

Charakterisierung der Autotransporter-Protease SprS aus *Pseudomonas aeruginosa*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin Stephanie Serci

aus Moers

Düsseldorf, 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:Herr Prof. Dr. Karl-Erich JägerKorreferent:Herr Prof. Dr. Michael BottTag der mündlichen Prüfung: 12.07.2010

Meinen Eltern

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen recht herzlich bedanken, die durch Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger für die Möglichkeit, diese Dissertation am Institut für Molekulare Enzymtechnologie durchführen zu können, die sehr guten Arbeitsbedingungen und ein stetes und reges Interesse am Fortgang meiner Arbeit,

Herrn Prof. Dr. Michael Bott, Institut für Biotechnologie 1 am Forschungszentrum Jülich, für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt der allerbesten Arbeitsgruppenleiterin Dr. Susanne Wilhelm für die hervorragende, engagierte und freundschaftliche Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge während der letzten Jahre,

Herrn Dr. Frank Rosenau für die anregenden und konstruktiven Diskussionen,

Herrn Rien Hoge für die gute Zusammenarbeit im IMET und die Durchführung der Pathogenitätsmodelle in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Laurence Rahme der Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital in Bosten (Massachusetts, USA),

Herrn Horst Funken sowie Frau Dr. Melanie Brocker und Frau Christina Mack aus dem Institut für Biotechnologie 1 am Forschungszentrum Jülich für die Unterstützung bei der Durchführung der 2D-Gelelektrophorese- und MALDI-TOF-Analysen,

Herrn Alexander Pelzer, der im Rahmen seiner Diplomarbeit einige sehr interessante, hilfreiche Ergebnisse zeigen konnte und die Arbeit im Labor und die vielen Diskussionen mit ihm sehr viel Spaß machten,

allen – auch ehemaligen – Mitarbeitern des IMET's für die kollegiale Zusammenarbeit und das herzliche Arbeitsklima, insbesondere Frau Dr. Sabrina Schell, Frau Dr. Annette Markert und Herrn Dr. Achim Heck für eine sehr angenehme und nicht selten heitere Arbeitsatmosphäre in Labor, Büro und Küche, und die große Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit.

Mein Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Alexander Schulz für die freundschaftliche Unterstützung während der gesamten Zeit und darüber hinaus!

Abschließend geht ein besonders lieber und großer Dank an meine Eltern für ihre grenzenlose Unterstützung und ihr Vertrauen,

an meine Geschwister, Melani und Marcello, die jederzeit für mich da sind und mich immer unterstützen, und an Denis für sein Verständnis und die vielen aufmunternden Worte.

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion:

Würges, K., Petrusevska, K., <u>Serci, S.,</u> Wilhelm, S., Wandrey, C., Seidel-Morgenstern, A., Elsner, M. P. and Lütz, S. (2009).

Enzyme-assisted physicochemical enantioseparation processes: Part I. Production and characterization of a recombinant amino acid racemase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 58:10-16.

Pelzer, A., Serci, S., Wilhelm, S., Rosenau, F. (2010).

Cloning and expression of a novel subtilisin-like serine protease of *Pseudomonas aeruginosa*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Manuskript eingereicht.

Serci, S., Wilhelm, S., Rosenau, F., (2010).

SprS, a novel autotransporter protease of *Pseudomonas aeruginosa* influences the expression of other proteases. Manuskript in Vorbereitung.

Konferenzbeiträge:

S. Serci, F. Rosenau, S. Wilhelm, K.-E. Jaeger (2007).

SprS of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel autotransported protease influences virulence phenotypes. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie* (*VAAM*), Osnabrück.

S. Serci, F. Rosenau, S. Wilhelm, K.-E. Jaeger (2007).

SprS of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel autotransported protease influences virulence phenotypes. *Uni Düsseldorf*

S. Serci, F. Rosenau, S. Wilhelm, K.-E. Jaeger (2008).

A novel subtilisin-like autotransporter: SprS of *Pseudomonas aeruginosa. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Bochum.

S. Serci, F. Rosenau, S. Wilhelm, K.-E. Jaeger (2009).

SprS of *Pseudomonas aeruginosa*: a novel autotransported protease influences the expression of other proteases. *Pseudomonas 2009, XII International Conference August 13th - 17th,* Hannover.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	V
Abbildungen	V
Tabellen	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII

1 Einleitung	
1.1 Pseudomonas aeruginosa	1
1.1.1 Biologie und Phylogenie von Pseudomonas aeruginosa	1
1.1.2 Pseudomonas aeruginosa und Mukoviszidose	2
1.2 Pathogenität von Pseudomonas aeruginosa und seine Virulenzfaktoren	4
1.2.1 Quorum-sensing in Pseudomonas aeruginosa	7
1.2.2 Rhamnolipide	8
1.2.3 Biofilmbildung und Aggregation von Pseudomonas aeruginosa	9
1.3 Sekretionssysteme in Pseudomonas aeruginosa	10
1.3.1 Autotransporter	13
1.4 Proteasen	14
1.4.1 Funktion der Proteasen	16
1.4.2 Subtilisin Proteasen - Subtilasen	17
1.4.3 Proteasen aus Pseudomonas aeruginosa	21
1.5 Zielsetzung der Arbeit	23

2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien und Enzyme	25
2.2 Bakterienstämme	25
2.2.1 Escherichia coli-Stämme	25
2.2.2 Pseudomonas aeruginosa-Stämme	26
2.3 Oligonukleotide	28
2.4 Nährmedien und Zusätze	30
2.4.1 LB-Flüssigmedium (Sambrook, 1989)	30
2.4.2 TB-Medium	30
2.4.3 M9-Minimalmedium (Sambrook, 1989)	30
2.4.4 ABG-Medium (Chilton et al., 1974)	31

2.4.5 Indikatorplatten	31
2.4.5.1 α-Komplementations-Agar (Sambrook et al., 1989)	31
2.4.5.2 Tributyrin-Agar (Kok et al., 1993)	31
2.4.5.3 Skim-Milk-Agar	31
2.4.5.4 Columbia-Blut-Agar (Becton Dickinson)	31
2.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	31
2.5.1 Konservierung von Bakterienstämmen	32
2.5.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) und C43(DE3) in Überexpressionskulturen	32
2.6 DNA-Techniken	32
2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren	32
2.6.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	33
2.6.3 In vitro-Rekombination von DNA	33
2.6.4 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	33
2.6.5 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation	33
2.6.6 Konstruktion eines sprS-defizienten Stammes von Pseudomonas aeruginosa	33
2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.6.7.1 Standard-PCR	34
2.6.7.2 Kolonie-PCR	35
2.6.8 Aufreinigung von PCR-Produkten	35
2.6.9 Sequenzierung von DNA	35
2.7 RNA-Techniken	35
2.7.1 Standard-Präparation von bakterieller Gesamt-RNA	35
2.7.2 Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration	35
2.7.3 Reverse Transkription von RNA mit anschließender real time-PCR	36
2.8 Zellaufschluss zur Proteinisolierung	36
2.9 Gewinnung von Kulturüberständen	36
2.10 Präzipitation von Proteinen durch Trichloressigsäure-Fällung (Peterson, 1977)	36
2.11 Herstellung von Sphäroblasten (Witholt et al., 1976)	37
2.12 Herstellung der Periplasma-, Cytoplasma- und Membranfraktion	
(Pedrotta & Witholt, 1999)	37
2.13 Membranfraktionierung	37
2.14 Löslichkeitsanalysen von Proteinen	37
2.15 Reinigung von inclusion bodies der Protease	38
2.16 In vitro-Faltung von SprS aus inclusion bodies	38
2.17 Affinitäts-Chromatographie (IMAC) (Porath et al., 1975)	38

2.18 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	38
2.19 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
(Laemmli, 1970)	39
2.19.1 Isoelektrische Fokussierung	39
2.19.2 Zweite Dimension	39
2.20 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (nach Wilson & Juan, 1989)	39
2.21 Immunodetektion von Proteinen	40
2.22 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	40
2.22.1 Tryptischer in-Gel-Verdau von Proteinen	40
2.22.2 Bestimmung der Peptidmassen	40
2.23 Enzymaktivitätstests	41
2.23.1 Proteaseaktivität: Skim-Milk-Indikatorplatten	41
2.23.2 Gel-basierte Detektion der Proteaseaktivität	41
2.23.3 Colorimetrischer Nachweis von Proteaseaktivität	41
2.23.4 Nachweis der β-Galaktosidase Aktivität (ONPG-Test) (Miller, 1972)	41
2.24 Qualitative und Quantitative Messung der Biofilmproduktion	42
2.25 Bestimmung der Lipase-Aktivität	43
2.26 Drop-collapse-Test	43
2.27 Hämolysetest	43
2.28 Hämagglutinationstest (HAT)	43
2.29 Virulenzmodell Arabidopsis thaliana (Starkey & Rahme, 2009)	43
2.30 Virulenzmodell Drosophila melanogaster	44
2.30.1 Needle pricking (Apidianakis & Rahme, 2009)	44
2.30.2 Feeding (Lutter et al., 2008)	44
2.31 Computerprogramme und Online-Datenbanken	45
3 Ergebnisse	46
3.1 Identifizierung eines offenen Leserahmens pa3535	46
3.1.1 Sequenzanalysen und Homologievergleiche von SprS	48
3.2 Klonierung und Expression von <i>sprS</i>	51
3.3 Untersuchung der Transkription von <i>sprS</i> im Wildtyp <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	57
3.4 Physiologische und funktionelle Charakterisierung von SprS mittels eines <i>sprS</i> -negativen Stammes	61
3.4.1 Wachstumsuntersuchungen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$	61
3.4.2 Phänotypische Charakterisierung des sprS-defizienten Stammes	63

3.5 Profilanalyse der äußeren Membranproteine mittels SDS-PAGE	69
3.6 Identifizierung SprS-abhängiger Proteine	73
3.7 Transkriptomanalysen	79
3.8 Transkriptionelle <i>lacZ</i> -Fusionen	82
3.9 Einfluss von SprS auf die Pathogenität von Pseudomonas aeruginosa	86
3.9.1 Pathogenität von $\Delta sprS$ im Pflanzenmodell Arabidopsis thaliana	86
3.9.2 Pathogenität von $\Delta sprS$ in <i>Drosophila melanogaster</i>	88
4 Diskussion	91
4.1 Homologievergleiche und strukturelle Analyse der Serinprotease SprS	91
4.2 Heterologe Synthese und Versuche zur Aufreinigung des SprS-Proteins	95
4.3 Abhängigkeit der sprS-Expression von der Wuchsphase und der Temperatur	98
4.4 Phänotypische Veränderungen des sprS-negativen Stammes	99
4.5 Studien zum Einfluss von SprS auf die Proteinzusammensetzung der äußeren Membran und des Sekretoms	103
4.6 Transkriptionsanalysen	106
4.7 Koregulation der beiden Subtilisin-ähnlichen Proteasen SprS und SprP	107
4.8 Einfluss von SprS auf die Virulenz von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	108

5 Zusammenfassung	112
6 Summary	114
7 Literaturverzeichnis	116
8 Anhang	139
9 Lebenslauf	142

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1.1	Schematische Abbildung über den Mechanismus einer CF-Dysfunktion.	S.	3
Abbildung 1.2	Schematische Abbildung einer Auswahl an bekannten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Virulenzfaktoren.	S.	6
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung der Sekretionssysteme Typ I-VI.	S.	12
Abbildung 1.4	Schematische Abbildung über den Mechanismus von Proteasen.	S.	15
Abbildung 1.5	Dendogramm der Superfamilie der Subtilasen.	S.	19
Abbildung 1.6	Phylogenetischer Stammbaum der Autotransporterproteine.	S.	20
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung des Aufbaus von SprS.	S.	47
Abbildung 3.2	Generiertes 3D-Strukturhomologiemodell der Transportdomäne von SprS aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Kristallstruktur der Transportdomäne des NalP-Autotransporters aus <i>Neisseria meningitidis</i> und Kristallstruktur des Volllängenproteins von EstA aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	S.	49
Abbildung 3.3	Konservierter Bereich der katalytischen Triade in SprS und homologen Proteinen.	S.	50
Abbildung 3.4	SDS-PAGE-Analyse (12 %) der Überexpression von <i>sprS</i> im heterologen Wirt <i>E. coli</i> BL21(DE3).	S.	51
Abbildung 3.5	SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von SprS als $SprS_{His6}$ im heterologen Wirt <i>E. coli</i> BL21(DE3) durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC).	S.	53
Abbildung 3.6	Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen des Autotransporter-Proteins SprS.	S .	54
Abbildung 3.7	Immunoblot Analyse des N-Terminus von SprS, 1, 2 und 3 h nach Induktion.	S.	55
Abbildung 3.8	Promotoraktivität von sprS in Pseudomonas aeruginosa PAO1.	S.	58
Abbildung 3.9	<i>real time</i> -PCR-Quantifizierung zur Bestimmung des <i>sprS</i> -Transkriptes bei verschiedenen Temperaturen.	S.	60
Abbildung 3.10	Wachstumskurve von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$ in LB-Medium bei 37 °C.	S.	62
Abbildung 3.11	Kulturen der beiden Stämme <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$ und deren mikroskopische Betrachtung.	S.	63

Abbildung 3.12	Nachweis der Biofilmbildung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$ in Mikrotiterplatten.	S.	65
Abbildung 3.13	Drop-collapse-Test zur Untersuchung der Oberflächenspannung von Kulturüberständen aus Pseudomonas aeruginosa.	S.	66
Abbildung 3.14	Nachweis der Fähigkeit zur Hämolyse von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$.	S.	67
Abbildung 3.15	SDS-PAGE-Analyse (12 %) der äußeren Membran von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$ und tabellarische Auflistung der Proteine, die während der Kultivierung des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Wildtyps PAO1 und der <i>sprS</i> -Mutante differentiell produziert werden.	S.	70
Abbildung 3.16	SDS-PAGE Analyse (12 %) der Kulturüberstände von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$.	S.	72
Abbildung 3.17	2D-SDS-PAGE des Sekretoms extrahierter Proteine von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$ nach Bebrütung bei 37 °C für 16 h.	S.	74
Abbildung 3.18	2D-SDS-PAGE der extrazellulären Fraktion extrahierter Proteine von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und $\Delta sprS$ in einem pH-Bereich von 3-11 und Nachweis der Elastase- und Protease IV-Aktivität im Kulturüberstand der beiden Stämme.	S.	78
Abbildung 3.19	Relative Expression diverser für Proteasen kodierender Gene von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\Delta sprS$ im Vergleich zum Wildtyp <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	S.	80
Abbildung 3.20	Expression der beiden Gene sprS und sprP in Pseudomonas aeruginosa PAO1.	S.	83
Abbildung 3.21	β-Galaktosidase Aktivität als Maß der Promotoraktivitäten im Wildtyp <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 und dem <i>sprS</i> -negativen Stamm $\Delta sprS$.	S.	84
Abbildung 3.22	β-Galaktosidase-Aktivität als Maß der Promotoraktivitäten in dem <i>sprS</i> -negativen Stamm $\Delta sprS$.	S.	85
Abbildung 3.23	Überblick über die Infizierung des Pflanzenmodells Arabidopsis thaliana mit Pseudomonas aeruginosa-Kulturen.	S.	87
Abbildung 3.24	Vergleich der Pathogenität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Wildtyp und der <i>sprS</i> -Mutante ($\Delta sprS$) in <i>Arabidopsis thaliana</i> .	S.	87
Abbildung 3.25	Überblick über die Infizierung von Drosophila melanogaster mit Pseudomonas aeruginosa-Kulturen.	S.	88
Abbildung 3.26	Vergleich der Pathogenität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Wildtyp und der <i>sprS</i> -Mutante ($\Delta sprS$) in einem <i>Drosophila melanogaster</i> Modell.	S.	89
Abbildung 3.27	Vergleich der Pathogenität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Wildtyp und der <i>sprS</i> -Mutante ($\Delta sprS$) in <i>Drosophila melanogaster</i> .	S.	90
Abbildung 3.28	Vergleich der Pathogenität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Wildtyp und der <i>sprS</i> -Mutante ($\Delta sprS$) in einem <i>Drosophila melanogaster feeding</i> -Modell.	S.	90

Abbildung 4.1	Bildliche Darstellung einer Pseudomonas Infektion der Lungenepithelzellen.	S. 102
Abbildung 8.1	Schematische Darstellung der Konstruktion des Mutagenesevektors pSUP <i>sprS</i> Gm und der Erzeugung des <i>sprS</i> -defizienten Stammes <i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\Delta sprS$.	S. 140
Abbildung 8.2	Agarosegel (1 %) der PCR-Produkte zur Identifizierung des <i>sprS</i> -defizienten Stammes.	S. 140
Abbildung 8.3	Analyse der Lyse des Wildtyp-Stammes PAO1 und des <i>Pseudomonas aeruginosa sprS</i> -negativen Stammes $\Delta sprS$.	S. 141

Tabellen

Tabelle 2.1	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.	S.	25
Tabelle 2.2	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.	S.	26
Tabelle 2.3	Übersicht der verwendeten Vektoren.	S.	26
Tabelle 2.4	Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.	S.	27
Tabelle 2.5	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.	S.	28
Tabelle 2.6	Endkonzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika.	S.	32
Tabelle 3.1	Phänotypen, die im <i>Pseudomonas aeruginosa sprS</i> -negativen Stamm im Vergleich zum Wildtyp PAO1 untersucht wurden.	S.	68
Tabelle 3.2	Ausgewählte Ergebnisse der Proteine, die während der Kultivierung des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Wildtyps PAO1 und der <i>sprS</i> -Mutante differentiell produziert werden.	S.	76
Tabelle 3.3	Ausgewählte Protease-Gene, die mittels real time-PCR analysiert wurden.	S.	81
Tabelle 4.1	Übersicht über Subtilisin-ähnliche Autotransporter verschiedener human- und pflanzen-pathogener Bakterien.	S.	93

Abkürzungsverzeichnis

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

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
A. dest.	Aqua destillata
Ар	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
С	Celsius
ca.	circa
Cb	Carbenicillin
Cm	Chloramphenicol
CF	Cystische Fibrose
CFUs	colony formin units, Kolonie-bildende Einheiten
СР	Cytoplasma
Cs	Cycloserin
Ct	<i>Cycle threshold</i> , Schwellenwert-Zyklus
C-Terminus	Carboxyterminus
3-D	dreidimensional
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreithol
EDTA	Ethylendinitrilotetraacetat
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
g	Gramm
Gm	Gentamycin
GZE	Gesamtzellextrakt
h	Stunde(n)
НАТ	Hämagglutinationstest
HCCA	α-Cyano-4-hydroxytrans-Zimtsäure
IM	innere Membran
IMAC	immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
1	Liter
λ	Wellenlänge

lac	Lactose
LB	Luria-Bertani broth
Μ	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i> ; Polylinker
min	Minute(n)
μ	Micro
n	nano
ng	Nanogramm
ŇŤA	Nitrilo-3-Essigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
OM	äußere Membran
PBP	periplasmatisches Bindeprotein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polvethylenglycol
PP	Periplasma
PVDF	Polyvinyldifluorid
Rbs	Ribosomenbindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecvlsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polvacrylamid-Gelelektrophorese
SS	Signalsequenz
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetracyclin
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMF	Transformationspuffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	unit (Enzymeinheit)
ÜK	Übernachtkultur
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
W/V	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Pseudomonas aeruginosa

1.1.1 Biologie und Phylogenie von Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas ist eine Gattung stäbchenförmiger, mit polaren Geißeln sich aktiv bewegender, Gram-negativer Bakterien. Phylogenetisch werden sie der Familie der Pseudomonaceae zugeordnet, einer heterologen Gruppe innerhalb der Proteobacteria (Olson, 1994). Die chemoorganotrophen Pseudomonaden lassen sich durch ihre Oxidase-Aktivität von den 2000). Enterobakterien unterscheiden (Madigan, Aufgrund der Fähigkeit dieser anspruchslosen Bakterien, eine Vielzahl organischer Substrate zu metabolisieren, darunter auch heterozyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe (Palleroni, 1986), sind Pseudomonaden ubiquitär in Böden und Gewässern verbreitet. Innerhalb der Bacteria wird die Spezies Pseudomonas aeruginosa, im Phylum der Proteobacteria, den y-Proteobacteria zugeordnet (Anzai et al., 2000). Bei P. aeruginosa handelt es sich um ein 0,5 - 0,8 µm breites und 1,5 - 3,0 µm langes, stäbchenförmiges, Gram-negatives, polar begeißeltes Bakterium. Es ist ein ubiquitär vorkommender Erreger, der sich v. a. im feuchten Milieu vermehrt. Besonders augenfällig sind die von P. aeruginosa-Stämmen in unterschiedlichem Ausmaß und variabler Kombination produzierten Pigmente Pyocyanin (bläulich, nicht fluoreszierend), Pyoverdin (gelblich fluoreszierend), Pyomelanin (bräunlich bis schwärzlich) und Pyorubin (rot), welche als Siderophore fungieren und namensgebend für P. aeruginosa sind ("aerugo", lat. = Grünspan) (Frank & Demoss, 1959; Palleroni, 1993; Wasielewski et al., 2008). Das Genom von P. aeruginosa, welches im Jahr 2000 komplett sequenziert wurde, ist mit 6,3 Megabasen und 5570 Genen vergleichsweise groß (Stover et al., 2000). Bereits geringste Mengen organischer Verbindungen ermöglichen dem anspruchslosen Bakterium das Überleben. Dies hat zur Folge, dass die ubiquitär verbreitete Spezies, deren natürliches Habitat Wasser, Boden und Pflanzen umfasst, auch im Krankenhaus nahezu allgegenwärtig ist und u. a. durch die Präsenz in Wasserhähnen, Siphons, Toiletten und unterdosierten Desinfektionsmitteln sehr schnell zu ernsthaften Hygieneproblemen führen kann. P. aeruginosa ist aufgrund seines außergewöhnlich pathogenen Potenzials von großem wissenschaftlichem und medizinischem Interesse. Eine besondere Rolle wird P. aeruginosa als Erreger akuter nosokomialer, d. h. im Krankenhaus erworbener Infektionen, zuteil. Das äußerst vielseitige Bakterium kann Infektionen bei Menschen, Tieren und Pflanzen

hervorrufen (Palleroni, 1984; Gross, 1985). Als humanpathogenes Bakterium ist dieser ausgesprochene Opportunist für einen erheblichen Teil nosokomialer Infektionen verantwortlich

(Wagner et al., 2004; Mayank et al., 2009).

Bei ca. 10 - 20 % aller im Krankenhaus erworbenen Infektionen handelt es sich um Infektionen mit *P. aeruginosa* (Ikeno *et al.*, 2007). Als fakultativ pathogenes Bakterium treten Infektionen mit *P. aeruginosa* insbesondere bei immunsupprimierten und immundefizienten Patienten auf, die an Krankheiten wie AIDS oder Cystischer Fibrose (CF), einer autosomal rezessiven Erbkrankheit, die auch als Mukoviszidose bezeichnet wird, leiden (Bodey *et al.*, 1983; Bendiak & Ratjen, 2009).

1.1.2 Pseudomonas aeruginosa und Mukoviszidose

Die Mukoviszidose ist mit einer Inzidenz von 1:1900 bis 1:3700 die häufigste autosomalrezessiv vererbte und trotz intensiver Forschungen heutzutage immer noch früh letal verlaufende Stoffwechselerkrankung (Gibson et al., 2003). Dem Erkrankungsbild liegt eine oder mehrere Mutationen im Gen des sog. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) einem membranständigen Chloridionenkanal zugrunde. Der CFTR reguliert die intrazelluläre Chloridionenkonzentration und hat damit einen entscheidenden Einfluss auf den gesamten transepithelialen Elektrolyt- und Flüssigkeitsaustausch. Das auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q31.2) gelegene CFTR-Gen setzt sich aus einer Kette von 1480 Aminosäuren zusammen und besteht aus fünf Domänen: zwei membranüberspannenden Segmenten, zwei zytosolischen Segmenten (NBF1, NBF2) und einer regulatorischen R Domäne (Tsui et al., 1985; Riordan et al., 1989). CFTR ist ein signalgesteuerter Chloridkanal, dessen Funktionsstörung eine verminderte Wasser- und Natriumsekretion in das Drüsenlumen bewirkt (Tsui, 1991). Die Folge ist eine Zunahme der Viskosität exokriner Sekrete, welche die Funktion der Organsysteme, vor allem an der Epitheloberfläche des Respirations- und Gastrointestinaltraktes, beeinträchtigt. Zudem führt diese Funktionsstörung zu einer veränderten Elektrolytkonzentration im Schweiß. Die Krankheit äußert sich in Funktionsstörungen aller exokrinen Drüsen, wobei in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt große Mengen viskoser Sekrete produziert werden. In der Lunge führt dies zu einer progressiven Erkrankung mit partieller bis vollständiger Verstopfung.

Lebenslimitierend ist bei CF häufig die fortschreitende Einschränkung der Lungenfunktion infolge einer chronisch bakteriellen Pneumonie mit einem CF spezifischen Erregerspektrum.



Abbildung 1.1 Schematische Abbildung über den Mechanismus einer CF Dysfunktion. Pathogenitätskaskade beginnend mit dem *CFTR*-Gendefekt bis hin zur durch die Cystische Fibrose ausgelösten Lungeninsuffizienz (Amaral & Kunzelmann, 2007).

Zu diesen typischen bakteriellen Erregern gehören Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Achromobacter xylosoxidans, Stenotrophomonas maltophilia und die verschiedenen Spezies des Burkholderia cepacia-Komplexes (BCC). Noch vor wenigen Dekaden starben CF-Patienten im frühen Kindesalter auf Grund einer unzureichenden Absorption von Nährstoffen. Heute erreichen sie das junge Erwachsenenalter, während dessen in fast allen Fällen die Lunge chronisch durch P. aeruginosa infiziert wird, weshalb dieses Bakterium bei weitem für die meisten Todesfälle bei CF-Patienten verantwortlich gemacht wird (Bendiak & Ratjen, 2009). Damit ist er der weitaus wichtigste Erreger bei der Entstehung von Lungeninfektionen bei CF-Patienten. Betroffen sind insbesondere immunsupprimierte Patienten in der Intensivmedizin. Die Prävalenz von nosokomial infizierten Patienten auf Intensivstationen liegt bei etwa 15 bis 25 % (Vincent et al., 1995), wobei eine Mortalität von 16,3 % erreicht wird (Sanchez-Velazquez *et al.*, 2006). Bei *in vitro* Versuchen ließ sich eine erhöhte Adhäsion von *P. aeruginosa* sowohl an den Rezeptoren im Bronchialschleim (Dealler & Holton, 1992) als auch an "nackten Epithelzellen" des respiratorischen Epithels von CF-Patienten nachweisen (Cervin *et al.*, 1994; Imundo *et al.*, 1995; Zar *et al.*, 1995). Unbestritten ist, dass *P. aeruginosa* das infizierte Lungengewebe durch ein Arsenal an Virulenzfaktoren schädigt.

1.2 Pathogenität von Pseudomonas aeruginosa und seine Virulenzfaktoren

Pathogene Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass sie in geeigneten Wirten in der Lage sind, Krankheiten hervorzurufen. Für eine erfolgreiche Infektion des Wirtes benötigt P. aeruginosa eine Vielzahl von Virulenzfaktoren. Zu den Virulenzfaktoren zählen z. B. hydrolytische Proteine, Toxine und Oberflächen-Proteine, die das Anheften der Bakterien an Oberflächen erlauben oder sie vor der Immunabwehr des Wirtes schützen. Eine wesentliche pathogenetische Funktion von P. aeruginosa ist die Fähigkeit der irreversiblen Adhäsion. Die Anheftung an Oberflächen stellt eine sehr wichtige Eigenschaft von P. aeruginosa dar, die zur erhöhten Virulenz beiträgt. 30 Genprodukte sind an der Ausbildung und an der Funktion von Flagellen beteiligt, die dazu notwendig sind, einen Zielort durch Schwimmbewegung zu erreichen (Feldman et al., 1998; Adamo et al., 2004). Auch die Typ IV Pili sind für die Anheftung und für das Bewegen auf Oberflächen (z. B. auf Wirtszellepithelien) verantwortlich. Die bakterielle Adhäsion an den Oberflächenrezeptoren des respiratorischen Epithels stellt den ersten Schritt der Infektion dar, wobei generell Pili (Marcus et al., 1989), Flagellen (Feldman et al., 1998) sowie das Exoenzym S (Baker et al., 1991) als Adhäsine gelten. Mikroorganismen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl unterschiedlicher Adhärenzfaktoren, die über spezifische Wechselwirkungen mit Rezeptoren der Wirtszelle interagieren. Bakterien binden hauptsächlich an die membranständigen Glykokonjugate von Epithelzellen. Diese Anheftung an epitheliale Gewebe verhindert zum einen das Ausschwemmen der Bakterien durch körpereigene Flüssigkeiten wie Blut, Urin oder Sekrete, zum anderen ermöglicht sie die zielgerichtete Sekretion von Toxinen und die Invasion der Erreger in die Zelle bzw. in tieferliegende Gewebsschichten. Gleichzeitig wird auf der Seite des Wirtes eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die mit den typischen Symptomen einer Infektion einhergeht. Somit stellt die Expression von Adhäsinen den wohl bedeutendsten Virulenzfaktor bei der frühen Pathogenese bakterieller Infektionskrankheiten dar (Virkola *et al.*, 1988; Mulvey, 2002). Vereinfacht gesagt ermöglichen Virulenzfaktoren ein Eindringen in das Wirtsgewebe sowie ein Entkommen der Immunabwehr und damit das Zustandekommen einer Infektion mit den resultierenden Schäden an den Wirtszellen. Zu diesen Virulenzfaktoren zählen u. a. die Lipopolysaccharide (LPS) (Pier, 2007), auch Endotoxine genannt, die aus Molekülen bestehen, welche fest an die äußere Oberfläche Gram-negativer Bakterien gebunden sind und einen integralen Bestandteil der äußeren Membran bilden, sowie die Produktion von Alginat (Rehm & Valla, 1997). Dieses acetylierte Polymer aus Manuron- und Guluronsäure umgibt die Zelle als ein viskoses Gel, verleiht den Kolonien eine mukoide Morphologie (Ohman & Chakrabarty, 1981; Leid *et al.*, 2005) und schützt die Bakterien vor Phagozytose (Pier *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* bildet zwei LPS-Formen aus, wobei die A-Form ein Homopolymer aus verknüpften D-Rhamnose Molekülen ist, während die B-Form des LPS ein Heteropolymer ist. LPS-Moleküle scheinen an CFTR-Proteine zu binden (Lyczak *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass schon kurz nach der Adhäsion von *P. aeruginosa* Gene aktiviert werden, welche die Produktion von Alginat verstärken (Davies *et al.*, 1998).

Weiterhin sekretiert das Bakterium das Exotoxin A (Iglewski & Kabat, 1975; Morlon-Guyot et al., 2009), das Exotoxin S (Iglewski et al., 1978; Kulich et al., 1993; Bitter, 2003), eine Esterase (Wilhelm et al., 1999; Wilhelm et al., 2007), Phospholipasen (Berka & Vasil, 1982; Stonehouse et al., 2002), Lipasen (Jaeger et al., 1991; Martinez et al., 1999) und Rhamnolipide al., 2004). Die wie (Wagner et Proteasen. die Serin-Protease LasA und die Zink-Metalloprotease Elastase LasB (Doring et al., 1983; Kessler & Safrin, 1988), bauen Elastin ab, welches nahezu 30 % des Proteingehalts der Lunge stellt (Galloway, 1991). Die Fähigkeit der Elastase, Strukturproteine der Lunge wie Elastin und Kollagen abzubauen, ist ein entscheidender Faktor während der akuten Infektion. Bei der Protease IV aus P. aeruginosa handelt es sich um eine Serinprotease, die Lysin-haltige Peptide von der Carboxylseite her spaltet (Engel et al., 1998a). Diese Protease ist in der Lage, eine Vielzahl an Komponenten des humanen Immunsystems und Gewebebestandteile zu zerstören. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Protease IV eine entscheidende Rolle in der Virulenz von P. aeruginosa während Bindehautinfektionen spielt (Engel et al., 1998b). P. aeruginosa produziert als weiteren Virulenzfaktor die Phospholipase C (PLC) (plcH), die auf der Oberfläche der Alveolar-Zellen Phospholipide degradiert (Songer, 1997; Terada et al., 1999). Die Zugänglichkeit der Phospholipide wird durch ein weiteres Exoprodukt von P. aeruginosa, den Rhamnolipiden, erhöht.

Im Allgemeinen werden zwei Phasen der Infektion von *P. aeruginosa* unterschieden. Anfangs wird *P. aeruginosa* bei CF-Patienten nur vereinzelt nachgewiesen, was im Normalfall keine Verschlechterung der Lungenfunktion verursacht. Diese Phase kann unterschiedlich lang andauern (0 - 5,5 Jahre) (Johansen & Hoiby, 1992).

Als chronisch wird die Besiedlung dann bezeichnet, wenn über den Zeitraum von mindesten 6 Monaten *P. aeruginosa* kontinuierlich in respiratorischen Untersuchungsmaterialien nachgewiesen wird (Johansen & Hoiby, 1992).



Abbildung 1.2 Schematische Abbildung einer Auswahl an bekannten *P. aeruginosa* Virulenzfaktoren. Das Bakterium verfügt über ein Arsenal an Virulenzfaktoren, die sowohl zellassoziiert (Flagellum, Typ IV Pili, Biofilm/Alginat, LPS und andere Pili-unabhängige Adhäsine), als auch extrazellulär (Proteasen, hämolytische Phospholipase C und Rhamnolipide, Exotoxin A, Exoenzym S und Pyocyanin) vorliegen (Van Delden & Iglewski, 1998).

Unter den wechselhaften Bedingungen, wie sie in der CF-Lunge herrschen, haben solche Stämme einen Selektionsvorteil, die sich durch häufige Mutationen schnell anpassen können (Hogardt *et al.*, 2007). Die Therapie von *P. aeruginosa*-Infektionen ist problematisch, da das Bakterium über eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber Antibiotika (Quinn, 1998; Strateva & Yordanov, 2009) und eine hohe Toleranz gegenüber Desinfektionsmitteln (Stover *et al.*, 2000) verfügt. Während die akute Phase der Infektion mit planktonischem Wachstum und einer verstärkten Virulenz der Bakterien in Verbindung gebracht wird, wird

die chronische Infektion vor allem mit der Biofilmbildung und einer verringerten Virulenz verbunden (Mikkelsen *et al.*, 2009).

1.2.1 Quorum-sensing in Pseudomonas aeruginosa

Die Expression von Rhamnolipiden sowie die Ausbildung von Biofilmen und anderer Virulenzfaktoren unterliegen in P. aeruginosa der Kontrolle eines zelldichteabhängigen, interzellulärem Kommunikationssystems (Fugua et al., 1994). Ein bedeutender Bestandteil eines transkriptionalen Regulationsnetzwerkes in P. aeruginosa ist das Ouorum-sensing-System (QS). Als QS wird die Fähigkeit von Bakterien bezeichnet, untereinander durch Signalmoleküle zu kommunizieren. Es erlaubt Bakterien die Populationsdichte zu messen und entsprechend zu reagieren. Bei opportunistischen Krankheitserregern wie P. aeruginosa, gewährleistet das QS-System, dass die Expression von Virulenzfaktor-kodierenden Genen erst stattfindet, wenn die Populationsgröße eine erfolgreiche Infektion ermöglicht. Diese Art der Kommunikation geschieht mit Hilfe von Autoinducern, die von den Bakterien produziert und an die Umgebung abgegeben werden. Ist die Zelldichte hoch, so werden ab einer gewissen Schwellen-Konzentration vermehrt Autoinducer synthetisiert (Auto-Induktion). Ist die Dichte gering, so werden demensprechend weniger Autoinducer produziert und die Menge an Autoinducern reicht nicht aus, um eine koordinierte Reaktion auszulösen. P. aeruginosa nutzt als Autoinducer u. a. N-Acyl-L-Homoserinlactone (AHL) (Williams & Camara, 2009), die sich im Wesentlichen durch die Länge der N-Acyl-Seitengruppe sowie durch Modifikationen an Position C-3 (3-Oxo oder 3-Hydroxygruppe) unterscheiden. P. aeruginosa verfügt über das LasRI-System sowie das dem ersten untergeordneten RhlRI-System (Pesci et al., 1999), die beide aus einem Regulatorprotein (R-Protein) und einer AHL-Synthase (I-Protein) bestehen. Die Regulatorproteine fungieren durch die Bindung eines spezifischen Autoinducers als Transkriptionsaktivatoren, während die AHL-Synthase die entsprechenden Autoinducer synthetisiert. Die Signalmoleküle, die von den P. aeruginosa QS-Systemen zur Kontrolle eingesetzt werden, sind das N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-Homoserinlacton (3-oxo-C12-HSL) für das LasRI-System und das N-Butanoyl-L-Homoserinlacton (C4-HSL) für das RhlRI-System (Pearson et al., 1994; Pearson et al., 1995). Neben den beschriebenen und sehr gut charakterisierten Autoinducer-Molekülen der beiden QS-Systeme LasRI und RhlRI wurde 1999 von Pesci et al. ein drittes Signal-Molekül identifiziert, welches mit den QS-Systemen interagiert (Pesci et al., 1999). Dieses Molekül unterscheidet sich strukturell von den AHL. Es handelt sich um ein 2-Heptyl-3-hydroxy-4-

Gruppe der 4-Hydroxy-2-alkylquinolinen (HAOs) quinolon. das zu der gehört (Deziel et al., 2004). Es ist wahrscheinlich nicht an der Zelldichte-Wahrnehmung des Bakteriums beteiligt, sondern vielmehr für die Modulation des Rhl-QS-Systems in der stationären Phase, in der es auch gebildet wird, zuständig (McKnight et al., 2000). Die Biosynthese von HAQs, wie PQS und der biologisch inaktiven Vorstufe 2-Heptyl-4hydroxyquinolin (HHO) wird durch das LasIR-OS-System reguliert. Weiterhin konnte mit Promotor-lacZ-Fusionsstudien gezeigt werden, dass PQS positiv auf die Transkription von *rhlI* und in geringerem Maße auf *lasR* und *rhlR* wirkt. Offensichtlich sind die Enzyme des Operons PA0996 – PA1000 (pgsA-E) für die Biosynthese des PQS Moleküls verantwortlich. Auch die Produkte der Genloci PA1001 – PA1003 (phnAB und pgsR(mvfR)), sowie PA2587 (pqsH) sind an der Synthese und der Aktivität beteiligt (Gallagher et al., 2002; Diggle et al., 2003). Scheinbar werden 4-Hydroxy-2-Heptylquinolin-Moleküle (HHOs) in Abhängigkeit von PqsA-D synthetisiert, aber nur PQS induziert das Rhl-QS-System. Dabei scheint PqsH für die Konversion HHOs POS verantwortlich zu von zu sein (Deziel et al., 2004). PQS verstärkt die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren und ist essentiell für die Pyocyanin-Synthese (Pesci et al., 1999; Diggle et al., 2003).

1.2.2 Rhamnolipide

Rhamnolipide sind mikrobielle Biotenside, bestehend aus hydrophilen L-Rhamnose- und hydrophoben β -Hydroxydecansäureuntereinheiten, die von *P. aeruginosa* vor allem auf hydrophoben C-Quellen unter wachstumslimitierenden Bedingungen gebildet werden. Sie sind vollständig biologisch abbaubar und kommen in Haushaltsreinigungsprodukten, Kosmetikprodukten sowie in Pharmaapplikationen zum Einsatz. Die hauptsächliche physiologische Rolle dieses Biodetergenz für den Produktionsorganismus *P. aeruginosa* liegt wahrscheinlich in der Erschließung wasserunlöslicher Verbindungen als Nährstoffe.

Bis heute wurde eine Vielzahl Rhamnolipide gefunden, die sich v. a. in der Art ihrer Fettsäureuntereinheiten ($R_2C_{10}C_{10}$; $R_1C_{10}C_{10}$; $R_2C_{10}C_{12}$; $R_1C_{10}C_{12}$; $R_1C_{12:1}C_{10}$; $R_1C_{12:2}$; $R_1C_{8:2}$; $R_1C_{10}C_{12}$) unterscheiden (Chayabutra & Ju, 2001). Die ersten Eigenschaften, die dem Rhamnolipid zugeschrieben wurden, sind die Hitzestabilität und die hämolytische Wirkung (Sierra, 1960; Johnson & Boese-Marrazzo, 1980). Die physiologische Funktion der Rhamnolipide in der Infektion ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die Rhamnolipide in die Phospholipide der Lungenoberfläche interkalieren, diese auflösen und sie für andere Virulenzfaktoren angreifbarer machen. Es sind weitere Ursachen für die Synthetisierung der Rhamnolipide denkbar. Zum einen ist die Funktion der Rhamnolipide in der Verbesserung der biologischen Verfügbarkeit von hydrophoben Substraten gezeigt (Hommel, 1990; Haba *et al.*, 2003), zum anderen scheinen sie eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Biofilmen sowie bei der Anheftung bzw. Ablösung an Oberflächen in *P. aeruginosa* zu spielen (Davey *et al.*, 2003).

1.2.3 Biofilmbildung und Aggregation von Pseudomonas aeruginosa

Biofilme sind eine der ältesten und erfolgreichsten (Über-)Lebensgemeinschaften auf der Erde und können in Gewässern, an Pflanzen, im Boden, im Grundwasser, auf oder in Lebewesen, in technischen Systemen usw. vorkommen (Davey & O'Toole G, 2000; Hall-Stoodley et al., 2004). Sie entstehen an Grenzflächen und können in zahlreichen Formen vorkommen, als Film auf Oberflächen, als dicke schleimartige Aggregate oder als "Flöckchen" frei schwimmend (Costerton et al., 1987). Das Leben in einem Biofilm bietet entscheidende Vorteile, denn es gewährt eine optimale Nährstoffversorgung und Schutz vor der Außenwelt. Die Ansammlung der Mikroorganismen befindet sich meistens in einer Matrix aus Wasser und extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), die hauptsächlich aus Kohlenhydraten (Polysacchariden), Proteinen und DNA besteht (Flemming & Wingender, 2001). Die sekretierten unlöslichen Substanzen (Exopolysaccharide, DNA, Proteine) bewahren die Mikroorganismen vor der Ablösung von der kolonisierten Oberfläche und schützen vor Bedrohungen durch andere Organismen, Antibiotika und Desinfektionsmitteln (de Kievit, 2009; Saitou et al., 2009). Biofilme weisen eine sehr komplexe Struktur auf, wobei ein Netz aus wasserführenden Kanälen den Transport von Nähr- und Abfallstoffen vermittelt (Costerton et al., 1995; Flemming & Wingender, 2001). Die Therapie von P. aeruginosa-Infektionen wird zusätzlich durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung des Organismus erschwert, da die Zellen innerhalb eines Biofilmes für humane Phagozyten und Antibiotika räumlich schlechter erreichbar sind (Brooun et al., 2000; Xu et al., 2000). Beim initialen Schritt zur Erschließung eines neuen Lebensraums wird durch Anheftung und Zellteilung nach und nach ein Biofilm ausgebildet. Der Biofilm stellt ein dynamisches System dar, indem sich die Zellen neben der Besiedlung und der Zellteilung auch wieder aus dem Verband lösen können, um so in neue Habitate zu gelangen und diese zu besiedeln (Flemming & Wingender, 2001). Prinzipiell kann die Biofilmbildung in fünf aufeinanderfolgende Phasen unterteilt werden: [1] initiale Anheftungsphase, [2] irreversible Bindung an die Oberfläche, **[3]** Bildung von Mikrokolonien, **[4]** Biofilmreifung unter Bildung der extrazellulären Matrix, **[5]** Biofilmstreuung durch Herauslösen einzelner Mikroorganismen oder Biofilmteile.

Die erste Phase wird Anheftungsphase genannt (Dunne, 2002), in der sich planktonische Zellen reversibel an eine Oberfläche anheften. Dabei ist die Beweglichkeit der Zellen in dieser Phase noch nicht völlig eingeschränkt, sondern bleibt z. B. durch Tvp IV Pili auf Oberfläche erhalten. Danach bilden sich in der Reifungsphase 1 infolge erhöhter Zellteilungsraten und der Expression von Adhäsinen durch extrazelluläre polymerische Substanzen (EPS) verknüpfte Mikrokolonien aus (Sauer et al., 2002). Diese Mikrokolonien reifen zu komplexen, dreidimensionalen Strukturen heran, die von wassergefüllten Kanälen durchzogen sind. Durch die Einlagerung der Mikroorganismen in diese extrazelluläre Matrix wird der Biofilm zugleich resistenter gegenüber äußeren Umwelteinflüssen. Im weiteren Verlauf verändern die Bakterien ihren Phänotyp. Sie verlieren ihre Geisseln und verstärken die Produktion der hochhydratisierten EPS-Matrix, die hauptsächlich aus Exopolysacchariden Phospholipiden besteht. sowie zusätzlich aus Proteinen. Nukleinsäuren und (Sutherland, 2001). Verschiedene, größtenteils unbekannte Signale führen zum Ablösen einzelner Bakterien aus dem Zellverband. Diese ermöglichen durch die Rückkehr zur planktonischen Lebensweise die Ausbreitung und die Etablierung neuer Biofilme. Während des gesamten Prozesses der Biofilmreifung sind intermolekulare Zellinteraktionen auf der Grundlage von Adhäsinen von entscheidender Bedeutung (O'Toole et al., 2000; Stanley & Lazazzera, 2004).

1.3 Sekretionssysteme in Pseudomonas aeruginosa

Die Proteinsekretion Gram-negativer Bakterien erweist sich durch das Vorhandensein der äußeren Membran im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien als besonders komplex, was zur Entwicklung verschiedener Proteinsekretionsmechanismen führte. Die Sekretionswege Gram-negativer Bakterien werden heute in die Sekretionssysteme Typ I-VII unterteilt (Pukatzki *et al.*, 2006; Dautin & Bernstein, 2007), wobei das Typ VII System erst 2007 in Mykobakterien entdeckt wurde (Abdallah *et al.*, 2007). Zu besseren Übersicht sind in Abbildung 1.3 die verschiedenen Sekretionssysteme aufgezeigt. Der Proteintransport kann in Zweischritt-Transportsysteme (Typ II, Chaperon Usher CU, Typ V) und EinschrittTransportsysteme (Typ I, III, IV) unterteilt werden. Proteine, die Sec-abhängig transportiert werden, besitzen eine N-terminale Signalsequenz, die eine Translokation der Proteine über den Sec-Apparat ins Periplasma ermöglicht und daraufhin abgespalten wird. Die Sekretion der periplasmatisch lokalisierten Proteine durch die äußere Membran erfolgt anschließend entweder über das Typ II-Sekretionssystem oder durch das Typ V-Sekretionssystem, das sog. Autotransporter-System. Eine N-terminale Signalsequenz des Proteins, bestehend aus meist 20 - 25 Aminosäuren, leitet den Sec-abhängigen Transport aus dem Cytoplasma ein und wird danach im Periplasma von einer Signalpeptidase abgespaltet (Paetzel *et al.*, 1997). Hingegen wird der Transport der Proteine, die über den Tat-Weg sekretiert werden, durch ein doppeltes Arginin-Motiv innerhalb der Erkennungssequenz erzielt (Ochsner *et al.*, 2002). Im *chaperone/usher*-Transportweg fungiert ein periplasmatisches Chaperon gemeinsam mit einem *usher* (Pförtner-Protein) der äußeren Membran und bewirkt die Substratfaltung, - assemblierung und-sekretion an die Zelloberfläche. Der *chaperone/usher*-Sekretionsweg ist in die Pilus-Biogenese involviert (Thanassi *et al.*, 2002).

Bei dem Ein-Schritt-Sekretionsmechanismus Typ-I, der auch als ABC-Transporter (ATP-binding cassette) bekannt ist, wird das zu sekretierende Protein Sec-unabhängig und unter Verbrauch von ATP vom Cytoplasma direkt ohne periplasmatisches Intermediat durch eine Pore an die Zelloberfläche transportiert (Henderson et al., 2004). Aus P. aeruginosa sind bisher das Häm-bindende Protein HasAp (Letoffe et al., 1998) sowie die alkalische Phosphatase (Duong et al., 1992) bekannt, die über diesen Mechanismus transportiert werden. Das Typ-III-Sekretionssystem ist ein weiterer Ein-Schritt-Transportmechanismus, bei dem die Proteine einer Signalsequenz sekretiert ohne Abspaltung werden (Cornelis & Wolf-Watz, 1997). Der Transport ist hierbei vom Kontakt eines N-terminalen Erkennungssignals des Zielproteins mit der Wirtszelle abhängig (Warren & Young, 2005). P. aeruginosa besitzt sowohl das Flagellen- als auch das pathogenitätsbezogenen Typ III-Sekretionssystem, wobei das Flagellen-System die Untereinheiten der Flagellen, die sog. Flagelline exportiert (Aizawa, 2001) und das pathogenithätsbezogene Sekretionssystem Virulenzfaktoren, wie die Exoenzyme S, T, U und Y direkt in die Wirtszelle transportiert (Yahr et al., 1996; Yahr et al., 1997; Yahr et al., 1998). Ein weiteres Sekretionssystem, das Typ VI-Sekretionssystem, das in P. aeruginosa und Vibrio cholerae beschrieben wurde, zeigt E. Ähnlichkeiten zu dem Injektionsapparat des coli Bakteriophagen T4 (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006). Hier wird vermutet, dass die Effektorproteine direkt über ein "Zellpunktierungssystem" in die Wirtszelle gelangen (Pukatzki et al., 2007).



= targeting Protein), Twin arginine targeting (Tat) (TatA, B, C, E = IMP) (Kanehisa & Goto, 2000).

1.3.1 Autotransporter

Die Typ V-Sekretionsfamilie umfasst die Autotransporterproteine, deren Mechanismus zuerst für die Immunoglobulinprotease A1 (IgA1) aus Neisseria gonorrhoeae beschrieben wurde (Pohlner et al., 1987). Das Typ V-Sekretionssystem beinhaltet die konventionellen Autotransporter, das Zwei-Partner-Sekretionssystem (two partner system-TPS) und die trimeren Autotransporter. Im Gegensatz zu allen anderen Systemen ist das Typ V-Sekretionssystem relativ einfach aufgebaut, da alle benötigten Informationen für das Passieren der äußeren Membran in der Primärstruktur des Proteins determiniert sind (Henderson et al., 1998). Der N-terminale Bereich des sekretierten Proteins enthält das Signalpeptid, welches nach dem Transport durch die innere Cytoplasmamembran abgespaltet wird (Sec-abhängiges Typ II-System). Im Periplasma bildet die C-terminal-kodierte Autotransporterdomäne (
ß-Untereinheit) eine Pore in der äußeren Membran, durch welche die passenger-Domäne (α -Untereinheit) an die Zelloberfläche gelangt. Die β -Untereinheit besitzt die Form eines β -barrels und ist bei allen Autotransporterproteinen hoch konserviert. Die Passagierdomäne kann entweder mit der integralen Transporterdomäne an der Zelloberfläche verbunden bleiben, wie es bei der Esterase EstA aus P. aeruginosa gezeigt wurde (Wilhelm et al., 1999), nach einer autokatalytischen Spaltung über eine nichtkovalente Bindung an der Zelloberfläche assoziiert verbleiben (Wells et al., 2007) oder aber in das extrazelluläre Milieu abgegeben werden, wie es bei der IgA-Protease von N. gonorrhoeae der Fall ist (Pohlner et al., 1987). Der genaue Mechanismus der Translokation der Passagierdomäne durch die äußere Membran ist bisher unklar, es wurden drei verschiedene Modelle vorgeschlagen. Beim Hairpin-Modell wird angenommen, dass der C-Terminus der Passagierdomäne zunächst eine Schleife in der Pore bildet, und das Protein C-terminal durch die Pore gezogen wird (Oomen et al., 2004). Das Omp85-Modell sagt aus, dass die Passagierdomäne bereits teilweise im Periplasma gefaltet wird und die Translokation des Passagiers sowie die Integration der β-Domäne durch das Außenmembranprotein Omp85/YaeT stattfindet (Voulhoux et al., 2003; Voulhoux & Tommassen, 2004). Das multimere Modell geht davon aus, dass die Passagierdomäne teilweise im Periplasma gefaltet wird und schließlich durch einen Kanal, aus einem multimeren Komplex von β -barrel-Poren transloziert wird (Veiga et al., 2002).

Im Gegensatz zu konventionellen Autotransportern, die als ein einziges Polypeptid transloziert werden, werden im Zwei-Partner-Sekretionssystem die Passagierdomäne (TpsA = Exotoxin) und die Translokatordomäne (TpsB) als zwei getrennte Proteine transloziert, wobei das ungefaltete TpsA aufgrund eines Sekretionssignals in die Pore eingefädelt werden kann (Jacob-Dubuisson et al., 2004). Eine weitere Subfamilie der Autotransporter stellen die sog. Oca-Proteine (oligomeric coiled-coil adhesins) dar, die auch als trimere Autotransporter-Adhäsine (TAA) bezeichnet werden (Hoiczyk et al., 2000; Roggenkamp et al., 2003; Cotter et al., 2005). Der Prototyp dieser Familie der nicht-Fimbrien-Adhäsine ist das Yersinia-Adhäsin YadA (Hoiczyk et al., 2000). Charakteristisch ist trimere Struktur für Oca-Proteine ihre bestehend aus einer variablen N-terminalen Kopfdomäne, einem Stiel, der aus coiled-coils aufgebaut ist und einer C-terminalen Membranankerdomäne. Die Autotransportersekretion konventioneller und trimerer Autotransporter erfolgt zwar zunächst bei beiden Systemen über den Sec-Apparat, allerdings bilden konventionelle Autotransporter eine Pore in der äußeren Membran, die meist aus einer Einheit aus 12 β-Faltblättern aufgebaut ist (z. B. EstA aus P. aeruginosa (van den Berg) und NalP aus N. meningitidis (Oomen et al., 2004)), während das β -barrel von trimeren Autotransportern durch drei identische Monomere mit je vier β-Faltblättern gebildet wird (Cotter et al., 2005; Dautin & Bernstein, 2007). Zusätzlich besitzen viele konventionelle Autotransporter, wie BrkA von Bordetella pertussis, eine intramolekulare Chaperondomäne, die für die extrazelluläre Abspaltung der Passagierdomäne verantwortlich ist, welche bei trimeren Autotransportern jedoch fehlt (Surana et al., 2004), da die Passagierdomäne trimerer Autotransporter nach der Translokation durch die äußere Membran an der Translokatordomäne kovalent gebunden bleibt (Cotter et al., 2005). Über den Autotransportermechanismus sekretierte Passagierdomänen können bis zu 3000 Aminosäuren lang sein (Yen et al., 2002), wobei diese als N-Terminus bezeichnete Passagierdomäne das funktionelle Motiv des Proteins beinhaltet. Sie kann als Adhäsin, Toxin oder Cytotoxin agieren, ein Immunmodulator sein, die Maturation eines anderen Virulenzfaktors bewirken, Actin-abhängige Bakterienbewegungen vermitteln oder aber als Esterase, Lipase oder Protease fungieren (Henderson & Nataro, 2001).

1.4 Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen von Proteinen hydrolysieren. Sie gehören zu den Hydrolasen, der dritten Gruppe in der EC-Klassifikation (*Enzyme Commission*) und katalysieren reversibel die hydrolytische Spaltung einer Verbindung unter Verbrauch von Wasser. Unter der Vielzahl der Enzyme repräsentieren die Proteasen die größte funktionelle Gruppe und weisen im Bezug auf die Hydrolyse einen vergleichbaren Mechanismus im

nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom eines Substrates auf. Die kovalente Peptidbindung wird im Verlauf eines Säure- und Base-katalysierten Prozesses gespalten. Man unterscheidet zwei Gruppen von Proteasen, die Endo- und die Exopeptidasen. Die Exopeptidasen hydrolysieren endständige Peptidbindungen, während die Endopeptidasen interne Peptidbindungen spalten. Endopeptidasen werden weiter in vier Gruppen unterteilt, die Serinproteasen, die Cysteinproteasen, die Aspartatproteasen und die Metalloproteasen. Für den nukleophilen Angriff auf eine Carbonylgruppe mit der anschließenden Spaltung der Peptidbindung unter Bildung eines Säureanhydrids als Zwischenprodukt nutzen die diversen Proteasen verschiedene reaktive Aminosäuren. Die Serinproteasen haben ein Serin im aktiven Zentrum, welches in den katalytischen Prozess involviert ist, Cysteinproteasen ein Cystein, Aspartatproteasen zwei Apartatreste und Metalloproteasen benötigen ein Metallion im katalytischen Mechanismus (Abbildung 1.4). Ergänzend existiert noch eine Klasse unbekannter Proteasen, die ein Sammelbecken für alle Proteasen darstellt, die keiner der übrigen Klassen eindeutig zugeordnet werden können.



Abbildung 1.4 Schematische Abbildung des katalytischen Mechanismus der Substratspaltung durch Proteasen. a Serinproteasen (EC 3.4.21) besitzen eine katalytische Triade bestehend aus den drei Aminosäuren Histidin, Serin und Aspartat. Der Mechanismus der Cysteinproteasen (EC 3.4.22; b in der Abbildung) ähnelt dem der Serinproteasen. Nach Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes erfolgt ein nukleophiler Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung unter Ausbildung einer kovalenten Tetraeder-Zwischenstufe. Die Aspartylproteasen (EC 3.4.23; c in der Abbildung) beinhalten zwei Aspartylreste im aktiven Zentrum, die einerseits das für die Spaltung der Peptidbindung nötige Wassermolekül aktivieren und zum anderen als Protonenakzeptoren und –donatoren agieren. Das aktive Zentrum der Metalloproteasen (EC 3.4.24; d in der Abbildung) enthält ein gebundenes Metallion, fast immer ein Zinkion, das ein Wassermolekül aktiviert, welches dann als nucleophile Gruppe die Peptidcarbonylgruppe angreift (Erez *et al.*, 2009).

Es sind mittlerweile 28 verschiedene Familien von Serinproteasen in der MEROPS-Datenbank für Proteasen klassifiziert worden (Rawlings *et al.*, 2008). Ihnen allen ist gemein, dass sich im katalytischen Zentrum eine "Triade" aus den drei konservierten Aminosäuren Serin (nukleophil), Aspartat (elektrophil) und Histidin (nukleophil) befindet. Die Bezeichnung "Serinproteasen" stammt daher, dass das katalytische Serin ungewöhnlich reaktiv ist, was anhand von Inhibitionsstudien bei Chymotrypsin gezeigt wurde (Turba & Gundlach, 1955). Das Serin im aktiven Zentrum lässt sich durch organische Difluorophosphate (DFP) inhibieren, die dort kovalent gebunden werden. Die starke Reaktivität des Serins im aktiven Zentrum des Enzyms wird daran deutlich, dass keines der weiteren Serine im Protein DFP bindet (Blow & Smith, 1975). Auf dieses aktive Serin wird während der Proteolyse der N-terminale Teil des zu spaltenden Peptids transient übertragen.

1.4.1 Funktion der Proteasen

Proteasen können sowohl nichtspezifische Reaktionen katalysieren, wie die Verdauung durch die Verdauungsenzyme Chymotrypsin und Trypsin, als auch hoch selektiv und effizient spezifische Substrate hydrolysieren. Proteolytische Enzyme finden u. a. in der Nahrungsmittelindustrie, in der medizinischen Diagnostik, in der Lederverarbeitung sowie in der pharmazeutischen Industrie Verwendung (Gupta *et al.*, 2002) und sind aufgrund ihrer Stabilität und Aktivität besonders für den Einsatz in Waschmitteln geeignet (Maurer, 2004). Ein großes Interesse an Proteasen besteht in der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie, da viele Proteasen nachgewiesen an der Entstehung von Tumorzellen im Menschen beteiligt sind (Reuning *et al.*, 1998; Joyce & Hanahan, 2004; Liaudet-Coopman *et al.*, 2006; Stetler-Stevenson, 2008).

Die Identifizierung potenzieller Ziele für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien und spezifischer Inhibitoren, z. B. die Suche nach neuen spezifischen Inhibitoren für die tumorfördernden Matrix-Metalloproteinasen (MMP), sind Gegenstand intensiver Forschung. Proteasen, eingeschlossen die MMPs, können sowohl miteinander als auch mit den zugehörigen, natürlichen Inhibitoren in komplexen Netzwerken interagieren. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Inhibierung der eigentlich tumorfördernden MMPs wiederum die Tumorbildung begünstigt (Overall & Kleifeld, 2006). So wurde gezeigt, dass die Entwicklung diverser MMP-Inhibitoren, die in Maus-Tumormodellen erfolgreich getestet wurden, beim Patienten klinischen Studien keine Erfolge in zeigten (Fisher & Mobashery, 2006). Die Proteolyse ist weitestgehend irreversibel, daher katalysieren zudem meist irreversible Prozesse wie die Apoptose Proteasen (Kurokawa & Kornbluth, 2009), die Koagulation (Scotton et al., 2009), die Degradation von Proteinen oder die Angiogenese (Aplin et al., 2009). Dabei ist es wichtig, dass die proteolytische Aktivität innerhalb der Zelle aufgrund der potenziell zerstörerischen Wirkung streng vom Organismus kontrolliert wird. Die Zelle hat dafür verschiedenste Mechanismen, wie die Regulation der Sekretion oder der Genexpression, die gezielte Aktivierung von Proformen (Zymogene) sowie die Hemmung der proteolytischen Aktivität durch Inhibitoren. Die Aktivierung der Proformen erfolgt durch spezifische Hydrolyse eines Teils der Peptidkette, so dass die betroffene Protease ihre aktive Form einnehmen kann. Viele proteolytische Enzyme werden zuerst als inaktive Vorstufe, dem Proenzym bzw. Zymogen, gebildet. Dies hat vor allem den Vorteil, dass keine unerwünschten Spaltungen an wichtigen Enzym- und Strukturproteinen vollzogen werden, bevor die Enzyme am Zielort angekommen sind. Die Überführung in die aktive Form durch Abspaltung bestimmter Peptidreste erfolgt entweder durch Autokatalyse oder durch andere Proteasen (Shinde & Inouye, 1993; Shinde et al., 1993).

1.4.2 Subtilisin Proteasen - Subtilasen

Mehr als ein Drittel aller Proteasen wird zu den Serinproteasen gezählt, wobei zurzeit nach MEROPS 12 Clans von Serinpeptidasen unterschieden werden, sowie ein Clan (PA) aus der Gemischgruppe (P), der neben Vertretern der Serinpeptidasen ebenso Cysteinpeptidasen enthält (Rawlings *et al.*, 2008). Zwischen den einzelnen Clans der Serinpeptidasen bestehen keine verwandtschaftlichen Beziehungen, so dass vermutlich die funktionelle Ähnlichkeit dieser Enzyme auf eine unabhängige, konvergierende Evolution zurückzuführen ist (Siezen *et al.*, 1991; Rawlings & Barrett, 1994). Die am weitesten verbreiteten Clans der bakteriellen Serinpeptidasen stellen u. a. die Subtilisin-ähnlichen (SB) Peptidasen dar (Siezen, 1996). Sie leiten sich strukturell von einer weiteren Gruppe der Serinproteasen ab, den Subtilisinen. Der Clan der Subtilisin-ähnlichen Peptidasen beinhaltet dabei die wohl bestuntersuchten Peptidasen, wie etwa das Subtilisin E aus *Bacillus subtilis*. Eine Aufgliederung der Subtilisin-ähnlichen Peptidasen erfolgt nach MEROPS in eine

gleichnamige Familie (S8) mit über 1400 Enzymen, charakterisiert durch die Reihenfolge ihrer katalytischen Triade (Asp, His, Ser) und in die Familie der Sedolisine (S53) mit einer katalytischen Tetrade (Glu, Asp, Asp, Ser) und etwa 120 bekannten Vertretern. Einer der bekanntesten Vertreter der Serinproteasen bei *Bacillus* ist das ursprünglich in *B. subtilis* entdeckte Subtilisin. Durch die Sequenzierungsarbeit von (Smith *et al.*, 1966) und die Lösung der Kristallstruktur durch (Wright *et al.*, 1969) konnte gezeigt werden, dass Subtilisin nicht wie angenommen in die Chymotrypsin Familie S1, sondern in eine eigene Familie S8 eingeteilt werden kann. Die *in vivo* Funktion von Subtilisin liegt im Proteinabbau für die Nährstoffaufnahme.

Die Mehrheit der Subtilisine wird als Prä-Proenzym mit einem N-terminalen Signalpeptid und einem darauffolgenden, nicht konservierten Prosegment synthetisiert (Siezen & Leunissen, 1997). Dieses dient als intramolekulares Chaperon (Ohta et al., 1991) und kann durch Autoproteolyse entfernt und die Protease somit aktiviert werden (Ikemura & Inouye, 1988). Von den Subtilisin-ähnlichen Proteasen (Subtilasen) wurde lange Zeit angenommen, dass sie nur in Prokaryonten vertreten sind. Die Identifizierung der Subtilisin-ähnlichen Kex2p-Protease der Hefe Saccharomyces cerevisiae, die für die Reifung des Pheromons α-Faktor verantwortlich ist (Julius et al., 1984), bereitete jedoch den Weg für die Entdeckung von Subtilasen in nahezu allen eukaryontischen Organismen. Zwischen 1991 und 1997 wurden alleine 100 der bis dahin bekannten 200 Mitglieder dieser Familie identifiziert (Siezen et al., 1991; Siezen & Leunissen, 1997). Basierend auf Sequenzvergleichen wurden die Subtilasen in sechs Familien unterteilt. Sie sind nicht nur am Abbau von Proteinen sondern auch an weiteren, vielfältigen Funktionen beteiligt. Trypsin und Chymotrypsin sind beispielsweise wichtige Verdauungsenzyme in tierischen und menschlichen Organismen, die im Dünndarm Proteine zersetzen, während Thrombin das entscheidende Enzym der Blutgerinnung ist. Für einige Subtilisin-ähnliche Serinproteasen (Thermitase und Proteinase K) konnten Calcium-Ionen-Bindestellen gefunden werden, wobei sie nur wenige Disulfidbrücken aufweisen. Viele dieser Subtilasen besitzen neben dem N-terminalen Propeptid, dem Signalpeptid und der maturen Proteasesequenz, eine C-terminal verlängerte Sequenz bestehend aus Sequenzwiederholungen, Cystein-reichen oder Transmembran-Sequenzen. Es herrscht ein hoher Grad an Sequenzvariabilität im aktiven Zentrum in dieser Gruppe der Serinproteasen, wobei nur die Reste der katalytischen Triade (Asp-His-Ser) konserviert zu sein scheinen (Siezen & Leunissen, 1997).

In Eukaryoten ist die Proteolyse eines Vorläuferproteins durch eine bestimmte Protease ein allgemein bekannter Prozess, um ein aktives Signalmolekül zu generieren.

18

Viele Pro-Hormone werden durch spezialisierte Proprotein Convertasen (PPC) gespalten und damit aktiviert. Sie sind wesentlich an der proteolytischen Prozessierung und Reifung vieler physiologisch aktiver Proteine und im Sekretionsapparat der Zellen beteiligt. Die Proteasen der Unterfamilie S8B, wie Kexin und Furin, spalten spezifisch nach dibasischen Aminosäuren. Die Proprotein Convertasen sind Calcium-abhängige Multidomänen-Proteinasen, die aus einer N-terminalen, entfernt Subtilisin-ähnlichen Serinproteinase-Domäne, einer charakteristischen P-Domäne und weiteren Domänen, zum Teil auch einer Transmembran-Domäne, bestehen. Kex2 aus *S. cerevisiae* und Säugetier-Furine gehören zu diesen PPC, die als Subtilisin-ähnliche Proteasen in sekretorischen Signaltransduktionswegen agieren (Siezen & Leunissen, 1997). Kexin ist an der Prozessierung des *alpha-mating factors* in *S. cerevisiae* beteiligt. Furin ist im Trans-Golgi-Netzwerk und in der Endosomen-Membran von Säugetieren zu finden, wo es eine Vielzahl von Vorläufer-Proteinen spaltet.

Auf der Grundlage von Sequenzhomologien lässt sich die Superfamilie der Subtilasen weiter in verschiedene Familien einteilen (Siezen & Leunissen, 1997), die hier zur besseren Übersicht in einem Dendogramm angegeben sind (Abbildung 1.5):



Abbildung 1.5 Dendogramm der Superfamilie der Subtilasen. Es basiert auf einem Alignment der konservierten katalytischen Domänen (Siezen & Leunissen, 1997).

In der Pfam-Datenbank sind bereits 2878 Sequenzen mit einer für Subtilisin-Proteasen charakteristischen PeptidaseS8 Domäne annotiert, von denen 153 Sequenzen darüberhinaus am C-Terminus eine für Autotransporter charakteristische Domäne besitzen (Finn *et al.*). Die bisher charakterisierten Autotransporter werden vorallem mit der Virulenz des jeweiligen Organismus in Zusammenhang gebracht und auch die Subtilisin-ähnlichen Autotransporter findet man überwiegend in pathogenen Organismen. Bei den meisten Proteasen der Unterfamilie S8A, handelt es sich um unspezifische Proteasen, welche überwiegend in Prokaryoten bzw. niederen Eukaryoten vorkommen und vorzugsweise nach

hydrophoben Aminosäureresten spalten (Siezen & Leunissen, 1997). Unter diesen Proteasen gibt es jedoch auch Ausnahmen. Eine spezifische Spaltung findet man beispielsweise bei SphB1 aus

B. pertussis. SphB1 ist ein großes, exportiertes Protein mit einer Subtilisin-ähnlichen Domäne und einer C-terminalen Domäne, die typisch für bakterielle Autotransporter ist. Dieses Protein ist in der FhaB filamentösen Hämagglutinin Prozessierung in *B. pertussis* involviert (Coutte *et al.*, 2001). Die folgende Abbildung 1.6 zeigt die bisher bekannten Autotransporter und die dazu gehörende Gruppe der Subtilisin-ähnlichen Autotransporter (Gruppe 1):



Abbildung 1.6 Phylogenetischer Stammbaum der Autotransporterproteine. Die Alignments und der phylogenetische Stammbaum wurden mit den Programmen CLUSTALX und TREE hergestellt. Für die Analyse wurde der C-Terminus der Autotransporter verwendet. Cluster 1: Familie der Subtilase-Autotransporter, Cluster 2 und 11: Autotransporter aus *Helicobacter pylori*, Cluster 3 und 4: Familie der AIDA Autotransporter, Cluster 5 und 8: Serinprotease-Autotransporter, Cluster 6: Autotransporter aus *Bordetella*, Cluster 7: Autotransporter aus *Chlamydia*, Cluster 9: Autotransporter aus *Rickettsia*, Cluster 10: Lipasen und Esterasen (Henderson *et al.*, 2004).

1.4.3 Proteasen aus Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa sekretiert zahlreiche Proteasen, die an der Virulenz des Bakteriums maßgeblich beteiligt sind, u. a. die alkalische Protease (AprE), die beiden Zink-Metalloproteasen Elastase A (LasA) und Elastase B (LasB) sowie die Protease IV. Die sekretierte Elastase spaltet eine Reihe von Strukturproteinen und weiteren wichtigen Proteinen, die an der Ausbildung des Immunsystems und an der Initierung der Pathogenese beteiligt ist (Stehling et al., 2008). Die Elastase LasB degradiert neben Elastin auch Kollagen (Heck et al., 1986), inaktiviert Bestandteile des Immunsystems, wie Immunglobulin G (Fick et al., 1985) und Immunglobulin A (Heck et al., 1990) und inaktiviert Interferon y (Horvat et al., 1989) sowie Substanzen, die am Schutz des Respirationstraktes vor Proteasen beteiligt sind, wie den humanen Alpha-1-Proteaseinhibitor (Morihara et al., 1979). Die Fähigkeit, Elastin zu spalten, macht LasB zu einem bedeutsamen Virulenzfaktor bei akuten Infektionen, da der Abbau des Elastins der Blutgefäße z. B. zu Blutungen innerhalb des Wirtes führt (Komori et al., 2001). Elastin ist ein wichtiger Bestandteil des Binde- und Lungengewebes sowie der Blutgefäße und bedingt die Elastizität und Widerstandsfähigkeit des jeweiligen Gewebes. Die Elastase LasB verursacht durch den Abbau von Lungenoberflächenproteinen eine Schädigungen des Lungenepithels (Mariencheck et al., 2003; Alcorn & Wright, 2004) und eine erhöhte Produktion von LasB in der Lunge von CF-Patienten, die an einer Pseudomonas-Infektion litten, konnte durch die Analyse des Sputums nachgewiesen werden (Doring et al., 1983; Woods et al., 1986). Eine weitere Elastase aus P. aeruginosa ist die Elastase LasA. Die beiden Elastasen LasA und LasB wirken synergistisch (Galloway, 1991), wobei LasA maßgeblich für die Steigerung der Aktivität von LasB verantwortlich ist (Kessler et al., 1997). Die Elastase LasA spaltet mit einer wesentlich geringeren elastolytischen Aktivität ebenfalls Elastin und besitzt weiterhin eine staphylolytische Aktivität. Geringe Mengen der Protease bewirken aufgrund der Fähigkeit, Peptidbindungen innerhalb des Pentaglycins, einem Bestandteil des Peptidoglycans, zu spalten, die Lyse von Staphylococcus (Kessler et al., 1993). Die Protease IV, eine extrazelluläre Serinprotease, die Lysin-haltige Proteine am C-Terminus spaltet (Malloy et al., 2005), konnte bisher in allen klinischen Isolaten identifiziert werden und ist vermutlich der bedeutendste Virulenzfaktor unter den extrazellulären Proteasen in P. aeruginosa (Caballero et al., 2004). Die Protease IV ist ebenso wie die Elastase LasB für den Abbau diverser Lungenoberflächenproteine wie SP-A und SP-D (surfactant proteins), die Bestandteil des wirtseigenen Immunsystems sind, verantwortlich (Crouch, 1998; Malloy et al., 2005). Weiterhin ist die Protease IV in der Lage,
Proteine wie Fibrinogen und Plasminogen zu spalten und hat durch die Fähigkeit Immunglobulin G zu inaktivieren, einen drastischen Einfluss auf das Immunsystem (Malloy *et al.*, 2005).

Eine weitere extrazelluläre Metalloprotease, die an der Virulenz von *P. aeruginosa* beteiligt ist, ist die alkalische Protease AprE. Sie ist ebenso wie die Elastase LasB in der Lage, Kollagen zu spalten und ermöglicht somit die bakterielle Invasion in das Wirtsgewebe, die zur Ausbildung bluthaltiger Gewebenekrosen führt (Heck *et al.*, 1986). Weiterhin inaktiviert die alkalische Protease Interferon γ und den Tumornekrosefaktor α (Horvat *et al.*, 1989; Parmely *et al.*, 1990). Eine erst kürzlich charakterisierte Protease aus *P. aeruginosa* ist die extrazelluläre Protease PASP (*Pseudomonas aeruginosa small protease*) (Marquart *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2009), deren katalytischer Mechanismus bislang unbekannt ist. PASP wurde in allen untersuchten klinischen Isolaten des Auges identifiziert und es wird vermutet, dass diese Protease ebenso wie die Protease IV in der Lage ist, Kollagen zu spalten und zudem einer der Faktoren in *P. aeruginosa* ist, der umgehend Erosionen der Cornea hervorruft (Tang *et al.*, 2009). Neben der Funktion als Virulenzfaktoren sind Proteasen wichtige Bestandteile diverser intrazellulärer Synthesewege, wie der Typ IV Pili Synthese (Nunn *et al.*, 1990; Nunn & Lory, 1991).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

P. aeruginosa gewinnt als humanpathogener Erreger, gegen den aufgrund der hohen intrinsischen Resistenz nur ein begrenztes Arsenal an wirksamen Therapeutika zur Verfügung steht, zunehmend an Bedeutung. Die Pathogenität von P. aeruginosa ist auch auf die Produktion einer Vielzahl extrazellulärer und zellassoziierter Virulenzfaktoren zurückzuführen. Die Identifizierung und Charakterisierung weiterer Virulenzfaktoren ist für die gezielte Entwicklung von Therapeutika von besonderem Interesse. Aufgrund der Beobachtung, dass auch AT-Proteine an der Virulenz verschiedener Organismen beteiligt sind (Henderson & Nataro, 2001; Wilhelm et al., 2007), ist die Charakterisierung bekannter AT-Proteine sowie die Suche nach neuen Autotransportern aus pathogenen Bakterien notwendig.

P. aeruginosa besitzt mit SprS, neben dem bereits beschriebenen AT-Protein EstA (Wilhelm *et al.*, 1999), ein weiteres AT-Protein, das aufgrund von Sequenzhomologien und spezifischen Strukturmotiven identifiziert werden konnte (Serci, 2006). Zur physiologischen Charakterisierung von SprS wurden sowohl Überexpressionsstämme als auch ein *sprS*-defizienter *P. aeruginosa*-Stamm konstruiert, u. a. um diesen hinsichtlich Virulenz-assoziierter Faktoren zu analysieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, SprS als möglichen Virulenzfaktor sowohl auf molekularer Ebene als auch hinsichtlich seiner biologischen Funktion zu charakterisieren. Basierend auf den Vergleichen mit bereits vorhanden 3D-Strukturen von AT-Proteinen soll ein Modell von SprS erstellt und die Zugehörigkeit zur Familie der AT-Proteine bestätigt werden. Die Zugehörigkeit zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Proteasen soll durch Homologievergleiche getroffen werden.

Für die biochemische Charakterisierung des SprS-Proteins soll die Protease sowohl im heterologen Wirt *E. coli* als auch im homologen Organismus *P. aeruginosa* exprimiert und anschließend mittels IMAC aufgereinigt werden.

Mittels *lacZ*-Fusionsstudien und *real time*-PCR-Analysen sollen die Expressionsbedingungen von *sprS* im Wildtyp PAO1 analysiert werden, um so Aufschluss über die Funktion des Proteins zu erhalten. Die an der Virulenz des Bakteriums beteiligten Phänotypen sollen im *sprS*-negativen Stamm mit denen im Wildtyp PAO1 verglichen werden, um somit erste Hinweise von SprS als putativen Virulenzfaktor zu erhalten.

Für eine erfolgreiche Kolonisierung von Wirtsgewebe und eine Besiedelung des menschlichen Respirationstraktes sind u. a. Adhäsine und Oberflächen-assoziierte Proteine verantwortlich. Ziel dieser Arbeit ist die proteolytische bzw. prozessierende Funktion von SprS durch differentielle Analysen der Proteinzusammensetzung der äußeren Membran und des extrazellulären Milieus im Wildtyp und der *sprS*-defizienten Mutante zu untersuchen. Durch Anwendung von Proteomanalysen sollen dann an der Virulenz beteiligte Proteine identifiziert und ihr Vorkommen in beiden Stämmen verglichen werden. Mögliche Unterschiede aus den Proteomanalysen sollen dann durch Transkriptionsstudien mittels *real time*-PCR verifiziert und näher analysiert werden.

Eine Analyse der Genexpression von *sprS* mittels Reportergenfusionen im *sprS*-negativen Stamm soll einen möglichen Zusammenhang zu einer weiteren Subtilisin-ähnlichen Protease in *P. aeruginosa* aufklären.

Um die Bedeutung von SprS für die Virulenz aufzuklären, soll der *sprS*-negative Stamm in verschiedenen Virulenzmodellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

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

Antibiotika: Chemikalien:	Gerbu (Geilberg), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) Roth (Karlsruhe), Gibco BRL (Eggenstein), Pharmacia (Freiburg), Sigma, Serva, Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze), Biomol (Hamburg)		
Enzyme:	Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.		
Madiankomponantan.	Weitere Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Lysozym von Sigma (Deisenhofen), T4-DNA-Ligase, Ribonuclease A und T4-DNA-Polymerase von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Pfu-DNA-Polymerase von Stratagen (Heidelberg), Triple-Master DNA-Polymerase von Eppendorf (Hamburg), DNaseI von Promega (Mannheim).		
Antikörper:	Der Zweitantikörper, Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich- Peroxidase-Konjugat, wurde von der Firma BioRad (München) bezogen.		

2.2 Bakterienstämme

2.2.1 Escherichia coli-Stämme

Tabelle 2.1 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
DH5a	supE44 ∆(lacZYA-argF)U196 (Φ80∆lacZM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	(Hanahan, 1983)
S17-1	Ec294::[RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)], pro, res, recA, tra ⁺ , Tp ^r , Sm ^r	(Simon et al., 1986)
BL21(DE3)	F ompT hsdS _B ($r_B m_B$) gal dcm (λ Its857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5- T7gene1)	(Studier & Moffatt, 1986)

C43(DE3)	BL21(DE3)-Derivat mit mindestens einer weiteren, nicht charakterisierten Mutation	(Miroux & Walker, 1996)
JM110	rpsL thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac- proAB) [F`traD36 proAB lacIqZΔM15] StrR	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

2.2.2 Pseudomonas aeruginosa-Stämme

Tabelle 2.2 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
Pseudomonas aeruginosa PAOL	Wildtyp PAO1	(Holloway <i>et al.</i> , 1979) D. Haas, Lausanne, CH
Pseudomonas aeruginosa ∆sprS	$\Delta sprS:: \Omega$ -Gm ^r	(Serci, 2006)
Pseudomonas aeruginosa ∆sprP	$\Delta sprP::\Omega$ -Gm ^r	(Pelzer, 2009)
Pseudomonas aeruginosa PABST7.1	$\Delta ({}^{3}/_{4} lipA {}^{1}/_{3} lipH) \text{ miniD-180}$ (tetA tetR lacI _q P_{lacUV5} -T7 gene1)	(Rosenau, 2000)

Tabelle 2.3 Übersicht der verwendeten Vektoren.

Vektor für <i>E. coli</i>	Genetische Marken	Referenz/Bezugsquelle
pBCSK	$P_{37} P_{T3} P_{lac} lacZ' Cm^r ColE1$	Stratagene, Heidelberg
pBSL142	pBluescript-Derivat, MCS, Ap ^r , Gm ^r	(Alexeyev et al., 1995)
pSUP202	pBR325, Ap ^r Cm ^r Tc ^r mob	(Simon <i>et al.</i> , 1983)

pRK600	Cm ^r <i>ori</i> -ColE1 RK2 <i>-mob</i> ⁺ RK2 <i>-tra</i> ⁺ Helferplasmid in Konjugationen	(Kessler et al., 1992)
pET22b	ColE1 P _{T7Φ10} Ap ^r pelB <i>lac1</i> ^q	Novagen, Madison, USA
Vektoren mit weitem Wirtsbereich	Genetische Marken	Referenz/Bezugsquelle
pTZ110	Ap ^r , promotorloses <i>lacZ</i>	(Schweizer & Chuanchuen, 2001)
pBR22b	<i>lacZ</i> α Cm ^r <i>rep mob</i> (MCS: pET22b)	(Rosenau & Jaeger, 2004)
pBBR1MCS	Cm^{r} mob <i>lacZa</i> P_{lac} P_{T7}	(Kovach et al., 1994)
pUCPKS	ColE1 $P_{T7} P_{T3} P_{lac} lacZ \alpha Ap^r$	Stratagene, Heidelberg

Fortsetzung Tabelle 2.3

Tabelle 2.4 Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBBR <i>sprS</i>	3,003 kb <i>XhoI / Xba</i> I Fragment mit <i>sprS</i> in pBBR1MCS Plac-Ktr.	(Serci, 2006)
pET <i>sprS</i>	2,987 kb <i>NdeI / SacI</i> -Fragment mit <i>sprS</i> in pET22b+	(Serci, 2006)
pSUP <i>sprS</i> Gm	3,9 kb Fragment <i>Sal</i> I / <i>Nhe</i> I aus pBBR <i>sprS</i> Gm in pSUP202	(Serci, 2006)
pBBR <i>sprP</i>	1,794 kb <i>Hind</i> III / <i>Bam</i> HI Fragment mit <i>sprP</i> in pBBR1MCS Plac-Ktr.	diese Arbeit
pTZ110 <i>sprP</i>	0,556 kb <i>Eco</i> RI / <i>Bam</i> HI Fragment mit dem Promotor von <i>sprP</i> in pTZ110	diese Arbeit
pTZ110 <i>sprS</i>	0,816 kb <i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I Fragment mit dem Promotor von <i>sprS</i> in pTZ110	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Merkmal
PA3535 Up	CCG <u>CTC GAG</u> GGA GAC CGC ATG AC	XhoI
PA3535 Down	AAG TGC <u>TCT AGA</u> TCA GAA ACG CCA GTC	XbaI
PA3535 NdeI Up	AAA <u>CAT ATG</u> ACC GAC GAC CAC TC	NdeI
pTZ3535 Up	GGA AGC TTT GTG GTC GAT GTC GGG GA	HindIII
pTZ3535 Down	AAC TCG AGG CGG TCT CCA CGC TTT AT	XhoI
pTZ1242 Up	GGG AAT TCG CGC CTG CGG CTT GA	<i>Eco</i> RI
pTZ1242 Down	AAG GAT CCG GAC TCG GCT TCC GGA AC	BamHI
PA0372L	CGA CTA CAC CGC CTA TTA CC	RT-PCR
PA0372R	ATC TCG CTC TTG AAC TGG TC	RT-PCR
PA0766L	GCT ACG TAC CCT TCA TCC AG	RT-PCR
PA0766R	TGA AGA TCT GCG AGT TGA TG	RT-PCR
PA1249L	ATA TCT ACT CGC TGG GCA AG	RT-PCR
PA1249R	GAC GAA GTG GAT ATT GGT GAC	RT-PCR
PA3257L	GCC TTC TAC CTG GAC TTC AA	RT-PCR
PA3257R	AAC TTG TCC TTC TGC AAT TC	RT-PCR
PA1832L	GCT GTT GAA GAA GCA CGA TA	RT-PCR
PA1832R	AGG TCC TCC TGG AAC TTT TC	RT-PCR
PA5134L	GCC TGA TCG TCT ACA CCA A	RT-PCR
PA5134R	CCA CCG TTG ATC AGT ACC AC	RT-PCR
PA5474L	TCC AGG CCT ATA TGA ACG AC	RT-PCR
PA5474R	CTG AAG AAG CCC TGG TTG	RT-PCR

Tabelle 2.5 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Fortsetzung Tabelle 2.5

PA0580L	GCT CAA GAC CTT TAC CCT GA	RT-PCR
PA0580R	CAC TTG ATC AGC AGG GTC TC	RT-PCR
PA3649L	GCT CGA ACA GTC CTT CAA TC	RT-PCR
PA3649R	GAC CCA GAA GAA CAG AAT CG	RT-PCR
PA3086L	ATG TGG TTC TGG GAG CTG	RT-PCR
PA3086R	GTA CTG CAC CAC GTT GGA C	RT-PCR
PA0572L	GCG GTA ACT ACT GGG ACA AG	RT-PCR
PA0572R	ATT TCG ACC AGT CGT AGT CC	RT-PCR
PA1242L	TGT TGA TCG AGG AGA ACC A	RT-PCR
PA1242R	CAA CTG GTA GAG GTT CAA CG	RT-PCR
PA2939L	GAA CTT CGG CAA CTT CAT CT	RT-PCR
PA2939R	GGA AGT AGG CTT CGA ACA GG	RT-PCR
PA3535L	GCC AAC ACC AAC CAG AAC	RT-PCR
PA3535R	GTC TCG TAG CTG ACG TCC TT	RT-PCR
PA0328L	GGC TAT GAC TTC AGC TTC G	RT-PCR
PA0328R	GTC GTA GTC CTG CTT CTC GT	RT-PCR
PA3724LlasB	GAC CCA CAA GCT GTA CAT GA	RT-PCR
PA3724RlasB	GAC ACC AGC GGA TAG AAC AT	RT-PCR
PA1871LlasA	CAT TTC TCG CTG CTC TAC AA	RT-PCR
PA1871RlasA	GAA ATA GTA GCG GCG ACA GT	RT-PCR
PA4175LpIV	CAA GGA CCT CTC GGT CAA	RT-PCR
PA4175RpIV	GAG TCG GCG AAA TAC GAT AC	RT-PCR
rpoD Up	ATT TCC ATC GCC AAG AAG TA	RT-PCR
rpoD Down	GAC GGT ATT CGA ACT TGT CC	RT-PCR

Alle in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) in HPLC-gereinigter und lyophilisierter Form bezogen. Die DNA wurde jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Volumen A. dest. aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 pmol/µl vorlagen.

2.4 Nährmedien und Zusätze

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

2.4.1 LB-Flüssigmedium (Sambrook, 1989)

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

Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Um die basale Genexpression zu unterbinden, wurde dem LB-Medium für Überexpressionen mit den Bakterienstämmen *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) 0,4 % Glukose zugesetzt.

2.4.2 TB-Medium

Caseinhydrolysat 12 g/l, Hefeextrakt 24 g/l, Glycerol 5 g/l, 100 mM Phosphat-Puffer (pH 7,0)

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 100 ml sterile Laktoselösung (20 g/l) sowie 10 ml sterile Glukoselösung (50 g/l) zugegeben.

Der Phosphatpuffer (pH 7,0) wurde wie folgt angesetzt:	KH ₂ PO ₄ 81,3 g
	K ₂ HPO ₄ 78,7 g
	A. dest. ad 500 ml

Der Puffer wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und anschließend steril filtriert.

2.4.3 M9-Minimalmedium (Sambrook, 1989)

Die Lösungen I-IV wurden getrennt autoklaviert und anschließend wie folgt zusammengesetzt: 10 % (v/v) Lsg. I, 1 % (v/v) Lsg. II, 1 % (v/v) Lsg. III, 10 % (v/v) Lsg. IV.

2.4.4 ABG-Medium (Chilton et al., 1974)

5 % (v/v) AB Salz (×20); 5 % (v/v) AB Puffer (×20); 0,2 % (w/v) Glukose AB Salz (×20): 20 g/l NH₄Cl; 6 g/l MgSO₄; 3 g/l KCl; 0,2 g/l CaCl₂; 0,05 g/l FeSO₄ AB Puffer (×20): 60 g/l K₂HPO₄; 23 g/l NaH₂PO₄

2.4.5 Indikatorplatten

Für den qualitativen Nachweis von Enzymen wurden folgende Indikatorplatten verwendet:

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

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

2.4.5.2 Tributyrin-Agar (Kok et al., 1993)

7,5 ml Tributyrin und 0,75 g Gummi arabicum ad 15 ml A. dest. Die Lösung wurde gemischt, mit Ultraschall (3 min, 75 W, 100 %) emulgiert und zu 500 ml autoklaviertem LB-Agar (60 °C) gegeben.

2.4.5.3 Skim-Milk-Agar

3 % (w/v) Magermilchpulver in LB-Agar (10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 15 g Agar, ad 500 ml A. dest.). Proteaseaktivität führt zur Entstehung klarer Höfe um die Bakterienkolonien.

2.4.5.4 Columbia-Blut-Agar (Becton Dickinson)

Auf Columbia-Blut-Agar kann besonders gut der für *P. aeruginosa* typische, metallische Glanz und die Hämolyse beobachtet werden.

2.5 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Kulturen von *E. coli* und *P. aeruginosa* wurden in LB-Medium angelegt und bei 37 °C bebrütet. Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina in einem Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH), bei 180–220 UpM kultiviert. Dabei entsprach das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10. Stämme mit plasmid- oder genomkodierten Resistenzmarken wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums (Tabelle 2.6) kultiviert. Als Übernachtkulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Vorkulturen wurden entweder mit Einzelkolonien von Stamm- bzw. Transformationsplatten oder mit 1/500 Volumen aus einer Gefrierkultur inokuliert. Hauptkulturen wurden mit einer ÜK auf eine Zelldichte inokuliert, die einer OD_{580nm} von 0,5 entsprach. Die Zelldichte von Kulturen wurde turbidometrisch in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt.

2.5.1 Konservierung von Bakterienstämmen

Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden ÜK mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

Antibiotikum	Konzentration für <i>E. coli</i> (µg/ml)	Konzentration für <i>P. aeruginosa</i> (µg/ml)
Ampicillin (Ap)	100	-
Carbenicillin (Cb)	-	600
Chloramphenicol (Cm)	50	300
Gentamycin (Gm)	10	30
Irgasan (Irg)	-	25
Tetracyclin (Tc)	25	100

Tabelle 2.6 Endkonzentrationen der zur Selektion eingesetzten Antibiotika.

2.5.2 Kultivierung von E. coli BL21(DE3) und C43(DE3) in Überexpressionskulturen

Zur Überexpression der in verschiedene Vektoren klonierten Gene in *E. coli* BL21(DE3) und C43(DE3) wurden die Zellen bei 37 °C unter Selektionsdruck in LB-Glukose-Medium (2.4.1) bis zu einer Zelldichte bebrütet, die einer OD_{580nm} von 0,6 entsprach. Es erfolgte dann die Induktion durch Zugabe von 0,4 mM IPTG. Die anschließende Analyse der Proteinzusammensetzung der Proben erfolgte durch eine SDS-PAGE (2.19). Die Proteaseaktivität der Proben wurde durch Enzymaktivitätstests (2.23) bestimmt.

2.6 DNA-Techniken

2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse oder durch die Verwendung von Mini- und Midipräp-Kits der Firma Analytik Jena (Jena) nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer isoliert.

Chromosomale DNA aus Zellen von *P. aeruginosa* wurde mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen isoliert. Die Konzentrationen von DNA-Präparationen wurden durch analytische Gelelektrophorese bestimmt.

2.6.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen mit einer Konzentration von 0,6 % - 2 % (w/v) elektrophoretisch getrennt (Sambrook, 1989). Als Elektrophoresepuffer wurde $0,5 \times$ TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Längenstandard wurde je nach erwarteten Fragmentgrößen die 1 kb und 50 bp *GeneRulerTM Ladder* von Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Geldokumentation wurde auf dem *Eagle Eye II*-Videodokumentationssytems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des "omnipure-OLS Kit" der OMNI Life Science (Bremen). Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren und die mitgelieferten Puffer verwendet.

2.6.3 In vitro-Rekombination von DNA

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

2.6.4 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation sowie die Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.6.5 Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurde je 1 ml einer ÜK des Plasmid-haltigen Donorstammes *E. coli* S17-1 mit 1 ml Zellen des jeweiligen Rezipientenstammes von *P. aeruginosa*, der zuvor für 1 h bei 43 °C inkubiert wurde, gemischt und durch Zentrifugation (3 min, 5.000 UpM, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für mindestens 4 h bei 37 °C auf einer LB-Agarplatte inkubiert, bevor diese in 0,14 M NaCl suspendiert und in Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-6} auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion des Donorstammes enthielt der Selektivagar zusätzlich 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, CH).

2.6.6 Konstruktion eines sprS-defizienten Stammes von Pseudomonas aeruginosa

Zur Erstellung der Insertions-/Deletionsmutante des Gens sprS in PAO1 wurde ein Mutagenesevektor konstruiert, der auf dem mobilisierbaren Suizidvektor pSUP202 beruht. Zunächst wurden die stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Gensequenzen mittels PCR amplifiziert. Durch Hydrolyse des Plasmids pBBR*sprS* mit der Restriktionsendonuklease XcmI wurde zunächst ein internes DNA-Fragment des Gens deletiert. Anschließend wurde die ΩGm^r-Kassette, die zuvor aus dem Vektor pBSL142 isoliert wurde, in das resultierende Plasmid eingefügt und das so inaktivierte Genfragment anschließend über die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen Sall / NheI (kompatibel zu XhoI / XbaI) in den Suizidvektor pSUP202 kloniert. Eine ausführliche Darstellung der Klonierung ist im Anhang zu sehen. Alle rekombinanten Plasmide wurden durch Restriktionsanalvsen überprüft (ohne Abbildung). Das resultierende Mutagenesekonstrukt wurde im Weiteren als pSUP*sprS*Gm ($\Delta sprS::\Omega$ -Gm^r in pSUP202) bezeichnet. Nach der Transformation des E. coli-Stamms S17-1 mit dem Mutagenesevektor wurde dieser durch konjugativen Transfer nach P. aeruginosa PAO1 überführt. Die Transkonjuganden, die auf Selektivagarplatten mit den Antibiotika Gm, Cm und dem zur Gegenselektion verwendeten Detergenz Irgasan (25 µg/ml) wachsen konnten, enthielten den Mutagenesevektor durch homologe Rekombination ins Genom integriert, da dieses als pSUP202-Derivat in P. aeruginosa nicht replizieren konnte. Als Folge der homologen Rekombination bildet sich im bakteriellen Genom ein Cointegrat. Die Entfernung dieses Cointegrats erfolgte nach einem zweiten *crossing-over* (Rekombinations)-Ereignis, das durch den Verlust der Chloramphenicol-Ampicillin-Resistenz des Vektoranteils selektierbar war. Zur Anreicherung der Zellen ohne chromosomal integrierten Vektoranteil wurden die Chloramphenicol-Ampicillin-resistenten Transkonjuganden zweimal üN in 5 ml LB-Medium (2.4.1) mit 30 µg/ml Gentamycin angezogen. 10 ml LB-Medium wurden mit der Menge der zweiten ÜK inokuliert, dass die Zelldichte einer $OD_{580nm} = 0,01$ entsprach und die Kultur bei 37 °C und 150 UpM bis zu einer $OD_{580nm} = 0,1$ bebrütet. Nach anschließender Zugabe von Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 150 µg/ml wurde die Kultur weitere 1,5 h bebrütet. Chloramphenicol ist ein bakteriostatisch wirkendes Antibiotikum, das die Bindung der Aminoacyl-tRNAs durch Bindung an die 30S-Untereinheit hemmt und so die Proteinbiosynthese inhibiert. Darauf folgte die Zugabe von Cycloserin in einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml und weitere 3 h Bebrütung bei 37 °C, um die Chloramphenicol-resistenten teilungsfähigen Zellen lysieren, während zu die Chloramphenicol-sensitiven Zellen aufgrund der bakteriostatischen Wirkung des Chloramphenicols teilungsinaktiv waren. Anschließend wurden 2 ml der Kultur zentrifugiert (2 min, 8000 UpM, EZ, RT), das Pellet zweimal mit 1 ml 150 mM NaCl gewaschen um Antibiotikareste zu entfernen und 100 µl dieser Bakteriensuspension in den Verdünnungen 10° - 10^{-4} auf LB-Agarplatten (2.4.1) mit und ohne Gentamycin ausplattiert. Anschließend wurden Einzelkolonien durch paralleles Überimpfen auf Gentamycinhaltige LB-Agarplatten mit und ohne Chloramphenicol auf den Verlust des chromosomal integrierten Vektoranteils durchmustert.

2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.6.7.1 Standard-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 von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Triple-Master*-Polymerase der Firma Eppendorf (Hamburg) oder Turbo *Pfu*-DNA-Polymerase der Firma Stratagene (Heidelberg) im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten *Mastercycler Gradient* der Firma Eppendorf (Hamburg) mit dem folgenden Programm durchgeführt: $1 \times (10 \text{ min: } 98 \text{ °C})$; $30 \times (1 \text{ min: } 95 \text{ °C}; 0,5 \text{ min: } 55-65 \text{ °C}$ je nach Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide; 0,5-2 min 72 °C je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments); $1 \times (5 \text{ min: } 72 \text{ °C})$.

2.6.7.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde wie eine Standard-PCR (2.6.7.1) ausgeführt. Abweichend von diesem Protokoll wurde als Matrizen-DNA keine Plasmid oder genomische DNA, sondern stattdessen 30 μ l einer Resuspendierungslösung (1:10 TE-Puffer) einer Einzelkolonie, die für 10 min bei 95 °C erhitzt wurde, eingesetzt.

2.6.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte entweder direkt aus dem Ansatz oder mittels Agarosegelelution (2.6.2), wenn das gewünschte PCR-Produkt zunächst von unspezifischen Nebenprodukten getrennt werden musste. In beiden Fällen wurde die Aufreinigung mittels "Perfectprep Gel Cleanup" Kit der Firma Eppendorf oder mittels "omnipure-OLS DNAGelextraktions Kit" der Firma OMNI Life Science nach Herstellerangaben durchgeführt. Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.6.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

2.7 RNA-Techniken

2.7.1 Standard-Präparation von bakterieller Gesamt-RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde das "RNeasy Mini Kit" der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Handbook 06/2001) verwendet. Es wurde ein Aliquot der Bakterienkultur (~ 2 mL) in der entsprechenden Wachstumsphase geerntet. Das Zellpellet wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zu einer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bei der Isolierung der RNA aus *P. aeruginosa* wurden die sedimentierten Zellen, abweichend vom Standardprotokoll, in 100 μ l lysozymhaltigem TE-Puffer (20 mg Lysozym/ml) resuspendiert und 3 – 5 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde ein DNase-Verdau mit dem "RQ1 RNase-free DNase Kit" der Firma Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die isolierte DNA-freie RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.7.2 Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte photometrisch mit Hilfe des BioPhotometers der Firma Eppendorf (Hamburg) nach Herstellerangaben in einer TrayCell Küvette der Firma Hellma (Jena).

2.7.3 Reverse Transkription von RNA mit anschließender *real time*-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 *real time*-PCR quantifiziert. Dazu wurde das "QuantiTect SYBR-Green One Step PCR Kit" der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden für die *real time*-PCR jeweils Ansätze zu 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Die notwendigen Oligonukleotidstartermoleküle (2.3) für die reverse Transkription der RNA sowie für die anschließende *real time*-PCR mit der gebildeten cDNA als Matrize wurden mit Hilfe der "Primer3"-Software (2.31) designed.

Die Programmeinstellungen waren folgende:

U	e	0	
Produktlänge:		100 – 150 bp	
Primerlänge:		18 – 22 bp	(optimal: 20 bp)
GC-Gehalt:		40 - 60 %	(optimal: 50 %)
Schmelztemperat	ur der Primer:	55 – 60 °C	(optimal: 57 °C)
Schmelztemperat	ur des Produkts:	65 – 85 °C	(optimal: 75 °C)

Die *real time*-PCRs wurden in einem "ep gradient S realplex⁴" Automaten der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt.

2.8 Zellaufschluss zur Proteinisolierung

Gekühlte Zellsuspensionen mit einem Volumen von bis zu 2 ml wurden mit Hilfe von Ultraschall lysiert. Dazu wurde ein Sonifier 250 der Firma Branson mit MS72 Sonotrode bei 80 W und 50 Zyklen/min für 5 min (zweimal 2,5 min) verwendet.

2.9 Gewinnung von Kulturüberständen

Zur Gewinnung von Kulturüberständen für die anschließende Bestimmung der Proteinzusammensetzung durch eine SDS-PAGE (2.19) wurden je 2 ml der Überexpressionskulturen abgenommen. Nach Bestimmung der Zelldichte durch Messung der OD_{580nm}, wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 5000 UpM, RT) sedimentiert. Der Kulturüberstand wurde vorsichtig abgenommen und im Bedarfsfall sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter: 0,2 μ m Porendurchmesser).

2.10 Präzipitation von Proteinen durch Trichloressigsäure-Fällung (Peterson, 1977)

Für die Fällung der löslichen Proteine wurden 1 Volumen Proteinlösung und 0,5 Volumen 40 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) in 70 % (v/v) Aceton versetzt und üN bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 16000 × g und RT für 30 min sedimentiert und das Sediment mit 80 % Aceton gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in einer Vakuumzentrifuge (alternativ 15 min bei 65 °C) getrocknet und entsprechend dem

Volumen der eingesetzten wässrigen Proteinprobe, in SDS-Probenpuffer (2.19) aufgenommen. Ein durch TCA-Reste auftretender Farbumschlag des SDS-Probenpuffers von blau zu gelb konnte durch Zugabe von 1 μ l 1 M NaOH abgepuffert werden. Die so behandelten Proteinproben wurden durch eine SDS-PAGE (2.19) analysiert.

2.11 Herstellung von Sphäroblasten (Witholt et al., 1976)

Es wurden Zellen einer ÜK, bei einer Zelldichte $OD_{580nm} = 5$, geerntet (15 min, 6.000 UpM, 4 °C), in 1 ml Puffer A (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 % (w/v) Saccharose) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 1 ml Puffer B (Puffer A + 5 mM EDTA) und 10 µl Lysozym (2 mg/ml) dazugegeben und für 30 min bei RT inkubiert.

2.12 Herstellung der Periplasma-, Cytoplasma- und Membranfraktion (Pedrotta & Witholt, 1999)

Die generierten Sphäroplasten (2.11) wurden für 20 min zentrifugiert (10.000 x g) und der Überstand als Periplasmafraktion weiter verwendet. Die sedimentierten Sphäroplasten wurden in 1 ml Puffer C (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM MgCl₂) resuspendiert und DNase (0,01 mg/ml) zugefügt. Die Sphäroplasten wurden durch Ultraschall aufgeschlossen (Branson-Sonifier W250, 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt) und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, $3.500 \times g$, 4 °C) entfernt. Gesamtmembranfraktionen wurden durch Zentrifugation (1 h, 14.000 × g, RT) sedimentiert und der resultierende Überstand als Cytoplasmafraktion genutzt. Die Gesamtmembranen wurden in 20 µl Puffer D (100 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert.

2.13 Membranfraktionierung

Präparierte Gesamtmembranfraktionen (2.12) wurden mit 2 % (w/v) Laurylsarcosin gemischt und 1 h bei RT inkubiert, um die innere Membran selektiv zu solubilisieren. Anschließend wurde die äußere Membran durch Zentrifugation (3 h, 17000 × g, RT) sedimentiert und entsprechend dem Volumen der eingesetzten wässrigen Proteinprobe in SDS-Probenpuffer (2.19) aufgenommen.

2.14 Löslichkeitsanalysen von Proteinen

Um festzustellen, ob Proteine in Lösung oder als Präzipitat vorlagen, wurden die zu untersuchenden Proben zentrifugiert (15 min, 13.000 UpM, RT). Der Überstand wurde vorsichtig von dem Sediment getrennt und die Proteinkonzentration beider Fraktionen durch eine SDS-PAGE (2.19) untersucht.

2.15 Reinigung von inclusion bodies der Protease

Die Zelldichte der die *inclusion bodies* enthaltenden Kultur wurde bestimmt und die Zellen sedimentiert (30 min, 13.000 UpM, 4 °C). Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen Zellaufschlusspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert und aufgeschlossen (Branson-Sonifier W250, 5 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 13.000 UpM, 4 °C) wurde das Sediment, welches die gereinigten *inclusion bodies* enthielt, in entsprechendem Volumen Zellaufschlusspuffer aufgenommen. Die Ausbeute und der Erfolg der Reinigung wurden durch eine SDS-PAGE (2.19) analysiert.

2.16 *In vitro*-Faltung von SprS aus *inclusion bodies*

Die gereinigten *inclusion bodies* wurden in 8 M Harnstoff aufgenommen und durch Inkubation für 15 min bei RT vollständig denaturiert und anschließend zentrifugiert (1 min 13.000 UpM, RT), um die ungelösten Proteine zu sedimentieren. Daraufhin wurden der Überstand 1:10 im Rückfaltungspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 M NaCl; 0,5 % N-Dodecyl-N,N-Dimethyl-1-Ammonio-3-Propansulphonat (SB-12)) verdünnt. Nach Inkubation für verschiedene Zeiten (3 h, 8 h, 24 h und 48 h) wurde der Ansatz einem Enzymaktivitätstest (2.23) unterzogen, um den Erfolg der *in vitro*-Rückfaltung zu überprüfen.

2.17 Affinitäts-Chromatographie (IMAC) (Porath et al., 1975)

Bei diesem weit verbreiteten System werden die Zielproteine mit einem kurzen Poly-Histidinfusioniert und nach erfolgter Synthese mittels immobilisierter Metalltag Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt. Die IMAC basiert auf der Interaktion zwischen immobilisierten, divalenten Kationen (Ni2+, Co2+, Cu2+, Zn2+) und den Seitenketten bestimmter Aminosäuren, üblicherweise Histidinen, Nitrilo-3-Essigsaure (NTA) stellt heute die gebräuchlichste Chelatgruppe für die Reinigung von Proteinen mit Histidinresten dar (Hochuli et al., 1987). NTA kann vier der sechs Bindungsstellen eines Ni²⁺-Ions belegen, wodurch dieses sehr stabil an die Matrix gebunden wird und selbst unter stringenten Reinigungsbedingungen nicht von der Matrix gewaschen wird. Zur Elution der gebundenen Poly-Histidin-Fusionsproteine bestehen zwei Möglichkeiten. Durch Senkung des pH-Wertes werden die Seitenketten der Histidine protoniert (pH 4,5-5,3) und können nicht mehr als Elektronendonor mit der Ni²⁺-NTA-Matrix interagieren. Darüber hinaus können die Histidinreste der Fusionproteine durch Waschen mit Imidazol-haltigen Puffern von der Ni²⁺-NTA-Matrix verdrängt werden.

2.18 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen von Gesamtzellexrakten (GZE) wurden nach den Methoden von Bradford (1976) oder mit Hilfe des "BCA Protein Assay" (Pierce, Rockford, USA) ermittelt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

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

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli et al. (1970) bestehend aus einem 5 % Sammel- und einem 16 % Trenngel. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau 2%(v/v)Glycerin[.] R-250) aufgenommen und vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Gelapparatur "Mini Protean II Dual Slap Cell" der Firma Bio-Rad (München) bei einer Spannung von 100-200 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nach Merril (1990) mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg). Gering konzentrierte Proteinproben wurden vor der Gelelektrophorese durch TCA-Fällung nach präzipitiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.19.1 Isoelektrische Fokussierung

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden die Immobiline DryStrips (Firma Amersham), pH 3-11, 13 cm, verwendet. Die IEF-Strips wurden 20 Stunden in Rehydratisierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die IEF-Streifen wurden in dem Gerät positioniert, die Elektrodenstrips in Wasser getränkt und auf die Enden der IEF-Strips gelegt. Danach wurden die *sample cups* auf den IEF-Strip positioniert. Am Ende wurden die Elektroden in die richtige Lage gebracht und der Lauf gestartet.

2.19.2 Zweite Dimension

Äquilibrierung

Bevor die IPG-Streifen in der zweiten Dimension getrennt werden können, müssen diese mit SDS beladen und mit DTT und Jodacetamid behandelt werden. Dazu inkubiert man die IPG-Streifen je zweimal 10 min in 10 ml Äquilibrierungspuffer in einem Reagenzglas unter leichtem Schütteln. Im ersten Schritt wird mit 1 % DTT behandelt, im zweiten Schritt mit 4 % (w/v) Jodacetamid.

Auftrennung

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt in vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gelen. Die Laufbedingungen bei 20 °C mit betragen 15 mA/Gel für 15 min, danach wird die Stromstärke auf 50 mA/Gel für 4-5 h erhöht, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat.

2.20 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (nach Wilson & Juan, 1989)

Die durch SDS-PAGE (2.19) aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der *Mini-Transfer-Blot Elektrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran 1 min in Methanol, dann für 5 min in A. dest. und abschließend für 10 min in Dunn-Carbonat-Puffer (10 mM NaHCO₃, 3mM Na₂CO₃, 20 % (v/v) Methanol) equilibriert. Das SDS-PAGE-Gel wurde für 10 min in Dunn-Carbonat-Puffer equilibriert. Der Transfer der Proteine erfolgte in Dunn-Carbonat Puffer 15 min bei 150 mA und weitere 20 min bei 300 mA.

2.21 Immunodetektion von Proteinen

Nach Übertragung von Proteinen auf eine PVDF-Membran konnten diese Proteine immunologisch nachgewiesen werden. Die Hybridisierung erfolgte unter Verwendung eines spezifischen Antiserums (Anti-His-(C-term)-Antikörper Invitrogen GmbH, Karlsruhe), welches mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Unter Verwendung des Enhanced-Chemo-Luminescence (ECL) Western-Blotting-Detektionssystems (ECL Western Blotting Detection System) der Firma Amersham erfolgte die Visualisierung. Dabei wurde durch eine Peroxidase-katalysierte Reaktion Chemolumineszenz erzeugt, die photographisch detektiert wurde. Dazu wurde die PVDF-Membran nach dem Transfer der Proteine für 1 h bei 30 °C mit TBST-Puffer (Tween 20 in 1-fach TBS-Puffer 0,2 % (v/v)) mit 3 % (w/v) Magermilchpulver schüttelnd blockiert, um freie Bindugsstellen der Membran abzusättigen. Nach 15 min Waschen in TBST-Puffer bei 30 °C wurde die Membran für 1 h mit dem spezifischen Anti-Histidin-Antikörper (1/5000) bei 30 °C leicht geschüttelt. Durch zweimaliges 25 min Waschen in TBST-Puffer wurde der nicht gebundene Antikörper entfernt. Das auf der Membran gebundene Protein konnte anschließend indirekt, über die gebundene HRP mit Hilfe des ECL-Systems, nachgewiesen werden. Dieses wurde nach den Herstellerangaben verwendet. wobei die Dokumentation photographisch. mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage, erfolgte.

2.22 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

2.22.1 Tryptischer in-Gel-Verdau von Proteinen

Ausgewählte Proteinbanden wurden aus SDS-Gelen mit einem Skalpell ausgeschnitten, in 1,5 ml EPG überführt und die Proteine anschließend im Gel mit Trypsin behandelt (Fountoulakis & Langen, 1997). Die Gelstücke wurden durch mehrmaliges Waschen mit 350 μ l 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat unter permanentem Schütteln bei 1200 UpM entfärbt. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstücke anschließend für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wurden die Gelstücke in 6 μ l 3 mM Tris-HCl, pH 8,8, mit Trypsin (20 ng/ μ l Endkonzentration) rehydratisiert und üN bei RT inkubiert. Die zu unterschiedlich großen Peptidfragmenten abgebauten Proteine wurden durch Zugabe von 2 μ l A. dest., 15-minütiger Inkubation bei RT, Zugabe von 5 μ l 30 % (v/v) Acetonitril mit 1 % (v/v) Trifluoressigsäure und weiterer 15-minütiger Inkubation im Ultraschallbad aus den Gelstücken eluiert. Die Proben wurden direkt analysiert oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.22.2 Bestimmung der Peptidmassen

Für die Messung wurde 1 μ l der Peptidlösung auf die PAC96 (*Prespotted Anchor Chip*)-Platte der Firma Bruker Daltonics (Bremen) aufgetragen, auf der die HCCA (α -Cyano-4-hydroxytrans-Zimtsäure)-Matrix bereits vorhanden ist. Die Peptidlösung wurde für 3 min auf der HCCA-Matrix inkubiert. Nach Zugabe von 7 μ l einer 0,1 M Ammoniumphosphatlösung in 0,2 % Trifluoressigsäure und einer Inkubation von 5 s wurde die gesamte Flüssigkeit von der Matrix entfernt. Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels Peptidmassen-*Fingerprint*-Analyse (Fountoulakis & Langen, 1997; Nouwens *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001).

2.23 Enzymaktivitätstests

2.23.1 Proteaseaktivität: Skim-Milk-Indikatorplatten

Der Nachweis von Proteaseaktivität erfolgte auf Skim-Milk-Agar. Dazu wurden ÜK von *E. coli* und *P. aeruginosa* durch Zentrifugation (2 min, 13.000 UpM, RT) sedimentiert. Für die Betrachtung der Proteaseaktivität der ganzen Zellen wurde das Sediment in Zellaufschlußpuffer aufgenommen, so dass die Zelldichte einer OD_{580nm} = 10 entsprach. 0,5 μ l des GZE wurden auf Skim-Milk-Indikatorplatten aufgebracht. Die Skim-Milk-Indikatorplatten wurden 16 h bei 37 °C inkubiert. Das dem Agar zugesetzte Magermilchpulver enthält Casein, das von Proteasen als Substrat erkannt und abgebaut wird. Proteaseaktivität konnte als klarer Hof um die aufgetragenen Proben erkannt werden.

2.23.2 Gel-basierte Detektion der Proteaseaktivität

Neben Skim-Milk-Indikatorplatten (2.23.1) wurde proteolytische Aktivität auch mittels Novex® Zymogramm-Gelen (Blue Casein) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) detektiert. Dazu wurden 12,5 μ l zellfreier Kulturüberstand mit 12,5 μ l 2 × SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 0,005 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250) versetzt und ohne aufzukochen in den Casein-haltigen Gelen elekrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Proteasen erfolgte nach Herstellerangaben.

2.23.3 Colorimetrischer Nachweis von Proteaseaktivität

Der colorimetrische Nachweis der Proteaseaktivität wurde mit dem Substrat *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilid (DelMar *et al.*, 1979) der Firma Sigma (Seelze) untersucht. Dieses Substrat wird spezifisch von Proteasen der Serinprotease-Familie umgesetzt. Der Test basiert auf der enzymatischen Spaltung des 4-Nitroanilid-Substrates zu 4-Nitroanilin. Die Spaltung des Substrates verursacht einen Farbumschlag von farblos zu gelb, der bei 410 nm photometrisch gemessen werden kann. Es wurde eine 10 mM Lösung des Substrats in 0,2 M Tris-HCl Puffer, pH 8, hergestellt und unmittelbar verwendet. Die Versuche wurden in 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Bestimmung des Farbumschlages bei OD_{410nm} erfolgte daraufhin im Plattenphotomoter.

2.23.4 Nachweis der β-Galaktosidase Aktivität (ONPG-Test) (Miller, 1972)

Das *lacZ*-Gen aus *E. coli* kodiert für die β -Galaktosidase. Beim ONPG-Test ersetzt das synthetische Galactosid *o*-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) Laktose als das natürliche Substrat der β -Galaktosidase. Es wird wie die Laktose durch die Galaktosid-Permease in die Zelle hineingebracht und durch die β -Galaktosidase hydrolysiert. Hierbei entstehen die Reaktionsprodukte Galaktose und *o*-Nitrophenol. Letzteres verursacht eine Gelbfärbung und ist photometrisch messbar (420 nm). Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde in Toluol-permeabilisierten Zellen mit im Spektralphotometer (NovaspecII, Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 420 nm nach Miller (1972) bestimmt.

4 x Z-Puffer:	21,36 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 1,49 g/l KCl, 0,49 g/l MgSO ₄		
Stopp-Puffer:	5,3 g Na ₂ CO ₃ ad 50 ml A. dest.		
Aufschlusspuffer:	3 ml 4 x Z-Puffer, 42 μl β -Mercaptoethanol, 22,5 μl 20 % (w/v) SDS-Lösung		
ONPG-Lösung:	42 mg ONPG, 735 μ l β -Mercaptoethanol, 13,13 ml 4 x Z-Puffer ad 50 ml A. dest.		

Für die Probenentnahme wurden aus *P. aeruginosa* Vorkulturen Hauptkulturen (2.5) auf eine Zelldichte entsprechend einer $OD_{580nm} = 0,1$ angeimpft. Stündlich wurden Proben der Hauptkultur entnommen, die OD_{580nm} bestimmt und diese bei -20 °C gelagert. Zur Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität wurden 400 µl der entnommenen Proben mit 25 µl Chloroform und 25 µl Aufschlusspuffer versetzt. Der Ansatz wurde 10 sec gevortext und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Mit der Zugabe von 400 µl ONPG-Lösung wurde die β-Galaktosidase-Reaktion gestartet. Der Ansatz wurde inkubiert bis eine deutliche Gelbfärbung auftrat. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl Stopp-Puffer abgestoppt. Der Reaktionsansatz wurde daraufhin für 10 min bei 13000 UpM sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und in eine Küvette überführt. Als Leerwert wurden 400 µl LB-Medium verwendet, dem unmittelbar 400 µl ONPG-Lösung und 400 µl Stopp-Puffer zugegeben wurde. Die β-Galaktosidase-Aktivität in Miller Units wurde nach der Formel berechnet:

Aktivität
$$\left[\frac{\text{Miller Units}}{\text{min}}\right] = \frac{\text{O.D.}_{420 \text{ nm}}}{\text{O.D.}_{580 \text{ nm}}} \times \frac{\text{V}_{\text{ges}} \times 1000}{\text{V}_{\text{Probe}} \times t \text{ [min]}}$$

(Vges: Volumen des Ansatzes, VProbe: Volumen der Probe, t: Inkubationszeit)

2.24 Qualitative und Quantitative Messung der Biofilmproduktion

Der Test wurde in *Multiwell*-Platten durchgeführt. Aus einer Vorkultur wurde jedes *well* mit einer Zellzahl entsprechend einer $OD_{580nm} = 0,1$ inokuliert. In jedes *well* wurde 1 ml dieser Kulturen für 16 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurden ebenfalls *wells* mit 1 ml LB-Medium angesetzt. Nach der Inkubation wurden die Kulturen mit 200 µl einer 1 % (w/v) Kristallviolett-Lösung angefärbt. Das Kristallviolett färbt nur die Zellen an, nicht aber die Plastikoberfläche der Platte. Die Platten wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mehrfach mit A. dest. gewaschen. Die Dokumentation des am Rand der *wells* gebildeten Biofilms erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage.

Für die quantitative Messung der Biofilmproduktion wurde das Kristallviolett mit 95 % Ethanol bei RT unter leichtem Schütteln extrahiert. Diese Lösung wurde dann in Küvetten überführt und die OD_{600nm} in einem Spektralphotometer bestimmt.

2.25 Bestimmung der Lipase-Aktivität

Zum spektrophotometrischen Nachweis der Lipase-Aktivität wurden 30 mg *p*-Nitrophenylpalmitat (*p*NPP) in 10 ml Isopropanol gelöst und mit 90 ml Sørensen-Phosphatpuffer (85 ml 50 mM Na₂HPO₄; 5 ml 50 mM KH₂PO₄; 207 mg NaDOC; 100 mg Gummi Arabicum; pH 8) gemischt. Kulturüberstände wurden mit 2,5 ml der Substratemulsion 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 410 nm.

2.26 Drop-collapse-Test

10 μ l des KÜ einer ÜK, die in LB-Medium bei 37 °C inkubiert wurde, wurde auf eine Petrischale pipettiert (Lindum *et al.*, 1998). Die Form des Tropfens gibt eine Aussage über das Vorhandensein von Biodetergenzien. Je mehr Biodetergenz in dem KÜ vorhanden ist, desto geringer ist die Oberflächenspannung.

2.27 Hämolysetest

500 µl Citrat-Blut vom Kaninchen wurden ingesamt dreimal mit 10 ml PBS-Puffer (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄) gewaschen (5 min, 1000 × g, 4 °C). Die zu testenden *Pseudomonas*-Stämme wurden für einen Tag auf LB-Agarplatten angezogen. Anschliessend wurde eine Flüssigkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer Kulturdichte von OD_{580nm} 3 inkubiert. 1ml der Kultur wurde pelletiert und in PBS auf eine OD_{580nm} von 0,5 eingestellt. 200µl der eingestellten Bakterien wurden schliesslich mit 800µl der Blutsuspension versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente PBS ohne Bakterien. Die Hämolyse durch die untersuchten *Pseudomonas*-Stämme wurde durch Messen der OD_{546nm} verglichen.

2.28 Hämagglutinationstest (HAT)

Die hämagglutinierende Aktivität von SprS wurde mittels HAT nach Glick & Garber (1983) in Mikrotiterplatten (Rundboden, Nunc, Wiesbaden) ermittelt. Zur Gewinnung der Erythrozyten wurde Citrat-Blut vom Kaninchen zentrifugiert (15 min, 2.000 × g, RT). Die Erythrozyten wurden 3-mal in PBS-Puffer (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄) gewaschen und in der Menge PBS-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µl der Zellsuspension zu 50 µl der GZE (dreifache Verdünnungsreihe) folgte die Inkubation für 1 h bei RT. Nach Inkubation wurden die Erythrozyten durch Zentrifugation sedimentiert (30 sec, 1.000 × g, RT) und die hämagglutinierende Aktivität optisch bestimmt.

2.29 Virulenzmodell Arabidopsis thaliana (Starkey & Rahme, 2009)

Zur Untersuchung der Virulenz verschiedener *P. aeruginosa*-Stämme wurde der Modellorganismus *A. thaliana* mit den zu untersuchenden Stämmen infiziert und die Vermehrung der Bakterienzellen quantifiziert. Es wurden 4 – 6 Wochen alte, gesunde *A. thaliana* eingesetzt. Die *P. aeruginosa* Hauptkultur wurde aus einer 1:100 verdünnten Vorkultur hergestellt und bei 37 °C bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer OD_{580nm} = 3 entsprach, kultiviert. Es wurden 2 ml der Kultur abgenommen und diese 2 min bei 6000 UpM sedimentiert. Das Sediment wurde in 1 ml einer 10 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen und erneut 2 min bei 6000 UpM sedimentiert.

Daraufhin wurde das Sediment in 1 ml der 10 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen und die Zelldichte bestimmt. Es wurde eine 10 ml MgSO₄ Lösung hergestellt mit 2×10^6 Zellen/ml, entsprechend einer $OD_{580nm} = 0.002$. Diese Lösung wurde in eine Spritze gefüllt und vorsichtig auf die Blattunterseite aufgetragen, ohne das Blatt zu verletzen. Durch die geöffneten Stomata des Blattes konnte die Lösung in das Blatt eindringen. Anschließend wurden die Pflanzen getrennt voneinander in Gefäße mit 500 ml Wasser überführt und mit einer Plastikhaube bedeckt. Die behandelten Pflanzen wurden bei 29 – 30 °C und maximalem Feuchtigkeitsgehalt für 4 Tage mit einer täglichen Photoperiode von 12 h inkubiert. Zur Quantifizierung des Infektionsverlaufes wurde die Anzahl vorhandener Bakterienzellen bestimmt. Bereits am Tag der Infektion wurden bereits von jeder Pflanze infizierte Blätter geerntet und die Zahl inokulierter Bakterien bestimmt, um zu überprüfen, ob alle Blätter mit ähnlichen Zellzahlen infiziert wurden. Zur Bestimmung der Bakterienzellzahl wurden kleine Stücke aus den geernteten Blättern ausgestanzt. Die ausgestanzten Blattstücke wurden zu 1 ml der 10 mM MgSO₄-Lösung gegeben und die Bakterien durch starkes Schütteln von der Blattoberfläche gewaschen. Die Blattstücke wurden daraufhin kurz mit einem Tuch abgetrocknet und zu 300 µl der 10 mM MgSO₄ Lösung gegeben. Das Blattmaterial wurde mit einem Mörser zu einer homogenen Masse zerkleinert. Anschließend wurden nochmals 700 µl der 10 mM MgSO₄-Lösung zugegeben. Von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und 20 µl jeder Verdünnung auf LB-Agarplatten ausplattiert. Diese wurden üN bei 37 °C inkubiert und am darauffolgenden Tag die CFUs/ml (colony-forming units) bestimmt.

2.30 Virulenzmodell Drosophila melanogaster

Die Pathogenität verschiedener Stämme von *P. aeruginosa* wurde anhand eines Tiermodells überprüft. Als Wirtsorganismus wurde hierbei die Taufliege *Drosophila melanogaster* eingesetzt. Zur Infektion der Tiere wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet, die im Folgenden beschrieben werden.

2.30.1 Needle pricking (Apidianakis & Rahme, 2009)

Aus einer ÜK des zu überprüfenden *P. aeruginosa*-Stamms wurde eine Hauptkultur auf eine Zelldichte von $OD_{580nm} = 0,05$ beimpft und bis zu einer $OD_{580nm} = 3$ bei 37 °C kultiviert. Zellen aus 1 ml der Kultur wurden durch Zentrifugation bei 11000 rpm für 2 min sedimentiert, anschließend in 10 mM MgSO₄ gewaschen und in dem Volumen 10 mM MgSO₄ aufgenommen, dass eine Zelldichte entsprechend einer $OD_{580nm} = 0,03$ erreicht wurde. Diese Suspension wurde für die Infektion der mit CO₂-anästhesierten Tiere weiterverwendet. Hierzu wurde eine sterile Wolframnadel in die Bakteriensuspension eingetaucht und anschließend zentral entlang der anteroposterioren sowie dorsoventralen Achse in den Thorax 5-7 Tage alter Fliegen gestochen, wobei etwa 100 Bakterienzellen übertragen wurden. Für jeden untersuchten Stamm wurden 2-4 Tiergruppen von jeweils 20 Fliegen eingesetzt. Zur Bestimmung der Überlebensraten wurde 20 h nach Infektion mit der Auszählung der Anzahl lebensfähiger und toter Fliegen begonnen.

2.30.2 Feeding (Lutter et al., 2008)

Aus einer ÜK des zu untersuchenden Stamms wurden 2 ml einer Bakteriensuspension erstellt, die eine Zelldichte entsprechend einer $OD_{580nm} = 3$ aufwies. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert, in 175 µl 5 % Saccharose resuspendiert und auf ein Whatman-Filter (\emptyset =2,3 cm) gegeben. Kulturröhrchen wurden mit 5 ml 2,4 % Agar befüllt, der

zusätzlich 5 % Saccharose enthielt und die Bakterienfilter auf die Agaroberfläche gelegt. Anschließend wurden je Stamm 15 3-5 Tage alte Tiere, die zuvor für 5 h ohne Nahrung und Wasser gehalten wurden, in die Röhrchen gegeben, die anschließend verschlossen und bei 25 °C inkubiert wurden. Die Überlebensrate wurde täglich durch Auszählen der lebensfähigen Tiere bestimmt. Die Versuchsreihen wurden insgesamt 3-mal pro Stamm durchgeführt.

2.31 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde durch die Computerprogramme *CLONE Manager for Windows 7 (Scientific and Eductional Software)* und diversen Anwendungen des *Expert Protein Analysis-Systems (Gasteiger et al., 2003)* unterstüzt. Homologievergleiche wurden mit den *BLAST-Algorithmen* des *NCBI-Servers* (Altschul *et al., 1997)* oder *ClustalW* (Larkin *et al., 2007)* durchgeführt.

DNA-Sequenzinformationen bzw. Informationen über Peptidasen von *P. aeruginosa* wurden von dem *Pseudomonas-Genome Project* (Winsor *et al.*, 2009) bzw. der *MEROPS*-Datenbank (Rawlings *et al.*, 2008) bezogen. Abbildungen von Proteinstrukturen wurden mit dem Programm UCSF Chimera (University of California, San Francisco, USA) (Pettersen *et al.*, 2004) dargestellt. Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit dem *PSIpred* Algorithmus erstellt (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurden Ergebnisse mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage digitalisert und elektronisch in das Manuskript eingebunden. Im Verlauf der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Veränderungen der Abbildungen vorgenommen. Die Dokumentation und Verarbeitung von SDS-PAGE erfolgte mit Hilfe der *STELLA*- sowie *AIDA-Software* der Firma Raytest. Die Oligonukleotide für die *real time*-PCR wurden mit der *Software Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu) konstruiert. Die *real time*-PCR-Ergebnisse wurden mit Hilfe der *realplex-Software* der Firma Eppendorf ausgewertet.

Für Sequenz- und Datenbankrecherchen im Internet wurden folgende Adressen genutzt:

ExPASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.org	
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov	
Pseudomonas Genome Project	http://www.pseudomonas.com	
MEROPS - the Peptidase Database	http://merops.sanger.ac.uk	
PSIPRED	http://bioinf.cs.ucl.ac.	
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk	

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung eines offenen Leserahmens pa3535

Durch Sequenzanalysen mit dem C-Terminus der Esterase EstA aus Pseudomonas aeruginosa konnte ein weiterer ORF im Genom des Bakteriums identifiziert werden, dessen Genprodukt Homologien zu bekannten Autotransporter-Proteinen aufweist. Durch Sequenzanalysen und Homologievergleiche mittels BLAST (Altschul et al., 1997; Marchler-Bauer et al., 2009) wurden drei konservierte Bereiche für das durch den ORF pa3535 kodierte, putative Protein identifiziert (Abbildung 3.1a). Am N-Terminus des Proteins befindet sich eine PeptidaseS8-Domäne, die charakteristisch für Subtilisin-ähnliche Serinproteasen (Subtilasen) ist. Die MEROPS-Datenbank (Rawlings et al., 2008) sagt eine katalytische Triade in Form der Aminosäuren Asp (79) / His (122) / Ser (308) voraus. Das Protein besteht aus 995 Aminosäuren, hat ein theoretisches Molekulargewicht von 105 kDa und das kodierende Gen umfasst 2987 bp. Ausgehend von einer putativen Signalsequenz von 30 AS, wurde eine molekulare Masse von 101 kDa für das native Protein errechnet. Im Folgenden wird das Gen sprS und das durch dieses Gen kodierte Protein als SprS (Serinprotease S) bezeichnet (Serci, 2006; Hardie et al., 2009). Der C-terminale Bereich weist den für Autotransporter (AT) charakteristischen konservierten Bereich auf. Anhand der Aminosäuresequenz von SprS wurde eine Sekundärstrukturvorhersage mit Hilfe des **PsiPred-Servers** erstellt (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred), die in Abbildung 3.1b modifiziert dargestellt ist. Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht des Proteins mit seinen konservierten Bereichen. Das Protein beinhaltet das für Subtilisin-Proteasen charakteristische GTSMA-Motiv, sowie die konservierten Bereiche der beiden anderen AS der katalytischen Triade Histidin und Aspartat. Des Weiteren ist das Vorkommen von nur wenigen (2 in SprS) Cysteinen typisch für Autotransporter. Im C-terminalen Bereich befindet sich eine Vielzahl an β -Faltblättern. Anders als die α -helikalen Transmembran-Untereinheiten der inneren Membran besitzen die Proteine der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien keine hydrophoben Segmente, die lang genug wären, diese zu durchspannen.



Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des Aufbaus von SprS. (a) Die Darstellung beruht auf der Aminosäuresequenz des Volllängenproteins SprS. Das Volllängenprotein kann in vier Bereiche gegliedert werden: die Signalsequenz (I), die PeptidaseS8 Domäne (Sakai *et al.*), einen Bereich unbekannter Funktion (III) und den C-terminalen Bereich, der für Autotransporterproteine charakteristisch ist. Die Aminosäuren der katalytischen Triade Asn (79) / His (122) / Ser (308) sind in rot dargestellt. (b) Aminosäuresequenz von SprS. In rot gekennzeichnet sind die Aminosäurereste, die die katalytische Triade Histidin, Aspartat und Serin bilden, zwei Cysteine befinden sich in der Passagierdomäne (unterstrichen). In Pfeilen gekennzeichnet sind die β -Faltblatt-Strukturen und in Balken, die α -Helices, die durch das Programm PsiPred vorhergesagt wurden

Die transmembrane Kernregion äußerer Membranproteine besteht hauptsächlich aus antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen, die so angeordnet sind, dass sie wie die Dauben eines Fasses einen wassergefüllten Hohlraum von der lipophilen Umgebung abgrenzen - daher auch der Name β -barrel (β -Fass) für diese Anordnung. Diese Struktur kann man sehr deutlich in den Kristallstrukturen von EstA aus *P. aeruginosa* und NalP aus *N. meningitidis* und der vorhergesagten 3D-Struktur der β -Domäne von SprS erkennen (Abbildung. 3.2).

3.1.1 Sequenzanalysen und Homologievergleiche von SprS

Aufgrund der derzeit fehlenden Röntgenkristallstruktur von SprS wurde ein Modell der Transportdomäne angefertigt (www.sbg.bio.ic.ac.uk./phyre) (Kelley & Sternberg, 2009). Bisher sind die Röntgenkristallstrukturen der beiden AT-Proteine von EstA aus *P. aeruginosa* (van den Berg) und NalP aus *Neisseria meningitidis* (Oomen *et al.*, 2004) bekannt. Diese wurden in Abbildung 3.2 mit der generierten Struktur von SprS verglichen. Der Vergleich verdeutlicht, dass sich die C-Termini der drei AT-Proteine SprS, NalP und EstA in der 3D-Struktur sehr ähneln und somit eine Zugehörigkeit von SprS zur Familie der Autotransporter-Proteine bestätigt wird. Die Membran-durchspannenden β -Faltblätter sind in allen drei Strukturen deutlich zu erkennen. Während eine genaue Aussage über die Anzahl der β -Faltblätter in SprS nicht möglich ist, konnten für EstA aus *P. aeruginosa* und NalP aus *N. meningitidis* 12 β -Faltblätter laut 3D-Struktur bestimmt werden.

Der detaillierte Transportmechanismus der Autotransporter-Proteine über die äußere Membran wird noch diskutiert. Die Funktion der die β -Faltblätter durchspannenden α -Helix wurde bereits in einigen Autotransporter-Proteinen untersucht, und eine Rolle als Faltungshelfer für die Passagierdomäne und-/oder für die Transportdomäne konnte dieser zugesprochen werden (Konieczny *et al.*, 2001; Oliver *et al.*, 2003; Mogensen & Otzen, 2005; Berthiaume *et al.*, 2007). Somit könnte diese Linker-Region die Aufgabe eines Autochaperones einnehmen (Desvaux *et al.*, 2004).



Abbildung 3.2 Generiertes 3-D Strukturhomologiemodell der Transportdomäne von SprS aus *Pseudomonas aeruginosa* (links), Kristallstruktur der Transportdomäne des NalP-Autotransporters aus *Neisseria meningitidis* (nach Oomen *et al.*, 2004) (Mitte) und Kristallstruktur des Volllängenproteins von EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* (van den Berg). Zu sehen sind hier in gold die β -Faltblätter und in rot die membrandurchspannende α -Helix. Die 3D-Struktur von SprS wurde mit Phyre (www.sbg.bio.ic.ac.uk./phyre) (Kelley & Sternberg, 2009) vorhergesagt. Die Strukturen wurden in UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) in der *ribbon*-Darstellung visualisiert.

Unter Verwendung der ExPAsy-Datenbank (Gasteiger *et al.*, 2003) wurde ferner eine BLAST-Analyse durchgeführt, welche die Homologie des *P. aeruginosa* PAO1 Proteins SprS zu zahlreichen Subtilisin-ähnlichen Autotransportern aus anderen *Pseudomonas*-Spezies aufdeckte, u. a. *P. aeruginosa* PA14 Q02R06 (91 % Identität), *P. aeruginosa* PA7 A6V1R0 (87 % Identität), *P. fluorescens* Pf0-1 PrtA (61 % Identität), *P. fluorescens* PspA (61 % Identität) und *P. tolaasii* EprS (60 % Identität). Der hohe Grad der Identität spricht für eine weit verbreitete Konservierung des SprS-Proteins innerhalb der Gattung *Pseudomonas*.

Daneben zeigten sich auch Homologien zu Subtilisin-Autotransporter-Proteinen anderer Bakterien-Spezies, z. B. mit einer Ähnlichkeit von 50 % SSP-h1 und SSP-h2 aus *Serratia marcescens* (Ohnishi *et al.*, 1997), PfaI aus *P. fluorescens* mit 51 % Ähnlichkeit (Hu *et al.*, 2009), SphB1 aus *Bordetella pertussis* mit 43 % Ähnlichkeit (Coutte *et al.*, 2001) sowie AasP aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* mit 41 % Ähnlichkeit (Ali *et al.*, 2008). Die Abbildung 3.3 zeigt ein Alignment der konservierten Bereiche der katalytischen Triade weiterer homologer Proteine aus diversen pathogenen Bakterien-Spezies. Die Verbreitung des Proteins in diesen pathogenen Bakterien könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung an der Virulenz des jeweiligen Organismus sein.

SprS zeigt zudem Homologien zu Subtilisin/Kexin Typ 4-ähnlichen Proprotein-Convertasen (PCs) aus *Homo sapiens* (24 % Identität). Die Proprotein-Convertasen sind wesentlich an der proteolytischen Prozessierung und Reifung vieler physiologisch aktiver Proteine und Peptide (z. B. Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Metallo-Proteinasen und Prohormone) im Sekretionsapparat der Zellen beteiligt. Daneben sind sie aber auch für die proteolytische Aktivierung vieler bakterieller und viraler Pathogene verantwortlich (Steiner, 1998; Seidah & Chretien, 1999).

P. aeruginosa	SprS	GEMDSGFDP	S <mark>H</mark> GTHVGGTLG	NKSGT <mark>S</mark> MAAPHAT
B. pertussis	SphB1	AVVDEGVRS	RHGTSVALVLA	VEQGT <mark>S</mark> LSAPLVT
N. meningitidis	NalP	GIVDTGESV	G <mark>H</mark> IDLVSHIIG	QIAGT <mark>S</mark> FSAPIVT
S. maltophilia		ALFDTGSAL	DHGTHVLGTIG	lktgt <mark>s</mark> maaphit
P. mirabilis		GVMDSGALL	THGTHVTGTVG	TFSGT <mark>S</mark> MAAPHVT
B. thailandensis		GVLDSGYYA	NHGTLVSGVVG	NFNGT <mark>S</mark> AAAPHAS
B. mallei		GVLDSGYYA	NHGTLVSGVVG	NFNGT <mark>S</mark> AAAPHAS
S. marcescens	SSP-h1	GIF <mark>D</mark> QPVYA	- <mark>H</mark> GTHVGGIAA	KYSGT <mark>S</mark> MAAPHVA

Abbildung 3.3 Konservierter Bereich der katalytischen Triade in SprS und homologen Proteinen. Die Aminosäuren der katalytischen Triade Asn (79) / His (122) / Ser (308) sind rot unterlegt, konservierte AS in grün. Homologe Proteine: *B. pertussis* CAC44081, *N. meningitidis* AAN71715, *S. maltophilia* CAQ47536, *P. mirabilis* CAR44626, *B. thailandensis* Q2T5C4, *B. mallei* Q62BN6, *S. marcescens* BAA33455.

3 Ergebnisse

3.2 Klonierung und Expression von sprS

Um das Protein SprS sowohl im homologen als auch im heterologen Organismus produzieren zu können und so dessen biochemischen Eigenschaften zu charakterisieren, wurde das Gen *sprS* durch geeignete Oligonukleotide aus dem Genom des *P. aeruginosa*-Stammes PAO1 amplifiziert und in verschiedene Vektoren kloniert. Zur Überexpression im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) wurde zunächst ein T7-Expressionssystem verwendet, pET*sprS* (Serci, 2006), welches auf dem Vektor pET22b(+) basiert. Die T7-RNA-Polymerase zeichnet sich im Vergleich zu bakteriellen RNA-Polymerasen durch eine sehr hohe Prozessivität aus. Daher können mit T7-RNA-Polymerase-basierten Expressionssystemen sehr hohe Proteinausbeuten erzielt werden (Studier & Moffatt, 1986). Die Überexpression erfolgte in LB-Medium mit Zugabe von 0,4 % Glukose (2.4.1).



Abbildung 3.4 SDS-PAGE-Analyse (12 %) der Überexpression von *sprS* im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3). Die Induktion wurde durch Zugabe von 0,4 mM IPTG gestartet und nach 2 h wurden Proben entnommen. Die aufgetragenen Volumina der GZE wurden auf gleiche Zelldichten bezogen ($OD_{580nm} = 0,15$). Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie Brillant Blue gefärbt. S: Standard (Precision Plus ProteinTM Standard (BioRad)), 1: pET*sprS*, 2: pET22b(+) Leervektor, 3:

S: Standard (Precision Plus Protein^{1M} Standard (BioRad)), 1: pET*sprS*, 2: pET22b(+) Leervektor, 3: pET*sprShis*, 4: pET22b(+) Leervektor.

In den analysierten Gesamtzellextrakten (GZE) der Überexpressionskultur E. coli BL21(DE3)/pETsprS und BL21(DE3)/pETsprShis (enthält einen C-terminalen Hexahistidin-Tag) wurde im SDS-Gel auf der Laufhöhe von etwa 105 kDa nach Induktion eine zusätzliche Proteinbande im Vergleich zur Negativkontrolle E. coli BL21(DE3)/pET22b(+) (Leervektor) sichtbar. Die Genexpression wurde in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{580nm} = 0,6$) durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Die Induktion mittels IPTG führte bereits nach 2 h zu einer starken Überexpression des sprS-Gens, sowohl in der nativen Form als auch mit C-terminalem Hexahistidin-Tag, der die affinitätschromatographische Aufreinigung mittels IMAC (immobilisierte Metall- Affinitätschromatographie) ermöglicht. Zur Trennung der einzelnen Proteinfraktionen wurden die Zellen aufgeschlossen und aus dem GZE zunächst die Zelltrümmer durch niedertourige Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert. Bei diesem Schritt sedimentierten neben Bestandteilen der Membranen die sog. inclusion bodies aus unlöslichen, fehlgefalteten Proteinen, der Überstand stellte die lösliche Proteinfraktion dar. Die anschließende Analyse der Löslichkeit der rekombinanten Proteine ergab, dass der weitaus größte Proteinanteil in Form unlöslicher inclusion bodies akkumuliert (Abbildung 3.4). Da die Expression beider Gene vergleichbar ist, ist davon auszugehen, dass die Bildung der inclusion bodies durch den angefügten Hexahistidin-Tag weder ausgelöst noch gehemmt wurde. Membranproteine, wie Autotransporter-Proteine besitzen aufgrund ihres membranständigen Aufbaus große hydrophobe Strukturelemente, die dazu führen, dass es bei der heterologen Expression dieser Proteine recht häufig zur Bildung unlöslicher Einschlusskörper kommt.

Es wurde im Weiteren versucht, die Expression von *sprS* zu optimieren, indem verschiedene Parameter wie die Temperatur, die IPTG-Konzentration oder die Mediumzusammensetzung verändert wurden. Es war jedoch nicht möglich, die Expression so zu verändern, dass das Protein in ausreichend großer Menge nativ vorlag. Da die entstandenen *inclusion bodies* katalytisch inaktives Protein enthalten, wurde versucht nach vollständiger chemischer Denaturierung durch 8 M Urea eine *in vitro*-Rückfaltung (2.16) durchzuführen, so dass das Protein in einem katalytisch aktiven Zustand überführt wird. Dazu wurde zunächst eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durch eine immobilisierende Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) durchgeführt. Für diese Reinigungsmethode wurde die Proteinvariante genutzt, die mit einem C-terminalen Hexahistidin-*Tag* fusioniert ist, um sie anschließend über eine Ni²⁺-NTA-Matrix aufreinigen zu können (2.17). Der Reinigungsverlauf der IMAC ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Das Bandenmuster der SDS-PAGE (2.19) lässt erkennen, dass $SprS_{His6}$ nicht selektiv an der Säulenmatrix gebunden hat, sondern größtenteils bereits in den beiden Waschschritten eluierte.



Abbildung 3.5 SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von SprS als SprS_{His6} im heterologen Wirt *E. coli* **BL21(DE3)** durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). S: Standard (Precision Plus ProteinTM Standard (BioRad)), 1: GZE nach Überexpression, 2: Durchlauf, 3 & 4: Waschfraktionen, 5: Elutionsfraktion. Die aufgetragenen Volumina der GZE wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (OD_{580nm} = 0,15), während jeweils 20 μ l der Elutionsfraktion verwendet wurde. Das Trenngel (12 %) wurde nach der gelelektrophoretischen Trennung der Proteine mit Coomassie Brillant Blue gefärbt.

Nach *in vitro*-Rückfaltung (2.16) des Proteins der Elutionsfraktion wurden diese konzentriert und die Aktivität durch verschiedene Proteaseaktivitätstests (2.23) überprüft (ohne Abbildung). Es konnte in keinem Fall eine messbare Aktivität der Protease gegenüber herkömmlichen Protease-Substraten gemessen werden. Damit ist es derzeit nicht möglich, eine Aussage über den Erfolg der Rückfaltung bzw. der funktionalen Expression zu machen, da bisher kein spezifisches Substrat für SprS bekannt ist. Die Mehrheit der Subtilisine wird als Prä-Proenzym mit einem N-terminalen Signalpeptid und einem darauffolgenden Prosegment, welches nicht konserviert ist, synthetisiert. Dieses dient als intramolekulares Chaperon und kann durch Autoproteolyse entfernt und die Protease somit aktiviert werden. Eine Prozessierung des Prä-Proenzyms ist essentiell für die korrekte Faltung des Proteins. Es ist allerdings unklar, ob die hier gewählten Bedingungen der Expression eine korrekte Faltung und Prozessierung überhaupt zulassen da es nicht möglich ist, eine Aktivität gegenüber gängigen Substraten, wie Casein oder *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-Nitroanilid, zu zeigen. Auch für homologe Autotransporter-Proteasen wurde bereits beschrieben, dass eine Aktivität gegenüber Casein nicht gezeigt werden konnte (Ohnishi *et al.*, 1997). Bei diesen Proteasen besteht somit die Ausnahme, dass eine unspezifische Spaltung nach für Subtilasen bevorzugten hydrophoben Aminosäureresten nicht zutrifft. Die Spaltung läuft bei diesen Proteasen sehr spezifisch ab, wie bereits für das Protein SphB1 aus *Bordetella pertussis* gezeigt (Coutte *et al.*, 2001).

Um die Voraussetzung der korrekten Faltung von SprS als Autotransporter-Protein in der äußeren Membran zu umgehen und um die hydrophoben Bereiche zu eliminieren, die zu einer Aggregation führen, sollte versucht werden, nur den löslichen, N-terminalen Bereich des Proteins zu produzieren. Dieser Teil enthält das potentielle aktive Zentrum und somit die proteolytische Domäne des Proteins.

Über eine Motivvorhersage (*SSDB Motif Search*) wurde der Bereich von SprS, der den N-Terminus, d. h. den Teil, der die proteolytische Domäne enthält, eingegrenzt und separat vom Rest des Gens kloniert (Abbildung 3.6). Dazu wurde es durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, wodurch dem PCR-Produkt am 5'-Ende eine *Nde*I- und am 3'-Ende eine *Hind*III-Restriktionsschnittstelle angefügt wurde. Durch Fusion mit C-terminalem Hexahistidin-*Tag* sollte der immunologische Proteinnachweis sowie die affinitätschromatographische Aufreinigung ermöglicht werden.



Abbildung 3.6 Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen des Autotransporter-Proteins SprS. Die konservierten Regionen sind in blau (PeptidaseS8 Domäne) und in grün (Autotransporter Domäne) dargestellt. Die vorhergesagten Bereiche wurden mit dem Programm *SSDB Motif Search* ("www.genome.jp/kegg/ssdb/") berechnet.

Nach erfolgreicher PCR wurde das amplifizierte DNA-Fragment in den Vektor pET22b(+) kloniert und die DNA-Sequenz des klonierten PCR-Fragments durch Sequenzierung bestätigt. Die Überexpression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) in LB-Medium mit Zugabe von Glukose (2.4.1).

Bei einer Zelldichte, die einer OD_{580nm} von 0,7 entsprach, wurde mit 0,4 mM IPTG induziert. Es konnte mittels SDS-PAGE zur Analyse der Proteinzusammensetzung der löslichen Fraktion des Rohextraktes keine Expression nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Daher wurde diese direkt unter Verwendung eines spezifischen Antiserums (Anti-His6-Antikörper) mittels Westernblotanalyse (2.21) analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3.7 dargestellt.



Abbildung 3.7 Immunoblot Analyse des N-Terminus von SprS, 1, 2 und 3 h nach Induktion. Es wurden die löslichen Fraktionen der Rohextrakte des *sprS*-Konstruktes (1, 3 und 5) und des Leervektors (2, 4 und 6) aufgetragen. Als Positivkontrolle diente der Standard (Precision Plus ProteinTM Standard (BioRad)), dessen 75 kDa Bande einen Hexahistidin- *Tag* enthält. Anti-Histidin-Antikörper (1/5000).

Der Blot zeigt eine Bande auf einer Höhe von ca. 34 kDa, welche in etwa dem errechneten N-Terminus (32 kDa) von SprS entspricht. Daraus kann man ableiten, dass der N-Terminus in *E. coli* BL21(DE3) in löslicher Form produziert wird, die Expression jedoch so schwach ist, dass sie mittels SDS-PAGE nicht zu erkennen ist und daher auf eine Aufreinigung verzichtet wurde. In anschließenden Proteaseaktivitätstests konnte zudem keine Aktivität der Rohextrakte gegenüber gängigen Substraten im Vergleich zum Leervektor gemessen werden (ohne Abbildung). Es wurde im Weiteren versucht, die Protease als Volllängenprodukt im homologen Wirt P. aeruginosa zu produzieren, um durch Nutzung des homologen Wirtes evtl. benötigte Faktoren für eine korrekte Faltung zur Verfügung zu stellen. Zur homologen Expression von SprS in P. aeruginosa wurde der Stamm PABST7.1 verwendet. Der Stamm enthält eine Expressionskassette bestehend aus dem Gen für die T7-RNA-Polymerase unter transkriptioneller Kontrolle des lacUV5-Promotors und für dessen Regulation den konstitutiv exprimierten Lac-Repressor aus E. coli. Diese regulatorische Kontrolle erlaubt die Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG. Für die Überexpression des Proteins in P. aeruginosa wurde der Vektor pBR22b verwendet (Rosenau & Jaeger, 2000). Er besitzt einen weiten Wirtsbereich und ist zugleich ein T7-Expressionsvektor. Parallel dazu wurde zur Kontrolle ebenfalls der Leervektor pBR22b in den Überexpressionsstamm eingebracht. Die beiden Kulturen erreichten bei Anzucht über Nacht sehr unterschiedliche Zelldichten (OD_{580nm} von 0,5 beim Überexpressionsstamm gegen 3,8 beim Kontrollstamm). Neben der beobachteten Toxizität führte die starke Überexpression von sprS zur Aggregation der Zellen (ohne Abbildung). Aufgrund dieser starken Zellaggregation des Überexpressionsstamms konnte die geplante Aufreinigung der Protease nicht weitergeführt werden. Der Unterschied im Wachstum der Pseudomonaden weist daraufhin, dass das Protein SprS im homologen Wirt funktional produziert und die Oberfläche der Zellen direkt oder indirekt verändert wird, so dass diese aggregieren. Es existieren offenbar Mechanismen im homologen Wirt, die eine Aktivierung bzw. eine korrekte Faltung der Autotransporter-Protease bewirken. Da es sich bei SprS um eine Subtilase handelt ist es denkbar, dass diese ein Propeptid besitzt, welches der Protease als Faltungshelfer dient und nach korrekter Faltung der Protease autoproteolytisch abgespalten wird. Denkbar wäre zudem, dass die Autotransporter-Protease ein Chaperon oder andere akzessorische Faktoren benötigt, welche im heterologen Wirt E. coli nicht vorhanden sind.

3.3 Untersuchung der Transkription von *sprS* im Wildtyp *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Um Hinweise darauf zu bekommen, zu welchem Zeitpunkt des Wachstums die Transkription von sprS erfolgt, wurde die Expression von sprS im Wildtyp PAO1 mittels einer transkriptionellen Reportergenfusion in Abhängigkeit von der Wachstumsphase quantifiziert. Für die Reportergenfusion wurde ein 800 bp großes DNA-Fragment stromaufwärts von sprS ausgewählt, welches den putativen nativen Promotorbereich enthält. Nach Insertion in den Vektor pTZ110 (Schweizer & Chuanchuen, 2001), der das promotorlose lacZ-Gen trägt, wurde die Reportergenfusion in den Wildtyp-Stamm PAO1 eingebracht. Um Hintergrundaktivitäten des lacZ-tragenden Vektors pTZ110 zu berücksichtigen, wurde dieser ebenfalls in den P. aeruginosa-Wildtyp eingebracht. Die Promotoraktivität wurde indirekt über die Aktivität der β-Galaktosidase zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wachstumskurve quantifiziert. Aus der Transkription des Promotors durch die wirtseigene RNA-Polymerase resultiert die Synthese der β-Galaktosidase, deren Aktivität durch die Umsetzung des ONPG-Substrates über eine Farbreaktion nachgewiesen wurde. Als Maß für die Aktivität wurden Miller-Units berechnet (2.23.4) (Abbildung 3.8). Um festzustellen, in welcher Phase des Wachstums das Gen sprS exprimiert wird und somit evtl. Aufschluss über die Funktion zu erhalten, wurde zunächst die Promotoraktivität des Gens sprS in im Wildtyp P. aeruginosa PAO1 betrachtet (Abbildung 3.8). Die Expression von sprS stieg mit zunehmender Wuchsdauer an. In der stationären Wachstumsphase wurde nach 11 h die maximale Genexpression mit 1779 Miller-Units für sprS ermittelt. Daraufhin fallen die Werte auf etwa 1300 Miller-Units ab und bleiben dann, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, weitestgehend konstant. Die Daten veranschaulichen, dass die Transkription von sprS konstitutiv stattfindet und in der spätlogarithmischen Wuchsphase konstant bleibt.


Abbildung 3.8 Promotoraktivität von *sprS* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Die dargestellten Miller-Units (Säulendiagramm) sind die Messwerte der episomalen Transkriptionsfusion abzüglich der Hintergrundaktivität des Leervektors pTZ110. Die Wuchskurve (Liniendarstellung) wurde parallel zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Zelldichte und die β -Galaktosidaseaktivität wurden in Dreifachbestimmung gemessen.

Die Transkription in der späten logarithmischen Wuchsphase bei hohen Zelldichten ist ein erster Hinweis darauf, dass SprS an der Virulenz des Bakteriums beteiligt sein könnte. Zelldichte-abhängige Regulation von Virulenzfaktoren wurde bereits in diversen Bakterien beschrieben (Withers *et al.*, 2001; Diggle *et al.*, 2003; Smith & Iglewski, 2003).

Die Expression von *sprS* ist hier mit 1300 Miller-Units einer vergleichsweise schwachen Expression zuzuordnen. Bereits für andere Gene von Virulenzfaktoren wurde beschrieben, dass sie erst in Gegenwart eines Wirtes verstärkt exprimiert werden (Hu *et al.*, 2009) oder dass das Gen nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen verstärkt abgelesen wird (Termine & Michel, 2009).

Um weitere Erkenntnisse über den Expressionsverlauf von *sprS* zu erhalten wurde der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Expression von *sprS* im *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 analysiert. Die Fähigkeit zur Adaptation und somit zum Überleben bei suboptimalen Temperaturen, wie sie z. B. in Krankenhäusern anzutreffen sind, wurde bereits beschrieben (Termine & Michel, 2009). Die Quantifizierung der Transkriptmenge erfolgte mittels *real time*-PCR. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur Proben entnommen und die RNA isoliert.

Bei der relativen Quantifizierung der Transkription wurde die Expression des Gens sprS auf das rpoD-Gen, ein nicht reguliertes housekeeping-Gen, bezogen. Die relative Expression des Gens wurde bestimmt, indem die Genexpression in P. aeruginosa PAO1 bei 37 °C auf die Genexpression bei 25 °C bezogen wurde. Die Berechnung der Expressionsunterschiede erfolgte über die Berechnung der $\Delta\Delta$ Ct (*cycle threshold*)-Werte. Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus der PCR, bei dem sich die gemessene Fluoreszenz erstmalig signifikant von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt. Der Ct-Wert des rpoD-Gens wurde von den Ct-Werten der zu untersuchenden Gene subtrahiert (ACt). Nach dieser Normierung wurde von den ermittelten Δ Ct-Werten der Proben bei 30, 25 und 18 °C der entsprechende Δ Ct-Wert aus P. aeruginosa PAO1 37 °C abgezogen. Daraus ergab sich für jedes untersuchte Gen ein $\Delta\Delta$ Ct-Wert. Der relative Expressionsunterschied eines Gens von *P. aeruginosa* PAO1 bei 30, 25 und 18 °C im Vergleich zu P. aeruginosa PAO1 37 °C, normalisiert zum rpoD-Gen, ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Die Gesamt-RNA wurde aus den bei verschiedenen Temperaturen angezogenen Kulturen isoliert (2.7.1)und 250 ng der isolierten mRNA unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (2.3) durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese mittels real time-PCR quantifiziert. Als Negativkontrolle wurden alle Ansätze zusätzlich ohne reverse Transkriptase in die real time-PCR eingesetzt. Das Diagramm (Abbildung 3.9) stellt die relative Expression von sprS aus P. aeruginosa PAO1 bei 18, 25, 30 und 37 °C dar. Der fold change (x-fache Änderung) stellt eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen dar.



Abbildung 3.9 *real time*-PCR-Quantifizierung zur Bestimmung des *sprS*-Transkriptes bei verschiedenen Temperaturen.

Dargestellt ist die relative Expression von *sprS* im *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 in Abhängigkeit der verschiedenen Temperaturen. Jeder Messpunkt wurde dreimal unabhängig bestimmt. *fold change* = quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von *sprS* bei niedrigen Temperaturen verstärkt abläuft. Verglichen mit der Expression von *sprS* bei 37 °C und 30 °C kommt es zu einer 2,5-fachen Expression von *sprS* bei einer Expressionstemperatur von 25 °C und einer 3-fachen Expression bei einer Expressionstemperatur von 18 °C.

3.4 Physiologische und funktionelle Charakterisierung von SprS mittels eines *sprS* negativen Stammes

Um die Funktion von SprS in *P. aeruginosa* und den Einfluss dieser putativen Protease auf Virulenz-assoziierte Phänotypen zu untersuchen, wurde in einer früheren Studie (Serci, 2006) ein *sprS*-negativer Stamm erzeugt, dessen *sprS*-Gen durch Insertion einer selektierbaren Gentamycin-Resistenzkassette (Ω -Gm^r) ausgetauscht wurde. Als Parentalstamm für die Mutagenese wurde der Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 verwendet. Die erfolgreiche Insertion einer Gentamycin-Kassette in das *sprS*-Gen wurde mittels PCR nachgewiesen. Die entstandene Mutante wird im Folgenden als $\Delta sprS$ bezeichnet.

Um den Einfluss von SprS auf physiologische Prozesse zu untersuchen, wurde zusätzlich ein moderateres Überexpressionssystem konstruiert und das *sprS*-Gen in den Vektor pBBR1MCS kloniert, wo es unter der Kontrolle des in *P. aeruginosa* konstitutiven induzierten *lac*-Promotors steht. Das entstandene Plasmid pBBR*SprS* und der entsprechenden Leervektor pBBR1MCS wurden durch Konjugation in den Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 und für Komplementationsstudien in den *sprS*-negativen Stamm eingebracht.

3.4.1 Wachstumsuntersuchungen von Pseudomonas aeruginosa PAO1 und AsprS

Da bereits beschrieben wurde. dass einige Membranproteine Einfluss auf das Wachstumsverhalten der jeweiligen Organismen haben (Sauer & Camper, 2001) und zudem die Deletion eines AT-Proteins, dessen C-terminale Transportdomäne eine ß-Pore in der äußeren Membran bildet, zwangsläufig eine Veränderung der Zusammensetzung der äußeren Membran hervorruft, wurde überprüft, inwieweit sich das Wachstum von P. aeruginosa durch die Deletion von sprS verändert. Zunächst wurden parallel Wuchskurven des P. aeruginosa Wildtyps PAO1 sowie des erzeugten sprS-negativen Stammes aufgenommen. Das Wachstum wurde in LB-Flüssigmedium unter standardisierten Laborbedingungen verglichen. Für physiologische Untersuchungen ist es essentiell gleiche Wachstumsphasen und Zelldichten zu beobachten. Kulturen des Wildtyp-Stammes P. aeruginosa PAO1, wie auch des sprS-negativen Stammes, wurden in LB-Medium hergestellt und das Wachstum bis zur spät-stationären Phase verfolgt. Die Messungen wurden jeweils dreimal wiederholt und der Mittelwert ermittelt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte aerob bei 37 °C. Die anhand der Messung der OD_{580nm} erhaltenen Wachstumskurven sind in Abbildung 3.10 graphisch dargestellt. Das bakterielle Wachstum wurde über einen Zeitraum von 25 h verfolgt. Der *sprS*-negative Stamm wächst zunächst etwas langsamer an, erreicht aber nach 4 h dieselbe Zelldichte wie der Wildtyp PAO1, die einer OD_{580nm} von 2 entspricht. Man kann einen deutlichen exponentiellen Anstieg beider Kulturen erkennen, wobei die Zelldichte von $\Delta sprS$ über den gesamten Zeitraum etwas höher liegt als die des Wildtyps PAO1. Erst nach 16 h haben beide Stämme wieder eine vergleichbare Zelldichte, die einer OD_{580nm} von 5,2 entspricht. Die folgenden physiologischen Untersuchungen wurden mit Kulturen durchgeführt, die über diesen Zeitraum bebrütet wurden.

Es ist zu erwähnen, dass die Deletion des *sprS*-Gens zu einer Aggregation der Zellen führte, die im *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 nicht zu beobachten war. Die Kulturen beider Stämme wurden daher vor der jeweiligen Messung der OD_{580nm} intensiv geschüttelt



Abbildung 3.10 Wachstumskurve von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und *AsprS* in LB-Medium bei 37 °C. Die optische Dichte der Bakterienkulturen wurde bei einer Wellenlänge von 580 nm ermittelt. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen, deren Standardabweichungen durch Fehlerbalken dargestellt sind.

3.4.2 Phänotypische Charakterisierung des sprS-defizienten Stammes

Die Zelloberflächenbeschaffenheit spielt eine große Rolle sowohl bei der Beweglichkeit der Mikroorganismen auf diversen Oberflächen als auch bei deren Anheftung an das Substratum. Während die Beweglichkeit der Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung für das Aufsuchen neuer, geeigneter Lebensräume ist, schafft das Anheften (Adhäsion) der Zellen die Voraussetzung für die Besiedlung dieser Räume. Bereits in vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass $\Delta sprS$ die Fähigkeit zur Fortbewegung verloren hat, und dass sich die Pyocyanin-Produktion in den verschiedenen Stämmen unterscheidet (Serci, 2006).

Bei der Kultivierung der *P. aeruginosa* $\Delta sprS$ -Mutante fiel auf, dass sich Zellen der Übernachtkulturen deutlich in der Morphologie von der des *P. aeruginosa* Wildtyps PAO1 unterscheiden und bei vergleichbaren Zelldichten wesentlich mehr Aggregate bilden (Abbildung 3.11a). Bereits in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{580nm} = 0,6 – 0,8) konnte beobachtet werden, dass die Zellen in der Kultur von $\Delta sprS$ aggregierten (Abbildung 3.11a). Um diese Aggregatbildung genauer zu untersuchen, wurden die Hauptkulturen bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer OD_{580nm} = 3 entsprach, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen beider Kulturen mikroskopisch (Zeiss Plan NEOFLUAR, Maßstabsbalken 5 µm) betrachtet (Abbildung 3.11b).





Es war deutlich zu erkennen, dass *P. aeruginosa* $\Delta sprS$ im Vergleich zum Wildtyp PAO1 bei gleicher Zelldichte starke Zellagglomerate ausbildete, die in dieser Form bei *P. aeruginosa* PAO1 nicht vorhanden waren. Bisher wurden zahlreiche Oberflächenstrukturen zur Anheftung an diversen Oberflächen gefunden, die zum Teil auch an der Ausbildung von Biofilmen beteiligt sind. Beispielhaft sind hier Flagellen, Fimbrien, Pili, Membranproteine und das Lipopolysaccharid (LPS) zu nennen (Makin & Beveridge, 1996; Pratt & Kolter, 1998; Davey & O'Toole G, 2000; Donlan & Costerton, 2002). Es wurde gezeigt, dass insbesondere die Bewegungsorganellen von *P. aeruginosa* die Biofilmproduktion maßgeblich beeinflussen (O'Toole & Kolter, 1998). Mikrobielle Biofilme stellen eine spezielle, symbiotische Lebensform von Bakterien dar. Sie gelten als Sicherung des Überlebens im natürlichen Habitat und stellen sowohl in industriellen als auch in medizinischen Bereichen häufig Probleme dar. Unter anderem geht mit der Biofilmbildung eine höhere Resistenz der Organismen gegenüber chemischen Agenzien und Antibiotika einher (Bonifait *et al.*, 2008; Pumbwe *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2008).

Nach der Beobachtung der vermehrten Zellaggregation des *sprS*-negativen Stammes wurde im Folgenden der Einfluss von SprS auf die Biofilmbildung untersucht. Dazu wurde der Wildtyp-Stamm *P. aeruginosa* PAO1 und der *sprS*-negative Stamm $\Delta sprS$ für 16 h in Mikrotiterplatten kultiviert. Anschließend wurden die planktonischen Zellen entfernt und die angehefteten Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Der gebundene Farbstoff wurde mit Ethanol extrahiert und photometrisch bei 540 nm quantifiziert. Die Extinktion diente als Maß für die Menge der angehefteten Zellen. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* $\Delta sprS$ deutlich mehr Biofilm an der Polystyrol-Oberfläche der Mikrotiterplatte bildet als der Wildtyp Stamm PAO1 (Abbildung 3.12a). Die quantitative Messung der Biofilmproduktion ergab eine um das fünffach erhöhte Violettfärbung im *sprS*-defizienten Stamm gegenüber dem Wildtyp-Stamm PAO1 (Abbildung 3.12b). Die Ergebnisse der Biofilmproduktion korrelieren somit mit der Beobachtung der verstärkten Zellaggregation im *sprS*-negativen Stamm, indem sie auf eine veränderte Zelloberfläche in der Mutante hindeuten.



Abbildung 3.12 Nachweis der Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und $\Delta sprS$ in Mikrotiterplatten. (a) Die Anzucht erfolgte für 16 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln. Die angehefteten Zellen wurden an der Polystyrol-Oberfläche mit Kristallviolett angefärbt. (b) Nach Extraktion des Farbstoffes mit Ethanol wurde die Absorption bei OD_{540nm} bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Es wurden weitere Phänotypen untersucht, die mit der Virulenz in Verbindung stehen. In früheren Studien wurde die Beweglichkeit überprüft. Es stellte sich heraus, dass der *sprS*-negative Stamm nicht in der Lage war, sich durch Schwärmen fortzubewegen. Zum Schwärmen ist unter anderem auch die Produktion von Rhamnolipiden notwendig (Kohler *et al.*, 2000), da es als Biodetergenz nicht nur die Oberflächen-, sondern auch die Grenzflächen-Spannung zwischen Schichten unterschiedlicher Polarität reduziert.

Es handelt sich dabei um ein von *P. aeruginosa* produziertes Detergenz, das erstmals 1949 von Jarvis und Johnson beschrieben wurde (Jarvis, 1949). Die Rhamnolipidproduktion wurde daraufhin neben weiteren Phänotypen ebenfalls untersucht. Es wurde die Methode des *drop-collapse*-Test verwendet, um das Vorhandensein von Biodetergenz in Kulturüberständen zu überprüfen (2.26).



Abbildung 3.13 Drop-collapse-Test zur Untersuchung der Oberflächenspannung von Kulturüberständen aus *Pseudomonas aeruginosa.* Es wurden jeweils 10 µl der verschiedenen Kulturüberstände auf eine Petrischale pipettiert.

Dazu wurde ein Aliquot der jeweiligen Kulturüberstände auf eine Petrischale aus Polystyrol pipettiert. Die Form des Tropfens gibt Aufschluss über die Menge an Biodetergenz, die sich im Kulturüberstand befindet. Es war zu beobachten, dass der Tropfen des Wildtyp-Kulturüberstandes Detergenz beinhaltet, welches die Oberflächenspannung herab setzte und sich der Tropfen somit entlang der hydrophoben Oberfläche ausbreitete. Der Kulturüberstand der *sprS*-Mutante hingegen blieb kugelrund, um die energetisch vorteilhafteste Form anzunehmen (Abbildung 3.13). Hier ist der Anteil an Biodetergenz herabgesetzt oder gar nicht vorhanden. Es lässt sich somit festhalten, dass der *sprS*-negative Stamm weniger bis gar kein Rhamnolipid im Kulturüberstand beinhaltet.

Die erste dem Rhamnolipid zugeschriebene Eigenschaft ist dessen hämolytische Wirkung, welche zu einer Hämolyse und somit zur Auflösung von Erythrozyten führt. Man unterscheidet drei verschiedene Formen der Hämolyse 1) α -hämolysierende Bakterienkolonien sind auf Frischblutagar von grünen Höfen umgeben. Bei partiell intakten Erythrozytenmembranen kommt es zur Umwandlung von Hämoglobin in Met- und Sulfhämoglobin.

2) β-hämolysierende Bakterienkolonien sind auf Frischblutagar von vollständig entfärbten, durchsichtigen Höfen umgeben. Die roten Blutkörperchen werden vollständig aufgelöst und das Hämoglobin wird zu farblosen Substanzen abgebaut. 3) Die γ-Hämolyse steht für keine makroskopisch sichtbare Veränderung des Frischblutagars im Kolonienbereich. Unter Verwendung von bluthaltigem Agarnährboden wurde die Fähigkeit zur Hämolyse im *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 und in dem *sprS*-negativen Stamm untersucht. Im *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 trat eine β -Hämolyse mit klar begrenzten hämolytischen Höfen um die Kolonien auf, die im *sprS*-negativen Stamm nicht zu beobachten war (Abbildung 3.14a). Die Konzentration des bei der Hämolyse ausgetretenen Hämoglobins wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen einen Leerwert gemessen. Wie in Abbildung 3.14b gezeigt, wies der *sprS*-defiziente Stamm eine etwa 4-fach geringere hämolytische Aktivität auf, wodurch die Beobachtung des Plattentests bestätigt wurde.



Abbildung 3.14 Nachweis der Fähigkeit zur Hämolyse von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und $\Delta sprS$. (a) Reinkultur von *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 und $\Delta sprS$ auf Columbia-5 % Schafblut-Agar nach 24 stündiger Bebrütung bei 37 °C. (b) Photometrische Quantifizierung des ausgetretenen Hämoglobins in den beiden Stämmen. Die Messung erfolgte bei einer Absorption von OD_{546nm}. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. (c) Durch die Freisetzung des Hämoglobins verursachte Färbung des Überstandes in den zur Messung der Absorption verwendeten Küvetten (Aufsicht). Da die bisherigen Untersuchungen eine Reihe phänotypischer Unterschiede in den beiden Stämmen *P. aeruginosa* PAO1 und $\Delta sprS$ zeigten, wurden weitere mit der Virulenz des Bakteriums in Verbindung stehenden Phänotypen untersucht. Zur Veranschaulichung wurden alle bisher untersuchten Phänotypen in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Phänotypen	P. aeruginosa PAO1	P. aeruginosa ΔsprS
Zellagglomeration ⁴	_	+++
Biofilmbildung ²	+	+++
Rhamnolipid-Synthese ¹	+	-
PQS-Synthese ³	+	-
Hämolyse-Fähigkeit 1, 2	+	_
Hämagglutination ²	+	++
Beweglichkeit ¹	+	-
Pyocyaninproduktion ²	+	_
Lipaseaktivität 1, 2	+	++
Esteraseaktivität im KÜ ²	+	++
Phospholipase C ²	+	+++
Phospholipase A2 ²	+	_

 Tabelle 3.1 Phänotypen, die im Pseudomonas aeruginosa sprS-negativen

 Stamm im Vergleich zum Wildtyp PAO1 untersucht wurden.

¹ Plattentest, ² photometrischer Nachweis, ³ Dünnschichtchromatographie, ⁴ mikroskopische Analyse

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Deletion von *sprS* eine Reihe phänotypischer Veränderungen hervorruft. Ob eine mögliche, prozessierende Eigenschaft von SprS an diesen Veränderungen beteiligt ist, wurde im Weiteren untersucht.

3.5 Profilanalyse der äußeren Membranproteine mittels SDS-PAGE

Es ist bereits bekannt, dass Subtilisin-ähnliche Autotransporter an der Prozessierung diverser Proteine beteiligt sind. SphB1 aus *Bordetella pertussis* ist beispielsweise an der Prozessierung des filamentösen Hämagglutinins (FHA) beteiligt (Coutte *et al.*, 2001), AasP aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* modifiziert das Lipoprotein OmlA (Ali *et al.*, 2008) und NalP aus *Neisseria meningitidis* prozessiert die Proteasen App und IgA (van Ulsen *et al.*, 2003). SprS besitzt ebenfalls eine proteolytische Domäne, welche auf eine prozessierende Rolle von SprS hindeutet.

Da es sich bei SprS um ein AT-Protein handelt, welches in der äußeren Membran lokalisiert ist, wurde die Produktion der äußeren Membranproteine der beiden P. aeruginosa Stämme PAO1 und $\Delta sprS$ untersucht. Die äußeren Membranproteine können durch Einsatz kombinierter Methoden nach Standardprotokoll isoliert werden. Dafür wurde die äußere Membran beider Stämme isoliert (2.13) und mittels SDS-PAGE (2.19) differentiell analysiert (Abbildung 3.15). Die Abbildung zeigt deutliche Abweichungen in den Proteinmustern der beiden Stämme. Um die Proteine, die im sprS-negativen Stamm verändert vorliegen, zu identifizieren, wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel eluiert, tryptisch verdaut (2.22) und massenspektrometrisch (MALDI-TOF) (2.22) analysiert. Im Fall von $\Delta sprS$ konnte bei ≈ 18 kDa eine distinkte Proteinbande identifiziert werden, die im *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 nicht zu erkennen ist. Es handelt sich hierbei um das Protein, das durch den ORF pa3988 kodiert wird. Es wird als Lipoprotein mit einer transmembralen Helix und einer putativen Signalsequenz vorhergesagt. Die genaue Funktion des Proteins ist bisher nicht bekannt. Es wurden weitere Proteine identifiziert, die im sprS-negativen Stamm verstärkt produziert werden. Dabei handelte es sich um die Genprodukte der ORFs pa2760, pa0833, pa2087 und pa4501 (Abbildung 3.15).





(a) Die Proteine aus einem Kulturvolumen, das einer OD_{580nm} =1,8 entsprach, wurden präzipitiert. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie Brillant Blue gefärbt. S = Standard (Precision Plus ProteinTM Standard (BioRad). (b) Die Proteine wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Zu jedem Protein ist der Genlocus anhand der Bezeichnung des *P. aeruginosa*-Genomprojektes (PA-Nummer) angegeben.

Bei den entsprechenden Proteinen handelt es sich um äußere Membranproteine, deren Funktion noch nicht ausreichend geklärt ist. pa2760 zeigt 59 % Ähnlichkeit zu dem Porin OprD aus P. aeruginosa und pa4501 kodiert für das Protein OpdD. Es handelt sich hierbei um ein Glycine-Glutamat Dipeptidporin, das für den Transport von Arginin in die Zelle zuständig ist (Tamber & Hancock, 2006). Proteine der OprD-Familie sind an der Bindung des humanen Fibronectins beteiligt. Für einige der Mitglieder dieser Familie wurde gezeigt, dass sie eine Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen aus der Umgebung einnehmen (Arhin & Boucher).

Es sollte zudem untersucht werden, ob sich die Proteinzusammensetzung im extrazellulären Bereich der beiden Stämme *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 und $\Delta sprS$ unterscheidet. Dazu wurden nach Kultivierung der Zellen in 10 ml LB-Medium ohne Selektionsdruck die Kulturüberstände durch TCA-Fällung konzentriert (2.10) und mittels SDS-PAGE (2.19) analysiert (Abbildung 3.16). Wie in Abbildung 3.16 gezeigt, unterscheidet sich das Proteinbandenmuster des *sprS*-negativen Stammes ($\Delta sprS$) deutlich vom Wildtyp-Stamm PAO1. Insbesondere im höhermolekularen Bereich um 100 kDa sind signifikante Unterschiede zu erkennen. So fehlt im Fall des *sprS*-negativen Stammes ($\Delta sprS$) im Bereich um 100 kDa eine Proteinbande. Dabei handelt es sich nicht um das SprS-Protein selbst, da es stets in so geringen Mengen exprimiert wird, dass es in SDS-PAGE-Analysen nicht sichtbar ist.

Die im Wildtyp PAO1 noch vorhandene aber im *sprS*-negativen Stamm ($\Delta sprS$) fehlende Proteinbande wurde aus dem Gel isoliert und mittels Peptidmassen-Fingerprinting (2.22.2) analysiert. Es wurde ein als hypothetisch annotiertes Protein identifiziert, welches von dem ORF *pa0572* kodiert wird. Es handelt sich hierbei um ein Protein, mit prognostizierter Lokalisation in der äußeren Membran oder im Kulturüberstand. Welche genaue Funktion das Protein einnimmt, ist bisher nicht bekannt.

Offensichtlich wird das Protein PA0572 nur im Wildtyp PAO1 in den Kulturüberstand abgegeben. Zur Komplementierung wurde das Gen *sprS* auf einem Plasmid kodiert (pBBR*sprS*) in beide Stämme eingebracht. Die Proteinbande von PA0572 konnte nach Einbringen des Plasmides ebenfalls in $\Delta sprS$ im Kulturüberstand identifiziert werden (Abbildung 3.16).

Der Wildtyp-Phänotyp konnte somit wieder hergestellt werden. Mittels *real time*-PCR wurde die relative Menge des Transkriptes von *pa0572* quantifiziert (ohne Abbildung).

Es wurde beobachtet, dass sich die Transkriptmengen von pa0572 im Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 und in der Mutante $\Delta sprS$ nicht unterscheiden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine veränderte Transkriptionsrate das Fehlen von PA0572 im Kulturüberstand verursacht. Damit scheint für die Freisetzung von PA0572 in den Kulturüberstand die Anwesenheit von SprS notwendig zu sein.



Abbildung 3.16 SDS-PAGE Analyse (12 %) der Kulturüberstände von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und *AsprS*. Die Proteine aus einem Kulturvolumen, das einer $OD_{580nm} = 1,8$ entsprach, wurden präzipitiert. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie Brillant Blue gefärbt. PAO1 Wt = *P. aeruginosa* PAO1, $\Delta sprS = sprS$ -negativer Stamm, SprS++ = Überexpression von *sprS* im Wildtyp, pBBR1MCS = LV im Wildtyp, $\Delta sprS$ /SprS++ = Komplementationsstamm, S = Standard (Precision Plus ProteinTM Standard (BioRad).

Bei der Identifizierung der im *sprS*-negativen Stamm veränderten Proteine wurde zudem ein Protein identifiziert, von dem in der Mutante signifikant geringere Mengen im Kulturüberstand vorhanden sind. Es handelt sich dabei um die Elastase LasB (PA3724), die im Kulturüberstand am stärksten präsent ist und einen bedeutenden Virulenzfaktor von *P. aeruginosa* darstellt. Um die weiteren Veränderungen des Proteinbandenmusters der beiden Stämme genauer analysieren zu können wurde das Sekretom mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht.

3.6 Identifizierung SprS-abhängiger Proteine

Die mittlerweile als Standardmethode für die Aufklärung zellulärer Funktionen und Regulationsmechanismen etablierte Analyse bakterieller Proteome findet zunehmend ihre Anwendung. In dieser Arbeit wurde die Methode der 2D-Gelelektrophorese genutzt, um einen Überblick über sekretierte Proteine zu gewinnen, die durch SprS kontrolliert bzw. beeinflusst werden.

Dazu wurde das Sekretom des P. aeruginosa Wildtyps PAO1 mit dem der korrespondierenden sprS-Deletionsmutante verglichen (Abbildung 3.17). Zellen aus ÜK beider Stämme wurden geerntet und die Kulturüberstände isoliert (2.9). Jedes der durchgeführten Experimente wurde dabei mit mindestens drei unabhängigen Proteinpräparationen durchgeführt. Die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung, IEF) wurde unter Verwendung von IPG-Streifen, die einen pH-Bereich von 3-11 abdeckten, durchgeführt. Die weitere Auftrennung der Proteine nach deren Größe erfolgte mittels 12 %-iger SDS-PAGE (2.19). Die Abbildung 3.17 zeigt die Aufnahmen der 2D-Gele des Wildtyps P. aeruginosa PAO1 und des P. aeruginosa sprS-negativen Stammes Δ sprS. Unter Verwendung der 2D-Software Delta2D (Decodon) wurden die miteinander zu vergleichenden Gele übereinander gelegt (Abbildung 3.17), wobei die Protein-Spots des Wildtyp-Stammes blau und die des sprS-negativen Stammes orange eingefärbt sind. Existieren die jeweiligen Protein Spots in beiden Stämmen, so werden diese durch die Überlagerung in schwarz dargestellt. Der Bereich der IEF liegt zwischen pH 3 und pH 11, wobei die meisten dieser Proteinspots einen isoelektrischen Punkt zwischen 4 und 8 haben. Die Auswertung der 2D-Gele ergab für die Gegenüberstellung des P. aeruginosa Wildtyps PAO1 mit der P. aeruginosa sprS-Mutante unter normalen Wachstumsbedingungen 416 veränderte Proteinspots, wobei nur die Proteine berücksichtigt wurden, die mindestens 2fach reguliert vorlagen.



Abbildung 3.17 2D-SDS-PAGE des Sekretoms extrahierter Proteine von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und *AsprS* nach Bebrütung bei 37 °C für 16 h. Die oberen beiden Gele zeigen das Proteinmuster des Wildtyps *P. aeruginosa* PAO1 (links) und das Proteinmuster des *sprS*-negativen Stammes *AsprS* (rechts). Das untere Bild zeigt die Überlagerung der beiden Gele. Die Kulturüberstände der verschiedenen Stämme wurden so eingestellt, dass sie der gleichen OD_{580nm} entsprachen. Unter Verwendung der 2D-Software Delta2D (Decodon) wurden die miteinander zu vergleichenden Gele überlagert, wobei die Protein-Spots des Wildtyp-Stammes blau und die des *sprS*-negativen Stammes orange eingefärbt sind. Von diesen Proteinen sind 45 Spots (t-Test mind. 90 %) um mindestens das Doppelte im *sprS*-negativen *P. aeruginosa* Stamm erhöht, während 28 Spots (t-Test mind. 90 %) mit einer von mehr als der Hälfte verminderten Intensität im Sekretom der *sprS*-Mutante detektiert wurden.

Die Proteine einiger Spots, die ausschließlich in einem der beiden Stämme oder aber in unterschiedlicher Intensität mittels der 2D-Software Delta2D identifiziert wurden, wurden massenspektrometrisch identifiziert. Das entstandene Massenspektrum wurde zur Identifizierung der Proteine mit Spektren-Datenbanken verglichen und bei einer Übereinstimmung als Treffer angegeben. Diese Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Melanie Brocker und Frau Christina Mack im Labor von Prof. Dr. M. Bott am Institut für Biotechnologie 1 (IBT-1) im Forschungszentrum Jülich.

Insgesamt konnten 16 Protein-Spots erfolgreich massenspektrometrisch identifiziert werden. Die restlichen Proben zeigten, vermutlich aufgrund einer zu geringen Proteinmenge nur unzureichende Massenspektren, die beim Vergleich mit den Datenbanken kein Ergebnis lieferten. Häufig konnten mehrere Spots einem Protein zugeordnet werden, was auf Proteinmodifikationen hinweist. Die Ergebnisse des Proteinmustervergleichs nach erfolgreicher Identifikation mittels MALDI-TOF sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2 Ausgewählte Ergebnisse der Proteine, die während der Kultivierung des *Pseudomonas aeruginosa* Wildtyps PAO1 und der *sprS*-Mutante differentiell produziert werden.

Die Proteine von Interesse wurden nach ihrem tryptischen Verdau mittels Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifiziert. Weiterhin sind zu jedem Protein der korrespondierende Genname und der Genlocus anhand der Bezeichnung des *P. aeruginosa*-Genomprojektes (PA-Nummer) angegeben.

Spot-	PA	Fundation Con		MW	n 7	Expressions-
Nr.	Nr.	Funktion	Gen	[KDa]	թ	level
1	PA4761	Chaperone protein dnaK.	dnaK	68,4	4,79	ſ
2	PA0482	<u>Malatsynthase</u> G	glcB	78,7	5,47	Ť
3	PA4385	GroEL protein	groEL	57,1	5.04	Ť
4	PA2939	probable aminopeptidase		59,3	4,97	1
5	PA0852	chitin-bindingproteinCbpD precursor	cbpD	42,0	6,60	Ţ
б	PA0958	porin OprD precursor	oprD	48,4	4,96	Ť
7	PA1777	outermembraneporinOprF precursor	oprF	37,6	4,98	٥
8	PA3724	elastase LasB	lasB	53,7	6,28	1
9	PA4175	protease I V	piv	48,2	6,45	Ţ
10	PA1094	flagellar capping protein FliD	fliD	49,4	6,52	Ť
11	PA2001	acetyl-CoA acetyltransferase	ato B	40,4	6,03	Ť
12	PA2250	lipoamide dehydrogenase-V al	lpdV	48,6	6,16	Ť
13	PA1587	lipoamide dehydrogenase-glc	lpdG	50,2	6,48	Ť
14	PA4500	probable bindingprotein component of ABC transporter		59,7	8,09	Ť
15	PA0300	polyamine transport protein	spuD	40,6	6,97	Ť
16	PA3313	hypothetical protein		36,5	9,62	Ť

Die Symbole repräsentieren die differentielle Expression der Proteine des *P. aeruginosa sprS*-negativen Stammes $\Delta sprS$ im Vergleich zum Wildtyp PAO1.

- ↑ hoch reguliert
- \downarrow herunter reguliert
- gleich reguliert

Es lassen sich generell drei Gruppen von Proteinen festlegen; Proteine, die im *P. aeruginosa sprS*-negativen Stamm verstärkt exprimiert werden (orange), Proteine, die weniger stark exprimiert werden als im Wildtyp PAO1 (blau) und Proteine, deren Intensität in beiden Stämmen nahezu identisch ist (schwarz) (Abbildung 3.17).

Die verstärkt in dem *sprS*-negativen Stamm im Kulturüberstand befindlichen Proteine sind zum Großteil in Molekültransport und Membranaufbau involviert. Auch Chaperone konnten identifiziert werden. Viele der im *sprS*-negativen Stamm schwächer sekretierten Proteine, sind an der Virulenz des Bakteriums beteiligt. Hierbei handelt es sich um die Elastase LasB, die Protease IV, eine vorhergesagte Aminopeptidase und um das Chitin-bindende Protein. Es wurde beschrieben, dass durch die Freisetzung der Zink-Metalloprotease Elastase (LasB) sowie der Protease IV Zellen und Gewebe des Wirts geschädigt werden (Engel *et al.*, 1998).

Um heraus zu finden, ob die enzymatische Aktivität der beiden Proteasen im *sprS*-negativen Stamm ebenfalls reduziert ist, wurden die Elastase- und Protease-IV-Aktivität im Kulturüberstand ermittelt. Der photometrische Test der Elastaseaktivität beruht auf der Spaltung von mit *Congo red* gekoppeltem Elastin. Je höher die Elastaseaktivität ist, desto mehr Elastin wird gespalten, und desto mehr freies Chromophor kann im Überstand bei einer Wellenlänge von 496 nm gemessen werden. Der photometrische Test der Protease IV beruht auf der Spaltung von Chromozym PL (tosyl-Gly-Pro-Lys-*p*-nitroanilide) nach (O'Callaghan *et al.*, 1996). EDTA wurde zusätzlich in den Test gegeben, um die Aktivität von Metalloproteasen, wie der Elastase LasB, zu hemmen.



Abbildung 3.18 2D-SDS-PAGE der extrazellulären Fraktion extrahierter Proteine von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und *AsprS* in einem pH-Bereich von 3-11. (a) 2-D-Gele der Kulturüberstande des *P. aeruginosa* Wildtyps PAO1 und des *sprS*-defizienten Stammes $\Delta sprS$. (b) Relative Spotintensität der hervorgehobenen, stark veränderten Proteinspots. (c) Photometrischer Nachweis der Elastase- und Protease IV-Aktivität im Kulturüberstand von *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 und im *sprS*-defizienten Stamm $\Delta sprS$. Es wurden zellfreie Kulturüberstände in den Test eingesetzt. Die Kulturüberstände wurden nach Zugabe des Substrates für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die optische Dichte der Überstände gemessen. In Abbildung 3.18c sind die relativen LasB- und Protease IV-Aktivitäten des *P. aeruginosa sprS*-negativen Stammes im Vergleich zum *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 angegeben. Die Aktivitäten der beiden Proteasen LasB und Protease IV haben im *sprS*-negativen Stamm deutlich abgenommen, wobei die Aktivität von LasB im *sprS*-negativen Stamm nicht mehr messbar ist und die Protease IV lediglich eine Aktivität von 2 % im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Damit konnten die Beobachtungen aus der 2D-SDS-PAGE-Analyse bestätigt werden.

3.7 Transkriptomanalysen

Die Ergebnisse der 2D-Gele geben einen Überblick darüber, welche Proteine im *sprS*negativen Stamm beeinflusst wurden. Es wurde gezeigt, dass vor allem zwei der prominentesten Proteasen von *P. aeruginosa*, die Elastase LasB und die Protease IV, eine Veränderung in der Proteinmenge zeigen. Der nächste Schritt sollte nun klären, ob die Veränderung posttranskriptional stattfindet oder ob es sich um einen transkriptionellen Effekt oder sogar eine Regulation handelt. Da es sich wie bei der Elastase LasB und der Protease IV auch bei SprS um eine Protease handelt, sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine Form von koordinierter Regulation der *P. aeruginosa*-Proteasen nachgewiesen werden kann. Dafür wurde die Expression einer Auswahl an Proteasen aus *P. aeruginosa* mittels *real time*-PCR quantifiziert. Die analysierten Proteasen sind zur Veranschaulichung in einer Tabelle aufgelistet und absteigend nach Expressionsstärke sortiert (Tabelle 3.3).

Die differentielle Expression der Protease-Gene wurde bestimmt, indem die Genexpression in *P. aeruginosa* $\Delta sprS$ auf die Expression in *P. aeruginosa* PAO1 bezogen wurde.

Die Hauptkulturen der beiden Stämme wurden bis zum Erreichen einer Zelldichte, die einer $OD_{580nm} = 3$ entsprach, kultiviert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Stämmen isoliert (2.7) und 250 ng der isolierten mRNA unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (2.3) durch reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese in der *real time*-PCR nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden alle Ansätze zusätzlich ohne reverse Transkriptase in die PCR eingesetzt. Bei der Quantifizierung der Transkription wurde die Expression der untersuchten Gene auf das *housekeeping*-Gen *rpo*D bezogen, das gleichzeitig als Positivkontrolle diente. Die Berechnung der Expressionsunterschiede erfolgte über die Bestimmung der $\Delta\Delta$ Ct (*cycle threshold*)-Werte.

Das Diagramm der *real time*-PCR (Abbildung 3.19) stellt die relative Expression der ausgewählten Gene aus *P. aeruginosa* $\Delta sprS$ im Vergleich zum Wildtyp PAO1 dar. Dabei verdeutlichen $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Werte größer 1 eine erhöhte Transkriptmenge bzw. $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Werte kleiner 1 eine verringerte Transkriptmenge in *P. aeruginosa* $\Delta sprS$. Der fold change (x-fache Änderung) stellt die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen dar.

Dieser Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens gegenüber der zu vergleichenden Bedingung erhöht ist, bzw. negativ wenn die Transkription eines Gens geringer ist. Es konnten deutliche Unterschiede bezüglich der Transkription der ausgewählten Gene festgestellt werden. Eine erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp PAO1 konnte bei *pa1832 (sohB), pa1242 (sprP), pa5474 und pa3649* beobachtet werden. Wesentlich geringere Expressionslevel im *sprS*-negativen Stamm konnten bei *pa0328, pa0766 (mucD), pa0372, pa3986, pa0580 (gcp), pa1871 (lasA), pa4275 (piV), pa2939 (pepB) und pa3724 (lasB)* beobachtet werden. Desweiteren gibt es auch Proteasen, die in beiden Stämmen unverändert exprimiert werden, so dass man die untersuchten Gene generell in drei Gruppen einteilen kann (Tabelle 3.3).



Abbildung 3.19 Relative Expression diverser für Proteasen kodierender Gene von *Pseudomonas aeruginosa AsprS* im Vergleich zum Wildtyp *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Dargestellt sind die 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} Werte auf einer logarithmisch (log2) skalierten Ordinate. 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} -Werte größer 1 veranschaulichen eine erhöhte Genexpression bzw. 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} -Werte kleiner 1 eine verringerte Genexpression in *P. aeruginosa AsprS* im Vergleich zu *P. aeruginosa* PAO1.

Es stellte sich heraus, dass es sich in der Gruppe, der im *sprS*-negativen Stamm geringer exprimierten Proteasen, bei fünf der neun Gene um die bereits als Virulenzfaktoren beschriebenen Gene handelte. Insbesondere die Expression von *lasB* und *piv* ist in dem *sprS*-negativen Stamm deutlich geringer als im *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1. Aus den zuvor gezeigten Ergebnissen der Sekretomanalysen lässt sich schließen, dass die auf Proteinebene gezeigten Veränderungen der Expression der Elastase LasB und der Protease IV bereits auf Transkriptebene stattgefunden haben.

Tabelle 3.3 Ausgewählte Protease-Gene, die mittels *real time*-PCR analysiert wurden. Kriterium für die Auswahl der Gene war das Vorhandensein einer putativen Signalsequenz. Die Gene sind absteigend nach der Expressionsstärke im *sprS*-negativen Stamm angeordnet. Zu jedem Gen wurde der korrespondierende Genlocus anhand der Bezeichnung des *P. aeruginosa*-Genomprojektes (PA-Nummer), der Genname sofern vorhanden, sowie die Funktion des

PA-Nr.	Gen-Name	Funktion	Expressions- level
PA1832		probable protease	1
PA1242	sprP	Peptidase_S8, Subtilase family	1
PA5474		probable metalloprotease	↑
PA3649		Peptidase_M50, Peptidase family M50	Î
PA3257		periplasmic tail-specific protease	o
PA1249	aprA	alkaline metalloproteinase	o
PA5134		probable carboxyl-terminal protease	o
PA0328		Peptidase_M28, Peptidase family M28 Peptidase_M42, M42 glutamyl aminopeptidase	Ļ
PA0766	mucD	serine protease	↓
PA0372		probable zinc protease	↓
PA3086		Rhomboid, Rhomboid family	\downarrow
PA0580	gcp	O-sialoglycoprotein endopeptidase	↓
PA1871	lasA	LasA protease	\downarrow
PA4175	piV	protease IV	↓
PA2939		probable aminopeptidase	↓
PA3724	lasB	neutral metalloproteinase	↓

In der Gruppe der im *sprS*-negativen Stamm verstärkt exprimierten Protease-Gene wurde deutlich, dass die Expression des Gens einer weiteren Subtilisin-Protease aus *P. aeruginosa* hochreguliert ist. *P. aeruginosa* besitzt lediglich zwei Subtilisin-ähnliche Proteasen; die in dieser Arbeit beschriebene Autotransporter-Protease SprS (*pa3535*) und die Subtilisin-ähnliche Protease SprP (*pa1242*).

Dieses Protein ist in der *Pseudomonas*-Datenbank (Winsor *et al.*, 2009) als hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion annotiert. Es besteht aus 590 AS mit einer N-terminalen putativen Signalsequenz von 22 AS. Es besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 64,9 kDa und das kodierende Gen umfasst 1773 bp. Die Lokalisation des Proteins ist bislang unbekannt und wird im Rahmen einer Dissertation analysiert. Es weist ein Signalpeptid auf, was für einen extracytoplasmatischen Aufenthaltsort spricht. Das Protein beinhaltet eine für Subtilisin-ähnliche Serinproteasen konservierte PeptidaseS8-Domäne am C-Terminus. Im Rahmen einer assoziierten Diplomarbeit wurde das Protein näher charakterisiert (Pelzer, 2009).

Um einen möglichen funktionellen Zusammenhang der beiden Proteasen zu untersuchen, wurden im Folgenden transkriptionelle *lacZ*-Fusionen konstruiert.

3.8 Transkriptionelle *lacZ*-Fusionen

Die Ergebnisse der *real time*-PCR-Analyse wiesen darauf hin, dass es eine Form von koordinierter Regulation der Proteasen in *P. aeruginosa* gibt. Es sollte im Weiteren untersucht werden, ob sich speziell die beiden Subtilisin-Proteasen SprS und SprP gegenseitig beeinflussen, indem sie sich z. B. kompensieren.

Um die Expression der Gene über eine längere Wachstumsphase zu untersuchen, wurden transkriptionelle *lacZ*-Fusionen erstellt. Für die Reportergenfusion wurde ein 540 bp großes DNA-Fragment stromaufwärts des *pa1242*-Gens (*sprP*) und ein 800 bp großes DNA-Fragment stromaufwärts des *pa3535*-Gens (*sprS*) ausgewählt, welche die putativen nativen Promotorbereiche enthalten. Nach Insertion in den Vektor pTZ110, der das promotorlose *lacZ*-Gen trägt, wurde die Reportergenfusion in den Wildtypstamm PAO1 eingebracht. Um Hintergrundaktivitäten des *lacZ*-tragenden Vektors pTZ110 zu berücksichtigen, wurde dieser ebenfalls in den *P. aeruginosa*-Wildtyp eingebracht. Als Maß für die *pa1242* bzw. *pa3535*-Promotoraktivität wurde die intrazelluläre β -Galaktosidase-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wuchskurve bestimmt. Um festzustellen, ob die beiden Gene *sprS* und *sprP* in der gleichen Phase des Wachstums exprimiert werden, wurde zunächst die Promotoraktivität beider Gene im Wildtyp *P. aeruginosa* PAO1 betrachtet (Abbildung 3.20).

Die Expression der beiden Gene *sprS* und *sprP* steigt mit zunehmender Wuchsdauer an. In der stationären Wachstumsphase wurde nach 11 h die maximale Expression beider Gene mit 2221 Miller-Units für *sprP* und 1779 Miller-Units für *sprS* bestimmt. Daraufhin fallen die Werte ab und bleiben dann, unter Berücksichtigung der Standardabweichung, weitestgehend konstant. Die Daten veranschaulichen zum einen, dass die beiden Gene zum gleichen Zeitpunkt exprimiert werden und zum anderen, dass *sprP* stets stärker exprimiert wird als *sprS*. Die dargestellten Wuchskurven wurden parallel zur Bestimmung der zellulären β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die Wuchskurven beider Stämme wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.



Abbildung 3.20 Expression der beiden Gene *sprS* und *sprP* in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Die dargestellten Miller-Units (Säulendiagramm) sind die Messwerte der episomalen Transkriptionsfusion abzüglich der Hintergrundaktivität des Leervektors pTZ110. Die Wuchskurven (Liniendarstellung) wurden parallel zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Zelldichte und die β -Galaktosidaseaktivität wurden in Dreifachbestimmung gemessen. Aus Gründen der Übersicht sind die Standardabweichungen nicht dargestellt. Diese waren für die Zelldichte nie größer als 5 % und für die β -Galaktosidaseaktivität nie größer als 33 % (Grafik mit dazugehörigen Standardabweichungen: siehe Anhang).

Um das in der *real time*-PCR gezeigte Ergebnis der verstärkten Expression von *sprP* im *sprS*negativen Stamm näher zu untersuchen, wurden die beiden plasmidkodierten *lacZ*-Fusionen *sprS:lacZ* und *sprP:lacZ* in den *sprS*-negativen Stamm eingebracht. Für die weiteren Analysen wurde die β -Galaktoseaktivität zu einem Zeitpunkt gemessen, an dem nahezu gleiche Zelldichten vorlagen und sich die Zellen bereits in der stationären Phase befanden. Dazu wurde jeweils nach 8 h eine Probe entnommen und die β -Galaktoseaktivität bestimmt. In Abbildung 3.21 ist zu erkennen, dass die Promotoraktivität beider Gene im *sprS*-negativen Stamm im Vergleich zur Promotoraktivität im *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 etwa 10-fach erhöht ist.



Abbildung 3.21 β -Galaktosidaseaktivität als Maß der Promotoraktivitäten im Wildtyp *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (rote Balken) und dem *sprS*-negativen Stamm $\Delta sprS$ (graue Balken). Es wurden Proben nach Kultivierung von 8 h bei 37 °C in LB-Medium in den Test eingesetzt. Zu den promotortragenden Plasmiden *sprS:lacZ* und *sprP:lacZ* wurde jeweils der Leervektor pBBR1MCS für die folgenden Komplementationsstudien (siehe Abbildung 3.22) eingebracht.

Im *sprS*-negativen Stamm wird der Promotor der zweiten Subtilisin-Protease *sprP* verstärkt abgelesen, was ebenfalls duch die *real time*-PCR Analyse gezeigt wurde. Darüber hinaus ist auch die Promotoraktivität von *sprS* im *sprS*-negativen Stamm gesteigert, was darauf hindeutet, dass das Fehlen von SprS durch eine verstärkte Transkription des eigenen Gens kompensiert werden soll. Auch um diese Annahme zu bestätigen, wurden Komplementationsstudien durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich die Promotoraktivitäten der beiden Gene im *sprS*-negativen Stamm durch Wiedereinbringen einer *sprS*-Plasmid-kodierten, SprS-Kopie verändern.



Abbildung 3.22 β -Galaktosidaseaktivität als Maß der Promotoraktivitäten im *sprS* -negativen *Pseudomonas aeruginosa* Stamm *AsprS*. Es wurden Proben nach einer Kultivierung von 8 h bei 37 °C in LB-Medium in den Test eingesetzt. Zusätzlich zu den promotortragenden Plasmiden *sprS:lacZ* und *sprP:lacZ* wurde jeweils der Vektor pBBR*sprS* und der entsprechende Leervektor pBBR1MCS in den *sprS*- negativen Stamm eingebracht.

Anhand der gewonnenen Daten (Abbildung 3.22) ist zunächst deutlich zu erkennen, dass durch das Einbringen des auf dem Plasmid pBBR*sprS* unter Kontrolle des konstitutiven *lacZ*-Promotors kodierten *sprS*-Gens die Promotoraktivität von *sprP* wieder abfällt. Das Einbringen des Leervektors pBBR1MCS diente dabei als Kontrolle. Der entsprechende Stamm zeigte keinen Abfall der *sprP*-Promotoraktivität. Hiermit konnte der direkte Einfluss von *sprS* auf die Promotoraktivität von *sprP* bestätigt werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass auch die Promotoraktivität von *sprS* selber durch Einbringen des *sprS*-Gens in die Mutante absinkt, was die Präsenz eines Rückkopplungsmechanismus bestätigt.

3.9 Einfluss von SprS auf die Pathogenität von Pseudomonas aeruginosa

Durch die vorangegangenen Experimente konnte gezeigt werden, dass die Produktion verschiedener Virulenzfaktoren, z. B. die Rhamnolipid-Synthese, die Produktion der Elastase LasB und der Protease IV oder die Hämolyse, durch SprS beeinflusst wird. Um die Bedeutung der Protease für die Pathogenität von *P. aeruginosa in vivo* untersuchen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Laurence Rahme der Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital in Bosten, durchgeführt von Herrn Rien Hoge, der *sprS*-defiziente Stamm in die beiden etablierten Virulenzmodelle *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana* eingesetzt und jeweils mit dem Wildtyp PAO1 verglichen.

3.9.1 Pathogenität von AsprS im Pflanzenmodell Arabidopsis thaliana

Um den Einfluss von SprS auf die *P. aeruginosa*-induzierte Phytopathogenität zu untersuchen, wurden Blätter von *A. thaliana* mit Zellen einer Übernachtkultur des *P. aeruginosa*-Wildtyps Stammes PAO1 und des *sprS*-negativen Stammes ($\Delta sprS$) infiziert, indem 10 ml der Bakteriensuspensionen, die zuvor auf eine Zelldichte entsprechend einer OD₆₀₀ von 0,002 eingestellt wurden, auf die Unterseite der Blätter aufgebracht wurden (Abbildung 3.23) (Starkey & Rahme, 2009). Nach Infektion von jeweils vier Blättern jeder Pflanze mit den beiden Stämmen erfolgte die Betrachtung des Infektionsverlaufs über vier Tage. Die Anzahl der CFUs (*colony-forming units*), und damit die Anzahl lebensfähiger *P. aeruginosa*-Zellen innerhalb der Blätter, wurde am Tag der Infektion (Tag 0) sowie am zweiten und vierten Tag nach der Infektion bestimmt.



Abbildung 3.23 Überblick über die Infizierung des Pflanzenmodells Arabidopsis thaliana mit *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen. Die Unterseiten der Blätter werden mit leichtem Druck durch die Spritze mit den entsprechenden Kulturen infiziert. Es ist deutlich zu erkennen, wie die Flüssigkeit sich durch das Blatt zieht. Nach der Infektion werden die Blätter über vier Tage inkubiert. Zum Auszählen der noch lebensfähigen Bakterienzellen werden mit einem Korkbohrer Teile der Blätter entnommen, die Bakterien ausgewaschen und in verschiedenen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert (modifiziert nach Starkey, 2009).

Am Tag der Infektion konnte sowohl in den mit dem Wildtyp infizierten Pflanzen als auch in den Pflanzen, die mit dem *sprS*-negativen Stamm infiziert wurden, eine vergleichbare Anzahl an CFUs bestimmt werden (Abbildung 3.24). Somit wurde sichergestellt, dass die verwendeten Pflanzen mit einer vergleichbaren Bakterienzahl infiziert wurden. Im weiteren Verlauf ergab sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Vermehrungsrate der beiden Stämme in den Pflanzen (Abbildung 3.24).



Abbildung 3.24 Vergleich der Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Wildtyp und der *sprS*-Mutante ($\Delta sprS$) in *Arabidopsis thaliana*. Angegeben ist die Anzahl der CFUs in *A. thaliana* am Tag der Infektion (0) sowie zwei und vier Tage nach der Infektion. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Während aus den mit dem Wildtyp infizierten Blättern nach 2 Tagen im Mittel $4,2 \times 10^6$ und nach 4 Tagen $16,4 \times 10^6$ CFUs isoliert werden konnten, wurden aus den mit der *sprS*defizienten Mutante infizierten Blätter $4,6 \times 10^5$ am zweiten und nur $3,9 \times 10^5$ CFUs am vierten Versuchstag gewonnen. Diese Daten verdeutlichen, dass die Zelldichte des *sprS*negativen Stammes im Wirt *A. thaliana* über den Zeitraum der Messung signifikant geringer war als die des Wildtyps PAO1, was darauf hindeutet, dass der *sprS*-negative Stamm verglichen mit dem Wildtyp in dem verwendeten Modellorganismus ein geringeres phytopathogenes Potential aufweist.

3.9.2 Pathogenität von *AsprS* in *Drosophila melanogaster*

Der Modellorganismus *D. melanogaster* zeichnet sich neben seiner geringen Größe und der damit verbundenen leichten Handhabbarkeit im Labor durch eine hohe Fortpflanzungsrate mit Generationszeit von zwölf Tagen aus. Es gibt zwei unterschiedliche Methoden, um die Tiere zu infizieren: das *needle pricking* und der *feeding assay* (Apidianakis & Rahme, 2009). Beide Methoden wurden in dieser Arbeit verwendet, um die Pathogenität der beiden Stämme *P. aeruginosa* PAO1 und $\Delta sprS$ in *D. melanogaster* vergleichend zu untersuchen. Die Methode des *needle pricking* ist in Abbildung 3.25 veranschaulicht.



Abbildung 3.25 Überblick über die Infizierung von *Drosophila melanogaster* mit *Pseudomonas aeruginosa*-Kulturen. Für das *needle pricking*, d. h. für die Infizierung mit einer 0,2 mm dicken Nadel, wurde diese in die jeweilige Bakterienkultur eingetaucht und der dorsolaterale Thorax anschließend punktiert (modifiziert nach Starkey, 2009).

Die Mortalität der Fliegen korreliert mit der Fähigkeit des Bakteriums, sich innerhalb des Wirtsorganismus vermehren zu können. Die Überlebensrate der Tiere wurde auf signifikante Unterschiede in den verglichenen Gruppen überprüft und in Abbildung 3.26 graphisch dargestellt. Alle mit dem *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 infizierten Tiere verstarben signifikant früher als die mit $\Delta sprS$ infizierten Tiere (Abbildung 3.26).

Während die mit dem Wildtyp PAO1 infizierte Gruppe nach 40 h eine Überlebensrate von 25 % aufwies, konnte beim *sprS*-negativen Stamm noch eine Überlebensrate von etwa 70 % ermittelt werden.



Abbildung 3.26 Vergleich der Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Wildtyp und der *sprS*-Mutante ($\Delta sprS$) in einem *Drosophila melanogaster* Modell. Es wurde die Methode des *needle prickings* angewandt und die Überlebensrate in % zu bestimmten Zeiten [h] bestimmt.

Der Einfluss von SprS auf die Pathogenität der Bakterien in *D. melanogaster* wurde durch eine zweite, auf der *feeding*-Methode beruhende Versuchsreihe bestätigt. Auch hierbei ergaben sich signifikante Unterschiede in den Überlebensraten der Tiergruppen nach Infektion durch den *P. aeruginosa* Wildtyps PAO1 im Vergleich zum *sprS*-negativen Stamm $\Delta sprS$ (Abbildung 3.27).

Während keines der mit dem Wildtyp PAO1 infizierten Tiere nach 10 Tagen mehr lebensfähig waren, konnten noch über 70 % der Tiere überleben, die mit dem *sprS*-negativen Stamm infiziert wurden.



Abbildung 3.27 Vergleich der Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Wildtyp und der *sprS*-Mutante ($\Delta sprS$) in *Drosophila melanogaster*. Es wurde die Methode des *feedings* angewandt und die Überlebensrate in % einmal täglich über insgesamt 15 Tage bestimmt.

Zur Veranschaulichung sind die Röhrchen abgebildet, in denen die Tiere gehalten und ausgezählt wurden (Abbildung 3.28). Die Tiere, die mit dem Wildtyp-Stamm *P. aeruginosa* PAO1 infiziert wurden (links), waren nicht mehr lebensfähig, während die Tiere, die mit der Mutante infiziert wurden, auch nach 15 Tagen eine deutliche Lebensfähigkeit zeigten (rechts).



Abbildung 3.28 Vergleich der Pathogenität von Pseudomonas aeruginosa PAO1 Wildtyp und der sprS-Mutante (AsprS) in einem Drosophila melanogaster feeding-Modell. Links die nicht mehr lebensfähigen Tiere, die mit dem Wildtyp-Stamm PAO1 gefüttert wurden und rechts die lebenden Tiere, die mit der Mutante gefüttert wurden.

4 Diskussion

4.1 Homologievergleiche und strukturelle Analyse der Serinprotease SprS

P. aeruginosa ist ein fakultativ pathogener Keim, der eine wichtige Rolle als Erreger bei nosokomialen Infektionen und bei Patienten mit CF spielt. Maßgeblich für die Pathogenität von P. aeruginosa ist ein Arsenal an Virulenzfaktoren. Eine Gruppe von Proteinen, die mit Organismus der Virulenz des jeweiligen in Verbindung stehen, sind die Autotransporterproteine (AT-Proteine). Der Prototyp der AT-Proteine ist die IgA-Protease aus Neisseria gonorrhoeae, deren Proteasedomäne nach autoproteolytischer Spaltung in die Umgebung entlassen wird (Pohlner et al., 1987). Durch Sequenzanalysen mit dem C-Terminus des Esterase-Autotransporters EstA aus P. aeruginosa konnte ein weiterer ORF im Genom von P. aeruginosa identifiziert werden, der Homologien zu Autotransportern aufweist (Serci, 2006). Das Protein konnte anhand seiner Primärstruktur in drei konservierte Bereiche eingeteilt werde. Es beinhaltet am N-Terminus den für PeptidasenS8 charakteristischen Bereich. In der PeptidaseS8-Domäne ist die katalytische Triade mit den für Subtilisine charakteristischen hoch konservierten Aminosäureresten (His, Asp und Ser) zu finden sowie das für Subtilisin-Proteasen charakteristische GTSMA-Motiv. Das Protein wurde aufgrund seiner Homologie zu Serinproteasen als SprS (Serinprotease S) bezeichnet.

Mittels dem SignalP-Server wurde in der Proteinsequenz ein Signalpeptid für SprS von 30 AS vorhergesagt. Der C-Terminus von SprS enthält den für Autotransporter charakteristischen Bereich. AT-Proteine weisen eine Anordnung aus mindestens zwei Domänen auf, wovon die Translokationseinheit eine Signalsequenz für die Überquerung N-terminale der Cytoplasmamembran über den Sec-Komplex beinhaltet und einen ß-Faltblatt-reichen C-Terminus. Mit dem C-Terminus bilden die AT-Proteine ihre eigene Translokationspore und überqueren so die OM (Henderson et al., 1998; Yen et al., 2002). Die Sequenzanalysen bestätigen, dass der C-terminale Teil von SprS einen hohen Anteil von β-Faltblatt-Strängen mit einem periodischen Wechsel zwischen hydrophoben und hydrophilen Abschnitten aufweist. Auch die vorhergesagte Größe von 30-35 kDa ist typisch für Transportdomänen von AT-Proteinen. Aus Alignments mehrerer bekannter, bakterieller Autotransporter war bekannt, dass die letzte Aminosäure am C-Terminus bakterieller Autotransporter vom Typ Va meist ein Phenylalanin oder Tryptophan ist (Jose et al., 1995; Henderson et al., 1998). An Position 3, ausgehend vom C-Terminus, wird Tyrosin bevorzugt, an Position 5 eine weitere hydrophobe Aminosäure (Struyve *et al.*, 1991). Der C-Terminus von SprS besitzt ebenfalls an letzter Position ein Phenylalanin und ist an Position 3 und 5 durch hydrophobe Aminosäuren (W und V) besetzt. Somit ist die Zuordnung zur Gruppe der AT-Proteine sehr wahrscheinlich. Bei der Typ V-Sekretion wird die OM im ungefalteten Zustand überquert, die Ausbildung von Disulfidbrücken im Periplasma – ein oxidatives Millieu bei Gram-negativen Bakterien – würde zur Ausbildung ungeeigneter Sekundärstrukturen führen und die Translokation stören (Klauser *et al.*, 1992). Wie die meisten AT-Proteine besitzt SprS nur 2 Cysteine, wobei die Bildung von Disulfidbrücken bei AT-Proteinen selten auftritt. Es konnte eine weitere Domäne in der Sequenz von SprS gefunden werden, die jedoch keinerlei Ähnlichkeit zu anderen bisher bekannten Domänen aufweist und sich zwischen den schon beschriebenen N- und C-terminalen Domänen befindet.

Mit Hilfe der Röntgenkristallographie konnte bestätigt werden, dass die Autotransporter NalP aus N. meningitidis und EstA aus P. aeruginosa eine räumliche Anordnung annehmen, die als ein aus gegenläufigen β-Faltblättern bestehendes Fass umschrieben wird (van den Berg, ; Oomen et al., 2004). Wie die Integration in die Membran vonstatten geht konnte bisher allerdings noch nicht geklärt werden. Eine Hypothese ist, dass die C-terminale hydrophobe aromatische Aminosäure (F oder W) Kontakt mit den Phospholipiden der äußeren Membran aufnimmt, wonach sich die restlichen Aminosäuren des β-Fasses spontan in die Membran einfalten und eine porenähnliche Struktur bilden (Pohlner et al., 1987; Jose et al., 1995). Die erste und die letzte membrandurchspannende Region interagieren miteinander und knüpfen Wasserstoffbrückenbindungen (Henderson et al., 1998). Weiterhin wird vermutet, dass das Membranprotein Omp85 die Aufgabe eines periplasmatischen Chaperons übernimmt und die Faltung und Insertion vermitteln könnte (Voulhoux & Tommassen, 2004), was jedoch für AIDA-I aus E. coli bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Müller et al., 2005). Mit der Aufklärung der dreidimensionalen Anordnung der Linker- und β-Fass-Domäne von NalP und EstA konnte gezeigt werden, dass der α-helikale Linker das hydrophile Innere des β -Fasses durchzieht.

Da die Röntgenstruktur von SprS bisher noch nicht bekannt ist, wurde in dieser Arbeit ein Modell des C-Terminus von SprS angefertigt, um die Homologie zu den bisher bereits vorhandenen Röntgenkristallstrukturen der beiden AT-Proteine NalP und EstA zu vergleichen. Es konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von SprS ebenfalls die Anordnung einer β -Fass-Domäne besitzt, sowie einen α -helikalen Linker, der das hydrophile Innere des β -Fasses durchzieht. Der das β -Fass durchziehende α -Helix konnte eine Rolle als Faltungshelfer (Chaperon) zugesprochen werden (Oliver *et al.*, 2003; Mogensen & Otzen, 2005; Mogensen *et al.*, 2005; Berthiaume *et al.*, 2007). Um Homologien zu AT-Proteinen zu finden, wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt. Diese zeigte eine starke Verbreitung des AT-Proteins SprS in zahlreichen human- und phytopathogenen *Pseudomonas*-Spezies. Weiterhin wurden auch homologe Proteine in anderen pathogenen Bakterien-Spezies gefunden. Zur weiteren Spezifikation wurde die *Pfam protein families database* verwendet. Die Analyse ergab insgesamt 153 Proteinsequenzen, die eine PeptidaseS8 Domäne und zugleich eine Autotransporter Domäne besitzen. Zur Übersicht sind in der folgenden Tabelle 4.1 Subtilisin-ähnliche AT-Proteine gezeigt, die Homologien zu SprS und ebenfalls eine PeptidaseS8 Domäne und eine C-terminale Autotransporter-Domäne aufweisen.

Protein	Spezies	Identität [%] zu SprS	Literatur
SSP-h2	Serratia marcescens	38	(Ohnishi et al., 1997)
SSP-h1	Serratia marcescens	37	(Ohnishi et al., 1997)
PspB	Pseudomonas brassicacearum	44	(Chabeaud et al., 2001)
PrtB	Pseudomonas fluorescens	43	(Woods et al., 2001)
SphB1	Bordetella pertussis	30	(Coutte et al., 2001)
NalP	Neisseria meningitidis	27	(van Ulsen et al., 2001)
Serinprotease	Pseudomonas fluorescens	67	(Kawai et al., 1999)
Serinprotease	Xanthomonas axonopodis pv. citri	28	(da Silva et al., 2002)
Serinprotease	Xanthomonas campestris pv. campestris	27	(da Silva <i>et al.</i> , 2002)
Putativer Autotransporter	Pseudomonas syringae pv. tomato	66	(Buell et al., 2003)
Autotransporter	Pectobacterium atrosepticum	32	(Bell et al., 2004)
Serinprotease, Subtilase	Burkholderia mallei	51	(Nierman et al., 2004)
Extrazelluläre			
Serinprotease	Burkholderia pseudomallei	50	(Holden et al., 2004)
EC=3.4.21.			
Serinprotease	Xanthomonas campestris pv. campestris	27	(Qian et al., 2005)

Tabelle 4.1 Übersicht über Subtilisin-ähnliche Autotransporter verschiedener human- und pflanzen-pathogener Bakterien. Die Proteine besitzen Homologie zu SprS und bestehen ebenfalls aus den konservierten Bereichen der PeptidaseS8 Domäne und der C-terminalen Autotransporter Domäne.
Autotransporter Subtilase	Xanthomonas campestris pv.	27	(Thieme et al., 2005)
Putative Serinprotease PspB EC=3.4.21.	Pseudomonas entomophila	46	(Vodovar et al., 2006)
Putative Serinprotease	Pseudomonas aeruginosa	99	(Lee et al., 2006)
Autotransporter (Serinprotease)	Proteus mirabilis	31	(Pearson et al., 2008)

Fortsetzung Tabelle 4.1

Es handelt sich dabei um Proteine verschiedenster Spezies, von denen bisher jedoch nur ein geringer Teil charakterisiert wurde. Nur SphB1 aus *B. pertussis* und NalP aus *N. meningitidis* konnten bisher beschrieben werden.

SprS zeigt zudem 24 % Homologie zu eukaryotischen Pro-Protein-Convertasen. In Eukaryoten werden viele Pro-Hormone durch die Spaltung von speziellen Pro-Protein-Convertasen (PPC) aktiviert. Die Subtilisin-ähnlichen Pro-Protein-Konvertasen wurden durch Untersuchungen an Hefepilzen Mitte der 80er Jahre entdeckt. Es wurde nachgewiesen, dass das Enzym Kexin aus

Saccharomyces cervisiae pro-hormonelle Vorläufer in Säugetierzellen korrekt spaltet (Thomas *et al.*, 1988). PPCs und andere Proteinkonvertasen spalten Vorläufer von Polypeptiden an spezifischen Resten und generieren damit bioaktive Peptide und Proteine. Unter den Substraten der PPCs befinden sich zahlreiche Moleküle wie Prohormone, Vorläufer von Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren und virale Oberflächen-Glykoproteine (Van de Ven *et al.*, 1993; Seidah *et al.*, 1994; Richt *et al.*, 1998).

4.2 Heterologe Synthese und Versuche zur Aufreinigung des SprS-Proteins

Bei der Synthese von heterologen Membranproteinen, wozu ebenfalls die Autotransporterproteine gehören, kommt es aufgrund ihrer Topologie, die große hydrophobe Bereiche aufweist, in der Regel zur Bildung unlöslicher Proteineinschlusskörper, aus denen die Rückfaltung in die native Form des Membranproteins nur selten gelingt. Für die proteinbiochemische Analyse von SprS sollte dennoch versucht werden, dass Protein in ausreichender Menge zu synthetisieren und aufzureinigen.

Um das Gen sprS im heterologen Wirt exprimieren zu können, wurden verschiedene Expressionssysteme verwendet (Serci, 2006). Nach Klonierung in einen Expressionsvektor erfolgte die heterologe Überexpression u. a. in E. coli BL21(DE3), da dieser Stamm das Gen der T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors im Genom integriert trägt. Als Expressionsvektor diente pET22b(+), in dem das zu exprimierende Gen stromabwärts des T7-Promotors liegt. SprS konnte erfolgreich exprimiert werden, was sich bei der SDS-PAGE-Analyse des GZE durch eine zusätzliche Proteinbande im Vergleich zur Leervektorkontrolle zeigte. Frühere Analysen zeigten, dass die Proteinausbeute von SprS mit zunehmender Expressionsdauer nach Induktion mittels IPTG bei 37 °C zunahm und nach 16 h eine Abnahme der Proteinmenge zu verzeichnen war (Serci, 2006), was eine Folge von proteolytischer Degradation des Proteins bei übermäßiger Produktion sein kann. Die Überexpression des Proteins kann toxisch für die Zelle sein und das Protein somit zum Schutze der Zelle abgebaut werden. Da es möglich ist, SprS im heterologen Wirt E. coli effizient zu exprimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich ein Konstrukt von SprS erstellt, dass einen C-terminalen Hexahistidin-Tag beinhaltet, um das Protein nach erfolgter Überexpression affinitätschromatographisch mittels IMAC aufzureinigen. Um zu ermitteln, ob SprS in Form unlöslicher Aggregate synthetisiert wurde, schloss sich an die erfolgreiche Überexpression eine Löslichkeitsanalyse an. Diese Aggregate entstehen insbesondere, wenn bei der rekombinanten Genexpression eine ungenügende Anzahl von Chaperonen für eine korrekte Faltung zur Verfügung steht (Carrio & Villaverde, 2002), die Membranoberfläche, wie bei vielen heterologen Expressionswirten, limitiert ist oder der Sekretionsapparat eine rasche Absättigung erreicht, sodass die Translation der gebildeten Transkripte schneller erfolgt, als der Einbau der Genprodukte in die Membran des Expressionswirts (Arechaga et al., 2000; Drew et al., 2003). Eine SDS-PAGE-Analyse der entsprechend aufgetrennten Fraktionen der sprS-Überexpression zeigte, dass sich das Protein in der unlöslichen Proteinfraktion befand. Ein vergleichbares Ergebnis wurde ebenfalls bei der Variante erhalten, die den C-terminalen Hexahistidin-Tag enthielt. Mit dem Ziel, das SprS-Protein in löslicher Form gewinnen. wurden verschiedene zu Modifikationen der Expressionsbedingungen durchgeführt, um die Aggregation des rekombinanten Proteins zu verhindern. Eine Reduktion der Wachstumstemperatur, eine verkürzte Expressionsdauer sowie eine Verringerung der IPTG-Konzentration führten zu keiner Verbesserung der Löslichkeit von SprS. Es wurde ebenfalls versucht, dass Expressionsmedium zu wechseln und mittels Autoinduktionsmedium eine moderatere Induktion zu erreichen, was sich jedoch als erfolglos herausstellte. Der E. coli Expressionsstamm C43(DE3), der von Miroux und Walker durch Screening-Methoden aus dem E. coli Stamm BL21(DE3) generiert wurde (Miroux & Walker, 1996) und sich u. a. durch einen im Vergleich zu E. coli BL21(DE3) schwächeren lacUV5-Promotor besser für die Expression von Membranproteinen auszeichnet, wurde zusätzlich als Expressionswirt verwendet. Wie in E. coli BL21(DE3) konnte das untersuchte Zielprotein SprS auch in E. coli C43(DE3) lediglich unlöslich akkumuliert exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde die Isolierung des SprS-Proteins nach Expression in Form von inclusion bodies durch eine denaturierende Reinigung mittels IMAC durchgeführt. Somit musste sich an die denaturierende Reinigung des unlöslichen Proteins dessen Rückfaltung anschließen, sodass das Protein in einen katalytisch aktiven Zustand überführt wurde. Die Reinigung war zum Teil erfolgreich, wobei das Protein jedoch nicht selektiv mit der Säulenmatrix interagierte, sondern bereits in der Waschfraktion eluierte. Das Protein konnte jedoch für weitere Tests in diesem angereicherten Zustand verwendet werden. Die Laufhöhe der Proteinbande entsprach dem Molekulargewicht von 105 kDa, was der erwarteten Volllängengröße des zu charakterisierenden Proteins entsprach. Es wurde eine in vitro-Rückfaltung durchgeführt und diese durch verschiedene Proteaseaktivitätstests überprüft. Es konnte jedoch in keinem Fall eine messbare Aktivität gegenüber gängigen Protease-Substraten beobachtet werden.

Die Mehrheit der Subtilisine wird als Prä-Proenzym mit einem N-terminalen Signalpeptid, gefolgt von einem Prosegment, synthetisiert (Siezen & Leunissen, 1997). Das Prosegment ist allgemein nicht konserviert und kann als intramolekulares Chaperon fungieren (Ohta *et al.*, 1991). Wir konnten nur das Volllängenprotein SprS in *E. coli* nachweisen. Dies kann einerseits bedeuten, dass SprS keiner Autoproteolyse unterliegt und die N-terminale Verlängerung nicht abgespalten wird, oder aber, dass es nicht korrekt zurückgefaltet wurde und somit noch immer in einer fehlgefalteten und inaktiven Konformation vorliegt. Auch die

Abwesenheit spezifischer Proteasen im heterologen Wirt könnte die fehlende Aktivität erklären. Es ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, eine Aussage über den Erfolg der Rückfaltung zu machen, da bisher kein Substrat für SprS bekannt ist. Andere Vertreter aus der Gruppe der Subtilisin-ähnlichen Proteasen spalten beispielsweise nur sehr spezifisch und zeigen keine Aktivität bei herkömmlichen Substraten wie Casein (Ohnishi *et al.*, 1997; Kawai *et al.*, 1999; Chabeaud *et al.*, 2001).

Um das Protein löslich exprimieren zu können und das Ereignis der korrekten Faltung in der äußeren Membran zu umgehen, wurde in einem weiteren Versuch anhand einer Motivvorhersage nur die den N-terminalen Teil des Proteins kodierende Gensequenz, d. h. der Bereich, der den katalytisch aktiven Teil beinhaltet, so kloniert, dass das Protein mit einem Cterminalen Hexahistidin-*Tag* produziert wurde. Das Fragment konnte erfolgreich kloniert werden, und das konstruierte Plasmid wurde für die Expression in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) eingebracht. Es konnte jedoch zu keiner Zeit der Expression eine zum Leervektor deutlich zu unterscheidende Proteinbande in der SDS-PAGE identifiziert werden. Anhand des vorhandenen Hexahistidin-*Tag*s wurde die Expression des Proteins unter Verwendung eines spezifischen Antiserums (Anti-His6-Antikörper) mittels Westernblotanalyse untersucht. Das Ergebnis bestätigte eine erfolgreiche, lösliche Expression des N-Terminus von SprS, die allerdings so schwach war, dass sie auf der SDS-PAGE nicht zu erkennen war.

Weitere Versuche, dass verkürzte Protein effektiver zu produzieren, blieben erfolglos. Es wurde ebenfalls die Expressionstemperatur, die IPTG-Konzentration, die Dauer der Expression und auch der Expressionsstamm variiert. In den verwendeten Proteaseaktivitätstests konnte keine Aktivität des N-Terminus von SprS gegenüber gängigen Substraten verzeichnet werden.

Es ist somit davon auszugehen, dass die angenommene inkorrekte Faltung des C-Terminus in der äußeren Membran nicht der alleinige Grund für die fehlende, messbare Aktivität war. Da es sich bei SprS um eine Subtilisin-ähnliche AT-Protease handelt, ist es nicht auszuschließen, dass das Protein SprS ein Propeptid besitzt, welches unter bestimmten Bedingungen autokatalytisch oder aber durch andere Proteasen abgespaltet wird und erst danach in aktiver Form vorhanden ist. Demzufolge wurde SprS im homologen Wirt *P. aeruginosa* überexprimiert, da dort die zur vermuteten Prozessierung notwendigen Proteine oder mögliche Chaperone vorhanden sein sollten. Dazu wurde ebenfalls ein T7-Expressionssystem verwendet. Bereits die Anzucht der Zellen, die das Expressionsplasmid beinhalteten, erwies

sich als aussichtslos. Die starke Expression von *sprS* führte zu einer Aggregation der Zellen, so dass eine vergleichbare Messung der optischen Dichte nach Anzucht über Nacht nicht möglich war. Dieses Ergebnis legt jedoch nahe, dass die Protease SprS im homologen Wirt *Pseudomonas* in aktiver Form produziert wird und somit Mechanismen existieren, die eine korrekte Faltung oder aber eine Aktivierung der AT-Protease bewirken. Da die Überexpression mittels eines T7-Expressionssystems offenbar zu stark war, wurde für die folgenden Versuche ein moderateres System unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors verwendet.

4.3 Abhängigkeit der sprS-Expression von der Wuchsphase und der Temperatur

Da die AT-Protease SprS in P. aeruginosa im Gegensatz zur heterologen Expression in E. coli in aktiver Form produziert wird und eine sprS-Überexpression zu Veränderungen der Zellmorphologie führt, wurden zur weiteren Charakterisierung Transkriptionsanalysen durchgeführt, um einen Einblick über den zeitlichen Verlauf der Transkription von sprS zu bekommen. Es wurde zunächst untersucht, zu welchem Zeitpunkt des Wachstums die Transkription von sprS erfolgt, um somit erste Schlüsse über die evtl. Funktion des Proteins treffen zu können. Es wurden lacZ-Fusionen konstruiert und die Transkription von sprS indirekt über die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass sprS unter Laborbedingungen in P. aeruginosa transkribiert wird und nach 11 h Wachstum die maximale Genexpression erreicht wurde. Damit scheint sprS in der spät-logarithmischen Phase des Wachstums seine physiologische Aufgabe zu erfüllen, so wie es von diversen Virulenzfaktoren bekannt ist, dass sie Zelldichte-abhängig in einer späten Wachstumsphase gebildet werden (Withers et al., 2001; Smith & Iglewski, 2003). Zudem konnte im Wildtyp P. aeruginosa PAO1 unter Labordedingungen nur eine relativ schwache Expression von sprS verzeichnet werden, was ebenfalls für andere Gene von Virulenzfaktoren gezeigt wurde; die nur unter bestimmten Expressionsbedingungen z. B. in Gegenwart eines Wirtes, verstärkt abgelesen werden (Hu et al., 2009; Termine & Michel, 2009). Der Wildtyp P. aeruginosa PAO1 wurde bei verschiedenen Temperaturen kultiviert und die Expression von sprS mittels real time-PCR nachverfolgt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Expression von sprS bei niedrigen Temperaturen verstärkt erfolgt. Bei einer Temperatur von 25 °C konnte eine 2,5-fach stärkere Expression von sprS im Vergleich zu 37 °C gemessen werden.

Die Temperatur-abhängige Expression der Protease spiegelt die Anpassungsfähigkeit von P. aeruginosa an veränderte Bedingungen wider, die das Überleben des Keimes bei niedrigeren Temperaturen ermöglicht, wie sie beispielsweise in Krankenhäusern, an Kathetern und Drainagen auftreten können. P. aeruginosa ist in der Lage bei Raumtemperatur zu wachsen, wodurch eine Infektion mit dem Bakterium erleichtert wird. Die Virulenz dieses opportunistischen Pathogens ist multifaktoriell und von der Freisetzung vieler extrazellulärer Toxine und degradierender Enzyme abhängig, die durch die verschiedensten Sekretionssysteme transportiert werden. Die Expression der Komponenten der Sekretionssysteme und der sekretierten Proteine selbst muss somit bereits bei niedrigen Temperaturen erfolgen (Termine & Michel, 2009), was ein Grund für die Expression von SprS bei niedrigen Temperaturen darstellt.

4.4 Phänotypische Veränderungen des sprS-negativen Stammes

Bisherige Untersuchungen zur Funktion von SprS konnten zeigen, dass das Protein in der späten Wuchsphase gebildet wird. Zur genaueren Aufklärung der Funktion des Proteins wurde ein *sprS*-negativer Stamm ($\Delta sprS$) konstruiert, dessen *sprS*-Gen durch Insertion einer selektierbaren Gentamycin-Resistenzkassette (Ω -Gm^r) ausgetauscht wurde (Serci, 2006).

Es musste ausgeschlossen werden, dass ein Einfluss der Deletion von *sprS* auf das Wachstumsverhalten von *P. aeruginosa* besteht, da bereits in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass Membranproteine das Wachstumsverhalten des jeweiligen Organismus beeinflussen können (Sauer & Camper, 2001). Es ist essentiell für phänotypische Untersuchungen, gleiche Zelldichten heranzuziehen, weshalb der erste Schritt der phänotypischen Analysen die Überprüfung des Wachstumsverhaltens der beiden Stämme $\Delta sprS$ und PAO1 war. Wachstumstest mit beiden Stämmen wurde in Vollmedium (LB) unter standardisierten Laborbedingungen durchgeführt und über 25 h analysiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. Die Zelldichten der beiden Stämme Medium der beiden Kulturen auftraten. Während die Zellen des Wildtyps *P. aeruginosa* PAO1 ein normales Wachstum ohne Verklumpung zeigten, konnte im *sprS*-negativen Stamm eine starke Aggregation in ÜK festgestellt werden. Diese Veränderung der adhäsiven Eigenschaft weist auf eine veränderte Zelloberfläche der Zellen von $\Delta sprS$ hin.

Die Aggregatbildung wurde näher untersucht, indem beide Stämme zu gleichen Zelldichten angezogen und anschließend mikroskopisch analysiert wurden. Der *sprS*-negative Stamm zeigte im Vergleich zum Wildtyp die Ausbildung von Zell-Zellaggregaten und somit ein verstärktes Anheften der Zellen untereinander. Das Anheften von Bakterienzellen an Wirtsepithelzellen stellt den ersten Schritt einer Infektion dar, wofür beispielsweise Flagellen, Pili, Adhäsine oder andere Membranproteine verantwortlich sind (Donlan & Costerton, 2002). Aber auch das Anheften der Zellen untereinander spielt eine entscheidende Rolle insbesondere bei der Biofilmbildung; hierbei bilden sich Mikrokolonien aus, die in der Folge durch Zellaggregation und Einbettung in eine Exopolysaccharid-Matrix zum reifen Biofilm akkumulieren (Stoodley *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass der Übergang von einer planktonischen in eine sessile Lebensform, wie sie im Biofilm vorkommt, durch Genregulationsvorgänge kontrolliert wird (Prigent-Combaret *et al.*, 1999; Stoodley *et al.*, 2002).

Ob die vermehrte Bildung von Zellaggregaten in $\Delta sprS$ Einfluss auf die Biofilmbildung hat, wurde in Biofilmstudien analysiert. Hierzu wurde der P. aeruginosa Wildtyp PAO1 und der sprS-negative Stamm in Mikrotiterplatten üN kultiviert, die planktonischen Zellen entfernt und die adhärierten Zellen mit dem Farbstoff Kristallviolett angefärbt. Durch Extraktion des Farbstoffes mit Ethanol konnte eine quantitative Aussage über die Biofilmbildung getroffen werden. Es wurde beobachtet, dass beim sprS-negativen Stamm $\Delta sprS$ gegenüber dem Wildtyp die fünffache Menge an Biomasse an die Mikrotiterplatten-Oberfläche adhärierte. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass die verstärkte Zellaggregation mit der Biofilmbildung korreliert, möglicherweise hervorgerufen durch eine Veränderung der Zelloberfläche des sprS-negativen Stammes. Es ist bekannt, dass sich im Verlauf der Biofilmbildung die im planktonischen Zustand motilen Bakterien von den Flagellen trennen und somit ihre Beweglichkeit verlieren. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der sprSnegative Stamm die Fähigkeit zur Fortbewegung verloren hat (Serci, 2006). In dieser Arbeit wurden weitere phänotypische Untersuchungen in Bezug auf die Beweglichkeit und die Virulenz der beiden Stämme durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Fähigkeit von P. aeruginosa sich durch Schwärmen fortzubewegen, die Produktion des Biodetergenz Rhamnolipid voraussetzt (Kohler et al., 2000). Daraufhin wurde die Rhamnolipidproduktion in beiden Stämmen durch einen drop-collapse-Test näher untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass der Kulturüberstand des sprS-negativen Stammes weniger Biodetergenz enthält, was durch eine kugelrunde Form des Tropfens zu beobachten war. Der Tropfen des Kulturüberstandes des Wildtyps hingegen zeigte eine durch Herabsetzen der Oberflächespannung ausgebreitete Form und somit das verstärkte Vorhandensein von Biodetergenz.

Das Biodetergenz Rhamnolipid wurde zuerst mit der Eigenschaft zur Hämolyse und somit mit der Auflösung von Erythrozyten in Verbindung gebracht (Sierra, 1960). *P. aeruginosa* besitzt die Fähigkeit zur β -Hämolyse, wobei die Erythrozyten geschädigt werden und das Hämoglobin freigesetzt wird. Dort wird es zum Teil an Haptoglobin gebunden und teilweise als freies Hämoglobin an das Plasma abgegeben. Die Hämolyse wurde als weiterer Phänotyp in den beiden Stämmen PAO1 und $\Delta sprS$ zunächst qualitativ auf Frischblutagar untersucht. Während der *P. aeruginosa* Wildtyp PAO1 eine deutliche Hämolyse aufzeigte, konnte beim *sprS*-negativen Stamm keine Hämolyse und damit keine Auflösung der Erythrozyten festgestellt werden. Die Hämolyse wurde ebenfalls quantitativ analysiert, indem die Konzentration des durch die Hämolyse ausgetretenen Hämoglobins photometrisch ermittelt wurde. Diese Analyse ergab, dass der Stamm $\Delta sprS$ eine um 2,5-fach reduzierte Hämolysefähigkeit besitzt.

Die Ergebnisse der bisher untersuchten Phänotypen ließen die Vermutung aufkommen, dass die sprS-Deletion einen Einfluss auf die Virulenz haben könnte. Daraufhin wurden weitere Phänotypen untersucht, die mit der bakteriellen Bindung an die Epithelzellen des Respirations- oder des Gatsrointestinaltraktes sowie anderer Organe zusammenhängen. Für diesen Vorgang sind u. a. das Flagellin und das FliD-Protein (Scharfman et al., 2001), sowie die Typ IV Pili (Hahn, 1997) verantwortlich. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass YadA-exprimierende Bakterien die Fähigkeit besitzen, zu aggregieren (Skurnik et al., 1984). Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde festgestellt, wie die YadA-Lollipops bei der Autoagglutination ähnlich einem Reißverschluss miteinander in Kontakt treten (Hoiczyk et al., 2000). Es wird diskutiert, dass die Autoagglutination die Bildung von Mikrokolonien in infizierten Geweben oder Organen induzieren bzw. stabilisieren könnte und als Zwischenschritt der Biofilmbildung diskutiert wird (Hendrixson & St Geme, 1998). Die Bildung von Mikrokolonien stellt daher für Bakterien einen Schutzmechanismus gegen die Wirtsabwehr und die Wirkung antimikrobieller Peptide dar (Donlan & Costerton, 2002). Die verstärkte Fähigkeit zur Autoagglutination des sprS-negativen Stammes und damit zur verstärkten Bildung von Biofilm konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden. Weitere wichtige Adhäsionsfaktoren neben den bisher benannten sind die filamentösen Hämagglutinine. Die Hämagglutination ist häufig mit der Expression von Adhäsinen assoziiert, die an der Kolonisation von Schleimhäuten beteiligt sind (Abbildung 4.1).



Abbildung 4.1 Bildliche Darstellung einer *Pseudomonas*-Infektion der Lungenepithelzellen. Der erste Schritt der Infektion ist die Adhäsion von *Pseudomonas* (oberer, braun gefärbter Teil) an die Wirtszellen (unterer, blau gefärbter Bereich). Dafür sind u. a. Adhäsine, Flagelline, Typ IV Pili und filamentöses Hämagglutinin verantwortlich (hier als rot gefärbte Filamente abgebildet) (Graham Johnson, http://www.molecularmovies.com/showcase).

In *B. bronchiseptica* wird das filamentöse Hämagglutinin (FhaB) als der wichtigste Adhäsionsfaktor angesehen, da seine Expression für die erfolgreiche Kolonisierung des respiratorischen Trakts unbedingt erforderlich ist (Cotter *et al.*, 1998). Am N-terminalen Ende befinden sich mehrere Proteindomänen, die für die Anheftung an eukaryotische Zellen verantwortlich sind (Arico *et al.*, 1993). Das N-terminale Ende von FhaB kann allerdings auch von der Bakterienoberfläche abgespalten werden, was für die Verbreitung der Bakterien innerhalb des Wirtsorganismus bzw. auf einen Folgewirt erforderlich ist (Menozzi *et al.*, 1994). Da *P. aeruginosa* ebenfalls Proteine besitzt, die hämagglutinierende Eigenschaften aufweisen, z. B. die beiden Lektine LecA und LecB, sowie das filamentöse Hämagglutin PA0041, wurden Untersuchungen über die Fähigkeit der beiden Stämme PAO1 und $\Delta sprS$ zur Hämagglutination von Schafserythrozyten durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass der *sprS*-negative Stamm eine verstärkte Fähigkeit zur Hämagglutination besitzt, was durch eine eingeschränkte Prozessierung adhärierender Proteine durch das Fehlen von SprS an der Zelloberfläche erklärt werden könnte. Somit könnte eine mögliche Funktion von SprS der Abbau bzw. die Prozessierung von Adhäsinen an der Zelloberfläche sein.

Durch die vermehrte Zell-Zellaggregation und die verstärkte Hämagglutination wurde eine Veränderung der Zelloberfläche des *sprS*-negativen Stammes vermutet. Bereits aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass Subtilisin-ähnliche AT-Proteasen an der Prozessierung von Zelloberflächen-exponierten Proteinen beteiligt sind. So ist SphB1 aus *B. pertussis* an der Prozessierung des filamentösen Hämagglutinins (FHA) beteiligt (Coutte *et al.*, 2001), AasP

aus *Actinobacillus pleuropneumonia* modifiziert das Lipoprotein OmlA (Ali *et al.*, 2008) und NalP aus *N. meningitidis* prozessiert die Proteasen App und IgA (van Ulsen *et al.*, 2003).

4.5 Studien zum Einfluss von SprS auf die Proteinzusammensetzung der äußeren Membran und des Sekretoms

Um die prozessierende Fähigkeit von SprS zu untersuchen, wurde als nächster Schritt die äußere Membran der Zellen der beiden Stämme PAO1 und $\Delta sprS$ isoliert und durch SDS-PAGE analysiert. Es gab deutliche Abweichungen in den Proteinmustern der beiden Stämme. Die unterschiedlichen Banden wurden aus dem Gel eluiert, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass vor allem Proteine der äußeren Membran, die beim Transport von Nährstoffen eine Rolle spielen, in der Mutante verstärkt vorhanden sind. Das Protein OprQ (pa2760) zeigt im sprS-negativen Stamm eine deutlich prominentere Proteinbande als im Wildtyp PAO1. Das äußere Membranprotein OprQ gehört zur Familie der OprD-Proteine (Jaouen *et al.*, 2006; Tamber *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass das Protein OprQ ein bedeutender Virulenzfaktor bei der Infektion durch *P. aeruginosa* ist und an der Adhäsion an Wirtszellen beteiligt zu sein scheint (Arhin & Boucher). Die verstärkte Adhäsion des *sprS*-negativen Stammes kann somit zum Teil auch durch die Überexpression des Proteins OprQ erklärt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass SprS die Proteinzusammensetzung der äußeren Membran beeinflusst. Weiter sollte untersucht werden, ob ebenfalls Proteine des Kulturüberstandes verändert werden, indem sie beispielsweise von SprS prozessiert und freigesetzt werden und somit im *sprS*-negativen Stamm in einer geringeren Menge vorhanden sind.

Dazu wurde die Proteinzusammensetzung des extrazellulären Bereiches mittels SDS-PAGE analysiert. Es gab auch hier Unterschiede in der Proteinzusammensetzung, die nach tryptischen Verdau massenspektrometrisch analysiert wurde. Im hochmolekularen Bereich wurde ein Protein identifiziert, das im *sprS*-negativen Stamm nicht vorhanden war. Es handelt sich hierbei um das Protein, das durch den ORF *pa0572* kodiert wird. Die genaue Funktion des Proteins ist bisher nicht bekannt. Es beinhaltet ein Zink-Metalloproteasemotiv und wurde als mögliches Substrat des Xcp-Apparates beschrieben (Seo *et al.*, 2009). Ein möglicher Defekt des Xcp-Apparates und dadurch das Fehlen von PA0572 im Kulturüberstand des *sprS*-negativen Stammes kann zwar nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Jedoch konnte bei

anderen Substraten des TypII-Sekretionsapparates, wie bei der Lipase LipA und LipC (Martinez *et al.*, 1999; Rosenau & Jaeger, 2000) eine verstärkte Aktivität im Kulturüberstand des *sprS*-negativen Stammes im Vergleich zum Wildtyp-Stamm PAO1 gezeigt werden (Tabelle 3.1). Somit ist nicht anzunehmen, dass ein möglicher Deffekt des Xcp-Apparates die Ursache für das Fehlen von PA0572 im Kulturüberstand von $\Delta sprS$ ist. Weiterhin scheint SprS die Freisetzung von PA0572 in den Kulturüberstand zu beeinflussen. *Real time*-PCR-Analysen ergaben, dass die Transkriptmenge von *pa0572* in beiden Stämmen vergleichbar war, so dass davon auszugehen ist, dass die reduzierte Menge des Proteins im Kulturüberstand nicht mit der Transkription des Gens in Verbindung steht. Es bleibt somit festzuhalten, dass die Freisetzung von PA0572 in den Kulturüberstand die Anwesenheit von SprS benötigt. Ein weiteres, sekretiertes Protein, das im *sprS*-negativen Stamm weniger stark vorhanden ist, als im Wildtyp PAO1 ist die Elastase LasB (*pa3724*). Das Protein stellt einen der bedeutendsten Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* dar.

Um einen besseren Überblick über die Veränderung der extrazellulären Proteinzusammensetzung im *sprS*-negativen Stamm zu bekommen, wurde eine Sekretomanalyse mittels differentieller 2D-Gelelekrophorese durchgeführt. Es wurden IPG-Streifen, die einen pH-Bereich von 3-11 abdeckten und eine darauf folgende 12 %-ige SDS-PAGE eingesetzt. Die 2D-Gele wurden nach dem Lauf mit der Software Delta2D (Decodon) verglichen und analysiert. Es wurden insgesamt 416 veränderte Proteinspots identifiziert. Es fiel auf, dass im sprS-negativen Stamm die Anzahl der Proteinspots im Vergleich zum Wildtyp PAO1 erhöht war. Eine Zelllyse des sprS-negativen Stammes kann jedoch ausgeschlossen werden, da weitere Ergebnisse zeigten, dass dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp eher weniger stark lysiert (Anhang, Abbildung 8.3).

Die Analyse der 2D-Gele ergab, dass 45 Proteinspots im *sprS*-negativen Stamm um mindestens das Doppelte erhöht sind und 28 Proteinspots mit einer um mehr als der Hälfte verminderten Intensität im Sekretom von $\Delta sprS$ vorhanden sind. Zur weiteren Analyse wurde eine Auswahl der in der Intensität veränderten Proteinspots aus den Gelen eluiert, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch identifiziert.

Die Ergebnisse zeigten, dass im *sprS*-negativen Stamm vor allem Proteine vermehrt vorhanden sind, die mit der Adhäsion des Bakteriums in Verbindung stehen, wie das Protein FliD (Arora *et al.*, 1998). Somit konnten die zuvor beschriebenen Ergebnisse einer verstärkten Adhäsionsfähigkeit von $\Delta sprS$ bestätigt werden. Ferner ergaben die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse, dass im *sprS*-negativen Stamm insbesondere Proteasen herunterreguliert sind, vor allem die prominentesten Proteasen aus *P. aeruginosa*, die Elastase LasB und die ProteaseIV. Somit konnte das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse der untersuchten Kulturüberstände bestätigt werden. Zur Quantifizierung wurde die Menge der Proteinspots bestimmt. Es konnte eine Differenz der Proteinmenge im *sprS*-negativen Stamm von 55 % im Vergleich zum Wildtyp PAO1 für die Elastase LasB und 66 % für die Protease IV gemessen werden.

Die veränderte Proteinmenge bedingt jedoch nicht zwangsweise auch eine Veränderung der Aktivität der jeweiligen Proteasen. Da die enzymatische Aktivität aber die entscheidende Rolle bei der Virulenz des Organismus spielt, wurde die Aktivität der Proteasen LasB und Protease IV in einem Proteaseaktivitätstest photometrisch bestimmt. Der photometrische Test zur Bestimmung der Elastase-Aktivität beruht auf der Spaltung von mit *Congo red* gekoppeltem Elastin. Die Aktivität der Elastase LasB im *sprS*-negativen Stamm war so gering, dass sie unter die Nachweisgrenze fiel. Das Protein konnte allerdings auch im *sprS*-negativen Stamm in geringen Mengen mittels SDS-PAGE detektiert werden, zeigte allerdings keine messbare Aktivität. Die Protease IV-Aktivität wurde mit Hilfe eines photometrischen Tests analysiert, der auf der Spaltung von Chromozym PL (tosyl-Gly-Pro-Lys-*p*-nitroanilide) beruht. Die Protease IV wies im *sprS*-negativen Stamm noch eine Restaktivität von 2 % im Vergleich zum Wildtyp PAO1 auf.

Die Ergebnisse stimmen somit mit der Bestimmung der Proteinmenge überein und es kann festgehalten werden, dass die beiden Proteasen LasB und Protease IV in $\Delta sprS$ in deutlich geringeren Mengen vorhanden sind.

4.6 Transkriptionsanalysen

Es sollte analysiert werden, ob die durch proteinbiochemische Methoden ermittelten Veränderungen der Proteasemengen in der Mutante bereits auf transkriptioneller Ebene eingeleitet werden. Dafür wurde mittels real time-PCR das Transkriptlevel einer Auswahl an Proteasen untersucht. Die Proteasen repräsentieren eine Auswahl an intra- und extrazellulären Proteasen, die alle eine Signalsequenz besitzen. Die differentielle Expression der Proteasegene wurde bestimmt, indem die Genexpression in P. aeruginosa $\Delta sprS$ auf die Expression in P. aeruginosa PAO1 bezogen wurde. Es konnten deutliche Unterschiede bezüglich der Transkription der ausgewählten Gene festgestellt werden. Generell konnten drei Gruppen definiert werden, die im Vergleich zum Wildtyp PAO1 erhöht, erniedrigt oder unverändert exprimiert wurden. Zu den im sprS-negativen Stamm verstärkt exprimierten Proteasegene zählen *pa1832*, auch als *sohB* bekannt, *pa1242*, welches der zweiten Subtilisinähnlichen Protease sprP entspricht, pa5474 und pa3649. Sehr viel geringere Expressionslevel in $\Delta sprS$ konnten bei pa0328, pa0766, auch als mucD bekannt, pa0372, pa3986, pa0580 (gcp), pa1871 (lasA), pa2939 (pepB) und pa3724 (lasB) gemessen werden. Fünf der neun schwächer exprimierten Proteasegene konnten bisher bekannten Virulenzfaktoren von P. aeruginosa zugeordnet werden. Auch für die beiden in den Sekretomanalysen identifizierten Proteasen LasB und Protease IV konnte hier eine deutlich verringerte Transkription beobachtet werden. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Veränderung der Proteinmengen dieser beiden Proteasen im sprS-negativen Stamm bereits auf transkriptioneller Ebene bedingt wurden.

4.7 Koregulation der beiden Subtilisin-ähnlichen Proteasen SprS und SprP

Das Gen *pa1242* der zweiten Subtilisin-ähnlichen Protease SprP aus *P. aeruginosa* wird im *sprS*-negativen Stamm verstärkt exprimiert. Da *P. aeruginosa* nur zwei Subtilisin-ähnliche Proteasen besitzt kann ein funktioneller Zusammenhang der beiden Proteasen auf transkriptioneller Ebene vermutet werden. Um diese Vermutung näher zu untersuchen, wurden transkriptionelle *lacZ*-Fusionen konstruiert. Hierbei wurde der jeweilige Promotor der beiden Gene *pa1242(sprP)* und *sprS* in den Vektor pTZ110 stromaufwärts des promotorlosen *lacZ*-Gens kloniert. Zunächst wurde untersucht, wie die Transkription der beiden Gene im Wildtyp PAO1 abläuft. Die Promotoraktivität der beiden Gene wurde über die β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt und über 24 h gemessen. Es konnte gezeigt werde, dass beide Gene zur gleichen Zeit transkribiert werden und nach 11 h die stärkste Transkription abläuft. Der Promotor von *pa1242* wird generell stärker abgelesen, verhält sich vom zeitlichen Verlauf her aber ähnlich zum Promotor von *sprS*. Beide Gene werden am stärksten in der spät-logarithmischen Phase des Wachstums transkribiert, was für Gene anderer Virulenzfaktoren bereits bekannt ist. Dadurch, dass die beiden Gene in der gleichen Phase des Wachstums transkribiert werden, kann eine gegenseitige Beeinflussung möglich sein.

Das Ergebnis der real time-PCR zeigte, dass pa1242 (sprP) im sprS-negativen Stamm verstärkt transkribiert wird. Um dieses Ergebnis näher zu analysieren, wurden die transkriptionellen *lacZ*-Fusionen ebenfalls in den Stamm $\Delta sprS$ eingebracht. Um einen direkten Vergleich der Promotoraktivitäten zu erhalten, wurde ein Zeitpunkt gewählt, an dem die beiden Promotoren von pa1242 und sprS im P. aeruginosa Wildtyp PAO1 gleich stark transkribiert werden. Hierfür wurde der Zeitpunkt nach 8 h gewählt, an dem die Zellen sich bereits in der spät-logarithimischen Phase befinden. Es wurde gezeigt, dass die Promotoraktivitäten beider Gene (sprP und sprS) im sprS-negativen Stamm um mehr als das 10-fache verstärkt sind. Das Ergebnis der real time-PCR-Analyse wurde somit bestätigt und es konnte zudem gezeigt werden, dass auch der Promotor des fehlenden sprS-Gens im sprSnegativen Stamm verstärkt abgelesen wird. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Fehlen des SprS-Proteins durch eine verstärkte Transkription des Gens zu kompensieren versucht wird. Durch das Fehlen von SprS wird aber nicht nur der eigene Promotor verstärkt aktiviert sondern auch der des Gens pa1242 (sprP), das ebenfalls für eine Subtilisin-ähnliche Protease kodiert. Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Expression von pa1242 (sprP) ist eine Kompensation durch pa1242 (sprP) von sprS. Zur Bestätigung der Beobachtungen wurden Komplimentationsstudien durchgeführt. Nach Einbringen einer Plasmid-kodierten *sprS*-Kopie in den *sprS*-negativen Stamm wurde die Promotoraktivität der beiden Gene *pa1242* und *sprS* erneut gemessen. Auch hier wurde der Zeitpunkt nach 8 h gewählt und die Promotoraktivität indirekt über die β-Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Anhand der gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass durch das Einbringen des auf dem Plasmid unter Kontrolle des konstitutiven *lacZ*-Promotors kodierten *sprS*-Gens die Promotoraktivität von *pa1242* wieder abfällt. Es konnte somit ein direkter Einfluss von *sprS* auf die Promotoraktivität von *pa1242* gezeigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch die Promotoraktivität von *sprS* selbst durch das Einbringen des *sprS*-Gens abnimmt, was die Präsenz eines Rückkopplungsmechanismus vermuten lässt.

4.8 Einfluss von SprS auf die Virulenz von Pseudomonas aeruginosa

Zu den Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* zählen im Allgemeinen verschiedene Proteasen, Lipasen, Phospholipasen, das Exotoxin A und das Exotoxin S. *P. aeruginosa* sekretiert verschiedene Proteasen, von denen vor allem die alkalische Protease AprE und die beiden Zink-Metalloproteasen Elastase LasA und Elastase LasB von großem medizinischem Interesse sind. Die Elastase besitzt neben ihrer Fähigkeit Elastin abzubauen auch die Fähigkeit, Kollagen zu spalten (Heck *et al.*, 1986), inaktiviert Bestandteile des Immunsystems wie Immunglobulin A (Heck *et al.*, 1990) und Substanzen, die am Schutz des Respirationstraktes vor Proteasen beteiligt sind, wie den humanen α -1-Proteaseinhibitor (Morihara *et al.*, 1979). Wie zuvor beschrieben, wurde beobachtet, dass eine Reihe von Virulenzfaktoren im *sprS*-negativen Stamm in veränderter Menge produziert wird.

An der Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital in Bosten wurden zwei Tiermodelle eingesetzt, in denen die Pathogenität der beiden Stämme PAO1 und $\Delta sprS$ vergleichend überprüft werden sollte. Zum einen wurde die Taufliege *Drosophila melanogaster* gewählt, da sie sich vor allem durch ihre geringe Größe und der damit verbundenen leichten Handhabbarkeit im Labor sowie durch eine hohe Fortpflanzungsrate mit einer Generationszeit von zwölf Tagen auszeichnet. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um die Tiere zu infizieren. Bei der *needle pricking*-Methode erfolgt die Infizierung mit den beiden *P. aeruginosa*-Stämmen PAO1 und $\Delta sprS$ durch Eintauchen einer Nadel in die jeweilige Bakterienkultur und anschließender Punktierung des dorsolateralen Thorax der Tiere. Dabei korreliert die Mortalität der Tiere mit der Fähigkeit des Bakteriums, sich innerhalb des Wirtsorganismus vermehren zu können. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Tiere, die mit dem P. aeruginosa Wildtyp PAO1 infiziert wurden, signifikant früher verstarben als die Tiere, die mit dem sprS-negativen Stamm infiziert wurden. Selbst nach 40 h waren noch knapp 70 % der Fliegen, die mit der Mutante infiziert worden waren, lebensfähig. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Pathogenität von $\Delta sprS$ im Modell von D. melanogaster herabgesetzt ist. Die zuvor gezeigten Ergebnisse einer verminderten Produktion einiger an der Virulenz beteiligter Proteine, wie der Elastase LasB und auch die beobachtete verminderte Fähigkeit zur Hämolyse, werden somit in diesem Modellorganismus unterstrichen. Eine weitere Methode der Infektion, die verwendet wird, um die Pathogenität von Mikroorganismen in D. melanogaster zu untersuchen, ist die Methode des feedings. die Hierbei wurden Tiere mit Anzahl einer von 10⁴ – 10⁵ Bakterien infiziert und darüber hinaus mit Bakterien-haltigem LB-Medium gefüttert. Bei dieser Methode wird eine Langzeitinfektion des Gastrointestinaltrakts ausgelöst. Hierbei wurden die infizierten Tiere über 14 Tage beobachtet. Es stellte sich heraus, dass die Tiere, die mit dem sprS-negativen Stamm infiziert wurden nach 14 Tagen noch zu 80 % lebensfähig waren, wohingegen alle Tiere, die mit dem Wildtyp PAO1 infiziert wurden, bereits nach 10 Tagen verstorben sind. Anhand des Modellorganismuses D. melanogaster konnte somit gezeigt werden, dass der sprS-negative Stamm, wie zuvor bereits durch die Ergebnisse bezüglich der verminderten Synthese verschiedener Virulenzfaktoren vermutet, eine geringere Pathogenität aufweist.

Wie zuvor beschrieben, wurde der beobachtete Einfluss von SprS auf einzelne Virulenzfaktoren in einem in vivo-Pathogenitätsmodell bestätigt, bei dem das Zusammenwirken verschiedener Virulenzfaktoren betrachtet wurde. P. aeruginosa verursacht Infektionen und ist für die Entstehung von Krankheiten sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen verantwortlich. Insbesondere Arabidopsis thaliana hat sich als Modellorganismen für Studien tier- oder humanpathogener Bakterien etabliert (Rahme et al., 2000). Um Aufschluss über den Einfluss von SprS auf die Phytopathogenität zu erhalten, wurden A. thaliana-Blätter mit den P. aeruginosa-Kulturen PAO1 und $\Delta sprS$ beimpft. Die Untersuchungen wiesen darauf hin, dass ein deutlicher Unterschied des phytopathogenen Potentials der beiden Stämme vorlag. Nach einem Infektionsverlauf von 4 Tagen wurde die Anzahl lebensfähiger P. aeruginosa-Zellen innerhalb der Blätter bestimmt. Bei anfangs vergleichbaren Bakterienzahlen konnte bereits nach 2 Tagen eine signifikant geringere Zelldichte des *sprS*-negativen Stammes gemessen werden, was darauf hindeutet, dass der *sprS*-negative Stamm verglichen mit dem Wildtyp PAO1 in dem verwendeten Modellorganismus ein geringeres phytopathogenes Potential aufweist. Die Untersuchungen eines weiteren Modellorganismus zeigten somit, dass die Deletion von *sprS* zu einer signifikanten Verminderung der Virulenz von *P. aeruginosa* führt.

Mit SprS konnte ein weiteres AT-Protein in P. aeruginosa identifiziert werden. Diese Subtilisin-ähnliche AT-Protease ist an der Ausprägung diverser Virulenz-assoziierter Phänotypen beteiligt. Sowohl auf Proteinebene als auch auf transkriptioneller Ebene beeinflusst SprS vor allem weitere Proteasen aus P. aeruginosa. Da bisher sowohl für SprS als auch für andere Proteasen dieser Untergruppe keine Aktivität gegenüber kommerziell erhältlichen Subtraten beobachtet werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass SprS eine spezifische Prozessierung in P. aeruginosa ausführt. Schon für andere Subtilisin-ähnliche Proteasen wurde gezeigt, dass sie Virulenzfaktoren auf der Zelloberfläche spezifisch prozessieren. So prozessiert SphB1 das filamentöse Hämagglutinin FhaB in B. pertussis (Coutte, et al., 2001). NisP ist eine Subtilisin-ähnliche Protease, die an der Prozessierung eines Vorläufers des sekretierten, antibiotischen Peptids Nisin beteiligt ist (Kleerebezem & Quadri, 2001) und AasP aus Actinobacillus pleuropneumoniae, das an der Prozessierung von OmlA beteiligt ist. Die beobachteten Veränderungen der Proteinzusammensetzung in der äußeren Membran des sprS-negativen Stammes im Vergleich zum Wildtyp PAO1 geben weitere Hinweise darauf, dass SprS die Prozessierung spezifischer Substrate vornimmt. In weiterführenden Studien soll versucht werden, die Aufreinigung von SprS zu optimieren, um mögliche Substrate der Protease in vitro zu identifizieren. Die Expression im homologen Wirt könnte durch Einsatz schwächerer Promotoren wie z. B. dem tac-Promotor, die Ausbeute an funktionalem Protein steigern.

Das Fehlen von SprS führt zu einer veränderten Regulation weiterer Virulenzfaktoren, was darauf hindeutet, dass durch die Abwesenheit von SprS selbst oder aber durch die Abwesenheit eines Spaltproduktes von SprS regulatorische und phänotypische Veränderungen in der Zelle ablaufen. Um weitere Erkenntnisse über eine mögliche Regulation von *sprS* zu erhalten, wurde zum Ende dieser Arbeit eine Transposonmutagenese

im *sprS*-negativen Stamm durchgeführt, die in Zukunft näher untersucht wird. Expressionsstudien in dieser Arbeit zeigten, dass *sprS* in der spät-logarithmischen Phase des Wachstums und vergleichsweise schwach exprimiert wird. Es soll weiter untersucht werden, ob die Expression von *sprS* in Gegenwart eines Wirtsorganismus gesteigert werden kann, wie es bereits für andere homologe Proteine gezeigt werden konnte (Hu *et al.*, 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Deletion des Gens *sprS* zu einer verminderten Virulenz führt. Um weitere Einblicke in die Pathogenität des *sprS*-negativen Stammes zu erhalten, wird ein *sprS*-negativer Stamm in *P. aeruginosa* PA14 erzeugt, der anschließend in einem Mausmodell auf seine Pathogenität hin untersucht werden soll.

5 Zusammenfassung

Pseudomonas aeruginosa, ein Gram-negativer opportunistischer Krankheitserreger, ist Auslöser einer Vielzahl verschiedenster Infektionen und zählt zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen. Die Virulenz des Bakteriums beruht auf der Produktion eines Arsenals zellassoziierter und extrazellulärer Faktoren. Eine große Bedeutung haben hier die Autotransporter-Proteine (AT-Proteine), denen eine Eigenschaft als Virulenzfaktor zugesprochen wird. Diese Proteine bilden mit einer C-terminalen Domäne eine Pore in der äußeren Membran, durch welche die katalytisch aktive Domäne in den extrazellulären Raum transportiert wird. Durch Sequenzanalysen konnte das Gen sprS im Genom von P. aeruginosa identifiziert werden. Ein angefertigtes Homologiemodell des C-Terminus des entsprechenden Proteins zeigt die Zugehörigkeit von SprS zu bereits charakterisierten AT-Proteinen, wie EstA aus P. aeruginosa oder NalP aus N. meningitidis. Aufgrund des Konsensusmotivs GTSMA um das katalvtisch aktive Serin 308 kann SprS zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Proteasen gezählt werden. Die katalytische Triade besteht neben Serin 308 aus Histidin 122 und Aspartat 79. Eine BLAST-Analyse ergab eine weite Verbreitung von SprS-Homologen in zahlreichen human- und phytopathogenen Pseudomonaden sowie in anderen pathogenen Bakterien-Spezies.

In dieser Arbeit wurde SprS, das bislang als putative Serinprotease PA3535 annotiert ist, als möglicher Virulenzfaktor sowohl auf molekularer Ebene als auch hinsichtlich seiner biologischen Funktion charakterisiert.

SprS konnte erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert und in einer annähernd reinen Form für Aktivitätstest gewonnen werden. Eine Aktivität gegenüber gängigen Protease-Substraten konnte nicht nachgewiesen werden, wobei unklar bleibt, ob hierfür eine Fehlfaltung des rekombinanten Proteins verantwortlich ist, oder aber, ob von dieser Untergruppe der Subtilisin-ähnlichen Proteasen, zu der auch Ssp-h1 aus *S. marcescens* zählt, spezifische, bislang unbekannte Substrate gespalten werden. Auch die Expression des proteolytisch aktiven N-Terminus allein führte zu keiner messbaren Aktivität gegenüber herkömmlichen Substraten.

Transkriptionsstudien von *sprS* zeigten, dass das Gen in der spät-logarithmischen Phase des Wachstums exprimiert wird. Interessanterweise konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Expression von *sprS* bei niedrigen Temperaturen verstärkt induziert wird.

Es konnte ein deutlicher Einfluss von SprS auf verschiedene, mit der Virulenz in Verbindung stehende Phänotypen von P. aeruginosa beobachtet werden. Der sprS-negative Stamm zeigte eine starke Tendenz zur Zellaggregation und eine damit verbundene, verstärkte Biofilmbildung. Dieser adhäsive Phänotyp weist auf eine veränderte Oberfläche der Zellen von $\Delta sprS$ hin, was durch eine Proteomanalyse der äußeren Membran bestätigt werden konnte. Die Analyse extrazellulärer Proteine im sprS-defizienten Stamm zeigte u. a. Veränderungen bezüglich der Proteinmenge und der Aktivität zweier als Virulenzfaktoren beschriebener Proteasen, der Elastase LasB und der Protease IV. In weiterführenden Transkriptionsstudien wurde beobachtet, dass die veränderten Proteinmengen dieser beiden Proteasen im sprS-negativen Stamm bereits auf transkriptioneller Ebene beeinflusst wurden. Anhand von real time-PCR-Analysen ergaben sich deutliche Unterschiede bezüglich der Transkription weiterer ausgewählter Protease-Gene im sprS-negativen Stamm, was auf eine koordinierte Regulation der Proteasen in P. aeruginosa hindeutet. Eine zweite Subtilisinähnliche Protease, SprP aus P. aeruginosa, wurde im sprS-negativen Stamm verstärkt exprimiert, was einen funktionellen Zusammenhang der beiden Proteasen nahelegt. Anhand von Reporterfusionen konnte ein direkter Einfluss von sprS auf die Promotoraktivität von sprP beobachtet werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch die Promotoraktivität von sprS selbst durch das Wiedereinbringen einer Plasmid-kodierten Kopie des sprS-Gens in den Wildtyp-Niveau *sprS*-negativen Stamm auf absinkt, was die Präsenz eines Rückkopplungsmechanismus vermuten lässt.

Aufgrund der Beobachtung, dass eine Reihe wichtiger Virulenzfaktoren im *sprS*-negativen Stamm in veränderter Menge produziert werden, wurde in den Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* und *Drosophila melanogaster* die Pathogenität der beiden Stämme PAO1 und $\Delta sprS$ vergleichend überprüft. In beiden Modellen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Pathogenität von $\Delta sprS$ herabgesetzt ist.

SprS, ein weiteres AT-Protein, ist an der Modulation virulenzassozierter Funktionen beteiligt und kann damit als ein bislang unbekannter Virulenzfaktor aus *P. aeruginosa* angesehen werden.

6 Summary

The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is a causative agent of a variety of chronic and acute infections and an important cause of nosocomial pneumonia. The bacterium produces several cell-associated and extracellular virulence factors, including the family of autotransporter proteins (AT proteins). A C-terminal domain of these proteins forms a pore within the outer membrane, through which the catalytically active N-terminus is translocated into the extracellular space. By sequence alignments the gene *sprS* was identified in the genome of *P. aeruginosa*. Homology modeling of the C-terminus suggested that SprS belongs to the group of already characterized AT proteins, such as EstA from *P. aeruginosa* and NalP from *Neisseria meningitidis*. Moreover, the presence of a GTSMA consensus sequence surrounding the catalytic serine 308 suggests that SprS is a member of the family of subtilisin-like proteases. In addition to serine 308, the catalytic triad of SprS is composed of histidin 122 and aspartate 79. Blast analyses revealed a wide distribution of SprS-homologous proteins in numerous human- and phytopathogenic pseudomonades as well as in other pathogenic bacteria.

In the present study SprS, which is annotated as putative serine protease PA3535, was characterized structurally and its physiological function was investigated.

SprS was successfully overexpressed in *E. coli* and was purified for subsequent activity assays. However, proteolytic activity against common substrates, neither of the full length protein nor of the N-terminal catalytic domain alone, could be observed. Whether this lack of activity is caused by misfolding of the recombinant protein, or members of this subgroup of subtilisin-like proteases, including Ssp-h1 of *S. marcescens*, cleave specific and yet unkown substrates, remains uncertain.

Studies on the transcription of *sprS* revealed that the gene is expressed in the late logarithmic growth phase. Interestingly, expression of *sprS* was shown to be upregulated at lower temperatures.

Phenotypic studies using a *sprS*-deficient strain indicated that SprS has a significant impact on several virulence-associated phenotypes, such as rhamnolipid production and hemolysis. *sprS*-negative cells tend to aggregate in culture and form biofilms thicker than the wild type strain, suggesting a modified cell surface of $\Delta sprS$, which was verified by proteomic analyses of the outer membrane.

In addition, the *sprS*-negative strain secreted different amounts of the elastase LasB and the protease IV, two proteases, which were shown to contribute to the pathogenicity of *P. aeruginosa*. The altered protease concentrations in $\Delta sprS$ were already induced on the transcriptional level as shown by detailed transcription studies.

Real time-PCR analyses demonstrated that the genes of several proteases are differentially expressed in the *sprS*-negative strain, suggesting a coordinated regulation of the *P. aeruginosa* proteases in a network-like manner. Expression of the second subtilisin-like protease SprP of *P. aeruginosa* was upregulated in $\Delta sprS$, indicating a functional relation of these two proteases.

By the use of reporter fusion constructs it was shown that SprS directly influences the promoter activity of *sprP*. Upon reconstitution of the *sprS*-negative strain with an episomal copy of the gene, both the expression levels of *sprP* and *sprS* itself, which are significantly increased in $\Delta sprS$, dropped to wild type levels, suggesting a feedback regulation of *sprS*.

The aberrant levels of several virulence determinants in $\Delta sprS$ lead us to investigate the pathogenicity of the mutant strain in two different model organisms, *Arabidopsis thaliana* and *Drosophila melanogaster*, and compare it to the wild type PAO1. In both models a significantly reduced pathogenicity of the $\Delta sprS$ strain was observed.

SprS, a novel AT protein, modulates several virulence-assocciated functions, and hence may be regarded as a so far unknown virulence factor of *P. aeruginosa*.

7 Literaturverzeichnis

Abdallah, A. M., Gey van Pittius, N. C., Champion, P. A. & other authors (2007).

Type VII secretion--mycobacteria show the way. Nat Rev Microbiol 5, 883-891.

Adamo, R., Sokol, S., Soong, G. & other authors (2004).

Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and tolllike receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 627-634.

Aizawa, S. I. (2001).

Bacterial flagella and type III secretion systems. FEMS Microbiol Lett 202, 157-164.

Alcorn, J. F. & Wright, J. R. (2004).

Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* **279**, 30871-30879.

Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. & Croughan, T. P. (1995).

Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**, 63-67.

Ali, T., Oldfield, N. J., Wooldridge, K. G. & other authors (2008).

Functional characterization of AasP, a maturation protease autotransporter protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect Immun **76**, 5608-5614.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A. & other authors (1997).

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

Amaral, M. D. & Kunzelmann, K. (2007).

Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 334-341.

Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y. & other authors (2000).

Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 4**, 1563-1589.

Apidianakis, Y. & Rahme, L. G. (2009).

Drosophila melanogaster as a model host for studying Pseudomonas aeruginosa infection. Nat Protoc 4, 1285-1294.

Aplin, A. C., Zhu, W. H., Fogel, E. & other authors (2009).

Vascular regression and survival are differentially regulated by MT1-MMP and TIMPs in the aortic ring model of angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C471-480.

Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S. & other authors (2000).

Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F(1)F(o) ATP synthase. *FEBS Lett* **482**, 215-219.

Arhin, A. & Boucher, J. C. (2010).

The Outer Membrane Protein OprQ and Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to Human Fibronectin. *Microbiology*.

Arico, B., Nuti, S., Scarlato, V. & Rappuoli, R. (1993).

Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9204-9208.

Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C. & other authors (1998).

The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun* **66**, 1000-1007.

Baker, N. R., Minor, V., Deal, C. & other authors (1991).

Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S is an adhesion. Infect Immun 59, 2859-2863.

Bell, K. S., Sebaihia, M., Pritchard, L. & other authors (2004).

Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11105-11110.

Bendiak, G. N. & Ratjen, F. (2009).

The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* **30**, 587-595.

Berka, R. M. & Vasil, M. L. (1982).

Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. *J Bacteriol* **152**, 239-245.

Berthiaume, F., Rutherford, N. & Mourez, M. (2007).

Mutations affecting the biogenesis of the AIDA-I autotransporter. *Res Microbiol* **158**, 348-354.

Bitter, W. (2003).

Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* **179**, 307-314.

Blow, D. M. & Smith, J. M. (1975).

Enzyme substrate and inhibitor interactions. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 272, 87-97.

Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. & other authors (1983).

Infections caused by Pseudomonas aeruginosa. Rev Infect Dis 5, 279-313.

Bonifait, L., Grignon, L. & Grenier, D. (2008).

Fibrinogen induces biofilm formation by *Streptococcus suis* and enhances its antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* **74**, 4969-4972.

Brooun, A., Liu, S. & Lewis, K. (2000).

A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 640-646.

Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M. & other authors (2003).

The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas* syringae pv. tomato DC3000. Proc Natl Acad Sci USA **100**, 10181-10186.

Caballero, A., Thibodeaux, B., Marquart, M. & other authors (2004).

Pseudomonas keratitis: protease IV gene conservation, distribution, and production relative to virulence and other *Pseudomonas* proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 522-530.

Carrio, M. M. & Villaverde, A. (2002).

Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. J Biotechnol 96, 3-12.

Cervin, M. A., Simpson, D. A., Smith, A. L. & other authors (1994).

Differences in eucaryotic cell binding of Pseudomonas. Microb Pathog 17, 291-299.

Chabeaud, P., de Groot, A., Bitter, W. & other authors (2001).

Phase-variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog, and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*. *J Bacteriol* **183**, 2117-2120.

Chayabutra, C. & Ju, L. K. (2001).

Polyhydroxyalkanoic acids and rhamnolipids are synthesized sequentially in hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Biotechnol Prog* **17**, 419-423.

Chilton, M. D., Currier, T. C., Farrand, S. K. & other authors (1974).

Agrobacterium tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc Natl Acad Sci USA 71, 3672-3676.

Cornelis, G. R. & Wolf-Watz, H. (1997).

The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**, 861-867.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G. & other authors (1987).

Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol 41, 435-464.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E. & other authors (1995).

Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 49, 711-745.

Cotter, P. A., Yuk, M. H., Mattoo, S. & other authors (1998).

Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. *Infect Immun* **66**, 5921-5929.

Cotter, S. E., Surana, N. K. & St Geme, J. W., 3rd (2005).

Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **13**, 199-205.

Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H. & other authors (2001).

Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *Embo J* **20**, 5040-5048.

Crouch, E. C. (1998).

Collectins and pulmonary host defense. Am J Respir Cell Mol Biol 19, 177-201.

da Silva, A. C., Ferro, J. A., Reinach, F. C. & other authors (2002).

Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**, 459-463.

Dautin, N. & Bernstein, H. D. (2007).

Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. Annu Rev Microbiol 61, 89-112.

Davey, M. E. & O'Toole G, A. (2000).

Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847-867.

Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. (2003).

Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**, 1027-1036.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P. & other authors (1998).

The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298.

de Kievit, T. R. (2009).

Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Environ Microbiol 11, 279-288.

Dealler, S. F. & Holton, A. (1992).

Pseudomonas aeruginosa is retained in the bronchi of cystic fibrotics by the increased transepithelial potential. *Med Hypotheses* **37**, 186-190.

DelMar, E. G., Largman, C., Brodrick, J. W. & other authors (1979).

A sensitive new substrate for chymotrypsin. Anal Biochem 99, 316-320.

Desvaux, M., Parham, N. J. & Henderson, I. R. (2004).

Type V protein secretion: simplicity gone awry? Curr Issues Mol Biol 6, 111-124.

Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. & other authors (2004).

Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1339-1344.

Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R. & other authors (2003).

The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell densitydependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* **50**, 29-43.

Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002).

Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**, 167-193.

Doring, G., Obernesser, H. J., Botzenhart, K. & other authors (1983).

Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 147, 744-750.

Drew, D., Froderberg, L., Baars, L. & other authors (2003).

Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 3-10.

Dunne, W. M., Jr. (2002).

Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev 15, 155-166.

Duong, F., Lazdunski, A., Cami, B. & other authors (1992).

Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationships to other secretory pathways. *Gene* **121**, 47-54.

Engel, L. S., Hill, J. M., Caballero, A. R. & other authors (1998a).

Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas* aeruginosa. J Biol Chem 273, 16792-16797.

Engel, L. S., Hill, J. M., Moreau, J. M. & other authors (1998b).

Pseudomonas aeruginosa protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 662-665.

Erez, E., Fass, D. & Bibi, E. (2009).

How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **459**, 371-378.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S. & other authors (1998).

Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 66, 43-51.

Fick, R. B., Jr., Baltimore, R. S., Squier, S. U. & other authors (1985).

IgG proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Infect Dis* **151**, 589-598.

Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J. & other authors (2010).

The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res 38, D211-222.

Fisher, J. F. & Mobashery, S. (2006).

Recent advances in MMP inhibitor design. Cancer Metastasis Rev 25, 115-136.

Flemming, H. C. & Wingender, J. (2001).

Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol* **43**, 1-8.

Fountoulakis, M. & Langen, H. (1997). Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* **250**, 153-156.

Frank, L. H. & Demoss, R. D. (1959).

On the biosynthesis of pyocyanine. J Bacteriol 77, 776-782.

Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994).

Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.

Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S. & other authors (2002).

Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 184, 6472-6480.

Galloway, D. R. (1991).

Pseudomonas aeruginosa elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol* **5**, 2315-2321.

Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C. & other authors (2003).

ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788.

Gibson, R. L., Burns, J. L. & Ramsey, B. W. (2003).

Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 918-951.

Gross, D. C. C., Y. S. (1985).

Mechanism of plant pathogenesis by Pseudomonas species. Can J Microbiol 31, 403-410.

Gupta, R., Beg, Q. K. & Lorenz, P. (2002).

Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 15-32.

Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O. & other authors (2003).

Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng* **81**, 316-322.

Hahn, H. P. (1997).

The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa--*a review. *Gene* **192**, 99-108.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004).

Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 95-108.

Hanahan, D. (1983).

Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol 166, 557-580.

Hardie, K. R., Pommier, S. & Wilhelm, S. (2009).

Bacterial secreted proteins secretory mechanisms and role in pathogenesis. *Caister Academic Press, Norfolk, UK pp 451-478.*

Heck, L. W., Morihara, K., McRae, W. B. & other authors (1986).

Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* **51**, 115-118.

Heck, L. W., Alarcon, P. G., Kulhavy, R. M. & other authors (1990).

Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Immunol* 144, 2253-2257.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. & Nataro, J. P. (1998).

The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**, 370-378.

Henderson, I. R. & Nataro, J. P. (2001).

Virulence functions of autotransporter proteins. Infect Immun 69, 1231-1243.

Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M. & other authors (2004).

Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.

Hendrixson, D. R. & St Geme, J. W., 3rd (1998).

The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell* **2**, 841-850.

Hochuli, E., Dobeli, H. & Schacher, A. (1987).

New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* **411**, 177-184.

Hogardt, M., Hoboth, C., Schmoldt, S. & other authors (2007).

Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **195**, 70-80.

Hoiczyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M. & other authors (2000).

Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *Embo J* **19**, 5989-5999.

Holden, M. T., Titball, R. W., Peacock, S. J. & other authors (2004).

Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc* Natl Acad Sci U S A **101**, 14240-14245.

Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979).

Chromosomal genetics of Pseudomonas. Microbiol Rev 43, 73-102.

Hommel, R. K. (1990).

Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. Biosurfactants in hydrocarbon utilization. *Biodegradation* **1**, 107-119.

Horvat, R. T., Clabaugh, M., Duval-Jobe, C. & other authors (1989).

Inactivation of human gamma interferon by *Pseudomonas aeruginosa* proteases: elastase augments the effects of alkaline protease despite the presence of alpha 2-macroglobulin. *Infect Immun* **57**, 1668-1674.

Hu, Y. H., Liu, C. S., Hou, J. H. & other authors (2009).

Identification, characterization, and molecular application of a virulence-associated autotransporter from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. *Appl Environ Microbiol* **75**, 4333-4340.

Iglewski, B. H. & Kabat, D. (1975).

NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2284-2288.

Iglewski, B. H., Sadoff, J., Bjorn, M. J. & other authors (1978).

Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3211-3215.

Ikemura, H. & Inouye, M. (1988).

In vitro processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. J Biol Chem 263, 12959-12963.

Ikeno, T., Fukuda, K., Ogawa, M. & other authors (2007).

Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients. *Microbiol Immunol* **51**, 929-938.

Imundo, L., Barasch, J., Prince, A. & other authors (1995).

Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3019-3023.

Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R. & Coutte, L. (2004).

Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochim Biophys Acta* 1694, 235-257.

Jaeger, K. E., Kharazmi, A. & Hoiby, N. (1991).

Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function in vitro. *Microb Pathog* **10**, 173-182.

Jaouen, T., Coquet, L., Marvin-Guy, L. & other authors (2006).

Functional characterization of *Pseudomonas fluorescens* OprE and OprQ membrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 1048-1052.

Jarvis, F. G., Johnson, M.J. (1949).

A glycolipid produced by Pseudomonas aeruginosa. J Am Chem Soc 71: 4124-4126.

Johansen, H. K. & Hoiby, N. (1992).

Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. *Thorax* **47**, 109-111.

Johnson, M. K. & Boese-Marrazzo, D. (1980).

Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas* aeruginosa. Infect Immun **29**, 1028-1033.

Jose, J., Jahnig, F. & Meyer, T. F. (1995).

Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters. *Mol Microbiol* **18**, 378-380.

Joyce, J. A. & Hanahan, D. (2004).

Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. Cell Cycle 3, 1516-1619.

Julius, D., Brake, A., Blair, L. & other authors (1984).

Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* **37**, 1075-1089.

Kamath, S., Kapatral, V. & Chakrabarty, A. M. (1998).

Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. *Mol Microbiol* **30**, 933-941.

Kawai, E., Idei, A., Kumura, H. & other authors (1999).

The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. *Biochim Biophys Acta* **1446**, 377-382.

Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. (2009).

Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**, 363-371.

Kessler, B., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1992).

A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233**, 293-301.

Kessler, E. & Safrin, M. (1988).

Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Bacteriol* 170, 5241-5247.

Kessler, E., Safrin, M., Olson, J. C. & other authors (1993).

Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. In *J Biol Chem*, pp. 7503-7508.

Kessler, E., Safrin, M., Abrams, W. R. & other authors (1997).

Inhibitors and specificity of Pseudomonas aeruginosa LasA. J Biol Chem 272, 9884-9889.

Klauser, T., Pohlner, J. & Meyer, T. F. (1992).

Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *Embo J* **11**, 2327-2335.

Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F. & other authors (2000).

Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**, 5990-5996.

Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B. & other authors (1993).

Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**, 2329-2342.

Komori, Y., Nonogaki, T. & Nikai, T. (2001).

Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). *Toxicon* **39**, 1327-1332.

Konieczny, M. P. J., Benz, I., Hollinderbaumer, B. & other authors (2001).

Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal beta1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane beta2-domain. *Antonie Van Leeuwenhoek* **80**, 19-34.

Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H. & other authors (1994).

pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16, 800-802.

Kulich, S. M., Frank, D. W. & Barbieri, J. T. (1993).

Purification and characterization of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* 388. *Infect Immun* **61**, 307-313.

Kurokawa, M. & Kornbluth, S. (2009).

Caspases and kinases in a death grip. Cell 138, 838-854.

Laemmli, U. K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P. & other authors (2007).

Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947-2948.

Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G. & other authors (2006).

Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* **7**, R90.

Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E. & other authors (2005).

The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J Immunol* **175**, 7512-7518.

Letoffe, S., Redeker, V. & Wandersman, C. (1998).

Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol Microbiol* **28**, 1223-1234.

Liaudet-Coopman, E., Beaujouin, M., Derocq, D. & other authors (2006).

Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* **237**, 167-179.

Lindum, P. W., Anthoni, U., Christophersen, C. & other authors (1998).

N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **180**, 6384-6388.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).

Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. (2000).

Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**, 1051-1060.

Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J. (2000).

Biology of microorganisms, 9th edition. . Prentice Hall, New Jersey.

Makin, S. A. & Beveridge, T. J. (1996).

The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* **142 (Pt 2)**, 299-307.

Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A., Thibodeaux, B. A. & other authors (2005).

Pseudomonas aeruginosa protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L409-418.

Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F. & other authors (2009).

CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* **37**, D205-210.

Marcus, H., Austria, A. & Baker, N. R. (1989).

Adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheal epithelium. Infect Immun 57, 1050-1053.

Mariencheck, W. I., Alcorn, J. F., Palmer, S. M. & other authors (2003).

Pseudomonas aeruginosa elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 528-537.

Marquart, M. E., Caballero, A. R., Chomnawang, M. & other authors (2005). Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3761-3768.

Martinez, 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. *Mol Microbiol* **34**, 317-326.

Maurer, K. H. (2004).

Detergent proteases. Curr Opin Biotechnol 15, 330-334.

Mayank, D., Anshuman, M., Singh, R. K. & other authors (2009).

Nosocomial cross-transmission of *Pseudomonas aeruginosa* between patients in a tertiary intensive care unit. *Indian J Pathol Microbiol* **52**, 509-513.

McKnight, S. L., Iglewski, B. H. & Pesci, E. C. (2000).

The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas* aeruginosa. J Bacteriol 182, 2702-2708.

Menozzi, F. D., Boucher, P. E., Riveau, G. & other authors (1994).

Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella* pertussis. Infect Immun 62, 4261-4269.

Mikkelsen, H., Bond, N. J., Skindersoe, M. E. & other authors (2009).

Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **155**, 687-698.

Miller, J. H. (1972).

Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York*

Miroux, B. & Walker, J. E. (1996).

Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**, 289-298.

Mogensen, J. E. & Otzen, D. E. (2005).

Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol* **57**, 326-346.

Mogensen, J. E., Tapadar, D., Schmidt, M. A. & other authors (2005).

Barriers to folding of the transmembrane domain of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *Biochemistry* **44**, 4533-4545.

Morihara, K., Tsuzuki, H. & Oda, K. (1979).

Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor. *Infect Immun* **24**, 188-193.

Morlon-Guyot, J., Mere, J., Bonhoure, A. & other authors (2009).

Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication. *Infect Immun* **77**, 3090-3099.

Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S. & other authors (2006).

A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**, 1526-1530.

Müller, D., Benz, I., Tapadar, D. & other authors (2005).

Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. *Infect Immun* **73**, 3851-3859.

Mulvey, M. A. (2002).

Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli. Cell Microbiol 4, 257-271.

Nierman, W. C., DeShazer, D., Kim, H. S. & other authors (2004).

Structural flexibility in the Burkholderia mallei genome. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 14246-14251.

Nouwens, A. S., Cordwell, S. J., Larsen, M. R. & other authors (2000).

Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas* aeruginosa PAO1. Electrophoresis **21**, 3797-3809.

Nunn, D., Bergman, S. & Lory, S. (1990).

Products of three accessory genes, pilB, pilC, and pilD, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J Bacteriol* **172**, 2911-2919.

Nunn, D. N. & Lory, S. (1991).

Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3281-3285.

O'Callaghan, R. J., Engel, L. S., Hobden, J. A. & other authors (1996).

Pseudomonas keratitis. The role of an uncharacterized exoprotein, protease IV, in corneal virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 534-543.

O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).

Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 54, 49-79.

O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998).

Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**, 295-304.

Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I. & other authors (2002).

Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 8312-8317.

Ohman, D. E. & Chakrabarty, A. M. (1981).

Genetic mapping of chromosomal determinants for the production of the exopolysaccharide alginate in a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate. *Infect Immun* **33**, 142-148.

Ohnishi, Y., Beppu, T. & Horinouchi, S. (1997).

Two genes encoding serine protease homologues in *Serratia marcescens* and characterization of their products in *Escherichia coli*. *J Biochem* **121**, 902-913.

Ohta, Y., Hojo, H., Aimoto, S. & other authors (1991).

Pro-peptide as an intramolecular chaperone: renaturation of denatured subtilisin E with a synthetic pro-peptide [corrected]. *Mol Microbiol* **5**, 1507-1510.

Oliver, D. C., Huang, G., Nodel, E. & other authors (2003).

A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* **47**, 1367-1383.

Olson, G. J., Woese, C.R., Overbeck, R. (1994).

The wind of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. J Bacteriol 176: 1-6.

Oomen, C. J., van Ulsen, P., van Gelder, P. & other authors (2004).

Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. Embo J 23, 1257-1266.

Overall, C. M. & Kleifeld, O. (2006).

Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**, 227-239.

Paetzel, M., Strynadka, N. C., Tschantz, W. R. & other authors (1997).

Use of site-directed chemical modification to study an essential lysine in *Escherichia coli* leader peptidase. *J Biol Chem* **272**, 9994-10003.

Palleroni, N. J. (1984).

Pseudomonaceae. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.),. Bergery's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore pp 141-199.

Palleroni, N. J. (1986).

Taxonomy of the *Pseudomonads*. In: Sokatch, J.R. (ed.) The bacteria, Vol X: The biology of *Pseudomonas*. *Academic Press, Orlando, pp 3-20*.

Palleroni, N. J. (1993).

Pseudomonas classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 231-251.

Parmely, M., Gale, A., Clabaugh, M. & other authors (1990).

Proteolytic inactivation of cytokines by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 58, 3009-3014.

Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L. & other authors (1994).

Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 197-201.
Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. & other authors (1995).

A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1490-1494.

Pearson, M. M., Sebaihia, M., Churcher, C. & other authors (2008).

Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J Bacteriol* **190**, 4027-4037.

Pedrotta, V. & Witholt, B. (1999).

Isolation and characterization of the cis-trans-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *J Bacteriol* **181**, 3256-3261.

Pelzer, A. (2009).

Regulation eines proteolytischen Netzwerkes in Pseudomonas aeruginosa. Diplomarbeit Heinrich-Heine Universität Düseldorf

Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P. & other authors (1999).

Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11229-11234.

Peterson, G. L. (1977).

A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**, 346-356.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C. & other authors (2004).

UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.

Pier, G. B., Coleman, F., Grout, M. & other authors (2001).

Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun* **69**, 1895-1901.

Pier, G. B. (2007).

Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol* **297**, 277-295.

Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. & other authors (1987).

Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**, 458-462.

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & other authors (1975).

Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.

Pratt, L. A. & Kolter, R. (1998).

Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285-293.

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. & other authors (1999).

Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 5993-6002.

Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D. & other authors (2006).

Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1528-1533.

Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T. & other authors (2007).

Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15508-15513.

Pumbwe, L., Skilbeck, C. A. & Wexler, H. M. (2008).

Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*. *Microb Ecol* **56**, 412-419.

Qian, W., Jia, Y., Ren, S. X. & other authors (2005).

Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris. Genome Res* **15**, 757-767.

Quinn, J. P. (1998).

Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**, S117-124.

Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H. & other authors (2000).

Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8815-8821.

Rao, R. S., Karthika, R. U., Singh, S. P. & other authors (2008).

Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* **26**, 333-337.

Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1994).

Families of serine peptidases. Methods Enzymol 244, 19-61.

Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y. & other authors (2008).

MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res 36, D320-325.

Rehm, B. H. & Valla, S. (1997).

Bacterial alginates: biosynthesis and applications. Appl Microbiol Biotechnol 48, 281-288.

Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O. & other authors (1998).

Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* **13**, 893-906.

Richt, J. A., Furbringer, T., Koch, A. & other authors (1998).

Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* **72**, 4528-4533.

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B. & other authors (1989).

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073.

Roggenkamp, A., Ackermann, N., Jacobi, C. A. & other authors (2003).

Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* **185**, 3735-3744.

Rosenau, F. & Jaeger, K. (2000).

Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie* **82**, 1023-1032.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. & other authors (1988).

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Saitou, K., Furuhata, K., Kawakami, Y. & other authors (2009).

Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Sci* 14, 65-68.

Sakai, T., Matsuyama, T., Sano, M. & other authors (2009).

Identification of novel putative virulence factors, adhesin AIDA and type VI secretion system, in atypical strains of fish pathogenic *Edwardsiella tarda* by genomic subtractive hybridization. *Microbiol Immunol* **53**, 131-139.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).

Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanchez-Velazquez, L. D., Ponce de Leon Rosales, S. & Rangel Frausto, M. S. (2006).

The burden of nosocomial infection in the intensive care unit: Effects on organ failure, mortality and costs. A nested case-control study. *Arch Med Res* **37**, 370-375.

Sauer, K. & Camper, A. K. (2001).

Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surfaceassociated growth. *J Bacteriol* 183, 6579-6589.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D. & other authors (2002).

Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol 184, 1140-1154.

Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D. & other authors (2001).

A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**, 4404-4422.

Scharfman, A., Arora, S. K., Delmotte, P. & other authors (2001).

Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun* **69**, 5243-5248.

Schroeder, T. H., Lee, M. M., Yacono, P. W. & other authors (2002).

CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6907-6912.

Schweizer, H. P. & Chuanchuen, R. (2001).

Small broad-host-range lacZ operon fusion vector with low background activity. *Biotechniques* **31**, 1258, 1260, 1262.

Scotton, C. J., Krupiczojc, M. A., Konigshoff, M. & other authors (2009).

Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest* **119**, 2550-2563.

Seidah, N. G., Chretien, M. & Day, R. (1994).

The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* **76**, 197-209.

Seidah, N. G. & Chretien, M. (1999).

Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* **848**, 45-62.

Seo, J., Brencic, A. & Darwin, A. J. (2009).

Analysis of secretin-induced stress in *Pseudomonas aeruginosa* suggests prevention rather than response and identifies a novel protein involved in secretin function. *J Bacteriol* **191**, 898-908.

Serci, S. (2006).

Charakterisierung der Autotransporter-Proteine aus Pseudomonas aeruginosa.

Shinde, U. & Inouye, M. (1993).

Intramolecular chaperones and protein folding. Trends Biochem Sci 18, 442-446.

Shinde, U., Li, Y., Chatterjee, S. & other authors (1993).

Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6924-6928.

Sierra, G. (1960).

Hemolytic effect of a glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie Van Leeuwenhoek 26, 189-192.

Siezen, R. J., de Vos, W. M., Leunissen, J. A. & other authors (1991).

Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisinlike serine proteinases. *Protein Eng* **4**, 719-737.

Siezen, R. J. (1996).

Subtilases: subtilisin-like serine proteases. Adv Exp Med Biol 379, 75-93.

Siezen, R. J. & Leunissen, J. A. (1997).

Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. Protein Sci 6, 501-523.

Simon, R., O'Connell, M., Labes, M. & other authors (1986).

Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* **118**, 640-659.

Skurnik, M., Bolin, I., Heikkinen, H. & other authors (1984).

Virulence plasmid-associated autoagglutination in Yersinia spp. J Bacteriol 158, 1033-1036.

Smith, E. L., Markland, F. S., Kasper, C. B. & other authors (1966).

The complete amino acid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg. *J Biol Chem* 241, 5974-5976.

Smith, R. S. & Iglewski, B. H. (2003).

Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**, 56-60.

Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* **5**, 156-161.

Stanley, N. R. & Lazazzera, B. A. (2004).

Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* **52**, 917-924.

Starkey, M. & Rahme, L. G. (2009).

Modeling Pseudomonas aeruginosa pathogenesis in plant hosts. Nat Protoc 4, 117-124.

Stehling, E. G., Silveira, W. D. & Leite Dda, S. (2008).

Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Braz J Infect Dis* **12**, 86-88.

Steiner, D. F. (1998).

The proprotein convertases. Curr Opin Chem Biol 2, 31-39.

Stetler-Stevenson, W. G. (2008).

The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev* 27, 57-66.

Stonehouse, M. J., Cota-Gomez, A., Parker, S. K. & other authors (2002).

A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* **46**, 661-676.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & other authors (2002).

Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol 56, 187-209.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L. & other authors (2000).

Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.

Strateva, T. & Yordanov, D. (2009).

Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* **58**, 1133-1148.

Struyve, M., Moons, M. & Tommassen, J. (1991).

Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**, 141-148.

Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.

Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J. & other authors (2004).

The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *J Biol Chem* **279**, 14679-14685.

Sutherland, I. (2001).

Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147, 3-9.

Tamber, S. & Hancock, R. E. (2006).

Involvement of two related porins, OprD and OpdP, in the uptake of arginine by *Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol Lett* **260**, 23-29.

Tamber, S., Ochs, M. M. & Hancock, R. E. (2006).

Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 188, 45-54.

Tang, A., Marquart, M. E., Fratkin, J. D. & other authors (2009).

Properties of PASP: a *Pseudomonas* protease capable of mediating corneal erosions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 3794-3801.

Terada, L. S., Johansen, K. A., Nowbar, S. & other authors (1999).

Pseudomonas aeruginosa hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* **67**, 2371-2376.

Termine, E. & Michel, G. P. (2009).

Transcriptome and secretome analyses of the adaptive response of *Pseudomonas aeruginosa* to suboptimal growth temperature. *Int Microbiol* **12**, 7-12.

Thanassi, D. G., Stathopoulos, C., Dodson, K. & other authors (2002).

Bacterial outer membrane ushers contain distinct targeting and assembly domains for pilus biogenesis. *J Bacteriol* **184**, 6260-6269.

Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T. & other authors (2005).

Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* **187**, 7254-7266.

Thomas, G., Thorne, B. A., Thomas, L. & other authors (1988).

Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* **241**, 226-230.

Tsui, L. C., Buchwald, M., Barker, D. & other authors (1985).

Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* **230**, 1054-1057.

Tsui, L. C. (1991).

Probing the basic defect in cystic fibrosis. Curr Opin Genet Dev 1, 4-10.

Turba, F. & Gundlach, G. (1955).

[Amino acid sequence in the area of the reactive serine group of the chymotrypsin molecule.]. *Biochem Z* **327**, 186-188.

Van de Ven, W. J., Roebroek, A. J. & Van Duijnhoven, H. L. (1993).

Structure and function of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases. *Crit Rev Oncog* **4**, 115-136.

Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1998).

Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerg Infect Dis 4, 551-560.

van den Berg, B. (2010).

Crystal Structure of a Full-Length Autotransporter. J Mol Biol.

van Ulsen, P., van Alphen, L., Hopman, C. T. & other authors (2001).

In vivo expression of *Neisseria meningitidis* proteins homologous to the *Haemophilus influenzae* Hap and Hia autotransporters. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**, 53-64.

van Ulsen, P., van Alphen, L., ten Hove, J. & other authors (2003).

A *Neisserial* autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Mol Microbiol* **50**, 1017-1030.

Veiga, E., Sugawara, E., Nikaido, H. & other authors (2002).

Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *Embo J* **21**, 2122-2131.

Vincent, J. L., Bihari, D. J., Suter, P. M. & other authors (1995).

The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *Jama* 274, 639-644.

Virkola, R., Westerlund, B., Holthofer, H. & other authors (1988).

Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder. *Infect Immun* **56**, 2615-2622.

Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S. & other authors (2006).

Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol* **24**, 673-679.

Voulhoux, R., Bos, M. P., Geurtsen, J. & other authors (2003).

Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**, 262-265.

Voulhoux, R. & Tommassen, J. (2004).

Omp85, an evolutionarily conserved bacterial protein involved in outer-membrane-protein assembly. *Res Microbiol* **155**, 129-135.

Wagner, V. E., Gillis, R. J. & Iglewski, B. H. (2004).

Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa. Vaccine* **22 Suppl 1**, S15-20.

Warren, S. M. & Young, G. M. (2005).

An amino-terminal secretion signal is required for YplA export by the Ysa, Ysc, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B. *J Bacteriol* **187**, 6075-6083.

Wasielewski, E., Tzou, D. L., Dillmann, B. & other authors (2008).

Multiple conformations of the metal-bound pyoverdine PvdI, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: a nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* **47**, 3397-3406.

Wells, T. J., Tree, J. J., Ulett, G. C. & other authors (2007).

Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiol Lett* **274**, 163-172.

Wilhelm, S., Tommassen, J. & Jaeger, K. E. (1999).

A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 181, 6977-6986.

Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P. & other authors (2007).

The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* **189**, 6695-6703.

Williams, P. & Camara, M. (2009).

Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**, 182-191.

Winsor, G. L., Van Rossum, T., Lo, R. & other authors (2009).

Pseudomonas Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**, D483-488.

Withers, H., Swift, S. & Williams, P. (2001).

Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 186-193.

Witholt, B., Boekhout, M., Brock, M. & other authors (1976).

An efficient and reproducible procedure for the formation of spheroplasts from variously grown *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **74**, 160-170.

Woods, D. E., Schaffer, M. S., Rabin, H. R. & other authors (1986).

Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J Clin Microbiol* **24**, 260-264.

Woods, R. G., Burger, M., Beven, C. A. & other authors (2001).

The aprX-lipA operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: a molecular analysis of metalloprotease and lipase production. *Microbiology* **147**, 345-354.

Wright, C. S., Alden, R. A. & Kraut, J. (1969).

Structure of subtilisin BPN' at 2.5 angstrom resolution. Nature 221, 235-242.

Xu, K. D., McFeters, G. A. & Stewart, P. S. (2000).

Biofilm resistance to antimicrobial agents. Microbiology 146 (Pt 3), 547-549.

Yahr, T. L., Goranson, J. & Frank, D. W. (1996).

Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol* **22**, 991-1003.

Yahr, T. L., Mende-Mueller, L. M., Friese, M. B. & other authors (1997).

Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* **179**, 7165-7168.

Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K. & other authors (1998).

ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13899-13904.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Yen, M. R., Peabody, C. R., Partovi, S. M. & other authors (2002).

Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1562, 6-31.

Zar, H., Saiman, L., Quittell, L. & other authors (1995).

Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial cells from patients with various mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator. *J Pediatr* **126**, 230-233.

8 Anhang

Plasmide





P. aeruginosa \triangle sprS

Abb. 8.1 Schematische Darstellung der Konstruktion des Mutagenesevektors pSUP*sprS*Gm und der Erzeugung des *sprS*-defizienten Stammes *Pseudomonas aeruginosa* $\Delta sprS$. Ein Teil des Gens *sprS* wurde durch geeignete Restriktionsendonukleasen deletiert und durch eine Gentamycin-Resistenzkassette (Ω -Gm^r) ersetzt. Das mutagenisierte Fragment wurde durch geeignete Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in den Suizidvektor pSUP202 kloniert. Durch homologe Rekombination erfolgte die Integration der Ω -Gm^r - Kassette in das Genom des *P. aeruginosa* Wildtyp-Stammes PAO1.



Abb. 8.2 Agarosegel (1 %) der PCR-Produkte zur Identifizierung des *sprS*-defizienten Stammes. S=Standard, 1=Wildtyp, 2=*sprS*-defiziente Mutante, 3=Positivkontrolle (Mutagensevektor als Matrizen-DNA).



Abbildung 8.3 Analyse der Lyse des Wildtyp-Stammes PAO1 und des *Pseudomonas aeruginosa sprS*-negativen Stammes $\Delta sprS$. Die Kulturen wurden 1:1000 in LB+KNO₃ (5 mM) verdünnt. Die Anzucht der Kulturen erfolgte über 68 h bei 37 °C und die Zelllyse wurde anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen.



Expression der beiden Gene *sprS* und *sprP* in *Pseudomonas aeruginosa* **PAO1**. Die gezeigten miller units sind die Messwerte der episomalen Transkriptionsfusion abzüglich der Hintergrundaktivität des Leervektors pTZ110. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit den dazugehörigenden Standardabweichungen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Stephanie Serci, Diplom-Biologin geboren am 15.11.1980 in Moers Familienstand: ledig Staatsangehörigkeit: italienisch

Weiterbildung	
01/2010 - 07/2010	Weiterbildung zum Klinischen Monitor (CRA) / Klinische Forschung am mibeg- Institut Medizin Köln
Hochschulbildung	
08/2006 - 07/2010	Promotion am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich. Thema der Dissertation: Charakterisierung der Autotransporter-Protease SprS aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
06/2005 - 07/2006	Diplomarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich. Thema: Charakterisierung der Autotransporter-Proteine aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
09/2000 - 05/2005	Studium Diplom-Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
Schulbildung	
08/1991 - 06/2000	Abitur am Gymnasium Rheinkamp in Moers
08/1987 - 07/1991	Eichendorff-Grundschule in Moers
Anstellung	
08/2010 -heute	Clinical Research Associate (CRA), ClinAsses GmbH, Leverkusen
06/2005 - 11/2009	wissenschaftliche Angestellte am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich.

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

Düsseldorf, den 07. Juni 2010

Stephanie Serci