholderia* sp. (Dubeau *et al.*, 2009; Andra *et al.*, 2006; Haussler *et al.*, 2003).

Bei *P. aeruginosa* sind Rhamnolipide einerseits als Virulenzfaktoren beschrieben (Alhede *et al.*, 2009), zeigen jedoch auch Potential für biotechnologische Anwendungen (Tecon & van der Meer, 2010; Sotirova *et al.*, 2009; Sotirova *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2006; Banat, 2000b; Maier & Soberón-Chávez, 2000; Lang & Wullbrandt, 1999; Zhang & Miller, 1994). Durch ihre Oberflächen-aktiven Eigenschaften können sie den Abbau von kontaminierenden Substanzen wie Öl oder Phenanthren durch Mikroorganismen erleichtern (Tecon & van der Meer, 2010; Banat, 2000b; Zhang & Miller, 1994). Außerdem zeichnen sich die Rhamnolipide von *P. aeruginosa* durch bakterizide Wirkung auf andere Bakterien aus (Benincasa *et al.*, 2004; Haba *et al.*, 2003; Abalos *et al.*, 2001). Die Oberflächenaktivität der Rhamnolipide kann Dispersion der Biofilme von *Bordetella bronchiseptica*, dem Erreger verschiedener Tierkrankheiten, auslösen. Gerade bei Gram-positiven Bakterien permeabilisieren die Rhamnolipide von *P. aeruginosa* die Zellmembranen (Sotirova *et al.*, 2008). Bei *Staphylococcus aureus* wird durch Rhamnolipide die Adhäsionsfähigkeit reduziert. Oberflächen von medizinischen Prothesen werden häufig von *S. aureus* kontaminiert. Eine Behandlung der Prothesen mit Rhamnolipiden, reduziert die Kontaminationsgefahr enorm (Rodrigues *et al.*, 2006).

Um das biotechnologische Potential der Rhamnolipide von *B. glumae* zu erfassen, wurden verschiedene Charakteristika der Rhamnolipide untersucht. Die Rhamnolipide wurden u. a. in verschiedenen Konzentrationen zu unterschiedlichen Bakterien gegeben und das Wachstum der jeweiligen Kulturen überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Rhamnolipide auf die Gram-positiven Bakterien *S. aureus* und *B. subtilis* in relativ geringen Konzentrationen antimikrobiell wirken, während sie auf die hier getesteten Gram-negativen Bakterien keine Wirkung zeigen. Gram-positive Bakterien besitzen nur eine Zellmembran und die Rhamnolipide von *B. glumae* besitzen möglicherweise einen permeabilisierenden Effekt auf die Zellmembran wie die Rhamnolipide von *P. aeruginosa*. Bei den zwei Zellmembranen der Gram-negativen Bakterien scheint der permeabilisierende Effekt nicht auszureichen, um die Bakterien im Wachstum zu stören. Interessanterweise zeigten die Rhamnolipide von *B. plantarii* bis zu Konzentrationen von 256 µg/ml keine bakterizide Wirkung auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Andra *et al.*, 2006). Die Rhamnolipide von *B. glumae* zeigen jedoch die antimikrobielle Wirkung gegen Gram-positive Bakterien. Damit qualifiziert sich *B. glumae* als Produzent von Rhamnolipiden für medizinische oder pharmazeutische Zwecke. *B. glumae* zählt zu der Sicherheitsstufe S1 und kann daher ohne Bedenken in der Industrie eingesetzt werden. Mit der Rhamnolipid-Produktion und der bakteriziden Wirkung der Rhamnolipide zeigt *B. glumae* eine biotechnologisch interessante Eigenschaft.

2.2 Rhamnolipid-Bildung in *B. glumae* PG1Δ*gspD*

Nach dem Nachweis von Rhamnolipiden in *B. glumae* PG1 wurden auch die *gsp*-Mutanten auf ihre Rhamnolipid-Bildung untersucht. Dabei zeigte sich, dass *B. glumae* PG1Δ*gspD* im Vergleich zu *B. glumae* PG1 eine erhöhte Rhamnolipidmenge produziert.

Vergleicht man die beiden sekretionsdefizienten Mutanten untereinander, zeigt *B. glumae* PG1Δ*gspDEF* den gleichen Phänotyp wie *B. glumae* PG1. Bei den *gsp*-Mutanten unterscheidet sich nur die Lage der eingefügten Kanamycinkassette. Bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* wurde die Kassette in entgegengesetzter Richtung eingefügt, damit die Gene *gspE* und *gspF* nicht mehr abgelesen werden können. Da der *aphII*-Promotor dadurch in die andere Richtung liest, werden die Gene, die im Genom vor der Kanamycinkassette liegen, vermutlich zusätzlich transkribiert. Da aber die Leserichtung der Gene upstream der Kanamycinkassette in die gleiche Richtung wie das *gspD*-Gen läuft, d. h. in die entgegengesetzte Leserichtung der Kanamycin-Kassette, entstehen vermutlich nur *non-sense* Proteine, die wieder abgebaut werden. Möglicherweise beeinflussen aber auch die Proteine GspE und GspF weitere Faktoren, wodurch der unterschiedliche Phänotyp möglich ist.

Die Rhamnolipidmengen bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* sind im Vergleich zu *B. glumae* PG1 nach 24 h mehr als dreifach und nach 48 h mehr als zweifach erhöht. Die anschließende Transkriptionsanalyse der *rhl*-Gene bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* zeigt, dass auch die Transkriptmengen zu den gewählten Zeitpunkten deutlich höher waren als bei *B. glumae* PG1. Nach 24 h liegt in *B. glumae* PG1Δ*gspD* die doppelte Transkriptmenge als in *B. glumae* PG1 vor und das resultiert in einer mehr als dreifach höheren Rhamnolipidmenge. Transkript von *rhlC* konnte zu den gewählten Zeitpunkten in *B. glumae* PG1 nicht nachgewiesen werden. Die Transkription von *rhlC* war zu den gemessenen Zeitpunkten in *B. glumae* PG1 anscheinend schon beendet, während in PG1Δ*gspD* noch Transkript nachgewiesen werden konnte. Das weist daraufhin, dass die Transkription der *rhl*-Gene in *B. glumae* PG1Δ*gspD* anscheinend länger andauert als in *B. glumae* PG1. Bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* scheint die Transkription der *rhl*-Gene entweder keine zeitliche Begrenzung zu besitzen oder in *B. glumae* PG1Δ*gspD* ist keine Repremierung vorhanden.

In *P. aeruginosa* wird die Rhamnolipid-Produktion durch das Rhl-System reguliert, indem die Regulatoren RhlR und RhlI positiv auf *rhlA* wirken (Pearson *et al.*, 1997; Latifi *et al.*, 1995). Das hierarchisch höher angeordnete Las-System reguliert das Rhl-System durch verschiedene Mechanismen. Das Protein LasR und oxo-C₁₂-HSL regulieren sowohl *rhlR* als auch *rhlI* in einer positiven Weise (Pesci *et al.*, 1997). Gleichzeitig wird das Rhl-System auf einem posttranslationalen Weg vom Las-System reguliert, indem oxo-C₁₂-HSL die Interaktion von RhlR mit C₄-HSL hemmt (Pesci *et al.*, 1997). Dieser Effekt konnte jedoch nur in dem heterologen Wirt *E. coli* (Pesci *et al.*, 1997) und nicht im homologen Wirt *P. aeruginosa* festgestellt werden (Winzer *et al.*, 2000).

Übertragen auf *B. glumae* würde das bedeuten, dass die Rhamnolipid-Produktion durch C₆-HSL positiv reguliert wird und C₈-HSL die Produktion von Rhamnolipiden hemmen kann. In Abschnitt III.4 zeigte sich, dass bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* die Menge von C₈-HSL im Überstand unter diesen Bedingungen (Kohlenstoffquelle: Glycerol) drastisch reduziert ist. Damit würde reprimierende Wirkung von C₈-HSL wegfallen. Wäre die erhöhte Rhamnolipid-Produktion von *B. glumae* PG1Δ*gspD* darin begründet, müsste auch *B. glumae* PG1Δ*gspDEF* den Phänotyp der erhöhten Rhamnolipid-Bildung zeigen. *B. glumae* PG1Δ*gspDEF* produziert jedoch gleiche Mengen an Rhamnolipid wie *B. glumae* PG1.

Ein weiterer Faktor der auf die Regulation der Rhamnolipide wirkt, ist PQS, indem es bei RhIR die Fähigkeit andere Gene zu induzieren, erhöht (Diggle *et al.*, 2003; McKnight *et al.*, 2000; Pesci *et al.*, 1999). Diese Beziehung ist wechselseitig, da das PQS nicht nur einen positiven Effekt auf die Rhamnolipid-Bildung hat, sondern die Rhamnolipide wiederum die Bioaktivität von PQS erhöhen (Calfee *et al.*, 2005) und RhIR das PQS-Operon reprimiert (McGrath *et al.*, 2004). Da bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* das PQS-ähnliche Signal fehlt, ist diese Regulation bei *B. glumae* unklar. Durch die erhöhte Rhamnolipidproduktion könnte auch RhIR in einer erhöhten Menge produziert werden, was jedoch die Synthese von PQS negativ beeinflusst. Daher wurde das PQS-ähnliche Signal aus dem Überstand von *B. glumae* PG1 isoliert und zu Kulturen von *B. glumae* PG1Δ*gspD* in verschiedenen Mengen zugefügt. Da das PQS in *P. aeruginosa* die Rhamnolipid-Bildung verstärkt (Calfee *et al.*, 2005), sollte bei *B. glumae* PG1Δ*gspD* in der Rhamnolipid-Bildung ein positiver Effekt durch die Zugabe von PQS festzustellen sein. Doch es zeigte sich, dass das PQS-ähnliche Signal keinen Einfluss auf die Rhamnolipide nimmt, weder einen verstärkenden, noch einen reprimierenden. Es ist ein Unterschied, ob das Bakterium die Substanzen selbst produziert oder ob sie von außen zugegeben werden. Da aber bei *B. glumae* PG1Δ*gspDEF* dieser Effekt nicht festgestellt werden konnte, kann man vermuten, dass das PQS-ähnliche Signal keine regulatorischen Wirkung auf die Rhamnolipid-Produktion hat.

Die Regulation der Rhamnolipide von *P. aeruginosa* kann anscheinend nicht auf *B. glumae* PG1 übertragen werden. Die *rhl*-Gene von *B. glumae* zeigen im Genom eine andere Anordnung als die *rhl*-Gene von *P. aeruginosa*. Sie sind anders organisiert und besitzen daher vermutlich auch eine andere Regulation. Für eine vollständige Klärung sind weitere Analysen erforderlich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *B. glumae* PG1 Rhamnolipide produziert und wichtige Hinweise für weitere Untersuchungen gefunden werden.

3 Untersuchung der Biofilmbildung

Bei der Untersuchung der Biofilm-bildenden Eigenschaften von *B. glumae* zeigte sich, dass das Bakterium unter spezifischen Bedingungen Biofilm bildet. Durch Zugabe von Olivenöl als

Kohlenstoffquelle und unter statischer Inkubation konnte Biofilmbildung in *B. glumae* nachgewiesen werden. Die Bildung von Biofilmen bietet den Bakterien enorme Vorteile, da innerhalb eines Biofilms eine konstante Lebensweise ermöglicht wird und die Bakterien durch den Austausch genetischen Materials viele Selektionsvorteile erhalten können (Stewart & Costerton, 2001; Watnick & Kolter, 2000).

Die Untersuchung der Biofilm-Bildung der in dieser Arbeit erzeugten *gsp*-Mutanten von *B. glumae* zeigte, dass diese unter den untersuchten Bedingungen nicht in der Lage sind Biofilme zu bilden. Durch die Zugabe von zellfreiem Überstand von *B. glumae* PG1 konnte die Biofilmbildung jedoch in den *gsp*-Mutanten wiederhergestellt werden. Es wurde gezeigt, dass die Biofilmbildung mit der Menge des zugegebenen Überstands korreliert. Das wiederum wies daraufhin, dass im Überstand von *B. glumae* PG1 ein Biofilm-induzierender Faktor enthalten sein muss, der bei den *gsp*-Mutanten aufgrund des defekten Transportsystems fehlt. Nähere Untersuchungen des Überstands zeigten dann, dass der Biofilm-induzierende Faktor Protein-spezifische Charakteristika aufweist.

Die Biofilmbildung bietet nicht nur Bakterien enorme Vorteile, sie ist auch biotechnologisch nutzbar (Boltz & Daigger, 2010; Tian *et al.*, 2010; Macias-Flores *et al.*, 2009; Wang & Chen, 2009). Die Anwendung so genannter Biofilmreaktoren ist mittlerweile weit verbreitet (Boltz & Daigger, 2010) und durch die Immobilisierung von Mikroorganismen oder Enzymen kann man schädigende Einwirkungen auf die Fermentation wie z. B. durch das Scheren vermeiden, woraus eine erhöhte Lebensdauer der Zellen resultiert. Außerdem ermöglicht man höhere Zellkonzentrationen innerhalb des Reaktors. Bei der Herstellung von Wasserstoff durch das Bakterium *Rhodospseudomonas palustris* wird ein so genannter Photo-Biofilmreaktor genutzt (Tian *et al.*, 2010), auch bei der Herstellung von Biokraftstoff kann der Biofilmreaktor eingesetzt werden (Wang & Chen, 2009). Ein anderes Anwendungsgebiet zeigt sich durch den biologischen Abbau von Atrazin mittels Biofilmreaktoren (Macias-Flores *et al.*, 2009).

Durch diese Eigenschaft zeigt *B. glumae* weiteres biotechnologisches Potential. Eine mögliche Anwendung wäre bei der Expression und Isolierung der industriell interessanten Lipase. Eine weitere Möglichkeit bietet sich durch den Einsatz von *B. glumae* als immobilisierter Expressionswirt für Sekundärmetabolite.

3.1 Die Lipase LipA liegt im Überstand von *B. glumae* als Komplex vor

Bei der näheren Untersuchung des Biofilm-induzierenden Faktors in *B. glumae* zeigte sich, dass dieser sich durch Größenausschlusszentrifugation von anderen Komponenten isolieren lässt. Die berechnete Größe des biofilmbildenden Komplexes belief sich auf ca. 296 kDa. Native Gelelektrophorese zeigte eine Bande ~100 kDa und die SDS-PAGE zeigte letztendlich nur zwei dominierende Banden bei ~33 kDa und ~35 kDa. Die Proteine des

Komplexes wurden mittels MALDI-TOF als LipA und RBG10325 identifiziert wurden. Das Protein RBG10325 ist ein hypothetisches bislang nicht charakterisiertes Protein. Es ist homolog zu einem Protein aus *P. aeruginosa*, über dessen Funktion ebenfalls keine Informationen bekannt sind. Auch Vorhersagen zu dem Protein zeigten keine Eigenschaften oder Fähigkeiten, die für die Biofilmbildung relevant sein könnten. Die Herstellung einer Deletionsmutante von *rbg10325* war nicht möglich. Daher konnte der Einfluss auf die Biofilmbildung nicht näher untersucht werden. Vielleicht besitzt das Protein RBG10325 jedoch keine direkt Wirkung auf die Biofilmbildung.

Im Hinblick auf die Aufreinigung durch die Größenausschluss-Chromatographie fielen jedoch die variierenden Größen des Biofilm-induzierenden Faktors auf und daraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, dass ein Proteinkomplex vorliegt. Vielleicht dient das Protein RBG10325 zur Stabilisierung des Proteinkomplexes. Vielleicht hat es aber auch eine ähnliche Wirkung wie die Hitzeschockproteine (HSP), die bei *E. coli* IpbA und IpbB genannt werden (Bissonnette *et al.*, 2010). Diese Proteine agieren als molekulare Chaperone. Sie können sowohl Polypeptide in eine andere Konformation umbauen, als auch Proteinkomplexe anordnen (Arrigo, 2005).

Einige Lipasen existieren in zwei Formen: in einer inaktiven, geschlossenen Form (Abbildung 46 A) und einer aktiven, offenen Form (Abbildung 46 B). Bei der inaktiven, geschlossenen Form wird das aktive Zentrum durch eine Polypeptidkette, den so genannten Deckel, geschützt (Fernandez-Lorente *et al.*, 2003, Abbildung 46 A). Bei der aktiven, offenen Form wird der Deckel verschoben, das aktive Zentrum liegt frei und das Enzym ist aktiv (siehe Abbildung 46 B).

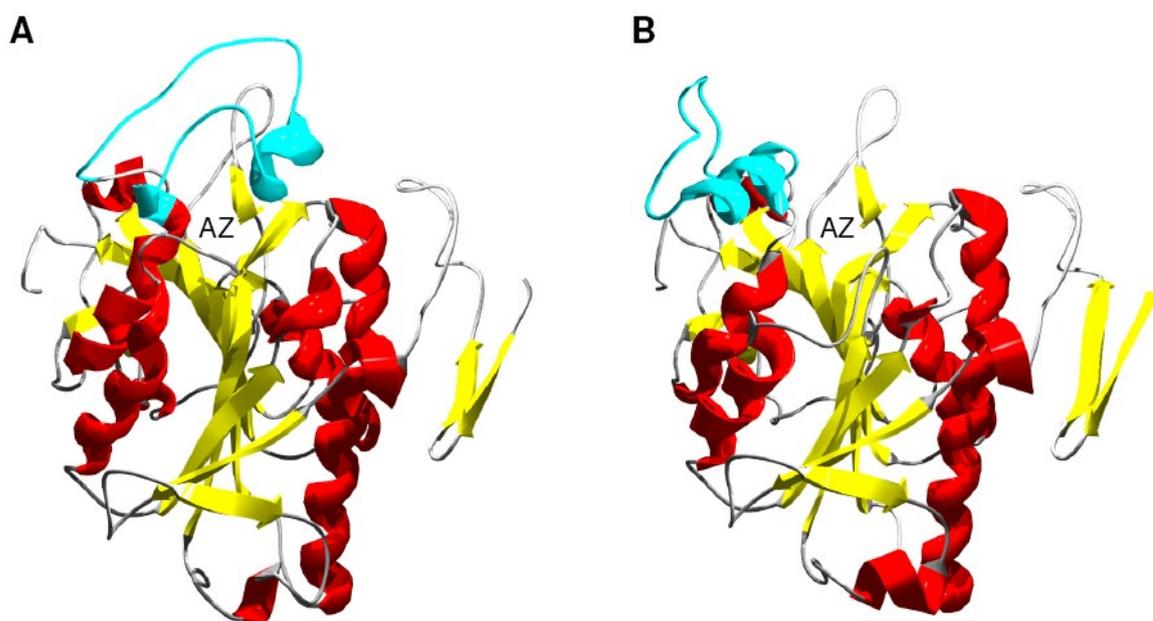


Abbildung 45: Struktur der humanen Pankreas-Lipase. Beispiel der geschlossenen (A) und der offenen Konformation (B) einer Lipase anhand der Struktur der katalytischen Domäne der humanen Pankreas-Lipase. Der sogenannte Deckel ist hellblau eingefärbt und schirmt in geschlossener Form das aktive Zentrum (AZ) ab.

In wässrigen, homogenen Medien liegt ein Gleichgewicht zwischen den beiden Formen vor, da der Wechsel mit einer komplexen Konformationsänderung verbunden ist (Grochulski *et al.*, 1993; Noble *et al.*, 1993; Derewenda *et al.*, 1992; Brzozowski *et al.*, 1991). In Anwesenheit von hydrophoben Substanzen erfolgt dann die Interphasenaktivierung. Durch Interaktion der internen hydrophoben Seite des Deckels und den hydrophoben Bereichen um das aktive Zentrum mit den hydrophoben Grenzschichten wird der Deckel verschoben und das aktive Zentrum der Lipase liegt offen vor (Fernandez-Lorente *et al.*, 2003). Das Gleichgewicht verschiebt sich und in Anwesenheit von hydrophoben Substanzen liegen mehr Lipasen in der offenen Konformation vor. Die offene Form der Lipase zeigt größere hydrophobe Taschen. Bei der Lipase von *Candida rugosa* kommt es bei den offenen Lipasen zur Bildung von bimolekularen Aggregaten in Form von Dimeren durch den engen Kontakt der hydrophoben Taschen (Pernas *et al.*, 2002; Pernas *et al.*, 2001). Auch die Bildung von Oligomeren ist bei den Lipasen möglich (Liou *et al.*, 1998; Stuer *et al.*, 1986). Im Allgemeinen werden multimere Proteine durch Interaktionen der verschiedenen Monomeren stabilisiert, während auch die Stabilität der einzelnen Monomeren, im Vergleich zu den isolierten Monomeren, in einem Komplex steigt (Poltorak *et al.*, 1998). Die offene Form der Lipase ist stabiler als die geschlossene Form (Palomo *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 1996; Holmquist *et al.*, 1993). Daher wird vermutet, dass ein Dimer der Lipasen stabiler als ein Monomer ist und auch Änderungen in der Aktivität und Enantioselektivität möglich sind (Fernandez-Lafuente, 2010).

Die Struktur der Lipase von *P. aeruginosa* wurde bereits aufgeklärt und besitzt eine α -Helix, die der Funktion eines Deckels zugesprochen wird (Nardini *et al.*, 2000). Die Lipase von *B. cepacia* zeigt ebenfalls offene und geschlossene Formen. Während die Lipase in wässriger Umgebung geschlossen vorliegt (Barbe *et al.*, 2009; Trodler *et al.*, 2009), zeigt sie an Öl-Wasser Interphasen ihre aktivierte, offene Konformation (Kim *et al.*, 1997). Auch die Lipase von *B. glumae* zeigt einen helicalen Deckel, der mit Mizellen interagieren kann (Noble *et al.*, 1993, siehe Abbildung 46).

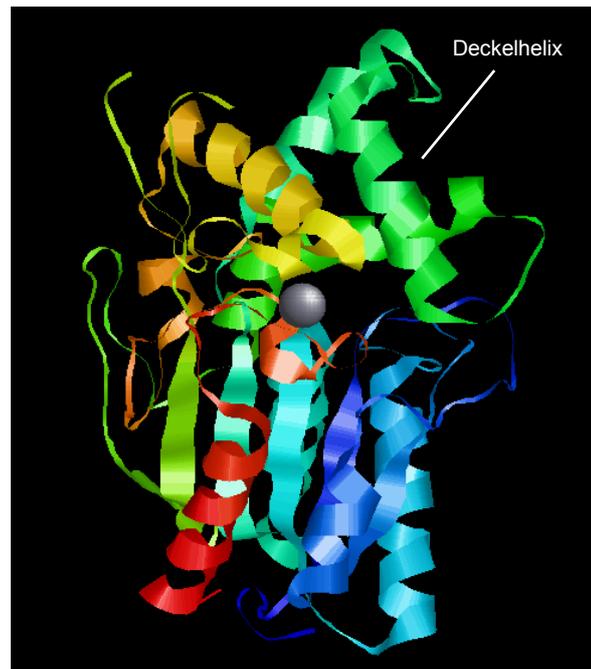


Abbildung 46: Struktur der *B. glumae* Lipase LipA. Die Deckelhelix ist markiert (nach Noble *et al.*, 1993).

Die Biofilm-Versuche wurden mit Olivenöl durchgeführt, daher war in dem wässrigen Medium eine hydrophobe Phase enthalten. Durch das Olivenöl verschiebt sich das Gleichgewicht der verschiedenen Konformationen zu der offenen Konformation, wodurch die Bildung von Dimeren oder auch Oligomeren möglich ist bzw. auch gefördert wird.

Die Rolle des gefundenen Proteins RBG10325 kann abschließend nicht geklärt werden. Aufgrund der Komplexbildung der Lipasen ist eine stabilisierende Wirkung von RBG10325 durchaus möglich. Bei einem Komplex von 296 kDa würde sich der Komplex aus 8 Lipasen und 4 stabilisierenden Proteinen (RBG10325) zusammensetzen. Das würde bedeuten, dass ein Protein RBG10325 die Dimerbildung von Lipasen unterstützen würde.

3.2 Induktion der Biofilmbildung durch Ölsäure in *B. glumae*

Bei der weiteren Untersuchung zur Biofilmbildung in *B. glumae* stellte sich heraus, dass die Lipase indirekt an der Biofilmbildung beteiligt ist. Durch die katalytische Spaltung des Olivenöls kommt es zu der Bildung von Fettsäuren (hauptsächlich Ölsäure) und Glycerol. Während Glycerol keinen Einfluss auf die Biofilmbildung nimmt, zeigte sich, dass die Zugabe der Lipase oder der Ölsäure die Biofilmbildung in den *gsp*-Mutanten wiederherstellen kann. Damit zeigt sich, dass die Lipase und ein Produkt aus der katalytischen Reaktion der Lipase die Biofilmbildung auslöst. Die fehlende Biofilmbildung bei den *gsp*-Mutanten und der LipA-Mutante ist auf die Verhinderung der katalytischen Umsetzung von Öl in Ölsäure durch die Lipase zurückzuführen. Der Biofilm-induzierende Faktor ist somit die Ölsäure. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie diese Fettsäure die Biofilmbildung auslösen kann.

Freie Fettsäuren sind als Oberflächen-aktive Substanzen bekannt (Gianotti *et al.*, 2008; Neu, 1996). Eine Eigenschaft von extrazellulären Fettsäuren ist die Immobilisierung an der Zelloberfläche, wo sie vermutlich einen Film bilden (Gianotti *et al.*, 2008; Neu, 1996; Loeb & Neihof, 1975). Sie können jedoch nicht nur an der Zelloberfläche immobilisieren, sondern auch an anderen Oberflächen (Neu, 1996). Dabei bestimmt die Oberfläche des Materials die Orientierung der Fettsäuren, d. h. bei hydrophobem Material lagert sich der hydrophobe Bereich der Fettsäure an, bei hydrophilen Materialien der hydrophile Teil. Bei einem hydrophoben Material, wie z. B. einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol, lagern sich die Fettsäuren mit ihrer hydrophilen Säuregruppe an die hydrophile Zelloberfläche, die hydrophoben Alkanketten der Fettsäuren ragen nach außen und ermöglichen so eine Anlagerung an die hydrophobe Oberfläche der Mikrotiterplatte (Abbildung 48). An die angelagerten Zellen können wiederum andere Zellen adherieren, so dass ein Biofilm entstehen kann (Abbildung 48 B). Die Fettsäuren dienen als Anheftungsfaktor und sobald sich ein paar Zellen an das hydrophobe Material anlagern können, kann ein Biofilm gebildet werden (Abbildung 48).

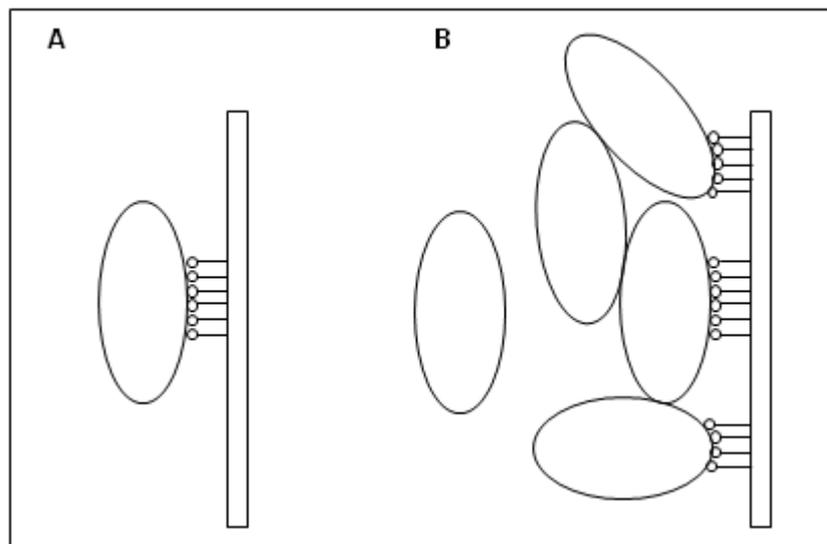


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Anlagerung von Zellen an eine hydrophobe Oberfläche mit Hilfe von Fettsäuren. Es wurde die Anlagerung einer einzelnen Zelle (A) und die mögliche Bildung von Biofilm (B) dargestellt. Die Fettsäure agiert hierbei als eine Art Anker. Die hydrophile Säuregruppe (Kreis) lagert sich an die hydrophile Zelloberfläche. Die hydrophobe Alkankette (Strich) bindet an die hydrophobe Oberfläche.

Diese Oberflächen-aktive Eigenschaft ist nur eine Möglichkeit, wie sich der Biofilm mit Hilfe von Fettsäuren ausbilden kann. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich, da Fettsäuren als Signalmoleküle agieren können. Das phytopathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* kontrolliert seine Virulenzfaktoren durch Akkumulation eines sogenannten *diffusible signal factor* (DSF). Dieser Faktor wird durch das Protein RpfF, die DSF Synthetase (Enoyl-CoA Hydratase), produziert und ist als *cis*-11-Methyl-2-Dodecensäure charakterisiert (Wang *et al.*, 2004; Barber *et al.*, 1997). Diese Fettsäure agiert als Signalmolekül und die

Signaltransduktion wird von dem Zwei-Komponenten-System RpfC/RpfG vermittelt (Slater *et al.*, 2000). Durch das DSF-Signalsystem wird die Transkription von 165 Genen beeinflusst, die zu 12 verschiedenen Gruppen gehören, wie z. B. zur Herstellung extrazellulärer Proteine oder zur Flagellum-Synthese (He *et al.*, 2006). Bei *X. campestris* wird durch DSF indirekt die Biofilmbildung reguliert, da die Biosynthese von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) DSF-abhängig ist (Torres *et al.*, 2007; Vojnov *et al.*, 2001a; Vojnov *et al.*, 2001b). Das DSF-Signalmolekül ist somit aufgrund der DSF-abhängigen Xanthan-Synthese an der Biofilmbildung beteiligt. Bei Anzucht von *X. campestris* in Minimalmedium wird nur wenig DSF produziert, wobei die DSF-Konzentration in einen kritischen Bereich fällt. Die Konzentration ist zu gering um die Induktion der Xanthansynthese zu bewirken (Torres *et al.*, 2007). Auch viele phytopathogene Bakterien produzieren DSF (Boon *et al.*, 2008; Newman *et al.*, 2008; Colnaghi Simionato *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004; Chatterjee & Sonti, 2002; Barber *et al.*, 1997). Das DSF-Signalmolekülsystem konnte in Pflanzen nachgewiesen werden und es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Konzentrationen des Signalmoleküls für die Virulenz der Bakterien benötigt werden (Torres *et al.*, 2007). Zu den DSF-produzierenden Bakterien zählt auch *B. cenocepacia* (Deng *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2009; Boon *et al.*, 2008). Das Signalmolekül von *B. cenocepacia* BDSF unterscheidet sich strukturell nur gering von dem DSF-Molekül und wurde als *cis*-2-Dodecensäure charakterisiert (Boon *et al.*, 2008). Die Zugabe von BDSF konnte in DSF-defizienten *X. campestris*-Stämmen die Biofilmbildung und die Produktion von extrazellulären Polysacchariden herstellen (Boon *et al.*, 2008). *B. cenocepacia* besitzt ein RpfF-homologes Protein, das eine Enoyl-CoA Hydratase-Funktion besitzt (Boon *et al.*, 2008). Das Signaltransduktionssystem von BDSF scheint sich von dem etablierten System aus *Xanthomonas* zu unterscheiden, da *B. cenocepacia* keine Histidinkinase kodiert, die Homologien zu RpfC aufweist (Ryan *et al.*, 2009). Der Mechanismus der Signalerkennung konnte jedoch noch nicht gelöst werden. Wie auch die Autoinducer ist die Akkumulation von BDSF Zelldichten-abhängig (Deng *et al.*, 2009). Viele bekannte Virulenzfaktoren von *B. cenocepacia* werden durch die BDSF-abhängige Kommunikation kontrolliert und BDSF-defiziente Stämme zeigen eine geringere Pathogenität (Deng *et al.*, 2009). Trotz der Co-Regulation scheint das BDSF-System unabhängig von dem QS-System zu agieren (Ryan *et al.*, 2009) und daher besitzen BDSF und die HSL vermutlich eigene Regulons (Deng *et al.*, 2009).

B. glumae besitzt 5 putative Enoyl-CoA Hydratasen. Damit könnte es sein, dass *B. glumae* über ein DSF-Signalsystem verfügt. Des Weiteren spricht für diese Hypothese, dass ein Bakterium der gleichen Gattung das DSF-Signalsystem besitzt und es schon bei vielen phytopathogenen Bakterien beobachtet wurde (Boon *et al.*, 2008; Colnaghi Simionato *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2007; Chatterjee & Sonti, 2002).

Vergleicht man die Strukturen der Fettsäuren der verschiedenen Bakterien (Abbildung 49) erkennt man die Ähnlichkeit zwischen DSF und BDSF und der Ölsäure. Auffällig ist nur, dass die Ölsäure eine längere Kettenlänge besitzt (Abbildung 49) Daher kann man spekulieren, dass die Ölsäure kein natürliches Signalmolekül darstellt, sondern eher die gleichen Effekte wie die BDSF-Signalmoleküle auslöst. Da das Signaltransduktionssystem von *B. cenocepacia* nicht bekannt ist (Ryan *et al.*, 2009) und es bislang keine Hinweise darauf gibt, wie das Bakterium das BDSF erkennt, ist auch unbekannt, wie spezifisch die Signalerkennung abläuft.

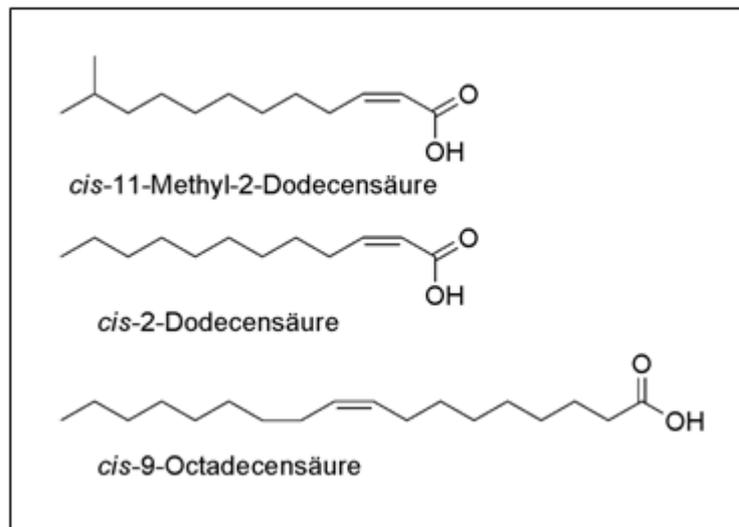


Abbildung 48: Strukturen der verschiedenen Fettsäuren, die als Signalmoleküle agieren. *X. campestris* produziert *cis-11-Methyl-2-Dodecensäure* als Signalmolekül DSF. Auch bei *B. cenocepacia* konnte ein Signalsystem mit *cis-2-Dodecensäure* (BDSF) gefunden werden. Die Biofilmbildung von *B. glumae* PG1 kann durch die Zugabe von Ölsäure (*cis-9-Octadecensäure*) wiederhergestellt werden.

Das QS-System von *B. cepacia* reagiert auf die HSL von *P. aeruginosa* (McKenney *et al.*, 1995), obwohl sich die HSL in der Kettenlänge unterscheiden. Bei *X. campestris* wird die Biofilmbildung bei DSF-defizienten Stämmen gehemmt, da die Synthese des extrazellulären Polysaccharid Xanthan durch die DSF-Signalkaskade kontrolliert wird (Torres *et al.*, 2007). Inwiefern *B. glumae* selbst ein solches Signalsystem mit den gleichen Regularien besitzt oder nur auf die vorhandene Ölsäure reagiert, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Zur Klärung, welche Rolle die Ölsäure nun in der Biofilmbildung spielt und wie die genaue Bildung des Biofilms abläuft, müsste eine vollständige Charakterisierung des Biofilms erfolgen. Innerhalb dieser Arbeit konnte erste Erkenntnisse über die Biofilmbildung gemacht werden und wichtige Indizien für weitere Untersuchungen offengelegt werden.

V Zusammenfassung

Das Gram-negative Bakterium *Burkholderia glumae* besitzt hohe biotechnologische Relevanz durch die Sekretion einer Lipase (LipA), die bereits industriell Anwendung findet. Im Gegensatz zu dieser Lipase wurde das Bakterium bislang jedoch noch nicht eingehender charakterisiert. Somit konnte das volle biotechnologische Potential dieses vielseitigen Bakteriums noch nicht gezeigt werden. Da das Genom von *B. glumae* vollständig sequenziert und annotiert wurde, war ein Ziel dieser Arbeit neue biotechnologisch interessante Eigenschaften von *Burkholderia glumae* zu finden.

Wie andere Spezies der *Burkholderia*-Gattung besitzt *B. glumae* zwei Chromosomen. Der GC-Anteil der genomischen DNA beträgt in Chromosom 1 68,36 % bzw. 69,23 % in Chromosom 2. Bei näherer Betrachtung der *open reading frames* (ORFs) fällt die hohe Anzahl an ORFs auf, die für Transport- oder Sekretionsproteine kodieren. Der Transport der Lipase LipA vom Periplasma in das extrazelluläre Milieu wird über den Typ II Sekretionsmechanismus, auch *main terminal branch* des Gsp-Systems (*general secretory pathway*) genannt, postuliert. Dazu besitzt *B. glumae* ein vollständiges Typ II-Sekretionssystem auf Chromosom 1 und ein zweites rudimentäres System auf Chromosom 2. Durch die Untersuchung zweier Mutanten des Typ II-Systems konnte gezeigt werden, dass nur das Typ II-Sekretionssystem auf Chromosom 1 funktionsfähig ist und nicht durch das unvollständige System auf dem 2. Chromosom komplementiert wird.

Die planktonische Lebensweise ist bei Mikroorganismen in natürlichen Habitaten eher selten. Stattdessen werden Biofilme gebildet, die den Bakterien auch in außergewöhnlichen Lebensräumen konstante Lebensbedingungen bieten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *B. glumae* Biofilme bildet. Es wurde nachgewiesen, dass die aktive Lipase LipA für die Biofilmbildung von *B. glumae* essentiell ist. Die Lipase hydrolysiert Öl zu einem Diacylglycerol und einer Oberflächen-aktiven Fettsäure. Diese nutzt *B. glumae* als Adhäsionsfaktor, wodurch sich das Bakterium z. B. an hydrophobe Oberflächen anlagern kann. Durch diese Erkenntnisse kann man nun die Verunreinigung der Fermenter durch Bildung von Biofilmen bei der Produktion der Lipase vermeiden, indem man andere Kohlenstoffquellen als Olivenöl einsetzt. Biofilme zeigen aber auch biotechnologische Relevanz, da z. B. in sogenannten Biofilmreaktoren die Biofilmbildung genutzt werden kann. Durch die Adhäsion der Mikroorganismen kann die Zelldichte erhöht, die Abführung toxischer Nebenprodukte oder die Abtrennung eines biotechnologischen Endproduktes vereinfacht werden.

Biotenside sind durch Mikroorganismen hergestellte Moleküle, die nützliche Eigenschaften besitzen. Ihre einfache Herstellung und der biologische Abbau sind nur zwei der vielen Vorteile gegenüber chemisch hergestellten Komponenten. Rhamnolipide gehören zu den

meistverbreiteten Biotensiden. Sie bestehen aus einem (Monorhamnolipid) oder zwei Rhamnosemolekülen (Dirhamnolipid), die mit zwei Fettsäuren verknüpft sind. Die Fettsäuren können in ihrer Kettenlänge variieren. Von einigen humanpathogenen *Burkholderia*-Spezies ist die Herstellung von Rhamnolipiden bekannt, während die Herstellung von Rhamnolipiden in *B. glumae* noch nicht beschrieben wurde. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *B. glumae* *rhl*-homologe Gene besitzt und Dirhamnolipide produziert. Das dominierende Dirhamnolipid besitzt zwei C₁₄-Ketten. Nähere Untersuchungen der Rhamnolipide zeigten, dass diese eine bakterizide Wirkung gegen Gram-positive Bakterien besitzen, die bisher nur bei den Rhamnolipiden des humanpathogenen Bakteriums *P. aeruginosa* beschrieben wurde. Aus biotechnologischer Sicht und aufgrund des S1-Sicherheitsstatus können die Rhamnolipide von *B. glumae* als Alternative zu den Rhamnolipiden von *P. aeruginosa* dienen.

VI Summary

The Gram-negative bacterium *Burkholderia glumae* has biotechnological relevance because it secretes a lipase (LipA) which has industrial applications. Therefore, the lipase was already characterized in contrary to the bacterium. The full biotechnological potential of *B. glumae* was not shown until now.

Because the complete genome was sequenced and annotated, the aim of the work was to investigate new biotechnological characteristics of *B. glumae* should.

Like other species of the genus *Burkholderia*, *B. glumae* has two chromosomes. The GC-part of genomic DNA is 68,36 % in chromosome 1 and 69,23 % in chromosome 2. Analysis of open reading frames (orfs) showed a high quantity of orfs coding for transport or secretion proteins. The transport of the lipase LipA from periplasm to the extracellular media is postulated to occur via the type II secretion mechanism of the Gsp-System (general secretory pathway). *B. glumae* has a complete typ II secretion system encoded on chromosome 1 and an incomplete system on chromosome 2. After construction of two *gsp*-mutants, it was shown that only the system of chromosome 1 is functional and it cannot be complemented by the second system on chromosome 2.

The planktonic life of microorganisms is really unusual in natural life. Microorganisms prefer to live in biofilms which offer a constant environment to organisms also in extremely habitats. Within this work, it was shown that *B. glumae* is able to form biofilms. The ability to form biofilms is dependent of the active lipase LipA. The lipase hydrolyses oil to a yield of fatty acids and a diacylglycerol. Fatty acids are surface-active compounds. *B. glumae* uses the produced fatty acids as an adhesion factor which allows the cells to attach to hydrophobic surfaces. This information is valuable to avoid contaminating biofilms at the production of lipase by using another carbon source than olive oil. Biofilms also have biotechnological relevance e. g. in biofilm reactors. A biofilm reactor has the advantage that the cell density can be increased or toxic components and end products can be isolated in an easy way.

Biotensides are surface-active molecules which are produced by microorganisms. The inartificial synthesis and the lightened biodegradation of pesticides are only two of the many advantages of biotensides compared to chemical compounds. Rhamnolipids belongs to common biotensides. They consist of one (mono-rhamnolipid) or two rhamnose molecules (di-Rhamnolipid), which are linked to two fatty acids. The fatty acids can vary in length. Some humanpathogenic *Burkholderia*-species are able to produce rhamnolipids, whereas the synthesis of rhamnolipids by *B. glumae* was not described yet. It was shown that *B. glumae* has *rhl*-homologous genes and it produces a mixture of di-Rhamnolipids. The significant rhamnolipid has two fatty acids with C₁₄-chains. Analysis of characteristics of rhamnolipids showed that the rhamnolipids exhibit an anti-microbial effect on Gram-positive bacteria. This

effect was described for rhamnolipids of the humanpathogenic bacterium *P. aeruginosa*. Because of the S1-security level of *B. glumae*, the rhamnolipids of *B. glumae* can be used as an alternative to rhamnolipids of *P. aeruginosa*.

VII Literatur

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., Garcia, F. & Manresa, A. (2001).** Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* **17**, 1367-1371.
- Aendekerk, S., Diggle, S. P., Song, Z., Hoiby, N., Cornelis, P., Williams, P. & Camara, M. (2005).** The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* **151**, 1113-1125.
- Aguilar, C., Bertani, I. & Venturi, V. (2003a).** Quorum-sensing system and stationary-phase sigma factor (*rpoS*) of the onion pathogen *Burkholderia cepacia* genomovar I type strain, ATCC 25416. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 1739-1747.
- Aguilar, C., Friscina, A., Devescovi, G., Kojic, M. & Venturi, V. (2003b).** Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. *Journal of Bacteriology* **185**, 6456-6462.
- Akrim, M., Bally, M., Ball, G., Tommassen, J., Teerink, H., Filloux, A. & Lazdunski, A. (1993).** Xcp-mediated protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of two additional genes and evidence for regulation of *xcp* gene expression. *Molecular Microbiology* **10**, 431-443.
- Alexeyev, M. F. (1995a).** Three kanamycin resistance gene cassettes with different polylinkers. *Biotechniques* **18**, 52-&.
- Alhede, M., Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Phipps, R. K., Moser, C., Christophersen, L., Christensen, L. D., van Gennip, M., Parsek, M., Hoiby, N., Rasmussen, T. B. & Givskov, M. (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology-Sgm* **155**, 3500-3508.
- Allenza, P. & Lessie, T. G. (1982).** *Pseudomonas cepacia* mutants blocked in the Entner-Doudoroff pathway. *Journal of Bacteriology* **150**, 1340-1347.
- Andra, J., Rademann, J., Howe, J., Koch, M. H. J., Heine, H., Zahringer, U. & Brandenburg, K. (2006).** Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biological Chemistry* **387**, 301-310.
- Aragon, V., Kurtz, S., Flieger, A., Neumeister, B. & Cianciotto, N. P. (2000).** Secreted enzymatic activities of wild-type and *pilD*-deficient *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity* **68**, 1855-1863.
- Arevalo-Ferro, C., Hentzer, M., Reil, G., Gorg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., Riedel, K. & Eberl, L. (2003).** Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environmental Microbiology* **5**, 1350-1369.
- Arrigo, A. P. (2005).** Heat shock proteins as molecular chaperones. *M/S-Médecine Sciences* **21**, 619-625.
- Arts, J., de Groot, A., Ball, G., Durand, E., Khattabi, M. E., Filloux, A., Tommassen, J. & Koster, M. (2007).** Interaction domains in the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretory apparatus component XcpS (GspF). *Microbiology* **153**, 1582-1592.

- Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2002).** A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **43**, 475-485.
- Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A. & Tommassen, J. (1992).** Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Molecular Microbiology* **6**, 1121-1131.
- Banat, I. M., Makkar, R. S. & Cameotra, S. S. (2000a).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**, 495-508.
- Banat, I. M. (2000b).** Potentials for use of biosurfactants in oil spills cleanup and oil bioremediation. In *Oil and Hydrocarbon Spills, Modelling, Analysis and Control II*, pp. 177-185. Edited by G. R. Rodriguez & C. A. Brebbia. Southampton: Wit Press.
- Barbe, S., Lafaquiere, V., Guieysse, D., Monsan, P., Remaud-Simeon, M. & Andre, I. (2009).** Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **77**, 509-523.
- Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J. G., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P. & Daniels, M. J. (1997).** A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology* **24**, 555-566.
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I. & Manresa, A. (2004).** Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **85**, 1-8.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523.
- Bissonnette, S. A., Rivera-Rivera, I., Sauer, R. T. & Baker, T. A. (2010).** The lbpA and lbpB small heat-shock proteins are substrates of the AAA+ Lon protease. *Molecular Microbiology* **75**, 1539-1549.
- Bitter, W., Koster, M., Latijnhouwers, M., de Cock, H. & Tommassen, J. (1998).** Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **27**, 209-219.
- Bleves, S., Lazdunski, A. & Filloux, A. (1996).** Membrane topology of three Xcp proteins involved in exoprotein transport by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **178**, 4297-4300.
- Bleves, S., Voulhoux, R., Michel, G., Lazdunski, A., Tommassen, J. & Filloux, A. (1998).** The secretion apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of a fifth pseudopilin, XcpX (GspK family). *Molecular Microbiology* **27**, 31-40.
- Boekema, B. K. H. L., Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. & Tommassen, J. (2007).** Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3838-3844.

-
- Boltz, J. P. & Daigger, G. T. (2010).** Uncertainty in bulk-liquid hydrodynamics and biofilm dynamics creates uncertainties in biofilm reactor design. *Water Science and Technology* **61**, 307-316.
- Boon, C., Deng, Y. Y., Wang, L. H., He, Y. W., Xu, J. L., Fan, Y., Pan, S. Q. & Zhang, L. H. (2008).** A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition. *Isme Journal* **2**, 27-36.
- Brint, J. M. & Ohman, D. E. (1995).** Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *Journal of Bacteriology* **177**, 7155-7163.
- Bruinsma, G. M., Rustema-Abbing, M., van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. (2001).** Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods* **45**, 95-101.
- Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Hugejensen, B., Patkar, S. A. & Thim, L. (1991).** A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**, 491-494.
- Calfee, M. W., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2001).** Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11633-11637.
- Calfee, M. W., Shelton, J. G., McCubrey, J. A. & Pesci, E. C. (2005).** Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa*-produced surfactant. *Infection and Immunity* **73**, 878-882.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R. & Rahme, L. G. (2001).** A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14613-14618.
- Cao, T. B. & Saier, M. H. (2003).** The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1609**, 115-125.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D. & Farrand, S. K. (1998).** Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**, 1119-1129.
- Chandrasekaran, E. V. & Bemiller, J. N. (1980).** Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods in Carbohydrate chemistry VIII*, 89-96.
- Chapon-Herve, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A. & Bally, M. (1997).** Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **24**, 1169-1178.
- Chatterjee, S. & Sonti, R. V. (2002).** *rpfF* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are deficient for virulence and growth under low iron conditions. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**, 463-471.
-

- Chun, H., Choi, O., Goo, E., Kim, N., Kim, H., Kang, Y., Kim, J., Moon, J. S. & Hwang, I. (2009). The quorum sensing-dependent gene *katG* of *Burkholderia glumae* is important for protection from visible light. *Journal of Bacteriology* **191**, 4152-4157.
- Coenye, T. & Vandamme, P. (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environmental Microbiology* **5**, 719-729.
- Colnaghi Simionato, A. V., da Silva, D. S., Lambais, M. R. & Carrilho, E. (2007). Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-EI-MS. *Journal of Mass Spectrometry* **42**, 1375-1381.
- Cornelis, G. R., Boland, A., Boyd, A. P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M. P. & Stainier, I. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 1315-+.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- Crespi, B. J. (2001). The evolution of social behavior in microorganisms. *Trends in Ecology & Evolution* **16**, 178-183.
- Dance, D. A. B., Wuthiekanun, V., Chaowagul, W., Suputtamongkol, Y. & White, N. J. (1991). Development of resistance to ceftazidime and co-amoxiclav in *Pseudomonas pseudomallei*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **28**, 321-324.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **185**, 1027-1036.
- De Kievit, T. R. (2009). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* **11**, 279-288.
- Degrassi, G., Devescovi, G., Kim, J., Hwang, I. & Venturi, V. (2008). Identification, characterization and regulation of two secreted polygalacturonases of the emerging rice pathogen *Burkholderia glumae*. *FEMS Microbiol Ecol* **65**, 251-262.
- Deng, Y. Y., Boon, C., Eberl, L. & Zhang, L. H. (2009). Differential modulation of *Burkholderia cenocepacia* virulence and energy metabolism by the quorum sensing signal BDSF and its synthase. *Journal of Bacteriology* **191**, 7270-7278.
- Derewenda, U., Brzozowski, A. M., Lawson, D. M. & Derewenda, Z. S. (1992). Catalysis at the interface - The anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry* **31**, 1532-1541.
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J. J., Kim, J., Hwang, I. & Venturi, V. (2007). Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4950-4958.
- Deziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A. & Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1440**, 244-252.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-

hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**, 2005-2013.

Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., He, J. X., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G. & Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1339-1344.

Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Camara, M. & Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular Microbiology* **50**, 29-43.

Diggle, S. P., Lumjiaktase, P., Dipilato, F., Winzer, K., Kunakorn, M., Barrett, D. A., Chhabra, S. R., Camara, M. & Williams, P. (2006). Functional genetic analysis reveals a 2-alkyl-4-quinolone signaling system in the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria. *Chemistry & Biology* **13**, 701-710.

Dubeau, D., Deziel, E., Woods, D. & Lepine, F. (2009). *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology* **9**, 263.

Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**, 2444-2449.

Eberl, L. & Tummeler, B. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *International Journal of Medical Microbiology* **294**, 123-131.

Eberl, L. (2006). Quorum sensing in the genus *Burkholderia*. *International Journal of Medical Microbiology* **296**, 103-110.

El Khattabi, M., Ockhuijsen, C., Bitter, W., Jaeger, K. E. & Tommassen, J. (1999). Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor. *Molecular and General Genetics* **261**, 770-776.

El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000). Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 26885-26891.

El Khattabi, M., Van Gelder, P., Bitter, W. & Tommassen, J. (2003). Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **22**, 329-338.

Engebrecht, J., Nealson, K. & Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence - isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* **32**, 773-781.

Espinosa-Urgel, M. (2003). Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *Journal of Bacteriology* **185**, 699-700.

Fekkes, P. & Driessen, A. J. M. (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 161-173.

- Fernandez-Lafuente, R. (2010).** Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **62**, 197-212.
- Fernandez-Lorente, G., Palomo, J. M., Fuentes, M., Mateo, C., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. (2003).** Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnology and Bioengineering* **82**, 232-237.
- Filloux, A., Bally, M., Ball, G., Akrim, M., Tommassen, J. & Lazdunski, A. (1990).** Protein secretion in Gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *Embo J* **9**, 4323-4329.
- Filloux, A., Michel, G. & Bally, M. (1998).** GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: The Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fems Microbiology Reviews* **22**, 177-198.
- Frenken, L. G. J., Egmond, M. R., Batenburg, A. M., Bos, J. W., Visser, C. & Verrips, C. T. (1992).** Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3787-3791.
- Frenken, L. G. J., Egmond, M. R., Batenburg, A. M. & Verrips, C. T. (1993).** *Pseudomonas glumae* lipase: increased proteolytic stability by protein engineering. *Protein Eng* **6**, 637-642.
- Frenken, L. G. J., Bos, J. W., Visser, C., Muller, W., Tommassen, J. & Verrips, C. T. (1993a).** An accessory gene, LipB, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. *Molecular Microbiology* **9**, 579-589.
- Frenken, L. G. J., Degroot, A., Tommassen, J. & Verrips, C. T. (1993b).** Role of the *lipB* gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Molecular Microbiology* **9**, 591-599.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C. & Manoil, C. (2002).** Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **184**, 6472-6480.
- Gambello, M. J., Kaye, S. & Iglewski, B. H. (1993).** LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of Exotoxin A expression. *Infection and Immunity* **61**, 1180-1184.
- Gianotti, A., Serrazarietti, D., Kamderri, S. S. & Guerzoni, M. E. (2008).** Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **123**, 9-17.
- Govan, J. R. W., Hughes, J. E. & Vandamme, P. (1996).** *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. *Journal of Medical Microbiology* **45**, 395-407.
- Grochulski, P., Li, Y. G., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. & Cygler, M. (1993).** Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12843-12847.
- Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante, M. R. & Manresa, A. (2003).** Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044. *Biotechnology and Bioengineering* **81**, 316-322.

-
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 95-108.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- Hauser, A. R., Kang, P. J. & Engel, J. N. (1998).** PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Molecular Microbiology* **27**, 807-818.
- Hauser, A. R., Cobb, E., Bodi, M., Mariscal, D., Valles, J., Engel, J. N. & Rello, J. (2002).** Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Care Medicine* **30**, 521-528.
- Haussler, S., Nimtz, M., Domke, T., Wray, V. & Steinmetz, I. (1998).** Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity* **66**, 1588-1593.
- Haussler, S., Rohde, M., von Neuhoff, N., Nimtz, M. & Steinmetz, I. (2003).** Structural and functional cellular changes induced by *Burkholderia pseudomallei* rhamnolipid. *Infection and Immunity* **71**, 2970-2975.
- He, Y. W., Xu, M., Lin, K., Ng, Y. J. A., Wen, C. M., Wang, L. H., Liu, Z. D., Zhang, H. B., Dong, Y. H., Dow, J. M. & Zhang, L. H. (2006).** Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Molecular Microbiology* **59**, 610-622.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D. (2004).** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 692-+.
- Herman, D. C., Zhang, Y. M. & Miller, R. M. (1997).** Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3622-3627.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979).** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **43**, 73-102.
- Holmquist, M., Norin, M. & Hult, K. (1993).** The role of arginines in stabilizing the active open-lid conformation of *Rhizomucor miehei* lipase. *Lipids* **28**, 721-726.
- Iiyama, K., Furuya, N., Takanami, Y. & Matsuyama, N. (1995).** A role of phytotoxin in virulence of *Pseudomonas glumae*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **61**, 470-476.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Vanheuver, M. & Misset, O. (1994).** Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* **15**, 29-63.
- Jarvis, F. G. & Johnson, M. J. (1949).** A glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society* **71**, 4124-4126.
- Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T. & Hwang, I. (2003).** Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant Disease* **87**, 890-895.
-

- Juhas, M., Eberl, L. & Tumbler, B. (2005).** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* **7**, 459-471.
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Heck, A. & Drepper, T. (2010).** A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expression and Purification* **69**, 137-146.
- Kim, J., Kim, J., Kang, Y., Jang, J. Y., Jog, G. J., Lim, J. Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T. & Hwang, I. (2004).** Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Molecular Microbiology* **54**, 921-934.
- Kim, J., Kang, Y., Choi, O., Jeong, Y., Jeong, J.-E., Lim, Y., Kim, M., Moon, J., Suga, H. & Hwang, I. (2007).** Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Molecular Microbiology* **64**, 165-179.
- Kim, J., Oh, J., Choi, O., Kang, Y., Kim, H., Goo, E., Ma, J., Nagamatsu, T., Moon, J. S. & Hwang, I. (2009).** Biochemical evidence for ToxR and ToxJ binding to the tox operons of *Burkholderia glumae* and mutational analysis of ToxR. *Journal of Bacteriology* **191**, 4870-4878.
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y. & Suh, S. W. (1997).** The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* **5**, 173-185.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003).** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* **48**, 1511-1524.
- Knorr, J., Voget, S., Hofmann, D., Santiago-Schübel, B., Wilhelm, S. & Rosenau, F. (2010).** The plant pathogen *Burkholderia glumae* produces rhamnolipids with anti-bacterial properties. *FEMS Microbiology Letters submitted*.
- Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B. & 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. *Journal of General Microbiology* **139**, 2329-2342.
- Koster, M., Bitter, W. & Tommassen, J. (2000).** Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **290**, 325-331.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M. & Peterson, K. M. (1994).** pBBR1MCS - a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* **16**, 800-&.
- Krakauer, D. C. (2000).** Stability and evolution of overlapping genes. *Evolution* **54**, 731-739.
- Kurita, T. & Tabei, H. (1967).** On the pathogenic bacterium of bacterial grain rot of rice. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **33**, 111.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-&.
- Lang, S. & Wullbrandt, D. (1999).** Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**, 22-32.

- Latifi, A., Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G., Lazdunski, A. & Williams, P. (1995).** Multiple Homologs of Luxr and LuxI Control Expression of Virulence Determinants and Secondary Metabolites through Quorum Sensing in *Pseudomonas-Aeruginosa* Pao1. *Molecular Microbiology* **17**, 333-343.
- Leitermann, F., Walter, V., Syldatk, C. & Hausmann, R. (2009).** Rhamnolipids. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, pp. 3037-3051.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E. P. & Sokol, P. A. (1999).** Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: Identification of the LuxRI homologs CepRI. *Journal of Bacteriology* **181**, 748-756.
- Lewenza, S. & Sokol, P. A. (2001).** Regulation of ornibactin biosynthesis and N-acyl-L-homoserine lactone production by CepR in *Burkholderia cepacia*. *Journal of Bacteriology* **183**, 2212-2218.
- Liang, Y., Medhekar, R., Brockman, H. L., Quinn, D. M. & Hui, D. Y. (2000).** Importance of arginines 63 and 423 in modulating the bile salt-dependent and bile salt-independent hydrolytic activities of rat carboxyl ester lipase. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 24040-24046.
- Lim, J., Lee, T. H., Nahm, B. H., Do Choi, Y., Kim, M. & Hwang, I. (2009).** Complete genome sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. *Journal of Bacteriology* **191**, 3758-3759.
- Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1998).** N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of Bacteriology* **180**, 6384-6388.
- Liou, Y. C., Marangoni, A. G. & Yada, R. Y. (1998).** Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. *Food Research International* **31**, 243-248.
- Loeb, G. I. & Neihof, R. A. (1975).** Marine conditioning films. *Advances in Chemistry Series*, 319-335.
- Lory, S. & Strom, M. S. (1997).** Structure-function relationship of type-IV prepilin peptidase of *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Gene* **192**, 117-121.
- Lory, S. (1998).** Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Current Opinion in Microbiology* **1**, 27-35.
- Lourith, N. & Kanlayavattanukul, M. (2009).** Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *International Journal of Cosmetic Science* **31**, 255-261.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J. C., Ramseier, T. M. & Saier, M. H. (2003).** Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1611**, 223-233.
- Macias-Flores, A., Tafoya-Garnica, A., Ruiz-Ordaz, N., Salmeron-Alcocer, A., Juarez-Ramirez, C., Ahuatz-Chacon, D., Mondragon-Parada, M. E. & Galindez-Mayer, J. (2009).** Atrazine biodegradation by a bacterial community immobilized in two types of packed-bed biofilm reactors. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **25**, 2195-2204.
- Maier, R. M. & Soberón-Chávez, G. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 625-633.

- Manting, E. H., van der Does, C., Remigy, H., Engel, A. & Driessen, A. J. M. (2000).** SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *Embo J* **19**, 852-861.
- Martínez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D. N. (1998).** Identification of an additional member of the secretin superfamily of proteins in *Pseudomonas aeruginosa* that is able to function in type II protein secretion. *Molecular Microbiology* **28**, 1235-1246.
- Martínez, A., Ostrovsky, P. & Nunn, D. N. (1999).** LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. *Molecular Microbiology* **34**, 317-326.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., C., S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, G. & Williams, P. (1997).** Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology-Sgm* **143**, 3703-3711.
- McGrath, S., Wade, D. S. & Pesci, E. C. (2004).** Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiology Letters* **230**, 27-34.
- McKenney, D., Brown, K. E. & Allison, D. G. (1995).** Influence of *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts on virulence factor production in *Burkholderia cepacia* - evidence of interspecies communication. *Journal of Bacteriology* **177**, 6989-6992.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000).** The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **182**, 2702-2708.
- Missiakas, D. & Raina, S. (1997).** Protein folding in the bacterial periplasm. *Journal of Bacteriology* **179**, 2465-2471.
- Nagamatsu, T. & Yamasaki, H. (2001).** General syntheses of 1-alkyltoxoflavin and 8-alkylfervenuin derivatives of biological significance by the regioselective alkylation of reumycin derivatives and the rates of transalkylation from 1-alkyltoxoflavins into nucleophiles. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 130-137.
- Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E. & Dijkstra, B. M. (2000).** Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation - The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 31219-31225.
- Neu, T. R. (1996).** Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews* **60**, 151-+.
- Newman, K. L., Chatterjee, S., Ho, K. A. & Lindow, S. E. (2008).** Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. *Moecular Plant-Microbe Interaction* **21**, 326-334.
- Nguyen, L., Paulsen, I. T., Tchieu, J., Hueck, C. J. & Saier, M. H. (2000).** Phylogenetic analyses of the constituents of type III protein secretion systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**, 125-144.
- Noble, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. & Frenken, L. G. J. (1993).** The crystal structure of the tracylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Letters* **331**, 123-128.

- Noble, M. E. M., Cleasby, A., Johnson, L. N., Egmond, M. R. & Frenken, L. G. J. (1994).** Analysis of the structure of *Pseudomonas glumae* lipase. *Protein Engineering* **7**, 559-562.
- Nunn, D. (1999).** Bacterial Type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends in Cell Biology* **9**, 402-408.
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* **30**, 295-304.
- Ochsner, U. A. (1993).** Genetics and biochemistry of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid. *Swiss Federal Institute of Technology Zurich*. (Dissertation).
- Ochsner, U. A., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994).** Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 19787-19795.
- Ochsner, U. A. & Reiser, J. (1995a).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6424-6428.
- Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002).** Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8312-8317.
- Oomen, C. J., van Ulsen, P., Van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J. & Gros, P. (2004).** Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *Embo J* **23**, 1257-1266.
- Overhage, J., Lewenza, S., Marr, A. K. & Hancock, R. E. W. (2007).** Identification of Genes Involved in Swarming Motility Using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Mini-Tn5-lux Mutant Library. *Journal of Bacteriology* **189**, 2164-2169.
- Paetzel, M., Strynadka, N. C. J., Tschantz, W. R., Casareno, R., Bullinger, P. R. & Dalbey, R. E. (1997).** Use of site-directed chemical modification to study an essential lysine in *Escherichia coli* leader peptidase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 9994-10003.
- Palomo, J. M., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. (2003).** General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* **4**, 1-6.
- Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2005).** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* **13**, 27-33.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. & Greenberg, E. P. (1995).** A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 1490-1494.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1997).** Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology* **179**, 5756-5767.

- Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1999).** Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of Bacteriology* **181**, 1203-1210.
- Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2008).** Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* **72**, 157-165.
- Pernas, M., Lopez, C., Prada, A., Hermoso, J. & Rua, M. L. (2002).** Structural basis for the kinetics of *Candida rugosa* Lip1 and Lip3 isoenzymes. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **26**, 67-74.
- Pernas, M. A., Lopez, C., Rua, M. L. & Hermoso, J. (2001).** Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *FEBS Letters* **501**, 87-91.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. (1997).** Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **179**, 3127-3132.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B. H. (1999).** Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11229-11234.
- Peters, G. H., Olsen, O. H., Svendsen, A. & Wade, R. C. (1996).** Theoretical investigation of the dynamics of the active site lid in *Rhizomucor miehei* lipase. *Biophysical Journal* **71**, 119-129.
- Poltorak, O. M., Chukhray, E. S. & Torshin, I. Y. (1998).** Dissociative thermal inactivation, stability, and activity of oligomeric enzymes. *Biochemistry-Moscow* **63**, 303-311.
- Poremba, K., Gunkel, W., Lang, S. & Wagner, F. (1991).** Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. *Environ Toxicol Water Quality* **6**, 157-163.
- Pugsley, A. P. (1992).** Translocation of a folded protein across the outer membrane in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 12058-12062.
- Pugsley, A. P. (1993).** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **57**, 50-108.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. & Soberón-Chávez, G. (2001).** Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology* **40**, 708-718.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Hoiby, N., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2001).** N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology-Sgm* **147**, 3249-3262.
- Rodrigues, L. R., Banat, I. M., Mei, H. C., Teixeira, J. A. & Oliveira, I. (2006).** Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 470-480.

-
- Rosenau, F. & Jaeger, K.-E. (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**, 1023-1032.
- Rosenau, F., Tommassen, J. & Jaeger, K. E. (2004). Lipase-specific foldases. *ChemBioChem* **5**, 153-161.
- Ryan, R. P., McCarthy, Y., Watt, S. A., Niehaus, K. & Dow, J. M. (2009). Intraspecies signaling involving the diffusible signal factor BDSF (cis-2-Dodecenoic Acid) influences virulence in *Burkholderia cenocepacia*. *Journal of Bacteriology* **191**, 5013-5019.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-Polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandrin, T. R., Chech, A. M. & Maier, R. M. (2000). A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4585-4588.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* **184**, 1140-1154.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. & Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258-268.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols* **3**, 1101-1108.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology* **185**, 2066-2079.
- Shaw, P. D., Ping, G., Daly, S. L., Cha, C., Cronan, J. E., Rinehart, K. L. & Farrand, S. K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6036-6041.
- Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo*-genetic engineering-transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio-Technology* **1**, 784-791.
- Slater, H., Alvarez-Morales, A., Barber, C. E., Daniels, M. J. & Dow, J. M. (2000). A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* **38**, 986-1003.
- Soberon-Chavez, G., Lepine, F. & Deziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**, 718-725.
- Sotirova, A., Spasova, D., Galabova, D., Karpenko, E. & Shulga, A. (2008). Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. *Current Microbiology* **56**, 639-644.
-

- Sotirova, A., Spasova, D., Vasileva-Tonkova, E. & Galabova, D. (2009).** Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research* **164**, 297-303.
- Sponza, D. T. & Gok, O. (2010).** Effect of rhamnolipid on the aerobic removal of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater. *Bioresource Technology* **101**, 914-924.
- Stewart, P. S. & Costerton, J. W. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135-138.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **56**, 187-209.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., 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. S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. & Olson, M. V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Stuer, W., Jaeger, K. E. & Winkler, U. K. (1986).** Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **168**, 1070-1074.
- Suzuki, F., Sawada, H., Azegami, K. & Tsuchiya, K. (2004).** Molecular characterization of the tox operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *Journal of General Plant Pathology* **70**, 97-107.
- Swartzman, E., Kapoor, S., Graham, A. F. & Meighen, E. A. (1990).** A new *Vibrio fischeri* lux gene precedes a bidirectional termination site for the lux operon. *Journal of Bacteriology* **172**, 6797-6802.
- Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U. & Wagner, F. (1985).** Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Zeitschrift Für Naturforschung/Journal of Biosciences* **40**, 61-67.
- Tecon, R. & van der Meer, J. R. (2010).** Effect of two types of biosurfactants on phenanthrene availability to the bacterial bioreporter *Burkholderia sartisoli* strain RP037. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**, 1131-1139.
- Tian, X., Liao, Q., Zhu, X., Wang, Y. Z., Zhang, P., Li, J. & Wang, H. (2010).** Characteristics of a biofilm photobioreactor as applied to photo-hydrogen production. *Bioresource Technology* **101**, 977-983.
- Tomlin, K. L., Coll, O. P. & Ceri, H. (2001).** Interspecies biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Canadian Journal of Microbiology* **47**, 949-954.
- Torres, P. S., Malamud, F., Rigano, L. A., Russo, D. M., Marano, M. R., Castagnaro, A. P., Zorreguieta, A., Bouarab, K., Dow, J. M. & Vojnov, A. A. (2007).** Controlled synthesis of the DSF cell-cell signal is required for biofilm formation and virulence in *Xanthomonas campestris*. *Environmental Microbiology* **9**, 2101-2109.
- Trodler, P., Schmid, R. D. & Pleiss, J. (2009).** Modeling of solvent-dependent conformational transitions in *Burkholderia cepacia* lipase. *Bmc Structural Biology* **9**.

- Tsushima, S., Naito, H. & Koitabashi, M. (1996).** Population dynamics of *Pseudomonas glumae*, the causal agent of bacterial grain rot of rice, on leaf sheaths of rice plants in relation to disease development in the field. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **62**, 108-113.
- Urakami, T., Itoyoshida, C., Araki, H., Kijima, T., Suzuki, K. I. & Komagata, K. (1994).** Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 235-245.
- Van Gennip, M., Christensen, L. D., Alhede, M., Phipps, R., Jensen, P. O., Christophersen, L., Pamp, S. J., Moser, C., Mikkelsen, P. J., Koh, A. Y., Tolker-Nielsen, T., Pier, G. B., Hoiby, N., Givskov, M. & Bjarnsholt, T. (2009).** Inactivation of the *rhIA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **117**, 537-546.
- Van, V. T., Berge, O., Ke, S. N., Balandreau, J. & Heulin, T. (2000).** Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant and Soil* **218**, 273-284.
- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K. & Govan, J. R. W. (1997).** Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1188-1200.
- Vandyke, M. I., Gulley, S. L., Lee, H. & Trevors, J. T. (1993).** Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. *Journal of Industrial Microbiology* **11**, 163-170.
- Vanlaere, E., van der Meer, J. R., Falsen, E., Salles, J. F., de Brandt, E. & Vandamme, P. (2008).** *Burkholderia sartisoli* sp. nov., isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 420-423.
- Vial, L., Lepine, F., Milot, S., Groleau, M. C., Dekimpe, V., Woods, D. E. & Déziel, E. (2008).** *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis*, and *B. ambifaria* produce 4-hydroxy-2-alkylquinoline analogues with a methyl group at the 3 position that is required for quorum-sensing regulation. *Journal of Bacteriology* **190**, 5339-5352.
- Vogel, H. J. & Bonner, D. M. (1956).** Acetylornithase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *The Journal of Biological Chemistry* **218**, 97-106.
- Voget, S. (2009).** *personal communication*.
- Voget, S., Liesegang, H., Poehlein, A., Knorr, J., Hornung, C., Wilhelm, S., Rosenau, F., Streit, W. & Jaeger, K. E. (2010).** The genome sequence of *Burkholderia glumae* PG1. *In preperation*.
- Vojnov, A. A., Slater, H., Daniels, M. J. & Dow, J. M. (2001a).** Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**, 768-774.

- Vojnov, A. A., Slater, H., Newman, M. A., Daniels, M. J. & Dow, J. M. (2001b).** Regulation of the synthesis of cyclic glucan in *Xanthomonas campestris* by a diffusible signal molecule. *Archives of Microbiology* **176**, 415-420.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. & Filloux, A. (2001).** Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* **20**, 6735-6741.
- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. & Iglewski, B. H. (2003).** Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: Effects of growth phase and environment. *Journal of Bacteriology* **185**, 2080-2095.
- Wang, L. H., He, Y. W., Gao, Y. F., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C. Z., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X. & Zhang, L. H. (2004).** A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molecular Microbiology* **51**, 903-912.
- Wang, Z. W. & Chen, S. L. (2009).** Potential of biofilm-based biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**, 1-18.
- Warren, S. M. & Young, G. M. (2005).** An amino-terminal secretion signal is required for Yp1A export by the Ysa, Ysc, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *Journal of Bacteriology* **187**, 6075-6083.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000).** Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* **182**, 2675-2679.
- Weinberg, J. B., Alexander, B. D., Majure, J. M., Williams, L. W., Kim, J. Y., Vandamme, P. & LiPuma, J. J. (2007).** *Burkholderia glumae* infection in an infant with chronic granulomatous disease. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 662-665.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. (2002).** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487-1487.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L. & Salmond, G. P. C. (2001).** Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 365-404.
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F. & Jaeger, K. E. (2007).** The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology* **189**, 6695-6703.
- Winkler, U. K. & Stuckmann, M. (1979).** Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* **138**, 663-670.
- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Camara, M. & Williams, P. (2000).** The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *Journal of Bacteriology* **182**, 6401-6411.
- Winzer, K. & Williams, P. (2001).** Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* **291**, 131-143.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. & Arakawa, M. (1992).** Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of 7 species of the

genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* comb. nov. *Microbiol Immunol* **36**, 1251-1275.

Yabuuchi, E., Kawamura, Y., Ezaki, T., Ikedo, M., Dejsirilert, S., Fujiwara, N., Naka, T. & Kobayashi, K. (2000). *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. *Microbiol Immunol* **44**, 307-317.

Zhang, Y. M. & Miller, R. M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3276-3282.

Zhang, Y. M. & Miller, R. M. (1994). Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2101-2106.