

Optimierung der Penicillinacylase Produktion und Charakterisierung einer neuen, biotechnologisch relevanten β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *Pseudomonas aeruginosa*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin Viola Fuchs

aus Köln

Düsseldorf, Oktober 2010

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

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

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger Korreferent: Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2010

Meinen Eltern

und Tobí

"In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt."

Sir Isaac Newton (1643-1727)

Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

<u>Fuchs, V.</u>, Jaeger, K.-E., Wilhelm, S., Rosenau, F. (2010). The BapF protein from *Pseudomonas aeruginosa* is a β -peptidyl aminopeptidase. *World J Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s11274-010-0484-6

Posterpräsentation

<u>Fuchs, V.</u>, Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.-E. (2009). A DmpA-homologous protein in *Pseudomonas aeruginosa*: A putative β -Peptidyl aminopeptidase. *Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM)*, Bochum.

Danksagung

Eine außergewöhnliche, spannende, schöne und oft auch nervenaufreibende Zeit geht zu Ende.

Hiermit möchte ich mich bei denjenigen Personen und Institutionen bedanken, die maßgeblichen daran beteiligt waren, dass diese Arbeit überhaupt möglich wurde...

... mein erster Dank geht zum einen an Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger. Ihm danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die guten Arbeitsbedingungen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie. Darüber hinaus möchte ich mich für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit bedanken.

... zum anderen danke ich Frau Prof. Dr. Martina Pohl für die freundliche Übernahme des Korreferats.

... Bei Frau Dr. Susanne Wilhelm und Herrn Dr. Frank Rosenau bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Planung der Arbeiten, die zahlreichen Gespräche und konstruktiven Diskussionen sowie die Durchsicht des Manuskriptes.

... Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums im Schwerpunkt "Nachhaltige Bioprozesse". Sowie für die zahlreichen Möglichkeiten, auch mal "über den eigenen Tellerrand hinausschauen zu können".

... Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Schmid (Universität Dortmund) bedanke ich mich für die Betreuung während der Förderzeit im Stipendienschwerpunkt "Nachhaltige Bioprozesse" der Deutschen Bundesstiftung Umwelt in Form eines Co-Mentors.

... Frau Prof. Dr. Laurence Rahme und ihrer Arbeitsgruppe von der Harvard Medical School (Boston, Massachusetts, USA) danke ich für die Durchführung der Virulenzstudien am Mausmodell.

... Frau Vera Svensson danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die wertvollen Tipps während der Proteinaufreinigung und für das stets offene Ohr bei allen Labor- und Alltagsfragen.

... Frau Astrid Wirtz danke ich für die große Hilfe bei den HPLC-Messungen.

... Frau Dr. Silke Isenhardt und Herrn Dr. Achim Heck danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

... Bei Frau Martina Paul und Herrn Marko Laschinski möchte ich mich für die kleinen und GROßEN Hilfestellungen im Laboralltag bedanken.

... ALLEN meinen Kollegen im Institut für Molekulare Enzymtechnologie - besonders Janina Knorr, Martina Paul, Silke Isenhardt und Franco Circolone - danke ich für die stets hilfsbereite, freundliche und lustige Atmosphäre.

... Mein innigster und herzlichster Dank geht an meine Familie und meinen Freund Tobias. Sie haben mit ihrer Liebe, Zuversicht und Geduld überhaupt erst ermöglicht, dass dies hier alles möglich geworden ist. DANKE!

Inhaltsverzeichnis

Abbil	dungs-	and Tabellenverzeichnis	V
Abb	oildunge	n	V
Tab	ellen		VIII
Abkü	rzungen		IX
Zusar	nmenfas	ssung	XI
Sumn	nary		XIII
1 E	inleitu	ng	1
1.1	Pseud	omonas aeruginosa	1
1.2	Pseud	omonas aeruginosa PAO1 und PA14	
1.3	Esche	richia coli als Expressionswirt	4
1.4	Verwe	endung von Chaperonen in der industriellen Biotechnologie	5
1.5	Protea	isen	9
1.6	Sering	proteasen	
	1.6.1	Penicillinacylasen	
	1.6.2	Penicillin G Acylase (PGA) aus Escherichia coli	
	1.6.3	Das bifunktionale Protein DegP aus Escherichia coli	
1.7	Amin	opeptidasen	14
	1.7.1	β-Aminosäuren und β-Peptide	14
	1.7.2	β-Peptidyl Aminopeptidasen	
	1.7.3	Carnosinasen	
	1.7.4	Natürlich vorkommende β/α -Dipeptide	17
	1.7.5	Carnosin und Wundheilung	
1.8	Zielse	tzung dieser Arbeit	
2 N	Iaterial	und Methoden	
2.1	Chem	ikalien und Enzyme	
2.2	Verwe	endete Bakterienstämme und Plasmide	
2.3	Verwe	endete Oligonukleotide	
2.4	Kultu	rbedingungen von Bakterien	
	2.4.1	Nährmedien	
	2.4.2	Anzucht und Lagerung von Bakterien	
2.5	Herste	ellung kompetenter Bakterienzellen	
	2.5.1	Chemisch kompetente Escherichia coli Zellen	
	2.5.2	Elektrokompetente Pseudomonas aeruginosa Zellen	

2.6	DNA-	Techniken	32
	2.6.1	Isolierung von Nukleinsäuren	32
	2.6.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	32
	2.6.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
	2.6.4	Herstellung der pENTR/SD/D-TOPO Vektoren	33
	2.6.5	Overlap-Extension PCR (OE-PCR)	33
	2.6.6	In vitro-Rekombination von DNA	34
	2.6.7	Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	34
	2.6	5.7.1 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA	34
	2.6	5.7.2 Elektroporation von <i>P. aeruginosa</i> Zellen mit Plasmid-DNA	34
	2.6.8	Übertragung von Plasmid-DNA mittels Konjugation	35
2.7	Protein	n-Techniken	35
	2.7.1	Zellaufschluss durch Sonotrode	35
	2.7.2	Zellaufschluss durch Lysozym	35
	2.7.3	Zellaufschluss durch eine French-Press-Zelle	35
	2.7.4	Expression von $bapF$ und Reinigung der β -Peptidyl Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i>	36
	2.7.5	Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen	37
	2.7.6	Größenausschlusschromatographie	37
	2.7.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
	2.7.8	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	38
2.8	Enzyn	naktivitätstests	38
	2.8.1	Proteaseaktivität: Skim Milk-Indikatorplatten	38
	2.8.2	Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität	39
	2.8.3	Bestimmung der Aktivität von Penicillinacylasen	39
	2.8.4	Bestimmung der pH- und Temperatur-Stabilität der β-Aminopeptidase BapF	40
	2.8.5	Einfluss verschiedener Inhibitorsubstanzen auf die β-Aminopeptidase- Aktivität	40
	2.8.6	HPLC (High performance liquid chromatography)-Messungen	40
2.9	Rham	nolipidnachweis in <i>P. aeruginosa</i>	41
	2.9.1	Dünnschichtchromatographie (Syldatk et al., 1985)	41
	2.9.2	Nachweis von Rhamnolipiden auf Agarplatten mit Methylenblau und CTAB (Pinzon & Ju, 2009 a,b)	3 42
2.10	Unters	suchung der AHL-Signalmoleküle aus P. aeruginosa	42
	2.10.1	Extraktion der AHL-Signalmoleküle	42

	2.1	10.1.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der AHL-Signal- moleküle	. 56
	2.10.2	Detektion der AHL-Signalmoleküle mit Indikatorbakterien	.43
2.11	Unters	suchung der Beweglichkeiten von <i>P. aeruginosa</i>	. 43
	2.11.1	Schwärmen	. 43
	2.11.2	Schwimmen	. 43
	2.11.3	Twitching Motility	. 43
2.12	Konst	ruktion von Insertionsmutanten in <i>P. aeruginosa</i>	. 44
2.13	Lunge	ninfektionsmodell der Maus	. 45
2.14	RNA-	Techniken	. 45
	2.14.1	Standard-Präparation von bakterieller Gesamt-RNA	. 45
	2.14.2	Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration	. 45
	2.14.3	Reverse Transkription von RNA mit anschließender real-time PCR	. 45
2.15	Comp	uterprogramme und Online-Datenbanken	. 46
3 E1	rgebnis	se	. 48
3.1	Optim	ierung der Expression der industriell genutzten Penicillinacylase (PGA) aus	
	Escher aerugi	richia coli AICCIII05 mithilfe von Chaperonen aus <i>Pseudomonas</i>	. 48
	3.1.1	Herstellung der Expressionsvektoren	. 48
	3.1.2	Erhöhung der Aktivität der Penicillinacylase durch Koexpression von DegP und Chaperonen aus <i>P. aeruginosa</i>	. 52
	3.1.3	Die koexprimierten Chaperongene werden transkribiert – Nachweis durch Transkriptanalyse	. 56
3.2	Die pl <i>aerugi</i>	hysiologische Funktion der β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus <i>Pseudomono</i> inosa	as . 59
	3.2.1	Das hypothetische Protein PA1486 aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1 zeigt Sequenz- homologien zu bekannten β-Peptidyl Aminopeptidasen	. 59
	3.2.2	Konstruktion der Insertionsmutante <i>P. aeruginosa</i> PAFU2 (PAO1 $\Delta pa1486$::Gm ^R)	. 61
	3.2.3	Überprüfung der erfolgreichen Konstruktion der Insertionsmutante PAFU2.	. 62
	3.2.4	Die Deletion von <i>bapF</i> in <i>P. aeruginosa</i> PAO1 hat keine Unterschiede in de Beweglichkeiten zur Folge	n . 64
	3.2.5	Die Produktion von Rhamnolipiden ist in der <i>P. aeruginosa</i> PAFU2 Mutant nicht beeinträchtigt	e . 65
	3.2.6	Untersuchung der Quorum Sensing Signalmoleküle aus P. aeruginosa	. 67
	3.2.7	Wann wird die β-Aminopeptidase BapF von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 exprimiert?	. 68
	3.2.8	Konstruktion der Mutante <i>P. aeruginosa</i> PA14Δ <i>pa14_45210</i> (PA14FU3)	. 70
	3.2.9	Die Expression des β -Aminopeptidasegens <i>bapF</i> von <i>P. aeruginosa</i> wird durch das β/α -Dipeptid Carnosin induziert	. 71

	3.2.10	Die β-Aminopeptidase wird für das Wachstum auf Carnosin von <i>P. aeruginosa</i> benötigt	
	3.2.11	Die Mutanten <i>P. aeruginosa</i> PAFU2 ($\Delta bapF$) und PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) verwerten die Einzelkomponenten des Carnosins – β -Alanin und L-Histidin – als Kohlenstoffquelle	
	3.2.12	Carcinin und Anserin – zwei weitere β/α -Dipeptide im menschlichen Körper 77	
	3.2.13	Ist die β-Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i> an dessen Virulenz beteiligt?	
	3.2.14	Das Gen <i>bapF</i> ist mit dem Gen <i>pa1485</i> in einem Operon lokalisiert	
	3.2.15	Die intergenische Region zwischen den Genen <i>pa1485</i> und <i>bapF</i>	
	3.2.16	Physiologische Funktion des Proteins PA1485 in P. aeruginosa	
	3.2.17	Konstruktion einer Δ <i>pa1485</i> -Mutante PAFU1 in <i>P. aeruginosa</i>	
	3.2.18	Die <i>P. aeruginosa</i> PAFU1 (Δ <i>pa1485</i>) Mutante wächst nicht auf Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle	
	3.2.19	Wann wird das Gen für den putativen Aminosäuretransporter <i>pa1485</i> transkribiert?	
3.3	In vitre	o Charakterisierung der β-Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i>	
	3.3.1	Die β-Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i> lässt sich in dem heterologen Expressionsstamm <i>E. coli</i> BL21(DE3) aktiv exprimieren	
	3.3.2	Reinigung der β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i>	
	3.3.3	Das native β -Aminopeptidaseprotein BapF aus <i>P. aeruginosa</i> ist ein $(\alpha\beta)_4$ -Homotetramer	
	3.3.4	Das pH-Optimum der β-Aminopeptidase BapF liegt bei 5,5	
	3.3.5	Das Temperatur-Optimum der β-Aminopeptidase BapF liegt bei 37°C95	
	3.3.6	Die β-Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1 wird nicht durch gängige Protease-Inhibitoren gehemmt	
	3.3.7	Bestimmung des Substratspektrums von BapF	
Di	skussio	n	
4.1	Optim	ierung der Expression der Penicillin G Acylase aus E. coli ATCC11105 102	
4.2	Das G	en <i>bapF</i> kodiert für eine β -Peptidyl Aminopeptidase in <i>P. aeruginosa</i>	
4.3	Physiologische Funktion der β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus P. aeruginosa 112		
4.4	Physio P. aeri	logische Funktion des putativen Aminosäuretransporters PA1485 in <i>aginosa</i>	
4.5	Das O	peron <i>pa1485/pa1486</i> in <i>P. aeruginosa</i>	
4.6	Biotec	hnologische Bedeutung von β-Peptidyl Aminopeptidasen	
Li	teratur		
Ar	1hang		

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1	Schematische Darstellung des Syntheseweges von Amoxicillin, das ein semisyn-
	thetisches β-Laktam-Antibiotikum ist11
Abb. 2	Der Synthese- und Sekretionsweg von Penicillinacylasen (PAC) in Gram-negativen
	Bakterien. 12
Abb. 3	Schematische Übersicht über das Vorläufer-Protein Prepro-PGA von E. coli 13
Abb. 4	Übersicht der allgemeinen Strukturformeln von α -Aminosäuren und β -Homo-
	aminosäuren
Abb. 5	Strukturformeln L-Carnosin und dessen Einzelkomponenten
Abb. 6	Strukturformel von L-Anserin, der methylierten Form von Carnosin
Abb. 7	Strukturformeln von Carcinin und dessen Einzelkomponenten
Abb. 8	Der metabolische Abbau von Carnosin im menschlichen Körper
Abb. 9	Schematische Darstellung der Klonierung der Homing Endonukleasesequenzen in
	den Vektor pET22b(+)
Abb. 10	Schematische Darstellung der Klonierung des Penicillinacylasegens pga und des
	Chaperongens <i>degP</i> in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO
Abb. 11	Einfluss der Koexpression einzelner Chaperongene mit und ohne <i>degP</i> auf die
	Aktivität der Penicillin G Acylase (PA) aus E. coli ATCC11105
Abb. 12	Nachweis der Transkripte der Gene <i>pga</i> , <i>degP</i> und <i>pa2725</i> im Expressionsstamm
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Abb. 13	Schematische Übersicht der Anordnung der Gene im Pseudomonas aeruginosa
	PAO1 Chromosom
Abb. 14	Vergleich der Aminosäuresequenz von BapF aus Pseudomonas aeruginosa PAO1
	mit den bekannten β -Peptidyl Aminopeptidase Sequenzen aus Ochrobactrum
	anthropi (DmpA), aus den beiden Sphingosinicella sp. Stämmen 3–2W4 und Y2,
	und aus einem <i>Pseudomonas</i> sp. Stamm
Abb. 15	Konstruktion der <i>bapF</i> -defizienten Mutante <i>P. aeruginosa</i> PAFU261
Abb. 16	Nachweis der Deletion des Gens <i>bapF</i> im <i>P. aeruginosa</i> PAFU2 Genom durch
	Insertion der Ω -Gm ^R -Kassette
Abb. 17	Nachweis der Insertion der Ω -Gm ^R -Kassette ins Genom an die Position von
	<i>bapF</i>
Abb. 18	Nachweis der drei Beweglichkeitsformen von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (Wt) und der
	Mutante <i>P. aeruginosa</i> PAFU2 ($\Delta bapF$)
Abb. 19	Nachweis der Rhamnolipidproduktion in den <i>P. aeruginosa</i> Stämmen PAO1 (Wt)
	und PAFU2 ($\Delta bapF$)
Abb. 20	Nachweis der kurz- und langkettigen AHL-Signalmoleküle aus <i>P. aeruginosa</i>
	Kulturüberständen mittels Chromobacterium violaceum (A) und Agrobacterium
	tumefaciens (B).
Abb. 21	Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen <i>real-time</i> PCR
	zum Nachweis des Transkripts für <i>banF</i> und das <i>housekeeping</i> Gen <i>rpoD</i>
Abb. 22	Proteinsequenzvergleich von den β-Aminopeptidase Enzymen BapF aus
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 und PA14 45210 aus <i>P. aeruginosa</i> PA14
Abb 23	Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen <i>real-time</i> PCR
	zum Nachweis der Transkripte für <i>hanF. na14</i> 45210 und die <i>housekeening</i> Gene
	<i>rpoD</i> aus den <i>P. aeruginosa</i> Stämmen PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) 71

Abb. 24	Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (Wt) und der $\Delta bapF$ -Mutante PAFU2, sowie
	<i>P. aeruginosa</i> PAFU2 mit dem Leervektor pBBR1MCS-1 (PAFU2 LV) und
	<i>P. aeruginosa</i> PAFU2 mit dem Kom-plementationsplasmid pBBR1 MCS-1 <i>bapF</i>
	(PAFU2 ++ bapF) in M9-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Carnosin als einziger
	Kohlenstoffquelle
Abb. 25	Wachstum von <i>P. aeruginosa</i> PA14 (Wt) und der $\Delta pa14_45210$ -Mutante PA14FU3,
	sowie <i>P. aeruginosa</i> PA14FU3 mit dem Leervektor pBBR1MCS-3 (PA14FU3 LV)
	und <i>P. aeruginosa</i> PA14FU3 mit dem Komplementationsplasmid pBBR1 MCS-3
	<i>bapF</i> (PA14FU3 ++ <i>bapF</i>) in M9-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Carnosin als
	einzige Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung der Stämme erfolgte über einen Zeit-
	raum von 30 h. Die Fehlerbalken
Abb. 26	Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen <i>real-time</i> PCR
	zum Nachweis der Transkripte für <i>bapF</i> und das <i>housekeeping</i> Gen <i>rpoD</i> in den
	komplementierten Stämmen P. aeruginosa PAFU2 ++bapF und
	PA14FU3 ++ <i>bapF</i> 74
Abb. 27	Wachstum von P. aeruginosa PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) und den entsprechenden
	<i>P. aeruginosa</i> Mutanten PAFU2 (Δ <i>bapF</i>) und PA14FU3 (Δ <i>pa14_45210</i>) in M9-
	Minimalmedium mit 1,6 % (w/v) β-Alanin als einziger Kohlenstoffquelle75
Abb. 28	Wachstum von P. aeruginosa PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) und den entsprechenden
	<i>P. aeruginosa</i> Mutanten PAFU2 (Δ <i>bapF</i>) und PA14FU3 (Δ <i>pa14_45210</i>) in M9-
	Minimalmedium mit 2,7 % (w/v) L-Histidin als einzige Kohlenstoffquelle76
Abb. 29	Wachstum von P. aeruginosa PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) und den entsprechenden
	<i>P. aeruginosa</i> Mutanten PAFU2 (Δ <i>bapF</i>) und PA14FU3 (Δ <i>pa14_45210</i>) in M9-
	Minimalmedium mit 4 % (w/v) Carcinin als einziger Kohlenstoffquelle78
Abb. 30	Wachstum von P. aeruginosa PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) und den entsprechenden
	P. aeruginosa Mutanten PAFU2 und PA14FU3 in M9-Minimalmedium mit 2,4 %
	(w/v) Histamin als einziger Kohlenstoffquelle
Abb. 31	Vergleich der Überlebensrate der infizierten Mäuse in einem
	Lungeninfektionsmodell mit dem <i>P. aeruginosa</i> PA14 (Wt) und der β-Amino-
	peptidase-negativen Mutante PA14FU3 (Δpa14_45210)80
Abb. 32	Lokalisation der Gene pa1485 und bapF (pa1486) in einem vorhergesagten
	Operon im Chromosom von P. aeruginosa PAO1
Abb. 33	Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen <i>real-time</i> PCR
	zum Nachweis, dass die Gene pa1485 und bapF (pa1486) in einem Operon
	lokalisiert sind und als polycistronische mRNA in P. aeruginosa PAO1 transkri-
	biert werden
Abb. 34	Darstellung der ausgebildeten Sekundärstruktur der mRNA in der intergenischen
	Region des Operons pa1485/bapF und in der Anfangssequenz von bapF
Abb. 35	Wachstumsverhalten der P. aeruginosa Stämme PAFU1 (<i>Apa1485</i>), P. aeruginosa
	PAFU1 mit den Komplementationsplasmiden pBBR1 MCS-1 pa1485 (PAFU1
	++ <i>pa1485</i>) bzw. <i>bapF</i> (PAFU1 ++ <i>bapF</i>) und mit dem Leervektor pBBR1MCS-1
	(PAFU1 LV) in M9-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Carnosin als einziger
	Kohlenstoffquelle
Abb. 36	Wachstum von P. aeruginosa PAFU1 in M9-Minimalmedium mit 2,7 % (w/v)
	L-Histidin bzw. 1,6 % (w/v) β-Alanin als einzige Kohlenstoffquelle
Abb. 37	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese der heterolog exprimierten β-Amino-
	peptidase BapF aus P. aeruginosa90
Abb. 38	Reinigung der β-Aminopeptidase BapF aus P. aeruginosa PAO1 durch Ver-
	wendung der Anionenaustauscherchromatographiesäule Q-Sepharose FF91

Abb. 39	Weiterer Reinigungsschritt der β-Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1 durch Verwendung der hydrophoben Interaktionschromatographiesäule mit Butyl-	
	Sepharose als Matrix.	91
Abb. 40	SDS-Gel des aufgereinigten BapF-Proteins.	93
Abb. 41	Eichgerade der Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der nativen	
	molekularen Masse der β-Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i>	94
Abb. 42	pH-Abhängigkeit der Aktivität der β-Aminopeptidase BapF	95
Abb. 43	Bestimmung des Temperatur-Optimums der β-Aminopeptidase BapF in einem Temperaturbereich von 20°C bis 60°C.	96
Abb. 44	Einfluss verschiedener Protease-Inhibitoren und dem Chelatkomplexbildner	
	EDTA auf die Aktivität der β-Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i> PAO1	97
Abb. 45	Untersuchung der Proteaseaktivität der β-Aminopeptidase BapF aus P. aeruginosa	ı
	gegen das Standardproteasesubstrat Casein.	97
Abb. 46	Nachweis der Hydrolyse des β/α -Dipeptids Carnosin durch die β -Aminopeptidase	
	BapF aus <i>P. aeruginosa</i> mittels HPLC-Analysen nach 0 min (A) und 60 min (B)	
	Inkubationszeit	00
Abb. 47	Nachweis der Hydrolyse des β/α -Dipeptids Carcinin durch die β -Aminopeptidase	
	BapF aus <i>P. aeruginosa</i> mittels HPLC-Analysen nach 0 min (A) und 10 min (B)	
	Inkubationszeit	01
Abb. 48	Vergleich der Aminosäuresequenzen bekannter β-Peptidyl Aminopeptidasen, die	
	am Prozess der Substratumsetzung beteiligt sind1	09
Abb. 49	Vereinfachte Darstellung der Situation im Wirt bei der Besiedlung durch	
	P. aeruginosa Wildtyp (Wt) und der entsprechenden β-Aminopeptidase-negativen	
	Mutante1	14
Abb. 50	Expressionsplasmid pET22b pga für die die Expression der Penicillin G Acylase	
	aus <i>E. coli</i> ATCC11051	39
Abb. 51	Expressionsplasmid pET22b <i>pga/degP</i> für die die Expression der Penicillin G	
	Acylase aus E. coli ATCC1105, zusammen mit dem Chaperongen degP1	39
Abb. 52	Expressionsplasmid pET22b <i>degP/pga</i> für die die Expression der Penicillin G	
	Acylase aus E. coli ATCC1105, zusammen mit dem Chaperongen degP 1	40
Abb. 53	Expressionsplasmid pEF (pET22b <i>bapF</i>) zur heterologen Expression der	
	β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus <i>P. aeruginosa</i> in <i>E. coli</i> BL21(DE3)1	40
Abb. 54	Mutagenesevektor pSUP202 $\Delta bapF$ zur Herstellung der Insertionsmutanten	
	<i>P. aeruginosa</i> PAFU2 (PAO1 $\Delta bapF$:: Ω Gm ^K) und PA14FU3	
	$(PA14\Delta pa14_45210::\Omega Gm^{\kappa}).$	41
Abb. 55	Mutagenesevektor pSUP202 $\Delta pa1485$ zur Herstellung der Insertionsmutante	
	<i>P. aeruginosa</i> PAFU1 (PAO1 Δ pa1485:: Ω Gm ^K)1	41
Abb. 56	Schematische Darstellung der Genregion von <i>pa1486 (bapF)</i> und den flankieren-	
	den strangaufwärts (UR) und strangabwärts (DR) gelegenen Bereiche zur Erzeu-	
	gung der $\Delta bapF$ -Mutante in <i>P. aeruginosa</i>	42
Abb. 57	Alignment der Proteinsequenz der putativen β -Peptidyl Aminopeptidasen aus den	
	humanpathogenen Stämmen Burkholderia cepacia (B. c.), Brucella abortus (B. a.))
	und Bordetella pertussis (B. p.) mit der β -Peptidyl Aminopeptidase BapF aus	
	P. aeruginosa PAO1	43

Tabellen

Tab. 1	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme	.23
Tab. 2	Übersicht über verwendete Plasmide.	.24
Tab. 3	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.	26
Tab. 4	Stammlösungen und Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika in verschie	-
	denen Bakterienstämmen.	. 29
Tab. 5	Übersicht über das in der Overlap-Extension PCR verwendete Cycler-Programm.	.34
Tab. 6	Verwendete Standardproteine zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex	
	200 <i>p.g.</i>	.37
Tab. 7	Gradientenprogramm für die Trennung des Dipeptids Carnosin und seiner Einzel-	
	aminosäuren.	41
Tab. 8	Gradientenprogramm für die Trennung des Dipeptids Carcinin und seiner Einzel-	
	aminosäuren.	41
Tab. 9	Ablauf der PCR zur Amplifikation der strangaufwärts und strangabwärts gelege-	
	nen DNA-Sequenzen von pa1486 (bapF).	.44
Tab. 10	Übersicht über das in der RT-PCR verwendete Software-Programm.	.46
Tab. 11	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Softwaretools und Programme	.47
Tab. 12	Auflistung der verwendeten Primer-Kombinationen zur Herstellung der Overlap-	
	Extension PCR Produkte	51
Tab. 13	Übersicht über die koexprimierten Faltungshelfer, die die spezifische Aktivität	
	der Penicillinacylase steigern konnten.	55
Tab. 14	Nachweis der Transkripte von bapF und des housekeeping Gens rpoD (als Positiv	-
	kontrolle) in verschiedenen Wuchsphasen und verschiedenen Medien durch real-	
	time PCR in den P. aeruginosa Stämmen PAO1 (Wt) und PAFU2 (\Delta bapF)	. 69
Tab. 15	Nachweis der Transkripte von <i>pa1485</i> und <i>bapF</i> in verschiedenen Wuchsphasen	
	und verschiedenen Medien durch real-time PCR in den P. aeruginosa Stämmen	
	PAO1 Wt, PAFU2 und PAFU1	. 88
Tab. 16	Übersicht über die Aufreinigungsschritte der β-Aminopeptidase BapF durch	
	Säulenchromatographie.	. 92
Tab. 17	Bestimmung der Aktivität von BapF gegenüber verschiedenen Substraten.	. 98
Tab. 18	Ubersicht über die Substratspektren der bekannten β-Peptidyl Aminopeptidasen	
	im Vergleich zu BapF	110
Tab. 19	Auflistung der inhibitorischen Wirkung verschiedener Proteaseinhibitoren auf	
	die bekannten β-Peptidyl Aminopeptidasen und BapF	111

Abkürzungen

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt. Ausgenommen sind die in der deutschen Sprache üblichen Abkürzungen und SI-Einheiten.

3	Epsilon, Extinktionskoeffizient
λ	Lambda, Wellenlänge
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Ω	Omega, Insertionskassette
00	unendlich
β-Aminopeptidase	Kurzform für β-Peptidyl Aminopeptidase
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AHL(s)	N-Acyl-L-Homoserinlacton(e)
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
СТАВ	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Schichtdicke in cm
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPG	Eppendorfgefäß
et al.	et alii (und andere)
FF	Fast Flow
Gm ^R	Gentamycin-Kassette bzw Resistenz
GZE	Ganzzell-Extrakt
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High performance
	liquid chromatography)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
Km ^R	Kanamycinresistenz
KPi	Kaliumphosphatpuffer
LV	Leervektor
M	Molar (mol/l) oder mega (10^6)
Мbр	Megabasenpaare
NK	Negativkontrolle
NIPAB	6-Nitro-3-Phenylacetamidbenzoesäure
nm	Nanometer (Wellenlänge)

0 D	optische Dichte		
0 D 5%0	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm		
OE	Overlan Extension		
OPA	ortho-Phthaldialdehyd		
ORF(s)	open reading frame(s)		
PA(C)	Penicillinacylase		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
ng	nren grade		
PGA	Penicillin G Acylase aus <i>E. coli</i>		
РК	Positivkontrolle		
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid		
pNA	<i>para</i> -Nitroanilid		
PPIase	Peptidyl-Prolyl <i>cis-trans</i> Isomerase		
RBS	Ribosomenbindestelle		
RL	Rhamnolipid(e)		
RNA	Ribonukleinsäure		
RT	Raumtemperatur		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
TBE	Tris-Borat-EDTA		
Tet ^R	Tetrazyklinresistenz		
TLC	Thin Layer Chromatography		
TMF	Transformationspuffer		
U	Unit (1 Unit = 1 µmol/min); Aktivität		
UCBPP	Department of Plant Pathology, University of California,		
	Berkeley		
ÜN	über Nacht		
Upm	Umdrehungen pro Minute		
v/v	Volumen pro Volumen		
w/v	Gewicht pro Volumen		
Wt	Wildtyp		
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid		
Nomenklatur für Rhamnolipide:			
RL-1,2 (Mono-RL)	L-Rhamnosyl- \beta-hydroxydekanoyl-\beta-hydroxydekanoat		
RL-2,2 (Di-RL)	L-Rhamnosyl-L-rhamnosyl-hydroxydekanoyl-β-hydroxy-		
	dekanoat		
Bezeichnung der β-Peptidyl Aminopeptidasen:			
DmpA	L-Aminopeptidase-D-amidase/esterase DmpA von		
	Ochrobactrum anthropi LMG7991		
Ps BapA	β-Ala-Xaa Dipeptidase von <i>Pseudomonas sp.</i> MCI3434		
3-2W4 BapA	β-Peptidyl Aminopeptidase von Sphingosinicella		
	xenopeptidilytica 3-2W4		
Y2 BapA	β-Peptidyl Aminopeptidase von Sphingosinicella		

microcystinivorans Y2

PAO1

β-Peptidyl Aminopeptidase von Pseudomonas aeruginosa

BapF

Zusammenfassung

Serinproteasen stellen eine große Gruppe innerhalb der Proteasen dar, die in der Industrie immer mehr an Bedeutung gewinnt. Die Verwendung von Enzymen in der Industrie ermöglicht es chemische Prozesse durch biokatalytische Verfahren zu ersetzen, und somit ökologisch und ökonomisch nachhaltiger durchzuführen. Die Synthese vieler industriell genutzter Enzyme verläuft jedoch oft nicht zufriedenstellend.

Die zu den Serinproteasen gehörenden Penicillinacylasen sind bedeutende Schlüsselenzyme für die industrielle Herstellung von Antibiotika. Daher ist die Produktion dieser Enzyme im großen Maßstab von hohem Interesse. Die Penicillin G Acylase (PGA) aus *Escherichia coli* ATCC 11105 wird schon lange in industriellen Prozessen für die Herstellung von semisynthetischen β-Laktam-Antibiotika verwendet. Die Produktion von PGA ist jedoch durch die Akkumulation von PGA-Vorstufen limitiert. Die Synthese von PGA könnte durch die Koexpression von Chaperonen verbessert werden. PGA wurde als Modellenzym ausgewählt, um mithilfe der vorhandenen Chaperongenexpressions-Bibliothek aus *P. aeruginosa* die bestmöglichen. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Koexpression der Chaperongene *hscB*, *pa2725* und *csaA* aus *P. aeruginosa* die spezifische Aktivität der PGA deutlich gesteigert werden kann.

Die noch wenig bekannten β -Peptidyl Aminopeptidasen aus der Familie der Serinproteasen sind die ersten bekannten Enzyme, die β -Peptide und β -aminosäurehaltige Peptide hydrolysieren können. Aufgrund ihres einzigartigen Substratspektrums und ihrer ungewöhnlichen Proteinfaltung werden diese Enzyme in die neue Proteasefamilie S58 in der MEROPS Datenbank eingeordnet. Die physiologische Funktion dieser Enzyme war nicht bekannt.

Das opportunistisch humanpathogene Bakterium *P. aeruginosa* besitzt eine Vielzahl von Proteasen, von denen beschrieben ist, dass sie bei der Ausprägung der Virulenz und der Etablierung von Infektionen eine entscheidende Rolle spielen. Durch Sequenzvergleiche mit den bekannten β -Peptidyl Aminopeptidasen konnte im Rahmen dieser Arbeit im Genom von *P. aeruginosa* PAO1 ein offener Leserahmen, *pa1486 (bapF)*, identifiziert werden, der Sequenz-ähnlichkeiten zu β -Peptidyl Aminopeptidasen zeigt. In dieser Arbeit wurde das entsprechende Protein BapF genannt und in *P. aeruginosa* erstmals physiologisch und biochemisch charakterisiert.

Es wurde postuliert, dass β -Peptidyl Aminopeptidasen für die Virulenz von humanpathogenen Bakterien eine Rolle spielen könnten. Um die physiologische Bedeutung dieser Enzyme *in vivo* zu untersuchen, wurden β -Peptidyl Aminopeptidase-negative *P. aeruginosa* Stämme konstruiert und verschiedene Phänotypen untersucht. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Auch in einem gut etablierten Virulenzmodell der Maus konnte durch die Deletion des β -Peptidyl Aminopeptidasegens in *P. aeruginosa* keine signifikante Reduktion der Virulenz detektiert werden.

Für das Gen *bapF* wurde gezeigt, dass es zusammen mit *pa1485* in einem funktionellen Operon im Chromosom von *P. aeruginosa* lokalisiert ist. Das Protein PA1485 ist ein putativer Aminosäuretransporter, und könnte für den Transport der Substrate von BapF ins Cytoplasma verantwortlich sein. Zur Untersuchung der physiologischen Funktion wurde eine *pa1485*-negative Mutante in *P. aeruginosa* konstruiert und die Aufnahme verschiedener Substrate (z. B. Carnosin und Carcinin) getestet. Jedoch zeigte sich, dass PA1485 nicht, oder nicht einzig für den Import von Carnosin als Substrat von BapF verantwortlich ist.

Das Enzym BapF konnte erstmals im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) aktiv exprimiert und anschließend über Säulenchromatographie isoliert werden. Das Substratspektrum von BapF zeigt, dass es spezifisch Substrate hydrolysiert, die am N-Terminus ein β -Alanin aufweisen. Das pH-Optimum von BapF liegt bei 5,5 und das Temperaturoptimum bei 37°C. Durch Größenausschlusschromatographie konnte gezeigt werden, dass BapF eine molekulare Masse von 140 kDa besitzt und das aktive Enzym ein ($\alpha\beta$)₄-Homotetramer ist. Zusammengefasst konnte für BapF aus *P. aeruginosa* erstmals gezeigt werden, dass es sich um eine β -Peptidyl Aminopeptidase handelt.

Summary

Serine proteases are one of the most abundant groups of proteolytic enzymes, which become more important in industrial processes. The use of enzymes in industry offers the possibility to replace chemical reactions by biocatalytic processes and thus contribute to the environmental sustainability. However, the synthesis of many industrially used enzymes is often limited by low levels of expression.

Penicillin acylases, which belong to the family of serine proteases, are important key enzymes for the industrial production of antibiotics and thus high-level production of these enzymes is of great interest. Penicillin G acylase (PGA) derived from *Escherichia coli* ATCC11105 has been used in industrial processes for the production of semisynthetic β -lactam antibiotics for a long time. But the production of PGA was limited by the accumulation of PGA precursors. The synthesis of PGA could be improved by chaperone coexpression. PGA was used as a model enzyme to identify the best possible chaperone for enhancing the production of this enzyme class by use of a *Pseudomonas aeruginosa* chaperone expression library. It was shown that coexpression of the chaperone genes *hscB*, *pa2725* and *csaA* from *P. aeruginosa* can increase PGA activity.

 β -peptidyl aminopeptidases are serine proteases which hydrolyse a variety of short β -peptides and β -amino acid containing peptides. Based on their unique substrate spectrum and unusual protein folding they are classified into the novel peptidase family S58 according to the MEROPS database. The physiological role of these enzymes still remains unclear.

The opportunistic human pathogen *P. aeruginosa* possesses a variety of different proteases most of which have been described to contribute to virulence and the establishment of *P. aeruginosa* infections. By homology search using known β -peptidyl aminopeptidase sequences, an open reading frame, *pa1486* (*bapF*), was identified in the genome of *P. aeruginosa* PAO1. In this work, the biochemical properties and the physiological role of BapF from *P. aeruginosa* were investigated.

It was postulated that β -peptidyl aminopeptidases are involved in the virulence phenotype of human pathogenic bacteria. To determine the physiological role of these enzymes *in vivo*, β -peptidyl aminopeptidase-negative strains of *P. aeruginosa* were constructed. Several phenotypes were analyzed, but under the chosen conditions there are no detectable differences between the mutant strain and the wildtype. However, by the use of a well-established mouse infection model no significant differences in virulence phenotype were detectable.

It was proven that the *bapF* gene is localized with *pa1485* in an operon on the chromosome of *P. aeruginosa*. The protein PA1485 is a putative amino acid permease that could be responsible for the import of substrates for BapF. To analyze its physiological function, a *pa1485* deletion

mutant of *P. aeruginosa* was created and the uptake or utilization of several substrates (e. g. carnosine and carcinine) was tested. The results demonstrated that PA1485 was not the (only) transporter for the analysed substrates of BapF.

BapF was functionally expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified using column chromatography. BapF was found to hydrolyse peptides and amides containing an N-terminal β -alanine. The enzyme showed maximal activity at pH 5.5 and its temperature optimum is at 37°C. According to size exclusion chromatography, the native molecular mass of BapF was about 140 kDa indicating that the enzyme forms a ($\alpha\beta$)₄-homotetramer. The results clearly show that BapF from *P. aeruginosa* is a β -peptidyl aminopeptidase.

1 Einleitung

Proteine gehören zu den Grundbausteinen einer Zelle und übernehmen eine Vielzahl von wichtigen Aufgaben, wie z. B. als Strukturproteine, Transportproteine und Enzyme. Enzyme katalysieren lebenswichtige Reaktionen in der Zelle und spielen so eine zentrale Rolle im Stoffwechsel aller Lebensformen. Diese mannigfaltigen Funktionen von Enzymen sind sowohl in der Wissenschaft, als auch in biotechnologischen Prozessen von großer Bedeutung. Daher werden Enzyme für die Verbesserung bestehender chemischer Prozessabläufe immer beliebter. Der Einsatz von Enzymen kann zur Entwicklung nachhaltiger und auch kostengünstiger Bioprozesse beitragen, so dass viele Prozesse der chemischen Industrie ersetzt werden können, die einen negativen Einfluss auf die Umwelt haben. Die biotechnologische Herstellung von Feinchemikalien (auch Arzneimitteln) gewinnt vor dem Hintergrund der Ressourcenverknappung, der immer strengeren Umweltschutzgesetzgebung, des Verbraucherschutzes und des weltweiten Strebens nach nachhaltiger Entwicklung immer mehr an Bedeutung (Antranikian, 2006). Ein Ziel der Biotechnologie ist daher, neue Enzyme zu suchen, zu charakterisieren und zu etablieren, um damit bestehende Prozesse zu verbessern oder neue, ökologisch unbedenkliche Prozesse zu etablieren.

In ihrem natürlichen Organismus werden Enzyme und andere Proteine, die von großem biotechnologischen Interesse sein könnten, jedoch nur in sehr geringen Mengen synthetisiert. Das führt dazu, dass potentielle neue Biokatalysatoren (Enzyme) nicht für die Forschung oder für die industrielle Produktion im großen Maßstab zur Verfügung stehen. Somit besteht besonderes Interesse daran, Methoden zu entwickeln oder zu verbessern, die es ermöglichen, große Mengen der gewünschten Enzyme zu produzieren. Dies kann unter anderem durch die Expression der Zielenzyme in heterologen Wirten erzielt werden, wie z. B. in dem hervorragend charakterisierten Bakterienstamm *Escherichia coli* oder durch die Verwendung neuartiger Koexpressions-Bibliotheken aus Pseudomonaden.

1.1 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa ist ein Gram-negatives Stäbchenbakterium der Gattung *Pseudomonas* das ubiquitär im Boden und in aquatischen Bereichen verbreitet ist (Klockgether *et al.*, 2010). Die Spezies *P. aeruginosa* wird auf Grundlage der 16S rRNA-Sequenzen taxonomisch dem γ -Zweig der Proteobakterien (*Proteobacteria*) zugeordnet (Olsen *et al.*, 1994).

Das Bakterium zeichnet sich durch seine hohe Anpassungsfähigkeit aus. Dies bezieht sich nicht nur auf seine natürlichen Habitate und metabolische Vielfalt, sondern auch auf die von ihm tolerierten Wachstumstemperaturen. So ist das Bakterium z. B. in der Lage bei Temperaturen von 4°C bis zu 43°C zu wachsen (Palleroni, 1993; Madigan *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* zeichnet sich außerdem durch die Produktion fluoreszierender Farbstoffe, die Fähigkeit zur Denitrifikation und seinen Oxidase-positiven Phänotyp aus (Palleroni, 1993). Die metabolische Vielseitigkeit von *P. aeruginosa* und dessen Anpassungsfähigkeit an verschiedene Habitate geht mit einem umfangreichen genetischen Repertoire einher.

Im Jahr 2000 wurde das 6,26 Mbp große *P. aeruginosa* PAO1 Genom komplett sequenziert (Stover *et al.*, 2000). Verglichen mit anderen Bakterien (z. B. *E. coli*: 4,64 Mbp) ist dies ein verhältnismäßig großes Genom. Für die daraus resultierende Anzahl von 5671 vorhergesagten Genprodukten (für *E. coli* werden 4400 Gene vorhergesagt), deren Faltung akkurat und konzertiert ablaufen muss, wird ein universelles System aus Chaperonen und Foldasen benötigt. Wie andere Organismen auch, verfügt *P. aeruginosa* daher über ein komplexes und gut reguliertes Protein-Kontrollsystem (Winsor *et al.*, 2009). So wird sichergestellt, dass die in diesem Organismus produzierten Proteine ihre native Konformation einnehmen und somit ihre biologische Funktion erfüllen können. Vergleicht man die Anzahl von cyto- und periplasmatischen Faltungsmodulatoren zwischen den Bakterienspezies *E. coli* und *P. aeruginosa*, so weisen beide eine ähnliche Zahl an Faltungshelfern auf (Kreuz, 2006). Dies deutet darauf hin, dass in dem Bakterium *P. aeruginosa* mit einer vergleichbaren Anzahl von Faltungshelfer wie in *E. coli* die Faltung einer größeren Anzahl von Genprodukten kontrolliert werden muss. Dies könnte durch ein breiteres Substratspektrum der Faltungshelfer gewährleistet sein.

P. aeruginosa stellt die bekannteste und humanmedizinisch bedeutsamste Spezies innerhalb der Gattung *Pseudomonas* dar die an nosokomialen Infektionen beteiligt ist (Peluso *et al.*, 2010). Es besitzt unter anderem die Fähigkeiten den unteren Respirationstrakt, den Gastrointestinaltrakt, die Schleimhäute, sowie die Haut von immunsupprimierten Patienten zu besiedeln. *P. aeruginosa* verursacht akute und chronische Lungeninfektionen in Patienten mit Cystischer Fibrose und Sepsen in immunsupprimierten Personen, wie Transplantations- und Krebspatienten, oder Patienten mit schwerwiegenden Brandwunden (Hsueh *et al.*, 1998; Lyczak *et al.*, 2000; Stover *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* gehört neben *Staphylococcus aureus* zu der Gruppe von Bakterien die am häufigsten in chronischen Hautwunden gefunden werden (Brandling-Bennett & Morel, 2010). Infektionen mit *P. aeruginosa* werden erst durch die Produktion von extrazellulären Virulenzfaktoren möglich. Diese werden zum größten Teil durch Zelldichte-abhängige Zell-Zell-Kommunikation (*Quorum Sensing*) durch die Acyl-Homoserinlacton-Signalmoleküle (AHLs) reguliert (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995; Swift *et al.*, 2001; Withers *et al.*, 2001; Bassler,

2002; Pesci & Iglewski, 2003; Smith & Iglewski, 2003). Zu den Virulenzfaktoren gehören verschiedene Exotoxine (Iglewski & Kabat, 1975; Iglewski *et al.*, 1978; Gambello *et al.*, 1993; Kulich *et al.*, 1993; Bitter, 2003), Rhamnolipide (Wagner *et al.*, 2004) und die zytotoxischen Lektine (Winzer *et al.*, 2000). Des Weiteren sind an der Virulenz die Elastasen A und B (Döring *et al.*, 1983; Kessler & Safrin, 1988), Phospholipasen (Berka & Vasil, 1982; Ostroff & Vasil, 1987; Stonehouse *et al.*, 2002) und Lipasen (Jaeger, 1994; Martínez *et al.*, 1999) beteiligt.

Die Analyse des gesamten Genoms von *P. aeruginosa* zeigt, dass mehr als fünf Prozent der gefundenen offenen Leserahmen für bekannte oder putative Peptidasen kodieren: 216 Gene kodieren für bekannte oder putative Peptidasen und 95 für Nicht-Peptidase-homologe Proteine. Nicht-Peptidase-homologe Proteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie bekannte andere Funktionen, als die Hydrolyse von Peptidbindungen, besitzen (Stover *et al.*, 2000; Rawlings & Morton, 2008; Winsor *et al.*, 2009; Rawlings *et al.*, 2010). Diese große Menge an Peptidasen könnte es dem Bakterium ermöglichen, sich an eine große Anzahl verschiedenster Umgebungen und Nahrungsquellen anzupassen.

Aufgrund ihres pathogenen Potentials gegenüber Menschen und Tieren (Palleroni, 1984), sowie Pflanzen (Gross & Cody, 1985), ist die Untersuchung und Bekämpfung der Pseudomonaden von großem wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Interesse.

Die Therapie einer *P. aeruginosa* Infektion ist schwierig, da dieser Organismus neben den oben aufgezählten Virulenzfaktoren eine wenig permeable Membran besitzt (Hancock, 1998) und eine hohe intrinsische Resistenz gegenüber Antibiotika (Quinn, 1992; Satake & Nakae, 1995), sowie Desinfektionsmitteln (Stover *et al.*, 2000) aufweist.

1.2 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und PA14

Das Bakterium *P. aeruginosa* PA14 (UCBPP-PA14) ist ein hochvirulenter Stamm (Lee *et al.*, 2006). Er wurde ursprünglich dafür isoliert, um einen pathogenen Stamm zu haben, der sowohl in der Lage ist, Infektionen in gut untersuchten Pflanzen-, als auch Tiermodellen hervorzurufen. Es konnte gezeigt werden, dass der Wildtypstamm *P. aeruginosa* PA14 in einer großen Anzahl von Wirten (z. B. im Nematoden *Caenorhabditis elegans*, in der Motte *Galleria mellonella* und in der Pflanze *Arabidopsis thaliana*) virulenter ist als der *P. aeruginosa* Wildtypstamm PAO1 (Rahme *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002). Anhand des Stammes *P. aeruginosa* PA14 konnte unter evolutionären Gesichtspunkten untersucht werden, welche bakteriellen Virulenzfaktoren sowohl bei Pflanzen, als auch bei Tieren an der Pathogenität beteiligt sind (Rahme *et al.*, 1995). Das Chromosom des Bakteriums *P. aeruginosa* PA14 besitzt eine Größe von 6,53 Mbp und 5965 vorhergesagte offene Leserahmen (ORFs); 294 ORFs mehr als *P. aeruginosa* PAO1 (Winsor *et*

al., 2009). In *P. aeruginosa* PA14 konnten 58 Gencluster mit 478 Genen identifiziert werden, die nicht in *P. aeruginosa* PAO1 vorhanden sind (Lee *et al.*, 2006). Es finden sich 91,7 % des *P. aeruginosa* PA14 Genoms in *P. aeruginosa* PAO1 wieder und 95,8 % des *P. aeruginosa* PAO1 Genoms findet sich in *P. aeruginosa* PA14 wieder (Lee *et al.*, 2006).

1.3 Escherichia coli als Expressionswirt

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* (griech. "enteron": Darm). Benannt wurde es 1919 nach seinem Entdecker Theodor Escherich (Lorenz, 1986).

Da *E. coli* zu den weltweit am besten untersuchten Organismen gehört, spielt es auch eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Produktion rekombinanter Proteine. *E. coli* hat kurze Generationszeiten, geringe Nährstoffansprüche und lässt sich sehr gut fermentieren (Rai & Padh, 2001; Baneyx & Mujacic, 2004; Jana & Deb, 2005).

Trotz einer Vielzahl geeigneter Strategien, diverse Proteine heterolog in diesem Organismus zu exprimieren, kommt es bei der Produktion vieler Proteine zu Problemen, so dass nicht die gewünschte Ausbeute biologisch aktiven Proteins erzielt werden kann. Das liegt unter anderem darin begründet, dass a) der genetische Code degeneriert ist und unterschiedliche Organismen eine unterschiedliche codon bias aufweisen können, b) Genprodukte toxische Wirkung auf den heterologen Wirt haben können, c) zellulärer Stress eine erhöhte proteolytische Aktivität verursacht und d) mögliche notwendige Kofaktoren im heterologen Wirt nicht zur Verfügung stehen. Ein weiteres häufig auftretendes Problem bei der Produktion rekombinanter Proteine ist die Aggregation des Zielproteins im Cytoplasma, die z. B. durch falsche oder unvollständige Faltungsprozesse oder aufgrund zu hoher Expressionsraten des rekombinanten Proteins verursacht wird. Die Bildung von unlöslichen Zelleinschlüssen, so genannten inclusion bodies, ist ein allgemein bekanntes Problem bei der Expression rekombinanter Gene in E. coli. Über den Mechanismus der Bildung dieser Proteinaggregate und über ihre Struktur ist wenig bekannt. Eine Vermutung ist, dass diese Strukturen durch ein passives Ereignis zustande kommen, bei dem hydrophobe, exponierte Bereiche ungefalteter Proteine miteinander interagieren (Villaverde & Carrio, 2003). Bei der heterologen Expression bestehen die entstehenden inclusion bodies zu 50 -95 % aus dem rekombinanten Protein. Diesen Vorteil nutzt man z. T. aus, um große Mengen Protein zu erhalten, die vor proteolytischem Abbau geschützt sind (Medina et al., 2002) und in nachfolgenden aufwendigen und kostenintensiven Renaturierungs- und Rückfaltungsschritten in ihre aktive Konformation überführt werden können (Middelberg, 2002; Sørensen et al., 2003 a,b). Obwohl Proteinaggregate solubilisiert und renaturiert werden müssen, hat die Produktion von Proteinen in Form von inclusion bodies einige Vorteile: a) hohe Expressionsausbeuten sind möglich, b) das Zielprotein ist vor proteolytischem Abbau geschützt, c) das Produkt kann in einem sehr reinen Zustand vorliegen und d) es ist durch Zellaufschluss und Zentrifugationsschritte leicht zu isolieren (Carrio & Villaverde, 2002; Fahnert et al., 2004; Graumann & Premstaller, 2006; Jürgen et al., 2010). Wenn nachfolgende Prozesse verfügbar sind, die eine Solubilisierung und Renaturierung des gewünschten Proteins erlauben, werden die oft sehr zeit- und kostenaufwendigen Prozesse in Kauf genommen, um ausreichende Proteinausbeuten zu erhalten. In der Industrie wird so eine Vielzahl humaner, therapeutischer Proteine produziert und für die Herstellung wichtiger Pharmazeutika verwendet (Schmidt, 2004; Graumann & Premstaller, 2006). Wenn keine geeigneten Verfahren zur Solubilisierung von inclusion bodies zur Verfügung stehen oder zur Vermeidung der sehr zeit- und kostenaufwendigen Solubilisierung von inclusion bodies wurden bis jetzt unter anderem folgende Strategien entwickelt: a) das Herabsetzen der Inkubationstemperatur, b) die Reduktion der Expressionsrate, c) die Wahl eines anderen Expressionswirtes, d) die Veränderung des Zielgens, oder e) die Koexpression von Faltungsmodulatoren (Jonasson et al., 2002). Die Koexpression von molekularen Chaperonen konnte in vielen Versuchen als geeignetes Mittel genutzt werden, um die Ausbeute aktiven Proteins zu erhöhen (Nishihara et al., 2000; Ikura et al., 2002; Schlieker et al., 2002). Daher finden Chaperone in der industriellen Biotechnologie immer größere Anwendungsfelder.

1.4 Verwendung von Chaperonen in der industriellen Biotechnologie

Die Produktion von Proteinaggregaten, sogenannten *inclusion bodies*, reduzieren oder ganz unterbinden zu können und dennoch ausreichende Produktmengen zu erhalten, würde einen immensen Kosten- und Zeitgewinn im industriellen Prozess bedeuten. Außerdem ist die Erhöhung der Ausbeute löslichen Proteins besonders bei solchen Enzymen wichtig, die durch Denaturierungs- und Renaturierungsschritte ihre biologisch aktive Konformation nicht wiedererlangen können (Georgiou & Valax, 1996). Daher ist es von besonderem Interesse, Strategien zu entwickeln, mit deren Hilfe die Ausbildung von Proteinaggregaten umgangen und das gewünschte Produkt in löslicher und aktiver Form hergestellt werden kann. Der Einsatz von zusätzlichen, heterologen Faltungshelfern bzw. Chaperonen könnte die korrekte Faltung und somit die biologische Aktivität der Zielproteine sicherstellen.

Molekulare Chaperone kommen ubiquitär in allen Zellen vom Bakterium bis hin zum Menschen vor und sind in verschiedene, evolutionär hoch konservierte Familien, beispielsweise in die Hitzeschockprotein (Hsp) Familie Hsp70 und Hsp60, einteilbar (Mogk *et al.*, 2001). Die Koexpression von Faltungshelfern zur Optimierung der Ausbeute an aktivem und löslichem

Protein bei der Expression von industriell relevanten Proteinen gewinnt immer mehr an Bedeutung. Vor allem die Chaperone GroEL/GroES und DnaK wurden schon mehrfach erfolgreich mit Zielproteinen koexprimiert, um biotechnologische Prozesse zu optimieren (Blum *et al.*, 1992; Ashiuchi *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2009).

In verschiedenen Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Chaperon- oder Faltungskatalysatorgenen eine offensichtliche Lösung für das Problem der Bildung von *inclusion bodies* bei der Produktion rekombinanter Proteine darstellt (Schlieker *et al.*, 2002; Martínez-Alonso *et al.*, 2009). Hierbei wurden in der Regel jedoch solche Faltungshelferproteine gewählt, die aus dem Bakterium *Escherichia coli* stammen und zu den wichtigsten Vertretern dieser Proteingruppe zählen. Doch nicht nur die Löslichkeit von Proteinen kann durch die Konzentrationserhöhung molekularer Chaperone verbessert werden, sondern auch die Gesamtausbeute von Proteinen, was z. B. für die humane Prokollagenase gezeigt werden konnte (Lee & Olins, 1992; Makrides, 1996).

Die allgemeine Funktion von Faltungshelfern ist es Proteine korrekt zu falten, damit diese ihre korrekte und native dreidimensionale Konformation erhalten. Faltungshelfer werden in zwei Gruppen eingeteilt: die Faltungskatalysatoren und molekulare Chaperone.

Molekulare Chaperone binden und schützen die neu synthetisierten Proteine, bis sie ihre native dreidimensionale Struktur erhalten haben. Sie verhindern die Aggregation von Proteinen durch die Bindung an exponierte hydrophobe Reste in ungefalteten, partiell gefalteten oder fehlgefalteten Polypeptiden und steuern Moleküle zu ihren intrazellulären Bestimmungsorten. Außerdem sind sie in der Lage, aggregierte Proteine (*inclusion bodies*) wieder aufzulösen und in den nativen Zustand zurückzufalten (Thomas *et al.*, 1997).

Faltungskatalysatoren katalysieren potentielle geschwindigkeitslimitierende Schritte während des Faltungsprozesses, wie die Isomerisierung von Peptidbrücken oder die Bildung von Disulfidbrücken (Kolaj *et al.*, 2009).

Die vier Hauptchaperongruppen im Cytoplasma von *E. coli* sind folgende: (1) der Ribosomenassoziierte Triggerfaktor (Tig); (2) die Hsp70 Familie; (3) die Hsp60 Familie; und (4) die Hsp100 Familie (Houry, 2001). Die unterschiedlichen Chaperongruppen werden im Folgenden kurz vorgestellt.

(1) Ribosomen-assoziierter Triggerfaktor (Tig)

Der Ribosomen-assoziierte Triggerfaktor ist das erste Chaperon, das mit der wachsenden Polypeptidkette am Ribosom interagiert. Er verhindert den proteolytischen Abbau oder die Aggregation des entstehenden Polypeptidstranges (Deuerling *et al.*, 2003; Baneyx & Mujacic, 2004). Der Triggerfaktor ist ATP unabhängig und benötigt kein weiteres Ko-Chaperon (Maier *et al.*, 2005).

(2) Die Hsp70 Familie

Zur Familie der Hsp70-Chaperone gehören DnaK (Hsp 70), dessen Kofaktor DnaJ (Hsp40), und der Nukleotid-Austauschfaktor GrpE. Durch Bindung kurzer, hydrophober Segmente in teilweise gefalteten und fehlgefalteten Substraten, können Hsp70-Chaperone die Aggregation und weitere Faltungsprozesse unterbinden (Rüdiger *et al.*, 1997; Craig *et al.*, 1999).

Mitglieder dieser Familie enthalten eine ATPase Domäne und eine Polypeptidbindedomäne. Bindung und Freisetzung des Polypeptides erfolgen im Wechsel von einem ATP-gebundenen DnaK Molekül mit schwacher Substrataffinität und einem ADP-gebundenen Status mit hoher Substrataffinität (Hartl & Martin, 1995). GrpE katalysiert die Freisetzung des ADP vom DnaK-ADP-Peptid Komplex (Szabo *et al.*, 1994).

(3) Die Hsp60 Familie

Diese Familie besteht aus GroEL (Hsp60) und dem Kofaktor GroES (Hsp10). GroEL besteht aus einem hohlen Zylinder, der eine Nukleotidbindestelle im Zentralkanal besitzt (Braig *et al.*, 1994). An hydrophoben Bereichen der GroEL-Untereinheiten erfolgt die Bindung des zu faltenden Substrates. Bindet das Ko-Chaperon GroES an einen der beiden GroEL-Ringe entsteht eine von der Umgebung abgeschlossene Höhle, in der die Faltung des Zielproteins erfolgen kann (Xu *et al.*, 1997). Die GroEL/GroES Reaktion ist ATP-abhängig (Tyagi *et al.*, 2009).

Es ist bekannt, dass die *de novo* Proteinfaltung in *E. coli* hauptsächlich über die ersten drei beschriebenen Chaperongruppen: Triggerfaktor, DnaK und GroEL gesteuert wird (Ullers *et al.*, 2007).

(4) Die Hsp100 Familie

Die Hsp100-Chaperone sind in der Lage, kleine Akkumulationen von Proteinen aufzulösen oder fehlgefaltete Proteine zu entfalten, um diese vor der Degradation zu schützen (Ben-Zvi & Goloubinoff, 2001; Houry, 2001).

Neben den klassischen molekularen Chaperonen, die dazu nötig sind, die Ausbildung von Proteinaggregationen zu verhindern oder wieder aufzuheben bzw. günstige Faltungsbedingungen bereitzustellen, gibt es weitere Enzymklassen, die für das Erzielen der korrekten Konformation eines Proteins essentiell sein können, die Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen (PPIasen (5)) und die Disulfidbrücken-bildenden Proteine (Dsb-Proteine (6)).

(5) Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerasen (PPIasen)

<u>P</u>eptidyl-<u>P</u>rolyl *cis-trans* Isomerasen findet man sowohl im Cytoplasma, als auch im Periplasma von Bakterien. Die meisten Peptidbindungen werden in der *trans*-Konformation am Ribosom synthetisiert, da diese energetisch deutlich günstiger ist als die *cis*-Konformation (Kim & Baldwin, 1982; Schmid, 1993). Eine Ausnahme stellen Peptid-Bindungen dar, in denen die Aminosäure Prolin C-terminal enthalten ist. Hier ist die Energiedifferenz zwischen der *cis-* und der *trans*-Konformation so gering, so dass 7 % der Bindungen als *cis*-Isomere synthetisiert werden (Stewart *et al.*, 1990). Aufgrund der hohen energetischen Barriere der *cis-trans* Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl Brücke stellt diese Isomerisierung einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Faltungsprozess dar (Schmid, 2001). Die richtige Konformation ist für die Funktionalität eines Enzyms jedoch unverzichtbar, so dass die Katalyse der Isomerisierung einer solchen Bindung dazu beiträgt, ein biologisch aktives Protein zu erhalten.

(6) Disulfidbrücken-bildende Proteine (Dsb-Proteine)

Das Periplasma Gram-negativer Bakterien stellt eine oxidierende Umgebung dar, in welcher die meisten Cysteine in Proteinen zur Bildung von Disulfidbrücken genutzt werden. Das Einführen der Disulfidbrücken ist ein oxidativer Prozess und sorgt für eine stabile, aktive und proteaseresistente tertiäre oder quartäre Struktur von extracytoplasmatischen Proteinen (Inaba, 2009). Dieser Prozess wird durch die sogenannten Dsb-Proteine (<u>disulfide-b</u>ond Proteine) katalysiert (Łasica & Jagusztyn-Krynicka, 2007; Depuydt *et al.*, 2009; Heras *et al.*, 2009).

Es gibt keine Garantie dafür, dass die Ko- oder Überexpression von Faltungshelfern in jedem Fall eine Verbesserung der Expression des Zielproteins hervorruft. Daher muss für jedes Zielprotein getestet werden, ob solche Faltungshelfer die Proteinproduktion beeinflussen können, und welche dies im speziellen Fall sind (Walter & Buchner, 2002; Baneyx & Mujacic, 2004).

Allein durch die immens hohen Proteinmengen oder durch die ständige Expression des Zielgens können der Zelle wichtige Ressourcen und Energie entzogen werden, was wiederum die Funktion wichtiger Zellprozesse und somit auch die Proteinausbeute beeinflussen kann (Hoffmann & Rinas, 2001). In solchen Fällen sollten strikt regulierbare Promotoren verwendet werden (z. B. T7 oder *tac*), die die Expression erst bei Erreichen einer ausreichenden Zellmasse durch Induktion erlauben (Studier, 1991; Jonasson *et al.*, 2002).

Eine andere Möglichkeit, die Ausbeute rekombinanten Proteins zu erhöhen, ist die Sekretion des Zielproteins ins Periplasma, wodurch dessen cytoplasmatische Konzentration gering gehalten werden kann (Hockney, 1994; Jana & Deb, 2005).

1.5 Proteasen

Proteasen, allgemein auch als Peptidasen bezeichnet, repräsentieren unter der Vielzahl der Enzyme die größte funktionelle Gruppe. Zwei Prozent der Gesamtheit aller bekannten Proteine in allen Arten von Organismen sind Proteasen (Polgár, 2005).

Sie katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen durch die Addition von Wasser. Alle Proteasen zeigen, in Bezug auf die Hydrolyse, einen vergleichbaren Mechanismus im nukleophilen Angriff auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom eines Substrates auf. Die kovalente Peptidbindung wird im Verlauf von säure- und basekatalysierten Prozessen gespalten (Polgár, 1989). Für die Generierung der nukleophilen Eigenschaften und deren Übertragung auf die zu spaltende Peptidbindung nutzen die unterschiedlichen Proteasen verschiedene reaktive Aminosäuren.

Aufgrund der verschiedenen reaktiven Aminosäuren im aktiven Zentrum, die für den katalytischen Mechanismus verwendet werden, klassifiziert das MEROPS-System Proteasen in sieben Klassen: Aspartatproteasen (z. B. Pepsin A¹), Asparaginproteasen, Cysteinproteasen (z. B. Papain², Kaspasen³), Glutamatproteasen (z. B. Scytalidocarboxyl Peptidase B), Metalloproteasen (z. B. Thermolysin⁴), Serinproteasen (z. B. Elastase, Trypsin⁵) und Threoninproteasen (z. B. Polycystin⁶). Ergänzend existiert noch eine weitere Klasse von Proteasen. Hier werden alle Proteasen zusammengefasst, die keinen bekannten katalytischen Typ aufweisen und so nicht den anderen Klassen zugeordnet werden können (Rawlings *et al.*, 2010).

Die Proteasen der verschiedenen Klassen werden weiterhin, aufgrund von Homologien der Primärsequenz und der tertiären Strukturelemente, sowie aufgrund von Ähnlichkeiten im Reaktionsmechanismus, in Clane und Proteasefamilien eingeteilt. Clane sind Gruppen von Proteasefamilien mit gleichem evolutionärem Ursprung. In einem Clan werden die Proteasefamilien zusammengefasst, die aufgrund der evolutionären Verwandtschaft Homologien in der Tertiärstruktur bzw. Quartärstruktur aufweisen. Falls die Tertiärstruktur unbekannt ist, werden Charakteristika, wie die Reihenfolge der Aminosäuren der katalytischen Triade, zur Einteilung der Proteasen in Clane herangezogen. Die Bezeichnung jedes Clans besteht aus zwei Buchstaben. Der erste bezeichnet den Katalysemechanismus (z. B. S für Serin) und der zweite wird fortlaufend dem jeweiligen Unterclan (z. B. SQ) zugeordnet. Proteasefamilien werden aufgrund von signifikanten Homologien in der Aminosäuresequenz vergleichend zu dem typischen Vertreter

¹ Verdauungsenzym im Menschen

² eiweißspaltendes Enzym der Papaya

³ die wichtigsten Enzyme der Apoptose, dem programmierten Zelltod

⁴ thermophile Endoprotease; katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen (aus *Bacillus thermoproteolyticus*)

⁵ Verdauungsenzym im Dünndarm des Menschen

⁶ spielt bei dem Aufbau der Nierenkanälchen (*tubuli*) eine wichtige Rolle

einer Proteasefamilie eingeteilt. Die Proteasefamilien werden ebenfalls nach dem Katalysemechanismus benannt und fortlaufend nummeriert (z. B. S58).

Die Gruppen von Proteasen, die für diese Arbeit wichtig sind, werden im Folgenden vorgestellt.

1.6 Serinproteasen

Eine wichtige Gruppe innerhalb der Proteasen sind die so genannten Serinproteasen. Sie tragen ihren Namen aufgrund des aktiven, nukleophilen Serins im katalytischen Zentrum des Proteins, das für den Reaktionsmechanismus der Protease eine entscheidende Rolle spielt. Die katalytische Triade von klassischen Serinproteasen besteht aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure. Jedoch kann die Abfolge der Aminosäuren in der katalytischen Triade je nach Serinprotease unterschiedlich sein (Polgár, 2005; Chilov *et al.*, 2007).

Der erste Schritt der Hydrolyse von Substraten ist der nukleophile Angriff durch den katalytischen Serin-Rest im aktiven Zentrum. Bei der Bindung des Substrates für die Hydrolyse bildet sich ein tetraedrisches Acyl-Enzym-Übergangsprodukt aus dem Substrat und dem aktiven Serin-Rest, das kovalent an das Enzym gebunden wird. Die Ausbildung dieses Übergangsproduktes stabilisiert den Komplex und ist wesentlich für die katalytische Aktivität des Enzyms verantwortlich. Der tetraedrische Übergangszustand ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken. Das bedeutet, dass das Übergangsprodukt mit höherer Affinität an das Enzym bindet als das Ausgangssubstrat, weil es energetisch begünstigt ist. Der zweite nukleophile Angriff erfolgt durch ein Wassermolekül, dies sorgt für die Dissoziation des Acyl-Enzymkomplexes und die neuge-bildete Carboxylgruppe wird freigegeben. Der katalytische Serin-Rest kehrt anschließend in seinen Ausgangszustand zurück (Zakharova *et al.*, 2009).

Man findet Serinproteasen in Viren, Bakterien und Eukaryoten. Diese Gruppe beinhaltet Exopeptidasen, Endopeptidasen, Oligopeptidasen und Omegapeptidasen (Rawlings & Barrett, 1994). Serinproteasen werden daher in der MEROPS Datenbank in 13 Clans und 46 Familien, mit weiteren Unterfamilien, eingeteilt (Rawlings *et al.*, 2010).

1.6.1 Penicillinacylasen

Penicillinacylasen (PAC) (EC 3.5.1.11) gehören zu den Serinproteasen und zur strukturellen Superfamilie der Ntn-Hydrolasen (N-terminale nukleophile Hydrolasen) (Ignatova *et al.*, 2005). Sie besitzen im aktiven Zentrum zwar einen Serin-Rest, jedoch fehlen die beiden anderen, typischen Aminosäuren Histidin und Asparaginsäure (Chilov *et al.*, 2007).

Diese Enzyme sind in vielen Eubakterien (Gram-positiv und Gram-negativ), Archaeen, Hefen und Pilzen vertreten. Hier sind sie für den Metabolismus von aromatischen Kohlenstoffkomponenten verantwortlich (Jager *et al.*, 2007).

In der industriellen Anwendung sind Penicillinacylasen Schlüsselenzyme, die zur biokatalytischen Produktion von Vorstufen verschiedener β -Laktam-Antibiotika eingesetzt werden (Shewale & Sivaraman, 1989; Elander, 2003). Unter Verwendung von Penicillinacylasen werden jährlich 1000 Tonnen des Grundgerüsts 6-Aminopenicillansäure (6-APA) hergestellt (Abb. 1). Diese Vorstufe wird für die weitere Herstellung semisynthetischer β -Laktam-Antibiotika verwendet (Powell *et al.*, 2001). Neuartige und optimierte Acylasen können des Weiteren für die Hydrolyse von alternativen Fermentationsprodukten, sowie für die Synthese von semisynthetischen β -Laktam-Antibiotika (z. B. Ampicillin, Amoxicillin (Abb. 1) oder Cephalexin) verwendet werden (Sio & Quax, 2004; Maresová *et al.*, 2010). Zu diesen Acylasen zählen z. B. die Penicillinacylasen aus *Alcaligenes faecalis*, aus *Bacillus megaterium*, aus *Kluyvera citrophila* und aus *Providencia rettgeri* (Sio & Quax, 2004).



Abb. 1 Schematische Darstellung des Syntheseweges von Amoxicillin, das ein semisynthetisches β -Laktam-Antibiotikum ist. Penicillinacylasen (PAC) sind sowohl in der Lage die Hydrolyse des Penicillin G zum Grundgerüst der 6-Aminopenicillansäure zu katalysieren, als auch die Reacylierung zum fertigen β -Laktam-Antibiotikum.

Zurzeit ist es noch schwierig, diese Enzyme in ausreichend großen Mengen herzustellen, da die Produktion von großen Mengen an rekombinanten Penicillinacylase-Protein (PAC) in *E. coli* und anderen heterologen Stämmen eine große Herausforderung darstellt. Der Grund liegt hier in einem einzigartigen Syntheseweg für das Protein, an welchem Translokation, periplasmatische Prozessierung und die Faltung beteiligt sind (Abb. 2) (Sizmann *et al.*, 1990).



Abb. 2 Der Synthese- und Sekretionsweg von Penicillinacylasen (PAC) in Gram-negativen Bakterien. Das pac-Gen kodiert für ein Polypeptid-Vorläuferprotein (Prepro-PAC). Dieses besteht aus einem Signalpeptid (Pre-Sequenz) am N-Terminus (orange), einer α -Untereinheit (rot), einem Verbindungsprotein (Pro-Sequenz; grün) und einer β -Untereinheit (blau). Das Signalpeptid sorgt für die Translokation des gesamten Peptides in das Periplasma. Nach der Translokation ins Periplasma wird dieses abgetrennt. Ein weiterer Vorläufer, das Pro-PAC entsteht im Periplasma. Die Prozessierung im Periplasma beinhaltet eine Serie von proteolytischen Schritten, in welchen das Verbindungspeptid entfernt wird und die beiden Untereinheiten frei werden, um das fertige PAC bilden zu können. Man nimmt an, dass an der korrekten Faltung sowohl der Vorläufer des PAC, als auch von PAC selber, verschiedenste Chaperone und Faltungshelfer (z. B. das DegP-Protein) beteiligt sind.

1.6.2 Penicillin G Acylase (PGA) aus Escherichia coli

Die Penicillin G Acylase PGA (EC 3.5.1.11) aus *E. coli* wird in die Unterfamilie S45 der Peptidasen eingeordnet (Rawlings *et al.*, 2010) und besteht aus 846 Aminosäuren.

Das Strukturgen *pga* von *E. coli* ATCC 11105 kodiert für ein 96 kDa Vorläufer-Protein, das so genannte Prepro-PGA (Abb. 3). Dieses Vorläuferprotein besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid (Pre, 26 AS), welches für die Translokation durch die Cytoplasmamembran *via* Tat-Sekretionsweg zuständig ist (Ignatova *et al.*, 2002; Daly & Hearn, 2005). Das intramolekulare Verbindungspeptid (Pro, 54 AS) verbindet den C-Terminus der α -Untereinheit (23 kDa) und den N-Terminus der β -Untereinheit (62 kDa). Es sorgt für die richtige Faltung des PGA Proteins und wird später durch eine Serie von intra- und intermolekularen autoproteolytischen Reaktionen entfernt (Kasche *et al.*, 1999; Hewitt *et al.*, 2000; Ignatova *et al.*, 2005). Im reifen PGA-Protein sind die α - und die β -Untereinheit durch nicht-kovalente Interaktionen fest miteinander verbunden (Ignatova *et al.*, 2005).

Pre (26 AS)	α-Untereinheit (209 AS)	Pro (54 AS)	β-Untereinheit (557 AS)	
Signalpeptid	Ala	 ₂₀₉ Sei	 ¹ 264	
	Verbindungspeptid			

Abb. 3 Schematische Übersicht über das Vorläufer-Protein Prepro-PGA von *E. coli.* Der initiale Schritt der Prepro-PGA Prozessierung ist die Abspaltung der Signalsequenz, was zum Pro-PGA führt. Die weitere Prozessierung von Pro-PGA (92 kDa) ist eine intermolekulare, autoproteolytische Spaltung zwischen dem Thr263 und dem Ser264, die dann die β -Untereinheit freisetzt. Folgende autoproteolytische Schritte am Ala209 sorgen für die Freisetzung der α -Untereinheit. Das native heterodimere PGA-Protein hat eine Größe von 85 kDa.

Die korrekte Faltung der Penicillinacylase findet wahrscheinlich durch noch nicht weiter charakterisierte Faltungshelfer und Chaperone im Cyto- und Periplasma statt. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Koexpression eines periplasmatischen Protease/Chaperon-Proteins ist DegP, das mit deutlichem Erfolg zur Optimierung eines Expressionssystems zur Produktion von Penicillinacylasen eingesetzt wurde (Narayanan *et al.*, 2006).

1.6.3 Das bifunktionale Protein DegP aus Escherichia coli

Das Protein DegP aus *E. coli* spielt als Mitglied der konservierten HtrA Serinprotease Familie eine wichtige Schlüsselrolle in der Qualitätskontrolle extracytoplasmatischer Proteine (Meltzer *et al.*, 2009). Es ist ein essentielles, periplasmatisches Hitzeschock-Protein, das es dem Bakterium

ermöglicht, bei hohen Temperaturen zu überleben (Skórko-Glonek *et al.*, 1997). DegP zeigt sowohl Protease-, als auch Chaperon-Funktion in einer temperaturabhängigen Art und Weise. DegP hat die ungewöhnliche Eigenschaft bei Temperaturen unter 28°C als Chaperon zu fungieren und fehlgefaltete Proteine vor der Ausbildung von Aggregaten zu schützen. Bei Temperaturen über 30°C werden fehlgefaltete Proteine effizient durch DegP degradiert (Jomaa *et al.*, 2007; Subrini & Betton, 2009). Jedoch ist dieser temperaturabhängige Wechsel der Funktion nicht absolut. So können manche periplasmatisch fehlgefaltete Proteine auch bei 25°C durch DegP degradiert werden (Skórko-Glonek *et al.*, 2008).

1.7 Aminopeptidasen

Aminopeptidasen sind Exoproteasen, die, im Gegensatz zu Carboxypeptidasen, am N-terminalen Ende von Polypeptiden oder Proteinen α -Aminosäuren oder Dipeptide abspalten (Gonzales & Robert-Baudouy, 1996). Sie stellen eine diverse Gruppe von Hydrolasen dar und sind in allen Reichen lebender Organismen zu finden (Rawlings & Barrett, 1994).

Für alle natürlichen α -Aminosäuren existieren spezifische Aminopeptidasen, welche nur diese am N-terminalen Ende eines Proteins abspalten (z. B. Arginin-Aminopeptidase, Leucin-Aminopeptidase, usw.). Man findet sie sowohl im Cytoplasma, als auch fest an die Zellmembran gebunden. Aminopeptidasen sind im Allgemeinen Zink-Metalloenzyme, die ein hoch konserviertes Zinkbindemotiv besitzen. Sie werden unter anderem durch den Proteaseinhibitor Bestatin gehemmt (Rawlings & Barrett, 1993; Taylor, 1993).

Die Enzyme, die in der Lage sind, β -Aminosäuren von Peptiden abzuspalten, stellen eine neue Gruppe der Aminopeptidasen dar und werden als β -Peptidyl Aminopeptidasen bezeichnet.

1.7.1 β-Aminosäuren und β-Peptide

Bei proteinogenen α -Aminosäuren befindet sich die Aminogruppe am α -Kohlenstoffatom (dem ersten Kohlenstoffatom nach dem Carboxy-Kohlenstoffatom) (Abb. 4). Sie kommen als L-Enantiomer vor. Neben den 22 proteinogenen Aminosäuren, die zu den Bausteinen der Proteine gehören, konnten in Pflanzen und Mikroorganismen über 500 weitere, seltenere Aminosäuren nachgewiesen werden, die als nicht-proteinogene Aminosäuren bezeichnet werden. Unter diese Definition fallen auch die D-Formen vieler proteinogener α -Aminosäuren.



Abb. 4 Übersicht der allgemeinen Strukturformeln von α -Aminosäuren und β -Homoaminosäuren. Das R steht symbolisch für proteinogene Seitenketten. Der Begriff β -Homoaminosäure bedeutet, dass formal eine zusätzliche Methylgruppe zwischen der Carboxygruppe und dem die Aminogruppe tragenden Kohlenstoffatom inseriert ist. Um die Positionsisomere von β -Homoaminosäuren differenzieren zu können, wird die Position der Seitenkette durch eine hochgestellte Ziffer nach dem Buchstaben β angezeigt (Sewald, 2003).

In der Natur kommen mehr β -Aminosäuren als proteinogene α -Aminosäuren vor. β -Aminosäuren unterscheiden sich von den proteinogenen Vertretern durch die Position der Aminogruppe, diese befindet sich hier am β -Kohlenstoffatom (dem zweiten Kohlenstoffatom nach dem Carboxy-Kohlenstoffatom) (Abb. 4). In Pilzen und Bakterien findet die Biosynthese von β -Aminosäuren in bausteinartigen Enzymkomplexen, den nicht-ribosomalen Peptidsynthasen (NRPSs), statt (Seebach *et al.*, 2004).

Die wahrscheinlich häufigste und wichtigste β -Aminosäure ist das β -Alanin (H- β hGly). Diese essentielle Aminosäure ist ein Bestandteil der Pantothensäure, welche wiederum im Coenzym A enthalten ist (Seebach *et al.*, 2004). Dieses ist am Energiestoffwechsel beteiligt. Des Weiteren ist β -Alanin in vielen Vertebratengeweben in Form des β/α -Dipeptids Carnosin (H- β Ala-His-OH) anzutreffen.

Bis jetzt ist in der Natur kein Peptid bekannt, das einzig aus β -Aminosäuren besteht. Jedoch sind β -aminosäurehaltige Komponenten ubiquitär in lebenden Organismen verbreitet, da sie als *building blocks* in vielen natürlich vorkommenden Substanzen enthalten sind. Diese Komponenten besitzen oft toxische Eigenschaften. Beispiele hierfür sind das Microcystin⁷, das Kokain⁸, das Taxol⁹, das Bestatin¹⁰ und das Nephilatoxin¹¹ (Seebach *et al.*, 2004). Sie haben damit häufig interessante pharmakologische Eigenschaften und finden zunehmend Verwendung in der medizinischen Chemie, zumal Peptide, die β -Aminosäuren enthalten, eine erhöhte metabolische Stabilität im Menschen aufweisen, da sie nicht so schnell abgebaut werden können (Sewald, 2003).

⁷ Microcystine sind cyclische Heptapeptide bzw. Oligopeptide und sind Cyanotoxine bestimmter Cyanobakterien

⁸ Esteralkaloid aus dem Cocastrauch

⁹ auch Paclitaxel genannt; es ist eine in der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) vorkommende Substanz aus der Gruppe der Taxane. Es wird in der Medizin zur Behandlung verschiedener Krebsarten (z. B. Brustkrebs) verwendet.

¹⁰ Aminopeptidase-Inhibitor

¹¹ Toxin der Riesenradnetzspinnen

1.7.2 β-Peptidyl Aminopeptidasen

 β -Peptidyl Aminopeptidasen sind, wie Penicillinacylasen, Ntn-Hydrolasen mit einem Serin-Nukleophil, das durch eine autokatalytische Spaltung gebildet wird. Daher ordnet man sie ebenfalls in die Gruppe der Serinproteasen ein (Fanuel *et al.*, 1999a). In der Gruppe der Serinproteasen repräsentieren β -Peptidyl Aminopeptidasen jedoch eine neue Klasse von Enzymen mit außergewöhnlichen Substratspezifitäten und einer ungewöhnlichen Proteinfaltung. Daher wurden sie in eine eigene Familie und einen eigenen Clan (Familie S58: DmpA Aminopeptidase Familie; Clan SQ) in der Serinproteasefamilie der MEROPS Datenbank einsortiert. Bis jetzt hat man homologe Gene nur in Bakterien, Archaeen, Pilzen und Pflanzen gefunden. In Tieren, im Menschen und in Viren wurden bis jetzt noch keine homologen Gensequenzen detektiert (Rawlings *et al.*, 2010).

Die erste charakterisierte β-Peptidyl Aminopeptidase wurde in dem humanpathogenen Bakterium *Ochrobactrum anthropi* entdeckt (Fanuel *et al.*, 1999 a,b). Die drei weiteren bekannten und charakterisierten β-Peptidyl Aminopeptidasen stammen aus den Bakterienstämmen *Sphingosinicella xenopeptidilytica* 3-2W4 (3-2W4 BapA), *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2 (Y2 BapA) und *Pseudomonas* sp. MCI3434 (Ps BapA).

Bakterielle β -Peptidyl Aminopeptidasen sind in der Lage, Peptidbindungen zwischen β -Aminosäuren zu spalten, die durch bis jetzt bekannte Proteasen nicht hydrolysiert werden können. Im Gegensatz zu den gut bekannten eukaryotischen Carnosinasen (Aminoacylhistidin-Dipetidase), besitzen die β -Peptidyl Aminopeptidasen ein weites Substratspektrum. Carnosinasen hydrolysieren z. B. D-Ala-L-His, sowie das Dipeptid Carnosin in die Einzelkomponenten D-Ala bzw. β -Alanin und L-Histidin. Es zeigte sich, dass das Enzym Carnosinase spezifisch für Dipeptide ist, die am C-Terminus ein L-Histidin aufweisen (van der Drift & Ketelaars, 1974; Yamada & Kera, 1998).

β-Peptidyl Aminopeptidasen dagegen katalysieren die N-terminale Abspaltung von β-Aminosäuren von Oligopeptiden, Amiden und Estern bis zur letzten Aminosäure (Geueke & Kohler, 2007). Sie sind außerdem in der Lage, die Synthese von β-Peptiden zu katalysieren und besitzen daher ein großes Potential für die Entwicklung neuer pharmazeutisch aktiver Substanzen, die die Funktion stabiler Peptidmimetika besitzen (Geueke *et al.*, 2005b). Obwohl bis jetzt nur vier Peptidasen dieser Gruppe charakterisiert sind, zeigen Datenbankrecherchen, dass die Gruppe viel größer zu sein scheint (Geueke & Kohler, 2007; Rawlings *et al.*, 2010). Die bis jetzt bekannten β-Peptidyl Aminopeptidasen bestehen im nativen Zustand aus einem Homotetramer, in welchem jedes Monomer zwei nicht kovalent assoziierte Polypeptidketten (α- und β-Untereinheit) enthält. Diese Polypeptidketten werden durch ein einzelnes Gen kodiert (Geueke & Kohler, 2007). Die Präproteine werden autokatalytisch vor einem konservierten Serin-Rest hydrolysiert,
jedoch unterscheiden sich die Hydrolysestellen von DmpA und Ps BapA (Gly \downarrow Ser) von denen von 3-2W4 BapA und Y2 BapA (Asn \downarrow Ser).

1.7.3 Carnosinasen

Carnosinasen wurden 1949 durch Hanson & Smith entdeckt (Hanson & Smith, 1949; Lenney et al., 1985). Sie stellen eine Gruppe von intra- und extrazellulären Dipeptidasen dar, die unter anderem zur großen Familie der Metalloproteasen gehören (Guiotto et al., 2005). Sie hydrolysieren das β/α -Dipeptid Carnosin zu β -Alanin und L-Histidin, sowie weitere Peptide die C-terminal ein L-Histidin aufweisen (Sauerhöfer et al., 2007). Es gibt zwei Typen von Carnosinasen: die cytosolischen Gewebe-Carnosinasen und die Serum-Carnosinasen. Die menschlichen Gewebe-Carnosinasen (EC 3.4.13.18) gehören zu den Cystein-Peptidasen und sind in allen Gewebetypen des Menschen vertreten. Sie agieren als nichtspezifische Dipeptidasen (Yeum et al., 2010). Diese unterscheiden sich vollkommen von den Serum-Carnosinasen (EC 3.4.13.20) (Lenney et al., 1985). Die Serum-Carnosinasen sind hochspezifische, Metall-Ionen abhängige, homodimere Dipeptidasen (Teufel et al., 2003). Sie kommen in unterschiedlichen Kompartimenten vor: im Serum, in der Niere, in der Milz und im Gehirn (Schoen et al., 2003; Bellia et al., 2009). Sie besitzen eine molekulare Masse von 75 kDa. Das aktive Enzym besteht aus einem Dimer (Jackson et al., 1991). Die Serum-Carnosinasen hydrolysieren die Dipeptide Anserin und Ophidin (N1- und N3-Methylderivate des Carnosins) kaum, und die Dipeptide Homocarnosin (y-Aminobutyryl-histidin) und Carcinin werden von den Carnosinasen gar nicht hydrolysiert (Boldyrev, 2000). Ophidin und Homocarnosin sind weitere β/α -Dipeptide im menschlichen Körper.

1.7.4 Natürlich vorkommende β/α-Dipeptide

Wichtige Vertreter von β/α -Dipeptiden, die sowohl im Menschen, als auch in anderen Säugetieren vorkommen, werden im Folgenden beschrieben.

1.7.4.1 L-Carnosin

Carnosin wurde im Jahr 1900 von W. S. Gulewitsch isoliert und charakterisiert (Hipkiss, 1998; Guiotto *et al.*, 2005). Es ist ein natürlich vorkommendes cytoplasmatisches β -Alanyl-L-Histidin

Dipeptid (Abb. 5), das ein typischer Bestandteil in langlebigen Geweben von Vertebraten ist (Boldyrev & Severin, 1990; Yan *et al.*, 2008). In den Skelettmuskeln kommt Carnosin in hohen Konzentrationen bis zu 20 mM vor, im Gehirn liegen die Konzentrationen zwischen 0,7 und 2 mM (Renner *et al.*, 2010). Des Weiteren kommt es im olfaktorischen Epithelgewebe der vorderen Nasenschleimhaut, im Herzen, aber auch im zentralen Nervensystem vor, von wo aus es ins Serum und in die Cerebrospinalflüssigkeit¹² entlassen wird (Bukharin *et al.*, 1999; Guiotto *et al.*, 2005; Fleisher-Berkovich *et al.*, 2009; Peters *et al.*, 2009).

Die biologische Rolle von Carnosin ist noch nicht vollständig geklärt. Es sind jedoch zahlreiche biologische Funktionen beschrieben. Zu diesen gehört die protektive Funktion als Antioxidans und selektiver Radikalfänger von α,β -ungesättigten Aldehyden. So schützt Carnosin Zellstrukturen wie DNA, Proteine und Membranen. Es verhindert die nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen und somit den Verlust ihrer Funktion. Es reguliert die Muskelkontraktionen und es stimuliert das Immunsystem und die Wundheilung (Hipkiss, 1998; Guiotto *et al.*, 2005). Im zentralen Nervensystem erfüllt Carnosin viele Kriterien als Neurotransmitter, welcher synaptische Prozesse moduliert; es ist aber auch an der Neuroprotektion beteiligt (Peters *et al.*, 2009). Des Weiteren dient Carnosin als effektives pH-Puffersystem in Muskeln und im Gewebe (Skulachev, 2000).

Carnosin besitzt ein enormes therapeutisches Potential zur Behandlung von Krankheiten, die mit oxidativen Schädigungen der DNA und DNA-Protein-Verlinkungen einhergehen, da es in der Lage ist als Radikalfänger zu agieren (Guiotto *et al.*, 2005; Kang, 2009) Carnosin wird im menschlichen Körper (in Muskelzellen und Zellen des zentralen Nervensystems) durch Carnosin-Synthetasen aus den Aminosäuren β -Alanin und L-Histidin synthetisiert (Harris *et al.*, 2006). Der Abbau von Carnosin findet im menschlichen Gewebe durch Carnosinasen statt.



Abb. 5 Strukturformeln L-Carnosin und dessen Einzelkomponenten. Das natürlich vorkommende L-Carnosin besteht aus den Einzelaminosäuren β-Alanin und L-Histidin.

¹² die Hirn-Rückenmarksflüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*)

1.7.4.2 L-Anserin

L-Anserin ist die methylierte Form von Carnosin. Es besitzt an der N-1 Position des Imidazol-Ringes eine zusätzliche Methylgruppe (Abb. 6). Es findet sich in millimolaren Konzentrationen in verschiedenen Gewebetypen von Säugetieren, einschließlich Skelett- und Herzmuskel, sowie im Gehirn (Babizhayev *et al.*, 1994; Fleisher-Berkovich *et al.*, 2009).

L-Anserin zeigt nur eine schwache Wirkung in Bezug auf den Schutz vor Glykierung von Proteinen (Hobart *et al.*, 2004).

Es wird, im Gegensatz zu Carnosin, nur sehr schlecht bis gar nicht von Carnosinasen im menschlichen Körper abgebaut (Fleisher-Berkovich *et al.*, 2009).



Abb. 6 Strukturformel von L-Anserin, der methylierten Form von Carnosin.

1.7.4.3 Carcinin

Carcinin (β-Alanyl-histamin) wurde 1973 von Arnould und Frentz im Herzgewebe des Krebs *Carcinus maenas* entdeckt (Abb. 7) (Arnould & Frentz, 1975).



Abb. 7 Strukturformeln von Carcinin und dessen Einzelkomponenten. Das natürlich vorkommende Carcinin besteht aus der β -Aminosäure β -Alanin und der stickstoffhaltigen Verbindung Histamin.

Man findet Carcinin in vielen Histamin-reichen Säugetiergeweben, wie z. B. im Herz, in der Niere, im Magen und im Darm. Die Konzentrationen von Carcinin entsprechen denen von Carnosin und Histamin. Sie sind jedoch geringer als die Konzentration von freiem Histidin (Babizhayev *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Carcinin als natürliches Antioxidans wirkt und eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Stress übernimmt (Chen *et al.*, 2004).

1.7.5 Carnosin und Wundheilung

Carnosin ist ein natürlicher Speicher von Histidin, welches eine Vorstufe von Histamin ist. Im menschlichen Körper wird Histamin durch das Zusammenspiel der Enzyme Carnosinase und Histidin-Decarboxylase aus Carnosin gebildet (Shen *et al.*, 2008). Die Carnosinase spaltet das Carnosin in β -Alanin und L-Histidin, und die Histidin-Decarboxylase synthetisiert aus dem L-Histidin das Histamin (Abb. 8).

In Entzündungsstellen sind Migration und Proliferation von Fibroblasten¹³ wichtige Prozesse während der Wundheilung. Histamin ist in der Lage, diese Fibroblasten-Migration zu stimulieren und somit die Kollagensynthese (Kohyama *et al.*, 2010). Es beschleunigt dadurch die Wundheilung (Numata *et al.*, 2006).



Abb. 8 Der metabolische Abbau von Carnosin im menschlichen Körper. Das Carnosin wird durch verschiedene, enzymatisch katalysierte Schritte zum Histamin umgebaut.

¹³ Zellen, die die extrazelluläre Verbindungsmatrix, z. B. Kollagen, synthetisieren

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Serinproteasen gehören zu einer großen Familie innerhalb der Proteasen. Serinproteasen zeichnen sich durch den gemeinsamen nukleophilen Serin-Rest im katalytischen Zentrum des Enzyms aus. Zu den Serinproteasen gehören sowohl gut charakterisierte und bereits wichtige industriell genutzte Enzyme wie die Penicillinacylasen, als auch die wenig bekannten und neuartigen β -Peptidyl Aminopeptidasen.

In dieser Arbeit sollte die Produktion der gut charakterisierten Penicillinacylase aus *Escherichia coli* verbessert werden, um ihren industriellen Einsatz ökonomisch und ökologisch vertretbarer zu gestalten. Zum anderen sollte ein neuartiges Enzym aus der Gruppe der Serinproteasen, die β -Peptidyl Aminopeptidase aus *Pseudomonas aeruginosa* charakterisiert werden, um mehr über die physiologische Funktion neuartiger Serinproteasen und ihrer möglichen industriellen Anwendungen zu erfahren.

1) Penicillinacylasen (PAC) sind bedeutende, industriell genutzte Biokatalysatoren, die in einer Vielzahl von intermediären Reaktionen zur Herstellung von Antibiotika eingesetzt werden. Daher ist die Produktion dieser Proteine selbst von hohem Interesse. Die Überproduktion von Enzymen dieser Klasse konnte bereits durch die Koexpression des Protease/Chaperon-Proteins DegP verbessert werden (Pan *et al.*, 2003). Chaperone arbeiten jedoch meistens sukzessiv, die wirksamste Kombination ist aber nicht vorhersagbar, so dass eine Expressionsoptimierung durch Chaperone nur empirisch erfolgen kann. Der positive Effekt von DegP auf die PAC-Produktion lässt eine weitere Steigerung durch zusätzlich koexprimierte Chaperone erwarten. Zur Optimierung von Expressionsstämmen wurde am IMET bereits eine Strategie entwickelt, die auf einer Koexpressions-Bibliothek basiert, die alle bekannten und putativen Chaperone und Faltungshelfer von *Pseudomonas aeruginosa* (ca. 50 Gene) beinhaltet.

- (1.1) Durch den Einsatz der Koexpressions-Bibliothek sollte die Produktion des Modellenzyms Penicillin G Acylase (PGA) aus *E. coli* ATCC11105 optimiert werden, um den Prozess der Penicillinacylase-Produktion umweltfreundlicher und ökologischer zu gestalten. Die Koexpression der periplasmatischen Protease DegP scheint aus nicht im Detail verstandenen Gründen vorteilhaft für die Leistungsfähigkeit eines *E. coli* Expressionssystems zur Produktion der Penicillin G Acylase zu sein.
- (1.2) Aus diesem Grund sollten Plasmide konstruiert werden, in denen neben dem eigentlichen Zielgen jeweils *degP* kodiert vorliegt und koinduziert exprimiert werden kann.

2) Bei der Gruppe der β -Peptidyl Aminopeptidasen handelt es sich um eine neuartige Proteasefamilie (S58), die zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur vier charakterisierte Mitglieder

enthielt. Die erste beschriebene β -Peptidyl Aminopeptidase stammt aus dem humanpathogenen Bakterium *Ochrobactrum anthropi* (DmpA). Durch Sequenzvergleiche mit dem *dmpA*-Gen wurde ein homologer ORF (*pa1486*) im Genom von *P. aeruginosa* identifiziert. Das resultierende Protein sollte BapF genannt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die physiologische Funktion von BapF in *P. aeruginosa* untersucht werden, da die Funktion dieser Enzyme noch völlig unbekannt ist. Zum anderen wurde BapF biochemisch charakterisiert.

- (2.1) Es sollte ein Stamm von *P. aeruginosa* erstellt werden, der eine Deletion im putativen ORF *pa1486* aufweist. Der Phänotyp dieses Stammes sollte in Experimenten detailliert charakterisiert werden. Dafür sollten unter anderem auch Virulenz-assoziierte Phänotypen und gut etablierte Virulenzmodelle untersucht werden. Um sicherzustellen, dass dieser Phänotyp auf die Deletion des Gens *pa1486* zurückzuführen ist, sollte überprüft werden, ob durch die Anwesenheit einer plasmid-kodierten Kopie von *pa1486* eine Komplementation der festgestellten Phänotypen möglich ist.
- (2.2) Für die biochemische Charakterisierung des hypothetischen Proteins PA1486 aus *P. aeruginosa* sollte das Protein heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und anschließend säulenchromatographisch isoliert werden.
- (2.3) Des Weiteren sollte untersucht werden, ob das Gen (*pa1485*), das stromaufwärts von *pa1486* liegt, mit diesem in einem bicistronischen Operon lokalisiert vorliegt.
- (2.4) Für die physiologische Untersuchung des putativen Proteins PA1485 sollte eine weitere Mutante von *P. aeruginosa* erzeugt werden, die eine Deletion im Gen *pa1485* aufweist. Auch hier sollte überprüft werden, ob durch die Anwesenheit einer plasmidkodierten Kopie von *pa1485* eine Komplementation ermittelter Phänotypen möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Antibiotika:	AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und
	Sigma (Deisenhofen).
Chemikalien:	Bachem (Weil am Rhein), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka
	(Sternheim), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe)
	Merck (Darmstadt), MoBiTec (Göttingen), Pharmacia (Freiburg),
	Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen),
	Serva (Heidelberg).
Enzyme:	Restriktionsendonukleasen und T4-DNA-Ligase wurden von den
	Firmen Roche (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und
	New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. DNA-Polymerasen
	wurden von den Firmen Stratagene (Agilent Technologies;
	Waldbronn) (PfuTurbo-DNA-Polymerase), 5 Prime (Hamburg)
	(Master Taq/Perfect Taq DNA Polymerase) oder von Finnzymes
	(Espoo, Finnland) (Phusion [™] High-Fidelity DNA Polymerase)
	bezogen.
Medien-	
komponenten:	Difco (Detroit, USA), Gibco BRL (Eggenstein), MoBiTec (Göttingen), Oxoid (Wesel), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Stamm	Genetische Eigenschaft	Referenz/Quelle
Escherichia coli		
ATCC11105	Mutante von ATCC 9637 (DSM 1116)	DSMZ
(DSM 1900)		
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B ($r_B^-m_B^-$) gal dcm (λ Its857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)	Studier & Moffatt, 1986
DH5a	Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>recA1 endA gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYAargF</i>) U169	Hanahan, 1983
K12	Wildtyp	DSMZ
S17-1	<i>thi pro hsdR⁻ M⁺</i> mit chromosomal integriertem [RP4-2 Tc::Mu:Km ^R ::Tn7, Tra ⁺ Tri ^R Str ^R]	Simon <i>et al.</i> , 1983

Tab. 1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genetische Eigenschaft	Referenz/Quelle
TOP10	$F^{-}mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80lacZ\DeltaM15$ $\Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697$ galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe
Pseudomonas aeruginosa		
PAO1	Wildtyp	Holloway et al., 1979
PAO1∆ <i>pa1485</i> ::Gm ^R (PAFU1)	1368-bp Austausch von Gen <i>pa1485</i> durch Gm^{R} Kassette; <i>pa1485</i> :: Ω Gm ^R	diese Arbeit
PAO1∆ <i>bapF</i> ∷Gm ^R (PAFU2)	1101-bp Austausch von Gen <i>pa1486</i> durch Gm ^R Kassette; <i>bapF</i> (<i>pa1486</i>)::Ω Gm ^R	diese Arbeit
UCBPP-PA14	Wildtyp	Rahme et al., 1995
PA14∆ <i>pa14_45210</i> ::Gm ^R (PA14FU3)	1101-bp Austausch von Gen $pa14_45210$ durch Gm ^R Kassette; $pa14_45210$:: Ω Gm ^R	diese Arbeit
AHL-Sensorbakterien		
Agrobacterium	traG::lacZ traR (pZLR4)	Cha et al., 1998
tumefaciens NTL4	AHL-Sensorstamm	
Chromobacterium	mini Tn5	McClean et al., 1997
violaceum CV026	AHL-Sensorstamm	

Tab. 2 Übersicht über verwendete Plasmide.

Plasmid	Genetische Eigenschaft	Referenz/Quelle
Vektoren für <i>E. coli</i>		
pET22b(+)	Amp ^R ; P _{T7Φ10} , ColE1 <i>pelB lacI</i>	Novagen,
		Madison, USA
pENTR/SD/D-TOPO	Km ^R ; RBS, attL1, attL2	Invitrogen, Karlsruhe
pSUP202	Amp ^R ; Cm ^R , Tc ^R ; pBR325, <i>mob</i>	Simon et al., 1983
pBSL142	Amp ^R , Gm ^R ; ColE1	Alexeyev et al., 1995
Vektoren mit weitem Wir	tsspektrum	
pVLT31	Tet^{R} ; <i>lacI</i> ^Q , P _{tac} , <i>mob</i> , <i>rep</i>	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993
pBBR1MCS-1	Cm ^R ; Plac PT7 mob, lacZa	Kovach et al., 1994
pBBR1MCS-3	Tet^{R} ; $P_{lac} P_{TT}$ mob rep, $lacZ\alpha$	Kovach et al., 1995

Plasmid	Genetische Eigenschaft	Referenz/Quelle
Rekombinante Plasmide		
pET22b HRS R1/R4	Amp ^R ; <i>Homing</i> Endonukleasesequenzen I-SceI/ PI-SceI in XbaI/NotI in MCS von pET22b(+) ligiert	diese Arbeit
pET22b pga	Amp ^R ; 2,5 kb I- <i>Sce</i> I/PI- <i>Sce</i> I Fragment des Penicillinacylase Gens in pET22b(+)	diese Arbeit
pET22b pga/degP	Amp ^R ; 3,7 kb I- <i>SceI</i> /PI- <i>SceI</i> Fragment von <i>pga</i> und <i>degP</i> in pET22b(+)	diese Arbeit
pET22b <i>degP/pga</i>	Amp ^R ; 3,7 kb I- <i>SceI</i> /PI- <i>SceI</i> Fragment von <i>degP</i> und <i>pga</i> in pET22b(+)	diese Arbeit
pEXP-Chaperongen	Tet ^R ; pVLT31 mit Chaperon/-system	Kreuz, 2006
pENTR pga	Km ^R ; pENTR/SD/D-TOPO mit Penicillinacylase- Gen aus <i>E. coli</i> ATCC11105	diese Arbeit
pENTR degP	Km ^R ; pENTR/SD/D-TOPO mit <i>degP</i> -Gen aus <i>E. coli</i> K12	diese Arbeit
pET22b bapF (pEF)	1,1 kb <i>NdeI/Eco</i> RI-Fragment <i>pa1486</i> in pET22b(+)	diese Arbeit
pSUP202∆ <i>pa1485</i>	Tet ^R ; $\Delta pa1485::\Omega \text{Gm}^{R}$ in pSUP202	diese Arbeit
pSUP202∆bapF	Tet ^R ; $\Delta pa1486::\Omega \text{Gm}^{R}$ in pSUP202	diese Arbeit
pBBR1 MCS pa1485	Cm ^R ; 1,4 kb <i>XhoI/Xba</i> I Fragment <i>pa1485</i> in pBBR1 MCS-1	diese Arbeit
pBBR1 MCS-1 bapF	Cm ^R ; 1,1 kb <i>PstI/Xba</i> I Fragment <i>pa1486</i> in pBBR1 MCS-1	diese Arbeit
pBBR1 MCS-3 bapF	Tet ^R ; 1,1 kb <i>PstI/Xba</i> I Fragment <i>pa1486</i> in pBBR1 MCS-3	diese Arbeit

2.3 Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	DNA-Sequenz (in 5'→ 3' Richtung)	Merkmal/
		Modifikation
Konstruktion des Vek	tors pET22b HRS 1/4:	
HRS1/4 1	CTA GA A GTT ACG CTA GGG ATA ACA GGG TAA TAT AGG TTA ACA TCT ATG TCG GGT GCG GAG AAA GAG GTA ATG AAA TGG CA G C	XbaI/NotI "geschnitten"
HRS1/4 2	GGC CGC TGC CAT TTC ATT ACC TCT TTC TCC GCA CCC GAC ATA GAT GTT AAC CTA TAT TAC CCT GTT ATC CCT AGC GTA ACT T	XbaI/NotI "geschnitten"
Konstruktion der pEN	TR Vektoren:	
pENTR_ <i>degP</i> up	CAC CAT GAA AAA AAC CAC ATT AGC A	
pENTR_ <i>degP</i> dwn	TTA CTG CAT TAA CAG GTA GAT GGT GCT	
pENTR_pga up	CAC CAT GAA AAA TAG AAA TCG TAT GAT C	
pENTR_pga dwn	TTA TCT CTG AAC GTG CAA CAC TTC C	
Konstruktion der Vek	toren pET <i>pga</i> und pET <i>pga/degP</i> :	
Fw_ENTR_A	AAT GCT AGT TAC GCT AGG GAT AAC AGG GTA ATA TAG CTC CGC GGC CGC CTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GCC CTT CAC C	I-SceI
Rev_ENTR_A	AAT GCT TTC GCT ACC TTA GGA CCG TTA TAG TTA CG G TAC AAG AAA GCT GGG TCG GCG CGC CCA CC	I-CeuI
Fw_entr_a	AAT GCT AGT TAC GCT AGG GAT AAC	
Rev_entr_a	AAT GCT TTC GCT ACC TTA GGA C	
Fw_ENTR_B	AAT GCT CGT AAC TAT AAC GGT CCT AAG GTA GCG AA C TCC GCG GCC GCC TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG CCC TTC ACC	I-CeuI
Rev_ENTR_B	AAT GCT ATT TGG CTA CCT TAA GAG AGT CAT AGT TA G TAC AAG AAA GCT GGG TCG GCG CGC CCA CC	I-PpoI
Fw_entr_b	AAT GCT CGT AAC TAT AAC GGT CC	
Rev_entr_b	AAT GCT ATT TGG CTA CCT TAA GAG AG	
Fw_ENTR_C	AAT GCT TAA CTA TGA CTC TCT TAA GGT AGC CAA AT C TCC GCG GCC GCC TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG CCC TTC ACC	I-PpoI
Rev_ENTR_C	AAT GCT TGC CAT TTC ATT ACC TCT TTC TCC GCA CCC GAC ATA GAT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GGC GCG CCC ACC	PI-Scel
Fw_entr_c	AAT GCT TAA CTA TGA CTC TCT TAA GGT AG	

Tab. 3 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	DNA-Sequenz (in 5'→ 3' Richtung)	Merkmal/
		Modifikation
Rev_entr_c	AAT GCT TGC CAT TTC ATT ACC TC	
Konstruktion des Exp	ressionsvektors pEF:	
<i>pa1486</i> up	AAA AAG AGT CCA TAT GCG CGC TCG A	NdeI
<i>pa1486</i> dwn	AAA AAA AAT TCT TAA GGC GTC CCG GCC	<i>Eco</i> RI
Konstruktion der Suiz	idvektoren zur Mutantenherstellung:	
UR_ <i>pa1486</i> up	AAA AAA AA G CTA GC C ATG AAG GAC GGC GG	NheI
UR_pa1486 dwn	TTT TTT TT G GAT CC G CGG ACT CCT GTT TCA AAG	BamHI
DR_ <i>pa1486</i> up	AAAAAAAGGATCCAAGCGGCTCAGCGCCAGC	BamHI
DR_ <i>pa1486</i> down	TTT TTT TTT GAC TTT TGT C GA AGA TCA CCT TCG GCA CC	BoxI
UR_ <i>pa1485</i> up	AAA AAA CCA TGG CAT CAG CGC CAG GAC CCA	NcoI
UR_ <i>pa1485</i> dwn	TTT TT G AAT TC G TCG TTG TCC TCT GAT TGT TAT TGA AGT TGA GG	<i>Eco</i> RI
DR_ <i>pa1485</i> up	AAA AA G AAT TC A ACA GGA GTC CGC ATG CGC GCT	<i>Eco</i> RI
DR_ <i>pa1485</i> up	TTT TTC TGC AGC CTC GCT GAA CGG CGA G	PstI
Nachweis der Mutante	en:	
50 vor <i>pa1486</i> up	GGT GAT TCT CTA CTG CAC CTA CGG C	
800 nach <i>pa1486</i> dwn	GGC CAT TTC GGG GTG ATC GGC AA	
Gm up	GCA GTC GCC CTA AAA CAA AG	
Gm dwn	CTT GGG TCG ATA TCA AAG TGC	
N <i>_pa1485</i> up	ATG TTC GCC TGG TGC TAT GCC GA	
N_ <i>pa1485</i> dwn	CAG GTA GAC CAT GAC GAT CAG CAA C	
Konstruktion der Kon	nplementationsplasmide:	
Ko_ <i>pa1485</i> up	AAA AAA CTC GAG CGA GTC TCC GTT ACT GCC TCA A	XhoI
Ko_ <i>pa1485</i> dwn	AAA GG T CTA GA T CAA AGC TTC TGG AAC GCC GGA	XbaI
<i>pa1486</i> pBBR1_1 up	TAT CGA TAA GCT TGA TAT CGA ATT C CT GCA G AA T	PstI
<i>pa1486</i> pBBR1_1 dwn	CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GGA G	
MCS_ <i>pa1486</i> up	CCC CCC TCC CC C TGC AG A ATA ATT TTG TTT AAC TTT A	PstI
MCS_ <i>pa1486</i> dwn	CCG GAT C TC TAG A TC AGT GGT GGT GGT G	XbaI
Primer für <i>real-time</i> P	CR:	
<i>pga</i> up	TGA TGT CGC GAT GAT ATT TG	
<i>pga</i> dwn	CTG ATT AAA TAC CGC CAT GC	
degP up	AAA TCC AGA ACC CGA AAA AC	

Bezeichnung	DNA-Sequenz (in 5'→ 3' Richtung)	Merkmal/
		Modifikation
degP dwn	AGA CAA TCC CGG AAG TTA CC	
csaA up	AAC TGA CCG CAC ACT ACC AG	
csaA dwn	ACC TTG TCC TCG CTA TCG TA	
hscB up	TAC CTG TTG ACC CTG AGT GG	
hscB dwn	GTC CTG CAA CTC CTC CAG T	
<i>pa2725</i> up	GAG ATC GAG CGC TAC TTC AA	
<i>pa2725</i> dwn	GTT GAC CAT CTG GGT GAA GA	
PAO1 rpoD up	CAG CTC GAC AAG GCC AAG AA	
PAO1 <i>rpoD</i> dwn	CCA GCT TGA TCG GCA TGA AC	
RT <i>pa1485</i> up	GAT ACC TGC TGC TCA ACC TG	
RT pa1485 dwn	TTG CCG TAG GTG CAG TAG A	
RT <i>pa1486</i> up	CAT CAC CAA TAC CCA CAG C	
RT pa1486 dwn	GTC GAA GGT CTC CAT CAC C	
RT 85_86 Operon	TGA TGA TCA TTG TCG GAC TG	
up		
RT 85_86 Operon dwn	GTG ATG CCA AGT TGT CGA G	

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) in HPLC-gereinigter und lyophilisierter bzw. in HYPUR-gereinigter (*Hydro Gel Purity Electrophoresis*) Form bezogen. Sie wurden in dem vom Hersteller angegebenen Volumen *A. dest.* aufgenommen, so dass sie in einer Konzentration von 100 bzw. 500 pmol/µl vorlagen.

2.4 Kulturbedingungen von Bakterien

Alle hitzestabilen Nähr- und Testmedien wurden für 20 min bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 2 bar autoklaviert. Die hitzelabilen Komponenten, wie Antibiotika oder AS bzw. Peptide, wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert (Millipore-Membranfilter: $\leq 0,22 \ \mu m$ Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium bei einer Temperatur ≤ 60 °C zugesetzt. Glukoselösungen wurden ebenfalls sterilfiltriert oder separat autoklaviert und dem Medium nachträglich zugesetzt.

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Medienkomponenten 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Um auf plasmidkodierte Resistenzen zu selektionieren, wurden die Medien mit den entsprechenden Antibiotika in den in Tab. 4 angegebenen Endkonzentrationen versetzt.

Antibiotikum	Stammlösung	Escherichia coli	Pseudomonas aeruginosa PAO1	Pseudomonas aeruginosa PA14
		[µg/ml]	[µg/ml]	[µg/ml]
Ampicillin	100 mg/ml in Millipore H ₂ O	100	-	-
Chloramphenicol	50 mg/ml in	50	500	-
	70 % (v/v) EtOH			
Gentamycin	30 mg/ml in Millipore H ₂ O	10	30	50
Irgasan	25 mg/ml in	-	25	25
	70 % (v/v) EtOH			
Kanamycin	50 mg/ml in Millipore H ₂ O	50	-	-
Tetrazyklin	50 mg/ml in	10	100	100
	70 % (v/v) EtOH			

Tab. 4 Stammlösungen und Endkonzentrationen der verwendeten Antibiotika in verschiedenen Bakterienstämmen.

- : Antibiotikum war nicht verwendbar.

2.4.1 Nährmedien

LB ('lysogeny broth') Medium, abgewandelt nach Miller (Bertani, 1951; Miller, 1992):

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

Zur Herstellung von LB-Agar wurde dem Medium 15 g/l Agar hinzugefügt.

PPGAS-Medium (Wild et al., 1997):

5 g/l Glukose; 10 g/l Pepton; 1,08 g/l NH₄Cl; 1,48 g/l KCl; 14,6 g/l Tris; 0,36 g/l; MgSO₄ • 7 H₂O; pH 7,2

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 (20x): 20 g/l NH₄Cl; 6 g/l MgSO₄; 3 g/l KCl; 0,2 g/l CaCl₂; 0,05 g/l FeSO₄ AB Puffer (20x): 60 g/l K₂HPO₄; 23 g/l NaH₂PO₄

NB-Medium

8 g/l Nutrient Broth (Difco[™] Nutrient Broth, Becton Dickinson); 4 g/l NaCl

M9-Medium (Sambrook et al., 1989)

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

Lösung 1:40 g/l Glukose oder andere KohlenstoffquellenLösung 2:25 g/l MgSO4 • 7 H2OLösung 3:2 g/l CaCl2 • 2 H2OLösung 4:70 g/l Na2HPO4 • 2 H2O; 30 g/l KH2PO4; 5 g/l NaCl; 10 g/l NH4Cl

Modifiziertes M9-Medium (Tremblay & Deziel, 2008)

20 mM NH₄Cl (1,07 g/l); 12 mM Na₂HPO₄ (2,14 g/l); 22 mM KH₂PO₄ (2,99 g/l); 8,6 mM NaCl (0,5 g/l); 1 mM MgSO₄ \cdot 7 H₂O (0,25 g/l); 1 mM CaCl₂ \cdot 2 H₂O (0,15 g/l); 11 mM Glukose (1,98 g/l); 0,5 % (w/v) Caseinhydrolysat (5 g/l)

SW-Medium (Pinzon & Ju, 2009b)

20 g/l Glukose; 0,7 g/l KH₂PO₄; 0,9 g/l Na₂HPO₄; 2 g/l NaNO₃; 0,4 g/l MgSO₄ · 7 H₂O; 0,1 g/l CaCl₂ · 2 H₂O

Spurenelementlösung: 2 ml *ad* 1 l SW-Medium 2 g/l FeSO₄ • 7 H₂O; 1,5 g/l MnSO₄ • H₂O; 0,6 g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄ • 4 H₂O

Zur Herstellung von SW-Agar wurde dem Medium 12 g/l Agar, 0,2 g/l CTAB und 0,005 g/l Methylenblau zugefügt.

E. coli Autoinduktionsmedium / TB-Medium (abgewandelt nach Tartoff & Hobbs, 1987)

TB-Medium: 12 g/l Caseinhydrolysat; 24 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Glycerol; in 100 mM KPi-Puffer lösen

KPi-Puffer (100 mM): 10,66 g/l K₂HPO₄; 5,28 g/l KH₂PO₄; pH 7

Autoinduktionsmedium: Nach dem Autoklavieren wurde dem TB-Medium 10 Vol % Laktose (20 g/l) und 1 Vol % Glukose (50 g/l) zugegeben.

Magermilch (Skim Milk)-Agar

Lösung 1: 10 g Trypton; 10 g NaCl; 5 g Hefeextrakt; 15 g Agar *ad* 500 ml *A. dest.* Lösung 2: 30 g Magermilchpulver (*Skim Milk*) *ad* 500 ml *A. dest.*

Beide Lösungen wurden getrennt voneinander autoklaviert. Lösung 2 wurde, abweichend von den übrigen Medien, 30 min bei 100°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden beide Lösungen unter leichtem Rühren zu gleichen Teilen zusammen gegeben. Proteaseaktivität zeigt sich durch die Bildung klarer Höfe um die aufgebrachte Probe.

2.4.2 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C in LB-Medium. Stämme mit plasmidkodierten Antibiotikaresistenzen wurden unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (2.2, Tab. 4).

Die Kultivierung der AHL-Sensorstämme *Agrobacterium tumefaciens* (ABG-Medium, 2.4.1) und *Chromobacterium violaceum* (LB-Medium, 2.4.1) erfolgte bei 30°C.

Flüssigkulturen mit einem Volumen von 5 ml wurden in Reagenzgläsern auf einem Reagenzglas-Rotator (Neolab, Heidelberg), größere Volumina in Erlenmeyer-Kolben auf einem Inkubationsschüttler (Unitron, Infors HT, Bottmingen, CH) bei 120 bzw. 150 UpM kultiviert, wobei das Verhältnis zwischen Kulturvolumen und Volumen des verwendeten Erlenmeyer-Kolbens 1:10 bzw. 1:5 entsprach.

Flüssigkulturen in *Deep-Well*-Platten wurden als Vorkulturen in 1,2 ml LB-Medium und als Hauptkulturen in 1,2 ml TB-Medium (2.4.1) bei 800 Upm und 30°C bzw. 37°C bebrütet.

Als Übernachtkulturen (ÜK) wurden solche Kulturen bezeichnet, die mindestens 16 h bebrütet wurden. Hauptkulturen wurden, wenn nicht anders beschrieben, aus einer ÜK auf eine $O.D_{.580}=0,05$ beimpft. Die Zelldichte von Kulturen wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 580 nm gegen das entsprechende Medium als Referenz ermittelt. Eine $O.D_{.580}=1/ml$ entspricht dabei einer Zahl von ca. 2·10⁹ Zellen pro ml Kultur.

Zur Lagerung von Bakterien wurden diese auf Festmedien ausgestrichen und nach erfolgter Bebrütung bei 4°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden 1,8 ml ÜK mit 7,5 % (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

2.5.1 Chemisch kompetente Escherichia coli Zellen

Als Vorbereitung wurde LB-Medium (2.4.1) mit 0,04 Volumen Mg^{2+} -Mix versetzt und mit der entsprechenden Menge einer *E. coli* ÜK auf eine Zelldichte entsprechend einer O.D.₅₈₀= 0,05 beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zum Erreichen der logarithmischen Wuchsphase (O.D.₅₈₀= 0,5 - 0,8) auf einem Schüttler (120 UpM) bebrütet. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 4000 UpM, 4°C) geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Sediment in 0,5-fachem Volumen eiskaltem TMF-Puffer resuspendiert und 0,5 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (15 min, 4000 UpM, 4°C) wurde das Pellet in 1/10 Volumen eiskaltem TMF-Puffer aufgenommen und in Aliquots von 200 µl auf EPGs verteilt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Ansätze auf Eis oder nach Zugabe von Glycerol in einer Endkonzentration von 15 % (v/v) bei -80°C gelagert.

Mg^{2+} -Mix:	500 mM MgCl ₂ , 500 mM MgSO ₄
TMF-Puffer:	100 mM CaCl ₂ , 50 mM RbCl ₂ , 40 mM MnCl ₂

2.5.2 Elektrokompetente Pseudomonas aeruginosa Zellen

Saccharoselösung: 300 mM Saccharose

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen von *Pseudomonas* wurde aus einer Übertagkultur eine 100 ml Kultur in LB-Medium (2.4.1) entsprechend einer O.D.₅₈₀= 0,01 inokuliert. Am nächsten Tag wurden jeweils 20 ml der ÜK in sterile 50 ml Gefäße überführt und für 10 min auf Eis gestellt, damit das Zellwachstum gestoppt wurde. Anschließend wurden die Gefäße mit *A. dest.* auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 5000 UpM, 4°C). Danach wurden die Zellpellets in je 50 ml Saccharoselösung gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 5000 UpM, 4°C). Nach der Zentrifugation wurden die Zellpellets jeweils in 20 ml Saccharoselösung gewaschen und in 2 Gefäße zu je 50 ml vereinigt. Es wurde erneut zentrifugiert (10 min, 5000 UpM, 4°C). Die Pellets wurden mit 25 ml Saccharoselösung gewaschen und in einem Gefäß vereinigt. Danach erfolgte eine letzte Zentrifugation (10 min, 5000 UpM, 4°C). Die Pellets wurden in 3 ml Saccharoselösung und 1 ml 80 % Glycerol (w/v) resuspendiert und in EPGs zu je 174 µl aliquotiert. Die Zellen wurden entweder direkt zur Elektroporation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.6 DNA-Techniken

2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Chromosomale DNA aus Zellen von *E. coli* oder *P. aeruginosa* wurde entweder mit Hilfe des "DNeasy Tissue Kits" der Firma Qiagen oder durch das "AquaPure Genomic DNA Isolation Kit" der Firma BioRad (München) isoliert. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. aeruginosa* erfolgte durch die Verwendung der Minipräp-Kits der Firmen Fermentas (St. Leon-Rot), Analytik Jena (Jena) und des Midipräp-Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

2.6.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA, sowie der gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989) in 0.8 - 2 %igen (w/v) Agarosegelen.

Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5×TBE (45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1,25 mM Na₂-EDTA; pH 8,3) verwendet. Als Größenstandards für die DNA-Gele wurden je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente entweder der "GeneRulerTM 50 bp DNA Ladder^{«14} oder der "GeneRulerTM 1kb DNA Ladder^{«15} der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Geldokumentation wurde auf dem "Gel Print 2000i"-Videodokumentationssytem der Firma

 ¹⁴ Der DNA-Längenstandard GeneRuler[™] 50 bp DNA Ladder enthält Fragmente folgender Größen: 50 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 250 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp

¹⁵ Der DNA-Längenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder enthält Fragmente folgender Größen: 205 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 3500 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 8000 bp, 10000 bp

MWG-Biotech (Ebersberg), sowie mittels des "Eagle Eye II"-Videodokumentationssytems der Firma Stratagene (Heidelberg) durchgeführt.

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des "Perfectprep[®] Gel cleanup"-Kits der Firma Eppendorf (Hamburg) oder durch das "QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.6.3 **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR zur Amplifikation 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 Phusion-Polymerase (bzw. an die jeweilige verwendete Polymerase laut Herstellerangaben angepasst) im jeweiligen Reaktionspuffer des Herstellers. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten "Mastercycler Gradient" der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung verschiedener Kits (2.6.2). Unerwünschte PCR-bedingte Mutationen wurden durch die Sequenzierung (Firma Sequiserve, Vaterstetten) der PCR-Produkte ausgeschlossen.

2.6.4 Herstellung der pENTR/SD/D-TOPO Vektoren

Die Konstruktion der Vektoren pENTR *pga* und pENTR *degP* (Tab. 2) erfolgte mit dem "pENTR/SD/D TOPO Cloning Kit" der Firma Invitrogen (Darmstadt) nach Herstellerangaben.

Die Methode des Einschritt-Klonierungs-Systems basiert auf dem Einsatz des Enzyms Topoisomerase I aus dem Virus *Vaccinia*, das einen der beiden Stränge der doppelsträngigen DNA an spezifischen Stellen öffnen kann (Shuman, 1991). Dabei wird die durch das geöffnete Phosphodiesterrückgrat frei werdende Energie durch eine kovalente Bindung an den Rest Tyr-274 der Topoisomerase I konserviert. Durch Hinzufügen eines 5'-Hydroxy-DNA-Endes kann die Bindung zum Enzym wieder aufgehoben und auf das DNA-Fragment übertragen werden (Shuman, 1994).

Nach Durchführung der Klonierungsreaktion und erfolgreicher Transformation von *E. coli* TOP10-Zellen, wurden die Klone auf den Erhalt des gewünschten Plasmids hin überprüft. Dazu wurde die Plasmid-DNA isoliert (2.6.1) und mit geeigneten Restriktionsendonukleasen überprüft. Konnte ein gewünschtes Plasmid auf diese Weise nachgewiesen werden, wurde der rekombinante Vektor anschließend mit den Primern M13 fw und M13 rev sequenziert (Sequiserve, Vaterstetten). Dadurch wurde die korrekte Sequenz des gewünschten Gens verifiziert. Erst dann wurde mit den entsprechenden rekombinanten Plasmiden weiter gearbeitet.

2.6.5 *Overlap-Extension* PCR (OE-PCR)

Die durch Standard-PCR Reaktionen amplifizierten Produkte der Gene *degP* und *pga* (2.6.3) wurden anschließend mittels OE-PCR verbunden (Ho *et al.*, 1989). Dabei hybridisieren die Gene über die Erkennungssequenzen der *Homing* Endonukleasesequenzen miteinander und werden anschließend mit Hilfe flankierender Primer (Fw_entr_c und Rev_entr_c, Tab. 3) durch die Phusion Polymerase amplifiziert. Der Ablauf der OE-PCR ist in Tab. 5 aufgeführt.

Die Produkte der erfolgreichen OE-PCR wurden anschließend mit I-*Sce*I und PI-*Sce*I restringiert und über diese Schnittstellen in den Expressionsvektor pET22b HRS R1/R4 kloniert.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenanzahl
Primäre Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	
Anlagerung	55,4	30	15
Verlängerung	72	20 s/kb für die Größe des längsten Gens	15
Zugabe der flankierenden Primer	4		
Denaturierung	98	10	
Anlagerung	57	30	20
Verlängerung	72	20 s/kb für die Größe des Gesamtfragments	30
Finale Verlängerung	72	10 min	1
Kühlung	4	∞	

Tab. 5 Übersicht über das in der Overlap-Extension PCR verwendete Cycler-Programm.

2.6.6 In vitro-Rekombination von DNA

Die Restriktion von DNA, Modifikationen von DNA-Enden und Ligationen von DNA-Fragmenten wurden nach Sambrook *et al.* (1989), sowie nach den Angaben des Herstellers der jeweiligen Enzyme in den mitgelieferten Puffern durchgeführt.

2.6.7 Übertragung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

2.6.7.1 Transformation von E. coli Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA wurde nach Hanahan (1983) durchgeführt.

2.6.7.2 Elektroporation von P. aeruginosa Zellen mit Plasmid-DNA

Bevor elektrokompetente Zellen, die bei -80°C gelagert worden sind, elektroporiert werden konnten, mussten diese vorbehandelt werden. Ein Aliquot der Zellen wurde dazu auf Eis aufgetaut und anschließend pelletiert (2 min, 13000 UpM, RT). 150 µl vom Überstand wurden abgenommen und das Pellet in 1 ml 300 mM Saccharoselösung resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation von 2 min bei 13000 UpM und RT. Zuletzt wurde 1 ml Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 µl Saccharoselösung resuspendiert. Zur Elektroporation

wurden 20 - 30 ng Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben, kurz gemischt und der komplette Ansatz in eine Küvette pipettiert. Die Zellen wurden mit 2,5 kV elektroporiert. Dann wurde 1 ml LB-Medium in die Küvette gegeben und das Medium samt Zellen in ein EPG überführt. Die "phänische Expression" fand, je nach verwendetem Antibiotikum, zwischen 2,5 und 3 h statt. Anschließend wurden unterschiedliche Verdünnungen auf LB-Selektivagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.6.8 Übertragung von Plasmid-DNA mittels Konjugation

Mobilisierbare Plasmide wurden in Zellen von *P. aeruginosa* durch di-parentale Konjugation eingebracht. Dabei wurden 2 ml einer Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase (O.D.₅₈₀= 0,6 - 0,8) oder einer ÜN-Kultur des Plasmid-haltigen Donorstamms *E. coli* S17-1 mit 1 ml Zellen des jeweiligen Rezipientenstammes gemischt. Der Rezipientenstamm wurde zuvor mindestens 1 h bis zu 16 h bei 43°C inkubiert. Die beiden Stämme wurden nach dem Mischen durch Zentrifugation (3 min, 5000 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 1 ml LB-Medium resuspendiert und in Verdünnungen bis 10^{-2} auf Selektivagar ausplattiert wurden. Zur Kontraselektion von *E. coli* wurden 25 µg/ml Irgasan (Ciba Geigy, Basel, Schweiz) eingesetzt.

2.7 Protein-Techniken

2.7.1 Zellaufschluss durch Sonotrode

Die Zellproben wurden auf eine $O.D_{.580}$ = 15 in dem entsprechenden Puffer (z. B. Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,5) eingestellt und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 2 min, Leistungszyklus 50 %, 20 Watt). Die so erhaltenen Gesamtzellextrakte (GZE) konnten in Enzymtests eingesetzt werden.

2.7.2 Zellaufschluss durch Lysozym

Um die Expression plasmidkodierter Proteine in Zellextrakten von *E. coli* nachzuweisen, wurden Ganzzell-Lysate hergestellt. Dazu wurden die Hauptkulturen in *Deep-Well*-Platten zentrifugiert (3000 UpM, 30 min, 4°C; Hettich Zentrifuge Rotanta 460R) und der Überstand anschließend abgenommen. Das Zellpellet wurde in 600 μ l Lysozymlösung (2 mg/ml, gelöst in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5) resuspendiert und 1 h bei 4°C inkubiert. Die so erhaltenen Zellextrakte konnten in Enzymtests eingesetzt werden.

2.7.3 Zellaufschluss durch eine *French-Press-*Zelle

Zellsuspensionen bis 20 ml wurden in einem 50 mM Na-Phosphat Puffer, pH 6 (Gomori, 1955) gelöst und durch viermalige Scherung mit einer *French-Press* der Firma Thermo Electron in einer 40K-Zelle bei 500 psi (551,6 bar) lysiert. Zur Gewinnung der löslichen Fraktion wurde der

entstandene Ganzzellextrakt 30 min bei 7000 UpM (4°C) zentrifugiert. Die sedimentierten Zellfragmente und unlöslichen Bestandteile wurden verworfen.

2.7.4 Expression von *bapF* und Reinigung der β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa*

Die Expression des *bapF* Gens aus *P. aeruginosa* erfolgte im heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) mit Hilfe des Vektors pET22b *bapF* (pEF; Tab. 2, Abb. 53) unter Kontrolle des T7-Promotors.

Nach Induktion der Expression in der logarithmischen Phase (O.D.₅₈₀= 0,4 – 0,7) mit 0,4 mM IPTG wurde die Kultur weitere 4 h bei 30°C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation geerntet (Sorvall "SLC-4000", Kendro Laboratory Products, Langenselbold, 7000 UpM, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde in 20 ml Natriumphosphat-Puffer (50 mM, pH 6) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels *French Press* (500 psi, *High Range*; Thermo Scientific; 2.7.3) lysiert und die unlöslichen Komponenten durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B, SS34, 13000 UpM, 30 min, 4°C) abgetrennt.

Alle Aufreinigungsschritte erfolgten bei 4°C an dem System ÄKTAexplorerTM (GE Healthcare Life Science, München). Als erster Schritt erfolgte die Aufreinigung unter Verwendung einer Anionenaustauschchromatographiesäule (Q-Sepharose FF; GE Healthcare Life Science), im zweiten Schritt über eine Hydrophobe Interaktionschromatographiesäule (Butyl Sepharose 4 FF; GE Healthcare Life Science) und im dritten Schritt durch eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200 *p.g.*; GE Healthcare Life Science). Die Elution der Proteine wurde über die Detektion der Absorption bei $\lambda = 280$ nm verfolgt.

Der lösliche Anteil des Gesamtzellextrakts (nach *French Press* Aufschluss) wurde auf eine XK26 Säule (GE Healthcare), die mit Q-Sepharose FF (42 ml) gepackt war und mit Puffer 1 äquilibriert worden war, mit 4 ml/min aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Puffer 1 von der Säule entfernt. Die Elution von BapF erfolgte durch Verwendung eines linearen Gradienten von 0 bis 100 % 0,5 M NaCl in 50 mM Natriumphosphat-Puffer (Puffer 2) innerhalb 180 min. Die Fraktionen, die aktives Enzym enthielten, wurden vereinigt und mit Puffer 3 konzentriert und umgepuffert (2.7.5). Die konzentrierte Enzymlösung wurde auf eine XK26 Säule (GE Healthcare), die mit Butyl Sepharose 4 FF (48,8 ml) gepackt war und mit Puffer 3 äquilibriert worden war, mit 2 ml/min aufgetragen. Die Elution von BapF erfolgte durch Verwendung eines linearen Gradienten mit Puffer 1. Fraktionen mit aktivem Enzym wurden wieder vereinigt und mit Puffer 4 konzentriert. Die Probe wurde auf eine mit mindestens 5 Säulenvolumen (Puffer 4) äquilibrierte XK 16/60 Superdex 200 *p.g.*-Säule (GE Healthcare), mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Das Protein BapF wurde ebenfalls mit Puffer 4 eluiert.

Die Reinheit des eluierten Proteins wurde durch SDS-PAGE (2.7.7) und dessen Aktivität mittels Enzymaktivitätstests (2.8.2) analysiert.

Puffer 1:	50 mM Natriumphosphat; pH 6
Puffer 2:	50 mM Natriumphosphat; 0,5 M NaCl; pH 6
Puffer 3:	50 mM Natriumphosphat; 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; pH 6
Puffer 4:	50 mM Natriumphosphat; 0,15 M NaCl; pH 6

Der Natriumphosphatpuffer wurde nach Gomori (1955) angesetzt.

2.7.5 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinlösungen

Proteinlösungen ≤ 15 ml wurden unter Verwendung der Zentrifugationskonzentratoren Vivaspin 20 (Vivascience, Hannover) mit jeweils für das Protein geeigneten Ausschlussgrößen in Ausschwingrotoren einer Kühlzentrifuge bei 3000 UpM konzentriert. Zur Umpufferung wurden die Proteinlösungen nach dem Konzentrieren dreimal mit dem Zielpuffer auf das ursprüngliche Volumen der Probe aufgefüllt und erneut konzentriert.

Proteinlösungen ≥ 20 ml wurden mit dem Zielpuffer auf ein Volumen von 250 ml aufgefüllt und unter Verwendung der Vivacell 250 (VWR, Darmstadt) mit den jeweils für das Protein geeigneten Membraneinsätzen (Ausschlussgröße: 10 kDa, 30 kDa oder 50 kDa) bei 4°C konzentriert.

2.7.6 Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung der molekularen Masse von BapF wurde das System ÄKTAexplorerTM (GE Healthcare Life Science, München) und die Original XK 16/60 Superdex 200 *p.g.*-Säule (*prep grade*; 34 µm Partikelgröße; 16 mm Durchmesser; 60 cm Länge; Bettvolumen 120 ml; GE Healthcare) verwendet. Die Säule wurde mit Puffer 4 (2.7.4) äquilibriert (Flussrate 1 ml/min). Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die in Tab. 6 aufgeführten Proteine dienten als Referenzproteine zur Kalibrierung der verwendeten Säule. Die molekulare Masse von BapF wurde durch Vergleich der Elutionsvolumina der Referenzproteine mit dem von BapF anhand folgender Formel bestimmt:

$(V_{e} - V_{0})$	V _e : Elutionsfraktion
K =	V ₀ : Elutionsvolumen von Blue Dextran nach
	Herstellerangaben (45,05 ml)
$(\mathbf{v}_t - \mathbf{v}_0)$	V _t : Säulenvolumen (126 ml)

Standard	Konzentration	Molekulargewicht	
	[mg/ml]	[kDa]	
Ferritin	0,5	440	
Katalase	5	232	
Aldolase	2	158	
Albumin	7	67	
Chymotrypsinogen A	3	25	
Ribonuklease A	10	13,7	

Tab. 6 Verwendete Standardproteine zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule Superdex 200 p.g.

2.7.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem nach Laemmli (1970), bestehend aus einem 5%igen Sammel- und einem 15%igen Trenngel. Die Protein-Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 95°C denaturiert. 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. Als Größenstandard wurde der "Precision Plus Protein Dual Color Standard"¹⁶ von BioRad (München) verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden in der SDS-PAGE mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg) gefärbt und anschließend über Nacht in einer Entfärbelösung entfärbt (Merril, 1990).

Elektrophorese-	
Laufpuffer:	0,1 % (w/v) SDS; 25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin (pH 8,8)
SDS-Probenpuffer:	0,03 % (w/v) Bromphenol-Blau R-250; 2 % (v/v) β -Mercapto-
	ethanol; 4 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerol; 50 mM Tris/HCl;
	pH 6,8
Färbelösung:	0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blue; 16 % (v/v) Essigsäure;
	42 % Ethanol (reinst); 42 % A. dest.
Entfärbelösung:	7 % (v/v) Essigsäure ; 20 % (v/v) Ethanol; 73 % <i>A. dest.</i>

2.7.8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (1976) im Spektralphotometer "Novaspec" (Pharmacia) bestimmt. Als Referenz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.8 Enzymaktivitätstests

2.8.1 Proteaseaktivität: Skim Milk-Indikatorplatten

Der Nachweis von Proteaseaktivität erfolgte auf *Skim Milk*-Agar (2.4.1). Dazu wurden ÜK von *E. coli* und *P. aeruginosa* durch Zentrifugation (2 min, 13000 UpM, RT) sedimentiert. Für die Betrachtung der Proteaseaktivität wurde das Sediment in LB-Medium aufgenommen, sodass die Zelldichte einer O.D.₅₈₀= 3 entsprach. Davon wurden 5 μ l auf die Platten getropft. Für die Analyse der Kulturüberstände wurden 15 μ l des Überstands auf die *Skim Milk*-Indikatorplatten aufgetragen. Ebenso wurden GZE (2.7.1) auf *Skim Milk*-Indikatorplatten aufgebracht. Die Platten wurden 16 h bei 30°C inkubiert. Das dem Agar zugesetzte Magermilchpulver (*Skim Milk*) enthält Casein, das von Proteasen als Substrat erkannt und abgebaut wird. Die Proteaseaktivität konnte als klarer Hof um die aufgetragenen Proben erkannt werden.

¹⁶ Der Protein-Größenstandard Precision Plus Protein Dual Color Standard enthält Fragmente folgender Größen: 10 kb, 15 kb, 20 kb, 25 kb, 37 kb, 50 kb, 75 kb, 100 kb, 150 kb, 250 kb

2.8.2 Bestimmung der Aminopeptidase-Aktivität

Die Messung der Enzymaktivität der Aminopeptidaseproben erfolgte mittels eines Mikrotiterplattenphotometers. Die Bildung von *p*-Nitroanilin (gelb) durch die Hydrolyse von H- β hGly-*p*Na wurde bei einer Wellenlänge $\lambda = 405$ nm und 37°C über einen Zeitraum von 30 min in Mikrotiterplatten gemessen.

Mikrotiterplattentest: 170 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8; 20 µl 50 mM H- β hGly-pNa in 100 % DMSO (final 5 mM); 10 µl GZE bzw. gereinigtes Enzym. Der Extinktionskoeffizient von p-Nitroanilin beträgt $\epsilon = 11,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Eine Einheit (1 Unit) der Enzymaktivität ist definiert als diejenige Menge Enzym, die die Bildung von 1 μ mol *p*-Nitroanilin pro Minute unter den gegebenen Testbedingungen umsetzt: 1 U = 1 μ mol/min.

Die Berechnung der volumetrischen Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

Volumetrische Aktivität [U/ml] =
$$\frac{\Delta A/\min \cdot V_{Gesamt} (ml)}{\epsilon (mM^{-1}cm^{-1}) \cdot d (cm) \cdot V_{Probe} (ml)}$$

V_{Gesamt}: Gesamtvolumen; d: Schichtdicke; V_{Probe}: Volumen der Probe

Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurden die Proteinkonzentrationen der Gesamtzellextrakte, wie unter 2.7.8 beschrieben, bestimmt.

Die spezifische Aktivität (U/mg) berechnet sich nach folgender Formel:

[U/ml]

Spezifische Aktivität [U/mg] =

Proteinkonzentration [mg/ml]

2.8.3 Bestimmung der Aktivität von Penicillinacylasen

Die Bestimmung der Aktivität der Penicillinacylaseproben erfolgte nach Kutzbach & Rauenbusch (1974), sowie abgewandelt nach Yang *et al.* (2006).

Pro Reaktion wurden 120 µl Na-Phosphatpuffer mit 66,6 µl Substratlösung (6 mM NIPAB gelöst in 50 mM Na-Phosphatpuffer) und 13,3 µl GZE-Extrakt (2.7.2) vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zunahme der optischen Dichte wurde bei einer Wellenlänge $\lambda = 405$ nm photometrisch bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von NIPAB beträgt $\varepsilon = 8,98$ mM⁻¹ cm⁻¹. Die Berechnung der volumetrischen und spezifischen Aktivität der Penicillinacylase erfolgte nach den unter 2.8.2 angegebenen Formeln.

2.8.4 Bestimmung der pH- und Temperatur-Stabilität der β-Aminopeptidase BapF

Die Tests zur Bestimmung der pH- und Temperatur-Stabilität der β -Aminopeptidase BapF wurden entweder mit der löslichen Fraktion von Überexpressionskulturen durchgeführt, die das Expressionsplasmid pEF (Tab. 2) enthielten, oder mit gereinigtem Enzym (2.7.4). Die pH-Stabilität wurde unter Standardtestbedingungen (2.8.2) mit einem Universalpuffer untersucht, der einen pH-Bereich von 4 bis 12 abdeckte (Teorell & Stenhagen, 1938).

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurden die Proben unter Standardtestbedingungen bei den entsprechenden Temperaturen eine Stunde vorinkubiert und anschließend die Aktivität durch Hydrolyse des Standardsubstrats (2.8.2) gemessen.

2.8.5 Einfluss verschiedener Inhibitorsubstanzen auf die β-Aminopeptidase-Aktivität

Der Aktivitätstest für den Nachweis der Aminopeptidase wurde, wie unter 2.8.2 beschrieben, durchgeführt. Die Inhibitorsubstanzen wurden in variablen Konzentrationen (s.u.) dem Reaktionsansatz zugefügt und es folgte eine Vorinkubation der Proben für 10 min bei 37°C. Die in den Reaktionen eingesetzten Endkonzentrationen der Inhibitorsubstanzen betragen:

EDTA (Roth):	0,1; 1; 10 mM
Bestatin (Roth):	0,01; 0,1; 1 mM
PMSF (AppliChem):	1; 10 mM
Pefabloc SC (Roche):	0,4; 4 mM

2.8.6 HPLC (*High performance liquid chromatography*)-Messungen

Die HPLC-Methodik dient der Trennung und der Analyse von Substanzen. Die Trennung der Aminosäuren und Aminosäure-Derivate wurde mit dem LC10Ai HPLC System von Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japan) durchgeführt. Dieses System ist mit einem Fluoreszenzdetektor RF-10AXL ausgestattet. Die verwendete Trennsäule (*Reversed Phase*) war eine Nucleodur 100-5 C18ec Säule (125 x 4 mm) (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland). Die verwendete Vorsäule (8 x 4 mm) war mit dem gleichen Material gefüllt. Die Versuche wurden alle bei 25°C durchgeführt.

OPA-Mercaptoethanol-Derivatisierung

Die primären Aminogruppen der Aminosäuren und Dipeptide wurden durch eine automatische Vorsäulenderivatisierung mittels Fluoraldehyd (OPA; *ortho*-Phthaldialdehyd) Reagent Solution (Thermo Scientific/ Pierce Biotechnology, Rockford, USA) in fluoreszierende Isoindolderivate überführt (Roth, 1971; Ogden & Foldi, 1987). Der Nachweis von Carnosin und seiner Einzelkomponenten erfolgte über das in Tab. 7 angegebene Gradientenprogramm, und der

Nachweis von Carcinin und seinen Einzelkomponenten über das in Tab. 8 angegebene Gradientenprogramm für die HPLC-Einstellungen.

Das LabSolution/ LCSolution Softwareprogramm Version 1.22SP1 wurde zur Steuerung und Auswertung verwendet.

Zeit	Laufmittel C: Acetonitril /	Laufmittel D: 40 mM Natriumacetat	Flussrate	Anregungs- / Emissionswellenlänge
	Methanol	pH 6 / Laufmittel C		
[min]	50/50 (v/v)	95/5 (v/v)	[ml/min]	[nm]
0	20	80	0,8	230 / 450
12,5	45	55		
13,0	100	0		
15,0	100	0		
15,50	20	80		
20	Controller STOP			

Tab. 7 Gradientenprogramm für die Trennung des Dipeptids Carnosin und seiner Einzelaminosäuren.

Tab. 8 Gradientenpro	gramm für die	Trennung des	Dipeptids	Carcinin und	seiner Einzelaminosäuren.
----------------------	---------------	--------------	-----------	--------------	---------------------------

Zeit	Laufmittel C: Acetonitril /	Laufmittel D: 40 mM Natriumacetat	Flussrate	Anregungs- / Emissionswellenlänge
[min]	Methanol 50/50 (v/v)	pH 6 / Laufmittel C 95/5 (v/v)	[ml/min]	[nm]
0	30	70	0,8	230 / 450
12,5	70	30		
13,0	100	0		
15,0	100	0		
15,50	30	70		
20	Controller STOP			

2.9 Rhamnolipidnachweis in *P. aeruginosa*

2.9.1 Dünnschichtchromatographie (Syldatk et al., 1985)

Bei der Dünnschichtchromatographie TLC (*Thin Layer Chromatography*) werden die zu analysierenden Lipide in leicht flüchtigem Lösungsmittel aufgenommen und auf Kieselgelplatten aufgetragen. Die chromatographische Auftrennung erfolgt unter laufmittelgesättigten Bedingungen. Infolge der Kapillarkräfte des Laufmittels wird das Lipidgemisch entsprechend der Affinität zur stationären Phase aufgetrennt.

Kieselgelplatte:	Kieselgel 60 F ₂₅₄ (Merck)
Probenpuffer:	Ethanol
Laufmittel:	Chloroform : Methanol : Essigsäure (65:15:2)
Farbreagenz:	0,15 g Orcinol (Sigma); 8,4 ml H_2SO_4 ; 42 ml A. dest.

Bei der TLC von RL wurden Kieselgelplatten verwendet. Das Kieselgel befindet sich als polare, dünne Schicht auf einer Glasplatte, auf der das stärker polare RL-1,2 (Mono-RL) langsamer läuft als das RL-2,2 (Di-RL). Die TLC-Chromatographie wurde mit den RL aus den Kulturüberständen von *P. aeruginosa* Kulturen durchgeführt, die in PPGAS-Medium kultiviert wurden. Eine Probenentnahme erfolgte nach 48 h. Die RL aus den Kulturüberständen wurden direkt mit Diethylether extrahiert. Nach vollständiger Evakuierung der Diethyletherphasen wurden die RL in 10 μ l Ethanol aufgenommen und punktuell mit einer Eppendorf-Pipette auf die Kieselgelplatte (20 x 20 cm) aufgetragen. Die Platte wurde in einen mit dem Laufmittel gesättigten Tank gestellt und wieder entnommen, sobald die Lauffront 2 cm von dem oberen Plattenrand entfernt war. Die bei RT getrocknete TLC-Platte wurde mit dem Farbreagenz besprüht, wiederum bei RT getrocknet und bei 110°C für 15 - 20 min inkubiert. Die RL-Punkte färbten sich braun und wurden sofort visualisiert. Als Standard wurde 0,1 mg HPLC-aufgereinigtes sterilfiltriertes RL in *A. dest.*, das von Ochsner zur Verfügung gestellt wurde (Ochsner & Reiser, 1995; Ochsner *et al.*, 1995), verwendet.

2.9.2 Nachweis von Rhamnolipiden auf Agarplatten mit Methylenblau und CTAB (Pinzon & Ju, 2009 a,b)

Zur Detektion der Bildung von Rhamnolipiden in verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen wurden die Methylenblauagarplatten mittig mit 5 μ l einer ÜN Kultur, deren Zelldichte mit LB-Medium entsprechend einer O.D.₅₈₀= 3 eingestellt wurde, beimpft. Diese wurden 16 h bei 30°C inkubiert. Der Nachweis der Rhamnolipidproduktion zeigt sich durch die Bildung dunkelblauer Höfe um die Kolonien. Diese entstehen durch die Komplexbildung von anionischen (negativ geladenen) Rhamnolipidmolekülen und kationischem (positiv geladenem) Methylenblau und CTAB.

2.10 Untersuchung der AHL-Signalmoleküle aus P. aeruginosa

2.10.1 Extraktion der AHL-Signalmoleküle

Für den Nachweis langkettiger AHL-Moleküle mit *Agrobacterium tumefaciens* wurden 1 ml Aliquots der Kulturüberstände von ÜN-Kulturen (LB-Medium; 37°C; vergleichbare O.D.₅₈₀) zwei Mal mit 1 ml Dichlormethan extrahiert. Nach dem Vakuumtrocknen des organischen Lösungsmittels wurden die Signalmoleküle in 10 µl Ethylacetat aufgenommen.

Für den Nachweis kurzkettiger AHL-Moleküle mit *Chromobacterium violaceum* wurden 5 ml Aliquots der Kulturüberstände von ÜN Kulturen (LB-Medium; 37°C; vergleichbare O.D.₅₈₀) zwei Mal mit 2,5 ml Dichlormethan extrahiert. Nach dem Lyophylisieren des organischen Lösungsmittels wurden die Signalmoleküle in 10 µl Ethylacetat aufgenommen.

2.10.1.2 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der AHL-Signalmoleküle

Für den Nachweis und die Identifikation von AHL-Signalmolekülen nach Shaw *et al.* (1997) wurden 10 μ l der aus Kulturüberständen extrahierten AHLs (2.9.1) auf DC-Platten (RP-18 F_{254s}, 20 × 20 cm, Merck, Darmstadt) aufgebracht und als Laufmittel 60 % Methanol in Wasser

verwendet. Als Standards wurden synthetische AHL-Moleküle verwendet, die nach der von Eberhard *et al.* (1981) beschriebenen Methode von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dyker (Lehrstuhl Organische Chemie, Ruhr-Universität Bochum) hergestellt (C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C12-HSL) oder von der Firma Fluka (Sternheim) (C6-HSL) bezogen wurden. Nach der Auftrennung der Proben wurden die DC-Platten für 1 h bei RT getrocknet.

2.10.2 Detektion der AHL-Signalmoleküle mit Indikatorbakterien

Der Nachweis von AHL-Signalmolekülen erfolgte nach McClean *et al.* (1997) bzw. Cha *et al.* (1998) mit Hilfe der AHL-Biosensor-Bakterien *Chromobacterium violaceum* CV026 bzw. *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (2.2), die durch gentechnische Veränderungen keine AHL-Signalmoleküle produzieren können, jedoch auf deren externe Zugabe als Detektoren reagieren können. Die DC-Platten wurden mit 150 ml Indikatorbakterien in Weichagar überschichtet (für *C. violaceum*: 33 % ÜN-Kultur in LB, 66 % LB-Agar (1,12 % (w/v) Agar), für *A. tumefaciens*: 33 % ÜN-Kultur in ABG-Medium, 66 % Agar (1,12 % (w/v), 100 µg/ml X-Gal). Nach einer Bebrütung für 24 h bei 30°C konnten die entstandenen violetten bzw. hellblauen Spots mit Hilfe der Standard-Moleküle als AHLs identifiziert werden.

2.11 Untersuchung der Beweglichkeiten von P. aeruginosa

2.11.1 Schwärmen

Die Schwärmplatten wurden mit einem veränderten M9-Medium (nach Tremblay & Deziel, 2008; 2.4.1) hergestellt. Die Selectagarkonzentration betrug 0,5 % (w/v). Nach dem Aushärten der Platten wurden diese für 60 min unter dem Luftzug einer Sterilbank getrocknet Die Schwärmplatten wurden mittig mit 5 μ l einer ÜN Kultur, deren Zelldichte entsprechend einer O.D.₅₈₀= 3 eingestellt wurde, beimpft. Diese wurden 16 h bei 30°C, und weitere 24 h bei RT inkubiert.

2.11.2 Schwimmen

Es wurden Weichagarplatten mit M9-Minimalmedium (2.4.1) und 0,3 % (w/v) Selectagar (Invitrogen) hergestellt. Diese wurden, wie unter 2.11.1 beschrieben, mit 5 μ l einer ÜN Kultur, deren Zelldichte entsprechend einer O.D.₅₈₀= 3 eingestellt wurde, beimpft und 24 h bei 30°C und weitere 24 h bei RT inkubiert.

2.11.3 Twitching Motility

Es wurden Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern von LB-Agarplatten (2.4.1) auf weitere, dünne LB-Agarplatten (10 ml Agar/Platte) überimpft. Dabei wird der Zahnstocher bis auf den Grund der Petrischale gestochen, da die so genannte *Twitching motility* an der Plastikoberfläche der Petrischale stattfindet. Die Platten wurden 24 h bei 30°C bebrütet und anschließend 2 bis 3 weitere Tage bei RT inkubiert.

2.12 Konstruktion von Insertionsmutanten in *P. aeruginosa*

Die Herstellung von *P. aeruginosa* Insertionsmutanten wird an dem Beispiel PAO1 $\Delta bapF$::Gm^R genau erklärt. Die Herstellung der weiteren Insertionsmutanten PAFU1 und PA14FU3 von *P. aeruginosa* erfolgte unter Verwendung der spezifischen Primer (Tab. 3) und Mutagenesevektoren (Tab. 2) auf die gleiche Art und Weise.

Zur Erstellung der Insertionsmutante (PAO1 $\Delta bapF$::Gm^R) des Gens *bapF* wurde ein Mutagenesevektor konstruiert, der auf dem mobilisierbaren Suizidvektor pSUP202 beruht (Abb. 54). Das erzeugte rekombinante Plasmid ist mobilisierbar, um nach *P. aeruginosa* übertragen werden zu können; es wird jedoch in *P. aeruginosa* nicht repliziert, so dass eine Integration in das Genom erfolgen muss. Zunächst wurden jeweils etwa 700 bp große flankierende strangaufwärts (UR) und strangabwärts (DR) gelegene Fragmente vom Gen *bapF* (*pa1486*) mittels PCR (Tab. 9) amplifiziert.

Tab. 9 Ablauf der PCR zur Amplifikation der strangaufwärts und strangabwärts gelegenen DNA-Sequenzen von *pa1486 (bapF)*.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenanzahl
Anfangsdenaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	
Anlagerung	68 - 71*	30	30
Verlängerung	72	15	
Finale Verlängerung	72	8 min	1

*: Abhängig von dem verwendeten Primerpaar.

Mit Hilfe der Oligonukleotide UR_*pa1486*up/UR_*pa1486*dwn und DR_*pa1486*up/DR_*pa1486*dwn (Tab. 3) wurden an die 5'-Enden der amplifizierten Fragmente Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen NheI (UR_*pa1486*up), bzw. BamHI (DR_*pa1486*up) inseriert, während an den 3'-Enden Erkennungssequenzen für die Enzyme BamHI (UR_*pa1486*down), bzw. BoxI (DR_*pa1486*down) eingefügt wurden.

Die Insertion der Gm^R-Kassette in den Vektor pSUP202 erfolgte durch Restriktion mit *Bam*HI und anschließender Ligation. Im Anhang ist in Abb. 57 eine schematische Zeichnung der durchgeführten Arbeitsschritte aufgezeigt. Aus diesem Vektor wurde mittels PCR der Bereich UR(*pa1485*)- Ω Gm^R-DR(*pa1487*) amplifiziert und durch *blunt-end* Ligation erneut in den Vektor pSUP202 überführt. Der resultierende Mutagenesevektor wird im Weiteren als pSUP202 Δ bapF ($\Delta pa1486$:: Ω Gm^R in pSUP202) bezeichnet (Abb. 54).

Durch Restriktion von pSUP202 mit *Sca*I wurde das Amp- und Cm-Resistenzgen zerstört und es konnte nur noch auf Tetrazyklin selektiert werden (Abb. 56). Die Selektion mit Tetrazyklin führte letztendlich dann auch zu den gewünschten positiven Klonen. Dies war vorher mit der Selektion auf Chloramphenicol nicht gegeben.

Nach der Transformation (2.6.7.1) des *E. coli*-Stammes S17-1 mit dem Mutagenesevektor, wurde dieser Vektor durch Konjugation (2.6.8) in den Stamm *P. aeruginosa* PAO1 überführt. Die Transkonjuganden wurden zuerst auf Selektivagarplatten bebrütet die nur das Antibiotikum Gentamycin und das zur Gegenselektion verwendete Detergenz Irgasan (25 μ g/ml) enthielten. Von diesen Platten wurden jeweils Einzelkolonien gleichzeitig auf Agarplatten mit Gm bzw. Tet

überführt. Wenn das zweite Rekombinationsereignis, das im Verlust des Vektoranteils aus dem Genom resultiert, stattgefunden hat, können die Klone nur noch auf Gm wachsen. Klone, die nur noch auf Gm wachsen konnten, wurden in weiteren Schritten auf den Verlust des gewünschten Gens hin untersucht.

2.13 Lungeninfektionsmodell der Maus

Zur Untersuchung der Virulenz verschiedener *P. aeruginosa* Stämme wurde ein Lungeninfektionsmodell an 6 Wochen alten männlichen CD1-Mäusen durchgeführt, wie es bei Comolli *et al.* (1999) beschrieben wird.

Die Durchführung der Virulenzstudie erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. L. Rahme (Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital and Shriners Burns Institute, Boston, Massachusetts, USA).

2.14 RNA-Techniken

2.14.1 Standard-Präparation von bakterieller Gesamt-RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde das "RNeasy Mini Kit" der Firma Qiagen nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Handbuch 06/2001) verwendet. Nach erfolgter RNA-Isolierung wurde ein DNase-Verdau mit dem "RQ1 RNase-free DNase Kit" der Firma Promega nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte, DNA-freie RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.14.2 Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration

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

2.14.3 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 nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden für die *real-time* PCR jeweils Ansätze zu 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Die notwendigen Oligonukleotidstarter-moleküle 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 (Tab. 11) ermittelt.

Die Programmeinstellungen waren folgende:

Länge des Produkts:	100 – 150 bp	
Länge des Primers:	18 – 30 bp	(optimal: 25 bp)
GC-Gehalt:	45 - 65 %	(optimal: 60 %)
Schmelztemperatur der Primer:	63 – 67°C	(optimal: 64°C)
Schmelztemperatur des Produkts:	65 – 85°C	(optimal: 75°C)

Real-time PCR Reaktionen wurden in einem "Mastercycler[®] ep gradient S realplex⁴" Automaten der Firma Eppendorf durchgeführt. Das verwendete Standardprogramm ist in Tab.10 aufgeführt.

Tab. 10 Übersicht über das in der RT-PCR verwendete Software-Programm. Das Produkt wird anschließend durch eine Schmelzkurve analysiert.

Programm	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Vorinkubation	cDNA-Synthese	50	30 min	1
Vorinkubation	Primäre Denaturierung	95	15 min	1
Amplifikation	Denaturierung	94	15 s	30
	Anlagerung	53	30 s	
	Verlängerung	72	30 s	
Schmelzkurve	Denaturierung	94	15 s	1
	Zusammenlagerung	53	30 s	
	Aufschmelzen der DNA	Temperaturerhöhung 0,1°C/s	20 min	
Kühlung		4	∞	

2.15 Computerprogramme und Online-Datenbanken

Die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes "CLONE Manager for Windows 9" (Scientific & Educational Software). Homologievergleiche (BLAST-Algorithmen) und Sequenzsuchen wurden mit den BLAST-Algorithmen des NCBI-Servers bzw. mit der *Pseudomonas* Datenbank durchgeführt (Altschul *et al.*, 1997; Winsor *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde die MEROPS Datenbank (www.merops.sanger.ac.uk) für Informationen über Peptidasen verwendet (Rawlings *et al.*, 2010). Für die Modellierung von RNA Sekundärstrukturen wurde die Software mfold verwendet (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003).

Die Dokumentation und Verarbeitung von SDS-PAGEs und Beweglichkeitsplatten erfolgte mit Hilfe der STELLA- sowie der AIDA-Software.

Während der Datenerfassung und der Datenverarbeitung wurden keine inhaltlichen Änderungen der Abbildungen vorgenommen. Genauere Angaben über die verwendeten Softwareprogramme finden sich in Tab. 11.

Name	Bezeichnung und Firma oder URL
AIDA	AIDA Image Analyzer v.4.18, Raytest
BioEdit	BioEdit Version 7.0.0, Sequence Alignment Editor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide blast (Datenbank: Nucleotide collection (nr/nt), Algorithmus: Megablast), protein blast (Datenbank: non-redundent protein sequences (nr), Algorithmus: blastp), NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
ChemBioDraw	ChemBioDraw Ultra 11.0, Cambridge Soft
Clone Manager	Clone Manager 9, Sci-Ed Software, Software for the Molecular Biologist, Scientific & Educational Software
Eppendorf Mastercycler ep realplex	Version realplex 1.0, 2005 Eppendorf AG
ExPASy	Proteomics Server, http://www.expasy.org/
MOPS	MWG Oligo Property Scan, Eurofins MWG Operon; https://ecom.mwgdna.com/services/webgist/mops.tcl
MEROPS	Peptidase Datenbank; http://www.merops.sanger.ac.uk
mfold	RPI Bioinformatics web server; http://mfold.bioinfo.rpi.edu/
MS Office	Microsoft Office, Microsoft Deutschland GmbH
NCBI	National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Primer 3	Primer 3 Input (Version 0.4.0); http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
Pseudomonas Database	Pseudomonas Genome Database V2; http://www.pseudomonas.com
STELLA	STELLA v.1.00, Raytest

Tab. 11 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Softwaretools und Programme.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Expression der industriell genutzten Penicillinacylase (PGA) aus *Escherichia coli* ATCC11105 mithilfe von Chaperonen aus *Pseudomonas aeruginosa*

Die Penicillinacylase aus *E. coli* ATCC11105 wird schon lange in der Industrie für die Herstellung der Vorstufe und für die Produktion semisynthetischer β -Laktam-Antibiotika verwendet. Dieses Enzym wurde in der vorliegenden Arbeit als Modellenzym verwendet, um den putativen positiven Einfluss der vorhandenen *P. aeruginosa* Chaperone auf die Penicillinacylaseproduktion zu überprüfen und gegebenenfalls ein leistungsfähigeres Expressionssystem zur gesteigerten Produktion der Penicillinacylase und ähnlicher Enzyme etablieren zu können.

Der Vorteil der bereits konstruierten Chaperon-Expressionsbank (Kreuz, 2006) liegt darin, dass neben den Standardchaperonen (-systemen) auch ungewöhnliche und noch nie getestete Chaperone von *P. aeruginosa* auf ihre Funktionalität unter den gewählten Versuchsbedingungen getestet werden können.

3.1.1 Herstellung der Expressionsvektoren

3.1.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors pET22b HRS R1/R4

Chaperone arbeiten meistens sukzessiv, die wirksamste Kombination ist aber nicht vorhersagbar, so dass eine Expressionsoptimierung durch Chaperone nur empirisch erfolgen kann. Die zusätzliche Koexpression von dem Chaperongen *degP* mit den Chaperongenen der Chaperonexpressionsbibliothek aus *P. aeruginosa* sollte zeigen, ob DegP weitere positive oder negative Effekte auf die Expression der Penicillinacylase hat. Um synthetische Operone von dem Penicillinacylase Gen *pga* und dem Chaperongen *degP* auf einem Expressionsplasmid erzeugen zu können, wurde eine einheitliche Strategie zur Herstellung verschiedener Expressionsplasmide (Tab. 2) verwendet. Dazu wurde die ursprüngliche *multiple cloning site* des T7-Expressionsvektors pET22b(+) (Novagen) so modifiziert, dass zwischen die beiden äußersten Restriktionssequenzen *Xba*I und *Not*I der ursprünglichen

multiple cloning site die Erkennungssequenzen für die *Homing* Endonukleasen I-*Sce*I und PI-*Sce*I eingefügt wurden. Die restlichen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme wurden entfernt. Die asymmetrischen Erkennungssequenzen von *Homing* Endonukleasen sind zwischen 12 und 40 bp lang, wohingegen die meisten anderen Restriktionsendonukleasen palindromische Erkennungssequenzen von vier, sechs oder acht Basenpaaren besitzen (Kessler *et al.*, 1985). Aus diesem Grund sind *Homing* Endonukleasesequenzen extrem selten (Jasin, 1996). In Eukaryoten sind sie meistens in Introns¹⁷ oder Inteinen¹⁸ eingebettet (Perler *et al.*, 1994) und die Wahrscheinlichkeit, dass die Basenfolge der *Homing* Endonukleasesequenzen in kodierenden Sequenzen von Bakterien vorkommt, extrem gering.

Zur Konstruktion des veränderten pET22b(+) wurden die von MWG Biotech synthetisierten einsträngigen Oligonukleotide (Tab. 3), die die Erkennungssequenzen für die *Homing* Endonukleasen I-*Sce*I und PI-*Sce*I enthielten, in einem Reaktionsgefäß im Verhältnis 1:1 zusammengeführt, anschließend 10 min bei 95°C im Wasserbad erhitzt und dann langsam auf RT abgekühlt. Die beiden gegenläufigen Oligonukleotide waren über nahezu die gesamte Sequenz komplementär, verfügten aber nach der Hybridisierung jeweils über 5'-Überhänge, die den hydrolysierten Erkennungssequenzen der Enzyme *Xba*I und *Not*I entsprachen (Abb. 9).



Abb. 9 Schematische Darstellung der Klonierung der *Homing* Endonukleasesequenzen in den Vektor pET22b(+). Der Vektor pET22b(+) wurde durch die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Not*I hydrolysiert und anschließend wurde das Fragment mit den *Homing* Endonukleasesequenzen I-*Sce*I und PI-*Sce*I durch Ligation in den Vektor eingebracht.

¹⁷ Introns: sind die nicht codierenden Abschnitte der DNA innerhalb eines Gens, die benachbarte Exons trennen

¹⁸ Intein: ist ein Segment eines Proteins, das sich selbst (autokatalytisch) aus diesem ausschneiden und die verbleibenden Stücke (Exteine) wieder durch eine Peptidbindung verknüpfen kann

Die so hybridisierten DNA-Doppelstränge (Insert R1/R4) wurden für die Ligation in pET22b(+) verwendet, der vorher durch die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Not*I hydrolysiert worden war. Die korrekte Sequenz der *Homing* Endonukleasesequenzen wurde durch Sequenzierungen überprüft. Das Plasmid wird im Folgenden als pET22b HRS R1/R4 bezeichnet (Abb. 9). Die Bezeichnung HRS steht für *Homing* Restriktionssequenz.

3.1.1.2 Konstruktion der Ausgangsvektoren für die Overlap-Extension PCR

Damit die Gene der Penicillinacylase PGA und das periplasmatische Chaperon DegP in beliebiger Reihenfolge in den Vektor pET22b HRS R1/R4 eingebracht und eine einheitliche Klonierungsstrategie verwendet werden konnte, wurden die Gene *pga* und *degP* zunächst durch PCR mit genspezifischen Primern (Tab. 3) vom Start- bis zum Stopkodon amplifiziert. Anschließend wurden sie gerichtet in den pENTR/SD/D-TOPO Cloning Vektor (2.6.4) eingebracht (Abb. 10). Dieser Vektor besitzt neben einem Kanamycin-Resistenzgen, eine für Bakterien geeignete Ribosomenbindestelle (RBS), die eine optimale Expression ermöglicht (Abb. 10).



Abb. 10 Schematische Darstellung der Klonierung des Penicillinacylasegens *pga* und des Chaperongens *degP* in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO. Nach erfolgreicher Amplifikation der jeweiligen Gene mit der Sequenz CACC am 5'- Ende des jeweiligen Gens, konnten die aufgereinigten PCR-Produkte in die Reaktion mit dem Zielvektor eingesetzt werden. Dabei wurde das jeweilige Gen gerichtet in den Vektor inseriert.

Durch das gerichtete Einbringen der Gene in den Vektor pENTR/SD/D-TOPO war es möglich, dass jeweils eine einheitliche und optimale Ribosomenbindestelle stromaufwärts vor den Startkodons der Gene *pga* und *degP* vorhanden war. Die konstruierten Plasmide werden im Folgenden als pENTR *degP* und pENTR *pga* bezeichnet.

Diese Ribosomenbindestelle wurde in den folgenden *Overlap-Extension* PCRs mit dem jeweiligen Gen als eine Einheit amplifiziert.

3.1.1.3 Durchführung der Overlap-Extension PCRs und Klonierung in pET22b R1/R4

Im folgenden Schritt wurden die Gene *pga* und *degP* in den Vektor pET22b R1/R4 in verschiedenen Kombinationen inseriert. Dazu wurden spezifische Primer verwendet, die jeweils spezifisch komplementär zu dem Teil des pENTR-Vektors waren, der die RBS enthielt und zusätzlich besaßen die Primer am 5`-Ende eine von vier spezifischen *Homing* Endonukleasesequenzen. Durch Verwendung der unterschiedlichen *forward* und *reverse* Primer (Tab. 3; Tab. 12) konnte die Position der Gene im Expressionsplasmid pET22b R1/R4 bestimmt werden. Die Amplifizierung der Zielgene mit den pENTR-Vektoren als Matrize hat den Vorteil, dass jedes Gen auch im synthetischen Operon eine eigene, definierte RBS enthält.

Bei der durchgeführten *Overlap-Extension* PCR wurden die *Homing* Endonukleasesequenzen als komplementäre Sequenzen verwendet. In Tab. 12 sind die Primer-Kombinationen und komplementären Bereiche aufgelistet, die für die Konstruktion der *Overlap*-PCR-Fragmente verwendet wurden (2.6.5).

Kombinationen	Verwendete Primerpaare zur	Komplementäre	Verwendete OE-PCR
	Amplifikation der Einzelfragmente	Sequenzen	Primer
5` pga	Fw_ENTR_A /Fw_entr_a		
	Rev_ENTR_B/Rev_entr_b	I-PpoI	Fw_entr_a/
3` degP	Fw_ENTR_C /Fw_entr_c		Rev_entr_c
	Rev_ENTR_C/Rev_entr_c		
5` degP	Fw_ENTR_A /Fw_entr_a		
	Rev_ENTR_A/Rev_entr_a	I-CeuI	Fw_entr_a/
3` <i>pga</i>	Fw_ENTR_B/Fw_entr_b		Rev_entr_c
	Rev_ENTR_C/Rev_entr_c		
5` pga 3`	Fw_ENTR_A /Fw_entr_a		
	Rev_ENTR_C/Rev_entr_c		

Tab. 12 Auflistung der verwendeten Primer-Kombinationen zur Herstellung der Overlap-ExtensionPCR Produkte.

Die entstandenen Produkte *pga/degP*, *degP/pga* oder *pga* und der Vektor pET22b R1/R4 wurden mit den *Homing* Restriktionsenzymen hydrolysiert und in anschließenden Ligationsreaktionen zusammengeführt. Auf diese Weise konnten folgende drei Expressionsplasmide erfolgreich konstruiert werden (Abb. 50 bis 52 im Anhang):

1) pET22b *pga/degP*; 2) pET22b *degP/pga*; 3) pET22b *pga*

3.1.2 Erhöhung der Aktivität der Penicillinacylase durch Koexpression von DegP und Chaperonen aus *P. aeruginosa*

Zur Untersuchung des Einflusses der koexprimierten Chaperongene aus *P. aeruginosa* und *degP* auf die Aktivität der Penicillin G Acylase (PGA) aus *E. coli* ATCC11105 wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) verwendet.

Für die Koexpressionsexperimente des Penicillin G Acylasegens *pga* mit den *Pseudomonas*-Chaperongenen wurden Expressionsplasmide verwendet, welche entweder nur die kodierende Sequenz des Penicillinacylasegens enthielten (pET22b *pga*), oder noch zusätzlich das Chaperongen *degP* enthielten (pET22b *pga/degP*). In diesem Fall wurde nur das Plasmid pET22b *pga/degP* verwendet, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass unter Verwendung dieses Expressionsplasmids höhere Penicillinacylase Aktivität zu detektieren war, als im Vergleich dazu durch Verwendung des Expressionsplasmids pET22b *degP/pga* (Daten nicht gezeigt).

Für die Koexpressionsversuche wurden zunächst *E. coli* Expressionsstämme hergestellt, die zwei Plasmide enthielten. Das erste Plasmid kodiert für *pga* bzw. *pga/degP*, und das zweite enthielt die Gene für verschiedene Chaperone bzw. Chaperonkombinationen. Die Expressionsstämme wurden für jeden Versuchsansatz frisch erzeugt. Dafür wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) zuerst mit den Chaperonplasmiden transformiert, die die Chaperongene aus *P. aeruginosa* enthielten. Von diesen Stämmen wurden chemisch kompetente Zellen hergestellt (2.5.1). In weiteren Transformationsansätzen wurden die kompetenten Zellen mit dem *pga*- bzw. *pga/degP*-Expressionsplasmid transformiert.

Die Kultivierung der Stämme erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben bei 37°C in TB-Medium (2.4.1). Die Autoinduktions-Methode basiert auf der Regulation des *lac* Operons. Die enthaltenen Medienkomponenten (Glukose und Laktose) werden zu unterschiedlichen Zeiten verwertet. Die Zellen verstoffwechseln zuerst die Glukose als Kohlenstoffquelle. Wenn die
Glukose verbraucht ist, stellt sich der Stoffwechsel auf Laktose um. Die Laktose wird zu Galaktose verstoffwechselt. Dies führt zur Aufhebung der Repression (durch *lac1*) und somit zur Proteinexpression, ausgehend vom T7-Promotor. Die Vorteile des Autoinduktionsmediums sind das Erreichen höherer Zelldichten, sowie ein zelldichteabhängiger Induktionszeitpunkt.

Mit Hilfe der vorliegenden Chaperon-Expressionsbank (Kreuz, 2006) sollte für die Penicillin G Acylase aus *E. coli* ATCC11105 die bestmögliche Chaperonkombination detektiert werden, die es ermöglicht, große Mengen lösliches und aktives Enzym zu produzieren. Die Kulturbedingungen (Temperatur, Medium) wurden so gewählt, dass sie später z. B. in Fermentationen ökologisch und ökonomisch eingesetzt werden können.

Es wurde erstmals der Einfluss von Chaperonen und Faltungskatalysatoren aus *P. aeruginosa* auf die Penicillin G Acylase aus *E. coli* getestet. Die dabei gemessenen Aktivitäten der Penicillinacylase sind in Abb. 11 gezeigt und wurden aus drei voneinander unabhängigen Messungen, jeweils mit Doppelbestimmung, berechnet.

Als Referenzstämme dienten die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) jeweils mit den Plasmiden pET22b *pga/degP* bzw. pET22b *pga*. Als Leervektor (LV-) Kontrolle wurden die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) pET22b *pga*, pVLT31-LV und *E. coli* BL21(DE3) pET22b *pga/degP*, pVLT31-LV verwendet (Abb. 11; Tab. 13).

Nach 24-stündiger Kultivierung erfolgte die Probenentnahme. Die Aktivitäten der Penicillinacylase werden im Folgenden als spezifische Aktivität ([U/mg]) in Bezug auf die Proteinkonzentration angegeben. Die Aktivität der Penicillinacylase lag in den Referenzstämmen *E. coli* BL21(DE3) pET22b *pga* bei 0,032 U/mg und *E. coli* BL21(DE3) pET22b *pga/degP* bei 0,01 U/mg. Ohne die die Expression zusätzlicher Chaperongene verminderte die Koexpression von *degP* somit die Aktivität der Penicillinacylase (Tab. 13). Das genaue Gegenteil zeigte sich in den gleichen Expressionsstämmen, wenn diese zusätzlich noch mit dem Chaperon-Leervektor transformiert wurden. Die ermittelte spezifische Aktivität der Penicillinacylase lag in der Leervektor-kontrolle *E. coli* BL21(DE3) pET22b *pga/degP* LV bei 0,02 U/mg und in *E. coli* BL21(DE3) pET22b *pga* LV bei 0,007 U/mg (Tab. 13).

Es konnte gezeigt werden, dass die Koexpression der Chaperongene sowohl negativen, als auch neutralen, als auch positiven Einfluss auf die Aktivität der Penicillinacylase haben konnte (Abb. 11).

Jedoch konnte nur in den Expressionsstämmen eine Steigerung der Aktivität der Penicillinacylase detektiert werden, in denen neben den Chaperongenen das *degP*

koexprimiert wurde. Ohne die Koexpression konnte trotz der zusätzlichen Koexpression weiterer Faltungshelfer keine Steigerung der Aktivität der Penicillinacylase detektiert werden (Abb. 11, hellgraue Balken).



Abb. 11 Einfluss der Koexpression einzelner Chaperongene mit und ohne *degP* auf die Aktivität der Penicillin G Acylase (PA) aus *E. coli* ATCC11105. Der Nachweis der Penicillinacylase-Aktivität erfolgte durch Einsatz von 10 μ l Proteinlösung aus den GZE-Proben. Die Aktivität ist in [U/mg] angegeben und die Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Messungen durch Fehlerbalken dargestellt. Legende: $\blacksquare: pga; \blacksquare: pga$ mit *degP*; LV: Leervektorkontrolle (pVLT31; Chaperon-LV).

Betrachtet man nur noch die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) pET22b *pga/degP* mit den jeweils zusätzlich koexprimierten Chaperongenen, so waren die cytoplasmatischen Faltungshelfer PA2725, CsaA und HscB aus *P. aeruginosa* in der Lage die spezifische Aktivität der Penicillinacylase um den Faktor 2 zu steigern. Das beste Ergebnis wurde durch

das Hitzeschockprotein HscB mit einer spezifischen Aktivität der Penicillinacylase von 0,066 U/mg erzielt (Abb. 11; schwarze Balken; Tab. 13).

Bezeichnung des Faltungshelfers	Spezifische Aktivität [U/mg]	Lokalisation des Faltungshelfers	
Referenz (PGA)	0,032		
Referenz (PGA/DegP)	0,01	periplasmatisch	
LV-Kontrolle (LV; PGA)	0,007		
LV-Kontrolle (LV; PGA/DegP)	0,02	periplasmatisch	
HtpG	0,038	cytoplasmatisch	
HslU	0,039	cytoplasmatisch	
LolA	0,041	periplasmatisch	
DsbC	0,044	periplasmatisch	
GrpE DnaKJ	0,048	cytoplasmatisch	
PA2725	0,061	cytoplasmatisch	
CsaA	0,063	cytoplasmatisch	
HscB	0,066	cytoplasmatisch	

Tab. 13 Übersicht über die koexprimierten Faltungshelfer, die die spezifische Aktivität der Penicillinacylase steigern konnten.

Die weiteren getesteten Chaperone konnten die spezifische Aktivität der Penicillinacylase nicht steigern und andere verminderten sogar die Aktivität der Penicillinacylase, im Vergleich zu der Leervektorkontrolle bzw. zum Referenzstamm (Abb. 11; Tab. 13).

Die im Folgenden aufgeführten Beispiele sind Chaperone bzw. Faltungshelfer, die einen negativen Einfluss auf die Aktivität der Penicillinacylase hatten:

- a) cytoplasmatische Chaperone/Faltungshelfer: HslVU, HscAB, PpiB, Tig
- b) periplasmatische Chaperone/Faltungshelfer: PpiA, SurA.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Koexpression der Chaperongene *pa2725*, *csaA* und *hscB* aus *P. aeruginosa* die Aktivität der Penicillin G Acylase aus *E. coli* deutlich gesteigert werden konnte.

Um einen Hinweis zu erhalten, dass die detektierten Unterschiede auf die Expression der Chaperongene aus *P. aeruginosa* zurückzuführen sind, wurde im Folgenden die Transkription dieser Chaperongene mittels RT-PCR untersucht.

3.1.3 Die koexprimierten Chaperongene werden transkribiert – Nachweis durch Transkriptanalyse

Bezugnehmend auf die Expressionsstämme von *E. coli* BL21(DE3), die in der Lage waren gesteigerte Penicillinacylase-Aktivität hervorzurufen, sollte überprüft werden, ob der positive Einfluss auf die Faltungshelfer aus *P. aeruginosa* bzw. DegP zurückzuführen waren. Dazu sollten die Transkripte der Gene von *pga*, *degP* und von verschiedenen Faltungshelfern mittels RT-PCR nachgewiesen werden (2.14.3).

Die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3), die sowohl das Expressionsplasmid pET22b pga/degP als auch die verschiedenen Chaperongenplasmide enthielten, wurden unter den gleichen Bedingungen wie für die Aktivitätstests (TB-Medium, 37°C) bis in die späte logarithmische Phase (O.D.₅₈₀= 0,9) inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde quantitativ isoliert und durch Reverse Transkriptase, unter Verwendung genspezifischer Primer (Tab. 3), in cDNA umgeschrieben.

Es konnte gezeigt werden, dass in den durchgeführten *real-time* PCRs die Transkripte der gewünschten Gene nachgewiesen werden konnten. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte durch den Farbstoff SYBR-*Green*, der nur an doppelsträngige DNA bindet und dabei fluoresziert.

Durch Aufschmelzen der erzeugten PCR-Produkte und Detektion der Fluoreszenz durch frei werdendes SYBR-*Green*, wurde eine Schmelzkurve für jedes erhaltene Produkt aufgenommen (Abb. 12: 1B; 2B; 3B). Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird ($53^{\circ}C \rightarrow 94^{\circ}C$). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff, das SYBR Green, freigesetzt, und es wird eine schlagartige Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere oder Verunreinigungen, konnte die Bildung der spezifischen Produkte bestätigt werden.



Abb. 12 Nachweis der Transkripte der Gene *pga*, *degP* und *pa2725* im Expressionsstamm *E. coli* **BL21(DE3).** Die in den *real-time* PCRs nachgewiesenen Produkte konnten mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse (B) und anschließender Visualisierung durch ein 2%iges Agarosegel (A) verifiziert werden. **Fortsetzung nächste Seite**

Die Ergebnisse der quantitativen *real-time* PCRs wurden zusätzlich mit Hilfe eines 2% igen Agarosegels visualisiert (Abb. 12). Als Negativkontrollen wurden RNA-Proben ohne Reverse Transkriptase inkubiert (Abb. 12: 1A; 2A; 3A), so dass man ausschließen kann, dass die erhaltenen Signale auf DNA-Verunreinigungen zurückzuführen sind. Die Agarosegele zeigen lediglich die spezifischen PCR-Produkte und keine weiteren, durch DNA-Verunreinigungen entstandene Banden.

Anhand der Schmelzkurven (Abb. 12: 1B; 2B, 3B) konnte gezeigt werden, dass die in der *real-time* PCR erzeugten Produkte tatsächlich die spezifischen Fragmente der Chaperongene, bzw. des Zielgens waren und diese exprimiert wurden. Exemplarisch sind die Schmelzkurven der *real-time* PCR Produkte für die Chaperongene *pa2725* (1B) und *degP* (3B), und für das Penicillinacylasegen *pga* (2B) in Abb. 12 dargestellt. Die Ergebnisse bestätigen sich zudem durch die spezifischen PCR-Produkte für die jeweiligen Genfragmente *pga* (2A), *degP* (3A) und *pa2725* (1A), die durch 2%ige Agarosegele visualisiert werden konnten (Abb.12: 1A; 2A; 3A). Die spezifischen Fragmente weisen, wie erwartet, alle eine Größe zwischen 100 und 150 bp auf.

Zusätzlich dazu konnte durch Aktivitätstests bestätigt werden, dass die Penicillinacylase in den untersuchten Proben exprimiert und aktives, lösliches Protein gebildet worden ist (Daten nicht gezeigt). Auch für die anderen überprüften Expressionsplasmide konnte gezeigt werden, dass die in der *real-time* PCR erzeugten Produkte tatsächlich die spezifischen Fragmente der jeweiligen untersuchten Chaperongene waren. Die Transkription aller ausgewählten Chaperongene, neben der Transkription und Expression der Gene *pga* und *degP*, konnte in dem heterologen Wirt *E. coli* BL21(DE3) gezeigt werden.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass durch die Expression der Chaperongene *pa2725, csaA* oder *hscB* aus *P. aeruginosa* die Aktivität der Penicillin G Acylase um den Faktor zwei gesteigert werden konnte.

Neben den bereits seit langem bekannten und gut charakterisierten Serinproteasen, wie den Penicillinacylasen, gibt es in Bakterien weitere, wenig bekannte Serinproteasen, wie die β -Peptidyl Aminopeptidasen. Um diese neuartigen, wenig bekannten Vertreter von Serin-

Fortsetzung von Abb. 12 Die Fragmente der ausgewählten Gene (*pa2725* (1), *pga* (2), *degP* (3)) wurden während der PCR-Reaktionen amplifiziert und das Produkt anschließend aufgeschmolzen. Anhand der spezifischen Schmelzkurven für jedes der untersuchten Fragmente und der spezifischen PCR-Produkte auf den Agarosegelen konnte gezeigt werden, dass das jeweilige Zielgen exprimiert wurde. Die Größen der Fragmente der Zielgene sollten eine Größe zwischen 100 und 150 bp im Agarosegel aufweisen. NK: Negativkontrolle, LV: Leervektor.

proteasen in Bakterien charakterisieren zu können und ihre physiologische Funktion, sowie putative industrielle Anwendungsbereiche kennen zu lernen, wurde eine putative β -Peptidyl Aminopeptidase aus *P. aeruginosa* untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

3.2 Die physiologische Funktion der β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1 Das hypothetische Protein PA1486 aus *P. aeruginosa* PAO1 zeigt Sequenzhomologien zu bekannten β-Peptidyl Aminopeptidasen

Die erste beschriebene und charakterisierte β -Peptidyl Aminopeptidase (DmpA), die in der Lage ist β -Peptide bzw. β -peptidhaltige Moleküle zu hydrolysieren, stammt aus dem opportunistisch humanpathogenen Gram-negativen Bakterium *Ochrobactrum anthropi* (Fanuel *et al.*, 1999a). Das Enzym DmpA besitzt im aktiven Zentrum an Position 250 einen Serin-Rest und gehört zu den Serinproteasen.

In der *Pseudomonas*-Datenbank (http://www.pseudomonas.com) fand sich ein bis jetzt hypothetisches Protein, das durch den ORF *pa1486* kodiert wird (Abb. 13).



Abb. 13 Schematische Übersicht der Anordnung der Gene im *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Chromosom. Die Farben zeigen die (putativen) Lokalisationen der Proteine in der Zelle (orange: Cytoplasmamembran; rot: Cytoplasma; grau: unbekannt).

Durch BLAST Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass das vorhergesagte Genprodukt von *pa1486* hohe Sequenzhomologien (69 %) zu einer bereits bekannten und charakterisierten β -Peptidyl Aminopeptidase BapA aus *Pseudomonas* sp. aufweist (Komeda & Asano, 2005) (Abb. 14).

DmpA BapA BapA BapA BapF	(O. a.) (3-2W4) (Y2) (Ps. sp.) (P. a.)	10 20 30 40 50 60
DmpA BapA BapA BapA BapF	(O. a.) (3-2W4) (Y2) (Ps. sp.) (P. a.)	708090100110120FQTIIENEPR PGR-KRPARSGVTAILPHNQSETPVPVYAGVHRENGNGEMTGTHWIEDGGHTTVISGDCA MVIGKGPYRTGVTITHP-LGKTSLDGVAAGRAVINGTGEWTGMHLVDEVGHATVISGDCPLVIGKGPYRTGVTITHP-LGKGSIDAVAAGRAVINGTGEWTGMHLVDEVGHATVISGDCPLVIGKGPYRTGVTITHP-LGKGSIDAVAAGRAVINGTGEWTGMHLVDEIGHATVISGDCPLVIGKGPYRTGVTITHP-LGKGSIDAVAAGRAVINGTGEWTGMHLVDEIGHSTLNVETGDVSIHSGVTUTEPRAGATHLQPCFAGVHVLNGNGDATGLEWIRERGHSTLNQRIDGRQVRTGVTLVQPRAGAARLQPCFAGCHVLNGNGDATGLEWIREAG
DmpA BapA BapA BapA BapF	(O. a.) (3-2W4) (Y2) (Ps. sp.) (P. a.)	130140150160170180YFLGPVVITNTHGIGMAHHATVRMMVDRYASTYQTDDFLMIMPVVAETYDGALNDINGFPQFLGPIALTGTGNVGLVHQSMMDWSVGKVPEEALFSRLLPVVAETLDNRLNDVFGHGSFLGPVLTGSGNVGLVHQSILDWSIGKVPEELLFSRVLPVVAETLDSRLNDVFGHGLLTSPIAYTNTHSVGVVRDALVAAER-EMGKQHTYWCMPVVLETYDGTLNDIWGQHLLTTPIAITNTHSVGAVRDALIAEERAELGDSGLYWCMPVVMETFDGLLNDIWGQH
DmpA BapA BapA BapF	(O. a.) (3-2W4) (Y2) (Ps. sp.) (P. a.)	VTEADVRKALDNVASGPVQEGNCGGGTGMITYGFKGGTGTASRVVEFGGRSFTIGALVQAUTRDHVFAALDGAKGGPVAEGNVGGGTGMIAYTFKGGIGTSSRVVSAGDTRYTVGVLVQAUTREHVFAALDSAKGGPVAEGNVGGGTGMIAYTFKGGIGTSSRVVSAGEKRYTVGVLVQAVTAEHVQIALQDARSGPVQEGNVGGGTGMICHEFKGGIGTSSRVLGPEQGGWTVGVLVQAVGARQVGEALACAESGPVREGSVGGGTGMICHEFKGGIGSASRRIPAEQGGWTVGALVQA
DmpA BapA BapA BapF	(O. a.) (3-2W4) (Y2) (Ps. sp.) (P. a.)	250 260 270 290 300 NHGQRDWITI AGVPVGQHMR DGT PQSQLQER GSI IVVLATDLPL NHGDRNDLRI AGVQIGKEIK G-AWPEVNGI VAAGPDAG KPQDKNSL LIVIATDAPL NHGSREDLRI AGVPISKEIK G-AWPEINGI AALGPDAG KPQDKNSL LIVIATDAPL NYGVREALRV GGYPVGTVLG DV PSPFKSEK KVGVPGMGSI VITIATDAPL NHGQRRELRV DGYPVGRRLG DI PSPFSEE GTPGMGSI VVILATDAPL
DmpA BapA BapA BapF	(O. a.) (3-2W4) (Y2) (Ps. sp.) (P. a.)	310320330340350360MPHQLKRLARRASIGIGRNGTPGGNNSGDIFIAFSTANQRPMQHRSAP-FLDVEMVMPHQLERMARRAALGVGRNGSTAGALSGEFALAFSTSHVIPLGGKPRLP-AIINDTMPHQLERLARRAALGVGRNGSTAGALSGELALAFSTSHVIPLGQAPRLP-AMINDTLPHQCTRLAQRASVGLARVGGGTEDSSGDIFIAFAVGNSNLPAANFGHPGEP-TTALKMVLPHQCQRLAQRASIGIARTGGGTEDSSGDVFLAFATGNQDLPPADYARKDLPQSTPLRML
DmpA BapA BapA BapA BapF	(0. a.) (3-2W4) (Y2) (Ps. sp.)	370 380 390 400 410 420 NDEPLDTVYL AAVDSVEEAV VNAMIAAEDM GGTPFDRLLV QATDHERLRA VLRQYGRLA- DSETMNALER GVVQATEEAL VNQLVASETM TGANNAKV YGIPHDQLAR IMKAR-FERR DSGTMNALES GVVQATEEAL VNQLVASETM TGANNVKV YGIPHDQLQR IMKAR-FERR NNDYISPLEV AAADAVEEAI INAMIGADDL -TGCGNTV LALKPERLLA ALQQVGWKAP NNDHISPLEA AAAEAVEEAI VNVLLAGEDM BTEDGRLV PALKGERLUA ALRETGWEGE

Abb. 14 Vergleich der Aminosäuresequenz von BapF aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mit den bekannten β -Peptidyl Aminopeptidase Sequenzen aus *Ochrobactrum anthropi* (DmpA), aus den beiden *Sphingosinicella* sp. Stämmen 3–2W4 und Y2, und aus einem *Pseudomonas* sp. Stamm. Identische Aminosäuren sind schwarz und ähnliche Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Aminosäure des putativen katalytischen Serin-Rests von BapF ist rot unterlegt und mit einem Pfeil markiert. Die unterstrichenen Sequenzelemente kennzeichnen die Signalsequenzen der β -Peptidyl Aminopeptidasen der *Sphingosinicella* Stämme 3-2W4 und Y2. Die Proteinsequenzen, die für den Vergleich verwendet wurden, besitzen die folgenden Datenbanknummern: DmpA aus *O. anthropi* LMG7991: CAA66259; BapA aus *Sphingosinicella xenopeptidilytica* 3-2W4: AAX93858; BapA aus *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2: ABC59253.1 und BapA aus *Pseudomonas* sp. MCI3434: BAE02664.

Die Sequenzidentitäten mit den drei anderen beschriebenen β -Peptidyl Aminopeptidasen liegen bei 45 % für das DmpA aus *O. anthropi* (Fanuel *et al.*, 1999a), 39 % und 38 % für die beiden β -Peptidyl Aminopeptidasen BapA aus *Sphingosinicella* sp. (Geueke *et al.*, 2006) (Abb. 14).

Das β -Peptidyl Aminopeptidase homologe Protein PA1486 aus *P. aeruginosa* PAO1 wird im Folgenden als BapF (β -Aminopeptidase F) bezeichnet. Es besteht aus 366 Aminosäuren und das kodierende Gen umfasst 1101 bp. Die vorhergesagte Lokalisation von BapF ist im Cytoplasma (Abb. 13), da es, genau wie die beiden β -Aminopeptidasen DmpA und BapA aus den Stämmen *Pseudomonas* sp. und *O. anthropi*, keine Signalsequenz aufweist. Einzig die β -Aminopeptidasen BapA 3-2W4 und Y2 aus den beiden *Sphingosinicella* Stämmen weisen eine Signalsequenz auf und sind im Periplasma lokalisiert (Geueke *et al.*, 2006) (Abb. 14).

3.2.2 Konstruktion der Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAFU2 (PAO1Δ*pa1486*::Gm^R)



Abb. 15 Konstruktion der *bapF*-defizienten Mutante *P. aeruginosa* PAFU2. Als Parentalstamm für die Konstruktion der Mutante PAFU2 wurde der Wildtyp PAO1 eingesetzt. Durch homologe Rekombination unter Verwendung des Suizidvektors pSUP202 $\Delta bapF$ (Abb. 54) wurde das 1,1 kb große *bapF*-Gen durch die 1,7 kb große Ω -Gm^R-Kassette ersetzt. Eine Abbildung der detaillierten Konstruktion des Mutagenesevektors pSUP202 $\Delta bapF$ befindet sich im Anhang (Abb. 56).

Da die physiologische Rolle von β -Peptidyl Aminopeptidasen zurzeit noch völlig unklar ist, wurde von dem Wildtyp-Stamm *P. aeruginosa* PAO1 eine Mutante erzeugt, indem dessen *bapF (pa1486)* Gen durch Insertion einer Ω -Gm^R-Kassette inaktiviert wurde (PAO1 Δ *bapF*:: Gm^R). Diese *P. aeruginosa* Insertionsmutante wird im weiteren *P. aeruginosa* PAFU2 genannt (Abb. 15).

3.2.3 Überprüfung der erfolgreichen Konstruktion der Insertionsmutante PAFU2

Der Nachweis des Austausches des Gens *bapF* in *P. aeruginosa* PAFU2 gegen die Ω -Gm^R-Kassette erfolgte mittels PCR. Bei dem Stamm PAFU2 entsteht durch die Insertion der Ω -Gm^R-Kassette ein PCR-Fragment, das im Vergleich zur Situation im Wildtyp etwa 600 bp größer ist, wenn man die Oligonukleotide UR_*pa1486*_up und DR_ *pa1486*_dwn einsetzt (Abb. 16). Diese binden jeweils 700 bp vor und hinter dem Start- und Stopkodon des Gens *bapF*. Das PCR-Produkt der Mutante weist eine Größe von 3100 bp und das des Wt 2500 bp auf. Die PCR Produkte aller getesteten putativen Mutanten wiesen das erwartete spezifische PCR-Fragment auf und zeigten keine Bande mehr in der Größe des *P. aeruginosa* Wt-Produktes (WT; Abb. 16). Die putativen Mutanten 3, 4, 7 und 8 wurden für weitere Nachweis-PCRs verwendet.



Abb. 16 Nachweis der Deletion des Gens *bapF* im *P. aeruginosa* PAFU2 Genom durch Insertion der Ω -Gm^R-Kassette. Obere Abbildung: Gelelektrophoretische Trennung der erzeugten PCR-Fragmente auf einem 1% igen Agarosegel zum Nachweis der Gendeletion. Spur 1-9: putativen Mutanten. Als Kontrollen wurde genomische DNA von *P. aeruginosa* PAO1 (WT) und Plasmid-DNA des Mutagenesevektors pSUP202 Δ *bapF* (VK) als Matrize verwendet. Untere Abbildung: Schematische Abbildung der Primerbindestellen im Chromosom der untersuchten Proben. Die Abbildung stellt keine maßstabsgetreue Wiedergabe der Verhältnisse im Genom dar.

Marker: 1 kb DNA Ladder (Fermentas); WT: Wildtyp-Kontrolle; VK: Mutagenesevektor-Kontrolle.

Zum sicheren Nachweis, dass die Ω -Gm^R-Kassette ins Genom inseriert wurde und im ersten Nachweis nicht nur verbliebenes Plasmid und somit ein *single crossover* nachgewiesen worden ist, wurde eine zweite PCR durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide dafür binden 50 bp vor dem ehemaligen Startkodon des Gens *bapF* und 800 bp nach dem ehemaligen Stopkodon (Tab. 3). Bei Verwendung der Wt-DNA sollte das entstehende PCR Produkt 1970 bp und unter Verwendung der Mutanten-DNA 2584 bp groß sein (Abb. 17).



Abb. 17 Nachweis der Insertion der Ω -Gm^R-Kassette ins Genom an die Position von *bapF*. Obere Abbildung: Gelelektrophoretische Trennung der spezifischen PCR-Produkte durch ein 1% iges Agarosegel zum Nachweis der Insertion der Ω -Gm^R-Kassette ins Genom der putativen Mutanten (3,4,7,8). Für Kontrollen wurden als Matrizen genomische DNA des Wildtyps (WT) bzw. Plasmid-DNA des Mutagenesevektors pSUP202 $\Delta bapF$ (VK) eingesetzt. **Untere Abbildung:** Schematische Abbildung der Primerbindestellen. Die Abbildung stellt keine maßstabsgetreue Wiedergabe der Verhältnisse im Genom dar. Marker: 1 kb DNA Ladder (Fermentas); WT: Wildtyp-Kontrolle; VK: Mutagenesevektor-Kontrolle

Alle untersuchten putativen Mutanten zeigen nach der PCR eine Bande auf der erwarteten Höhe im Agarosegel (Abb. 17). Da der strangabwärts gelegene Primer keine homologen Sequenzen in der Mutagenesevektorsequenz (VK) besitzt, entsteht bei der Vektorkontrolle (VK) kein PCR-Produkt. Das Produkt der PCR, in dem die genomische DNA vom *P. aeruginosa* PAO1 Wt (PK) verwendet wurde, zeigt eine Bande bei der Höhe von ca. 2000 bp (Abb. 17). Unter Verwendung genspezifischer Primer für den Nachweis der Gm-Kassette (Tab. 3) konnte man eindeutig die Gensequenz der Gentamycinresistenzkassette in den putativen Mutanten nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Die Sequenzierungsergebnisse der eluierten PCR-Produkte, die auf dem Agarosegel von den Proben 4 und 8 sichtbar sind (Abb. 17), zeigten eindeutig, dass es sich hierbei um das richtige Konstrukt handelt und die Ω -Gm^R-Kassette das Gen *bapF* in den getesteten Proben ersetzt.

Mit der erfolgreich konstruierten und verifizierten *P. aeruginosa* PAFU2 Mutante wurde im Folgenden weiter gearbeitet.

Um fundierte Einblicke in die Funktion der β -Peptidyl Aminopeptidase von *P. aeruginosa* zu erhalten, wurden verschiedene Phänotypen und physiologische Eigenschaften der *P. aeruginosa* PAFU2 Mutante, im Vergleich zum *P. aeruginosa* PAO1 Wt untersucht.

3.2.4 Die Deletion von *bapF* in *P. aeruginosa* PAO1 hat keine Unterschiede in den Beweglichkeiten zur Folge

Die Beweglichkeit von *P. aeruginosa* ist mit dessen Pathogenität verbunden (Arora *et al.*, 2005). Sie ermöglicht den Bakterien verschiedenste Umgebungen zu kolonisieren, sich an Oberflächen anzuhaften und Biofilme auszubilden (O'Toole & Kolter, 1998). *P. aeruginosa* ist in der Lage, sich auf drei unterschiedliche Arten zu bewegen:

1) *Twitching motility*: diese Bewegungsform findet an festen Oberflächen statt und wird durch die so genannten Typ IV Pili vermittelt (Rashid & Kornberg, 2000; Rashid *et al.*, 2000);

2) Schwimmen: findet in wässrigen Umgebungen durch eine polare Einzelflagelle statt.

3) Schwärmen: Zellen von *P. aeruginosa* sind auf semisoliden Agarflächen (0,5 bis 0,7 % Agar (w/v)) unter stickstofflimitierenden Bedingungen befähigt, die sogenannte Schwärmbewegung durchzuführen. Für die Schwärmbewegung benötigen die Zellen sowohl die Flagellen, als auch die Typ IV Pili (Köhler *et al.*, 2000).

Die *Twitching Motility* ist eine Bewegung der Zellen entlang einer Oberfläche und ist somit durch eine trübe Zone am Petrischalenboden um die entstandene Kolonie zu erkennen (durch einen Pfeil gekennzeichnet; Abb. 18 A). Die Schwimmbewegung wird durch eine trübe Zone auf der Agaroberfläche sichtbar (Abb. 19 B). Die Bildung der typischen dendritischen Strukturen auf semisoliden Agarflächen dokumentiert die Schwärmbewegung (Abb. 18 C).

Vergleicht man die drei verschiedenen Beweglichkeitsformen zwischen dem *P. aeruginosa* PAO1 Wt Stamm und der *P. aeruginosa* PAFU2 Mutante, so zeigt sich in Abb. 18, dass in der *P. aeruginosa* PAFU2 Mutante bei keiner der drei Beweglichkeitsformen eine signifikante Veränderung, im Vergleich zum *P. aeruginosa* PAO1 Wt, festgestellt werden konnte.



Abb. 18 Nachweis der drei Beweglichkeitsformen von *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) und der Mutante *P. aeruginosa* PAFU2 ($\Delta bapF$). In der linken Spalte sind die Ergebnisse der Beweglichkeitstests für PAO1 Wt und in der rechten Spalte die Ergebnisse für die Mutante PAFU2 dargestellt. A Nachweis der *Twitching Motility*: Einzelkolonien wurden mit Zahnstochern durch LB-Agar (1,5 % Agar) bis zum Grund der Petrischale gestochen und 24 h bei 37°C und weitere 72 h bei RT bebrütet. B Nachweis des Schwimmverhaltens: Die M9-Minimalagarplatten mit 0,3 % Agar wurden mit 5 µl einer ÜN-Kultur (O.D.₅₈₀= 3) beimpft und 24 h bei 37°C und weitere 24 h bei RT bebrütet. C Nachweis des Schwärmverhaltens: Die M9-Minimalagarplatten mit 0,5 % Agar wurden mit 5 µl einer ÜN-Kultur (O.D.₅₈₀= 3) beimpft und 24 h bei RT bebrütet. Die Stämme wurden für alle Versuche in vier unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung überprüft.

3.2.5 Die Produktion von Rhamnolipiden ist in der *P. aeruginosa* PAFU2 Mutante nicht beeinträchtigt

Rhamnolipide sind amphiphile Moleküle und somit sind sie in der Lage, die Oberflächenspannung herabzusetzen. Sie wirken als "Schmierstoff" zwischen den Zellen und der Oberfläche, und ermöglichen damit den *P. aeruginosa* Zellen die Flagellen- und Typ-IV-Piliabhängige Bewegung, das Schwärmen, über semisolide Oberflächen durchzuführen (Köhler *et al.*, 2000). Rhamnolipide spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr zellulärer Bestandteile (z. B. neutrophile Leukozyten) des Immunsystems (Bjarnsholt *et al.*, 2010) und werden daher zu den Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* gezählt.

Um einen Einfluss von BapF auf die Rhamnolipidproduktion untersuchen zu können, wurden die Rhamnolipidgehalte in den Kulturüberständen der *P. aeruginosa* Stämme PAO1 Wildtyp (Wt) und der $\Delta bapF$ -Mutante (PAFU2) miteinander verglichen. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte für 48 h bei 37°C in PPGAS Medium, welches eine erhöhte Rhamnolipidproduktion bewirkt und daher für deren Analysen besonders geeignet ist (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Zhang & Miller, 1994). Der Nachweis der Rhamnolipidproduktion erfolgte sowohl durch Dünnschichtchromatographie, als auch durch Indikatorplatten, die den Farbstoff Methylenblau enthielten (2.9.2).



Abb. 19 Nachweis der Rhamnolipidproduktion in den *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 (Wt) und PAFU2 (*AbapF*). A Nachweis der Rhamnolipidproduktion durch Entstehung dunkelblauer Höfe um die Kolonien durch Komplexbildung der negativ geladenen Rhamnolipide mit den positiv geladenen Komponenten Methylenblau und CTAB (durch Pfeile gekennzeichnet). Auf die Platten wurden 3 μ l einer ÜN-Kultur (O.D.₅₈₀= 3) getropft und diese wurden 24 h bei 37°C und weitere 24 h bei RT bebrütet. B Dünnschichtchromatographische Auftrennung der extrahierten Rhamnolipide aus Kulturen, die 48 h in PPGAS-Medium kultiviert wurden. Die Rhamnolipide wurden aus dem Kulturüberstand extrahiert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit einem Orcinol- und Schwefelsäurehaltigen-Farbreagenz detektiert. Als Standards wurden bei beiden Methoden gereinigte Rhamnolipide aus *P. aeruginosa* verwendet.

Bei den beiden untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 (Wt) und PAFU2 ($\Delta bapF$) konnte die Produktion von Rhamnolipiden nachgewiesen werden (Abb. 19). Auf den Indikatorplatten zeigten sich um alle Kolonien dunkelblaue Höfe. Diese werden durch die Komplexbildung der Rhamnolipide mit CTAB und Methylenblau verursacht (Abb. 19 A).

Auch auf den Dünnschichtchromatographieplatten zeigten sich in etwa gleich große Spots für das Mono- (RL 1,2) und das Di-Rhamnolipid (RL 2,2) sowohl im *P. aeruginosa* PAO1 Wildtyp, als auch in der *P. aeruginosa* Mutante PAFU2 (Abb. 19 B). Somit scheint die β -Aminopeptidase BapF keinen direkten Einfluss auf die Rhamnolipidproduktion zu haben.

3.2.6 Untersuchung der Quorum Sensing Signalmoleküle aus P. aeruginosa

Die Produktion verschiedenster Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* wird durch das Zelldichte-abhängige *Quorum Sensing* koordiniert reguliert. Zu dem *Quorum Sensing* System gehören unter anderem das *las*- und das *rhl*-System (Bjarnsholt *et al.*, 2010).



Abb. 20 Nachweis der kurz- und langkettigen AHL-Signalmoleküle aus *P. aeruginosa* Kulturüberständen mittels *Chromobacterium violaceum* (A) und *Agrobacterium tumefaciens* (B). Die extrahierten Signalmoleküle aus den Kulturüberständen der *P. aeruginosa* Stämme PAO1 (Wt) und der Mutante PAFU2 ($\Delta bapF$) wurden nach dem Vakuumtrocknen in 10 µl Ethylacetat gelöst, auf die DC-Platten aufgetragen und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Anschließend wurden die DC-Platten entweder mit dem Sensorbakterium *C. violaceum* CV026 oder mit dem Sensorbakterium *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) überschichtet und 24 h bei 30°C bebrütet. Für das Sensorbakterium *A. tumefaciens* wurde dem Weichagar zusätzlich 100 µg/ml X-Gal zugegeben. Als Referenzen wurden die synthetischen Signalmoleküle C4-HSL [15 nmol] und 3-oxo-C6-HSL [1,5 nmol] verwendet. Die Kennzeichnungen OC6, OC8, OC10 und OC12 beziehen sich auf die mit Hilfe der Standards, sowie Literaturvergleichen (Shaw *et al.*, 1997) als 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL und 3-oxo-C12-HSL identifizierten Spots der *P. aeruginosa* Extrakte.

Die produzierten Signalmoleküle sind Moleküle des Acyl-Homoserinlacton (AHL)-Typs. Neben den Hauptsignalmolekülen 3-oxo-C12-HSL des *las*-Systems und C4-HSL des *rhl*-

Systems, werden auch geringe Mengen 3-oxo-C6-HSL und C6-HSL, sowie Signalmoleküle mit acht bzw. zehn C-Atomen in der Acyl-Seitenkette von *P. aeruginosa* produziert.

In Abb. 20 ist gezeigt, dass sowohl in dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 (Wt), als auch in dem der *P. aeruginosa* Mutante PAFU2 ($\Delta bapF$) die Signalmoleküle beider *Quorum Sensing* Systeme in vergleichbaren Konzentrationen detektierbar waren. Somit zeigt sich auch hier kein Unterschied bei der Betrachtung der Phänotypen zwischen der Mutante und dem Wildtyp.

3.2.7 Wann wird die β-Aminopeptidase BapF von *P. aeruginosa* PAO1 exprimiert?

Nachdem sich kein Unterschied bei verschiedenen untersuchten Phänotypen (Rhamnolipidproduktion, Produktion der AHL-Signalmoleküle, Beweglichkeiten) zwischen dem Stamm *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) und der *bapF*-negativen Mutante PAFU2 zeigte, sollte untersucht werden, wann und unter welchen Bedingungen das β -Aminopeptidasegen *bapF* in *P. aeruginosa* transkribiert wird.

Zur Durchführung der verschiedenen Virulenztests wurden unter anderem die folgenden Kulturmedien verwendet: LB-Medium, M9-Medium (Glucose als C-Quelle), NB-Medium, PPGAS-Medium und SW-Medium (2.4.1). Die *P. aeruginosa* Stämme PAO1 (Wt) und PAFU2 ($\Delta bapF$) wurden bei 37°C in den verschiedenen Medien kultiviert und für die verschiedenen Experimente in der logarithmischen Phase (O.D.₅₈₀ von 0,5 bis 0,8) bzw. der stationären Phase (O.D.₅₈₀ > 1) geerntet. Für die Transkriptionsanalysen mittels *real-time* PCR wurden die Proben zu denselben Zeiten entnommen, die Gesamt-RNA isoliert (2.14.1) und davon jeweils 250 ng pro *real-time* PCR Ansatz verwendet, um die Transkripte des Gens *bapF* und des *housekeeping* Gens *rpoD* nachzuweisen. Das Gen *rpoD* kodiert für einen Transkriptionsregulator und ist essentiell für *P. aeruginosa* (Potvin *et al.*, 2008). RpoD (σ^{70}) gehört zu den Sigmafaktoren. Diese erkennen die Promotorregionen und interagieren wiederum mit den RNA-Polymerasen. *rpoD* wird konstitutiv exprimiert und so kann es als Referenzkontrolle für die *real-time* PCR verwendet werden.

In Tab. 14 sind exemplarisch Ergebnisse der *real-time* PCR Ergebnisse dargestellt, deren Gesamt-RNA-Proben aus Kulturen stammen, die sowohl im Komplexmedium LB, als auch im Minimalmedium M9 (mit Glukose als einzige C-Quelle) kultiviert worden sind. In beiden *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 (Wt) und PAFU2 ($\Delta bapF$) konnte zu den beiden Zeitpunkten und in den beiden getesteten Medien (LB und M9) Transkript des *housekeeping* Gens *rpoD* nachgewiesen werden (Abb. 21, Tab. 14). Für das Gen *bapF* konnte im *P. aeruginosa* PAO1

Wildtyp-Stamm unter keiner der getesteten BBedingungen Transkript nachgewiesen werden (Tab. 14). Der Stamm *P. aeruginosa* PAFU2 diente in diesem Fall als Negativkontrolle, da das Bakterium kein *bapF*-Gen mehr besitzt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *bapF* in keinem der getesteten Medien (LB-, M9-, NB-, PPGAS-, SW-Medium; Daten z. T. nicht gezeigt) unter den gewählten Bedingungen transkribiert wurde und somit auch nicht in den durchgeführten Virulenztests.

Tab. 14 Nachweis der Transkripte von *bapF* und des *housekeeping* Gens *rpoD* (als Positivkontrolle) in verschiedenen Wuchsphasen und verschiedenen Medien durch *real-time* PCR in den *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 (Wt) und PAFU2 ($\Delta bapF$).

Medium/Wuchsphase/ nachzuweisendes Transkript	P. aeruginosa PAO1 (Wt)	P. aeruginosa PAFU2 (ΔbapF)
LB/ log/ rpoD	+	+
LB/ log/ bapF	-	-
LB/ stat/ rpoD	+	+
LB/ stat/ bapF	-	-
M9 Glc/ log/ rpoD	+	+
M9 Glc/ log/ bapF	-	-
M9 Glc/ stat/ rpoD	+	+
M9 Glc/ stat/ bapF	-	-

M9 Glc: M9-Medium mit Glukose; log: logarithmische Phase; stat: stationäre Phase



Abb. 21 Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen real-time PCR zum Nachweis des Transkripts für bapF und das housekeeping Gen rpoD. Die real-time PCR Produkte wurden auf ein 2% iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Sowohl für den Stamm *P. aeruginosa* PAO1 (Wt), als auch für die *P. aeruginosa* $\Delta bapF$ -Mutante PAFU2 konnte deutlich gezeigt werden, dass in beiden Fällen das PCR-Produkt des housekeeping Gens rpoD akkumulierte. Für bapF war in beiden Fällen kein Transkript nachweisbar. In der Negativkontrolle (NK) wurde die RNA ohne vorherige Reverse Transkription in die PCR eingesetzt. Somit konnte eine Kontamination der Proben mit DNA ausgeschlossen werden. Das hier dargestellte Ergebnis stammt von *P. aeruginosa* Kulturen, die in LB-Medium bis zur logarithmischen Phase kultiviert wurden.

3.2.8 Konstruktion der Mutante *P. aeruginosa* PA14Δ*pa14_45210* (PA14FU3)

Der Stamm *P. aeruginosa* PA14 Wt ist der Referenzstamm für Untersuchungen der Virulenz in verschiedenen Infektionsmodellen (Lee *et al.*, 2006; Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2010).

P. aeruginosa PA14 besitzt ein Gen, kodiert durch den ORF *pa14_45210*, das auf Aminosäureebene 99,45 % Sequenzidentität zum BapF Protein aus *P. aeruginosa* PAO1 zeigt. In dem Protein von *P. aeruginosa* PA14 ist an Position 353 ein Arginin gegen ein Threonin und an Position 355 ein Alanin gegen ein Threonin ausgetauscht (Abb. 22).



Abb. 22 Proteinsequenzvergleich von den β -Aminopeptidase Enzymen BapF aus *P. aeruginosa* PAO1 und PA14_45210 aus *P. aeruginosa* PA14. Gezeigt ist der Ausschnitt der beiden Proteine, in dem Sequenzunterschiede aufgetreten sind. Identische Aminosäuren wurden schwarz hinterlegt. An Position 353 ist anstatt eines Arginins in der Sequenz von BapF ein Threonin (R \rightarrow T) in der Proteinsequenz von PA14_45210 von *P. aeruginosa* PA14 vorhanden. An Position 356 ist anstatt des Alanins ein Threonin (A \rightarrow T) in der Sequenz vorhanden.

Um die Auswirkungen der Deletion des Gens *bapF* bzw. *pa14_45210* in gut untersuchten und etablierten Maus-Virulenzmodellen zeigen zu können, wurde eine *pa14_45210* defiziente Mutante von *P. aeruginosa* PA14 konstruiert.

Diese Mutante, im Folgenden als PA14FU3 bezeichnet, wurde auf genau die gleiche Weise wie der Stamm *P. aeruginosa* PAFU2 durch das Mutageneseplasmid pSUP202 Δ bapF und homologe Rekombination hergestellt. Die *P. aeruginosa* PA14FU3 Mutante besitzt anstelle des Gens *pa14_45210* eine Ω -Gm^R-Insertionskassette im Genom. Die erfolgreiche Insertion der Ω -Gm^R-Insertionskassette wurde über PCRs und Sequenzierungen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.2.9 Die Expression des β-Aminopeptidasegens bapF von P. aeruginosa wird durch das β/α-Dipeptid Carnosin induziert

Von den bis jetzt beschriebenen β -Peptidyl Aminopeptidasen ist bekannt, dass sie in der Lage sind, sowohl β -Peptide, als auch gemischte β/α -Peptide, wie z. B. Carnosin, zu hydrolysieren. Um nachzuweisen, ob Carnosin in der Lage ist, die β -Aminopeptidasen aus den *P. aeruginosa* Wildtyp-Stämmen PAO1 und PA14 *in vivo* zu induzieren, wurden diese in M9-Medium mit Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert. Bei einer O.D.₅₈₀ von 0,9 wurden Proben für *real-time* PCR Analysen entnommen und auf das Vorhandensein des Transkripts für *bapF* bzw. *pa14_45210* hin untersucht. Unter diesen Bedingungen konnte in beiden *P. aeruginosa* Wildtyp Stämmen Transkript für das β -Aminopeptidase Gen nachgewiesen werden, wie durch Visualisierung auf einem Agarosegel gezeigt werden konnte (Abb. 23).

Als Negativkontrolle wurde den verschiedenen RT-Ansätzen keine Reverse Transkriptase zugegeben. Somit wurde keine cDNA als Matrize für die quantitative *real-time* PCR synthetisiert und demnach dürfte kein PCR-Produkt generiert werden. Mit dieser Kontrolle sollte eine Kontamination der Proben mit genomischer DNA ausgeschlossen werden (Abb. 23).



Abb. 23 Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen *real-time* PCR zum Nachweis der Transkripte für *bapF*, *pa14_45210* und die *housekeeping* Gene *rpoD* aus den *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 (Wt) und PA14 (Wt). Die Kultivierung der Stämme erfolgte in M9-Minimalmedium mit Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle. Die entstandenen *real-time* PCR Produkte wurden auf ein 2% iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Für beide untersuchten *P. aeruginosa* Wt Stämme konnte gezeigt werden, dass sowohl deutlich das PCR-Produkt des *bapF* bzw. *pa14_45210* Gens, als auch das der *housekeeping* Gene *rpoD* akkumulierte. In der Negativkontrolle (NK) wurde die RNA ohne vorherige Reverse Transkription in die PCR eingesetzt. Somit konnte eine Kontamination der Proben mit DNA ausgeschlossen werden. Das hier dargestellte Ergebnis stammt von *P. aeruginosa* Kulturen, die in M9-Medium mit Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert wurden. Die verschiedenen PCR Produkte sollten eine Größe zwischen 100 und 150 bp aufweisen.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression des β -Aminopeptidase Gens *bapF* von *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) durch das natürliche, im menschlichen Körper vorkommende β/α -Dipeptid Carnosin induziert wird. Auch für das *bapF*-homologe Gen *pa14_45210* aus

P. aeruginosa PA14 (Wt) konnte erstmals gezeigt werden, dass es durch Carnosin im Kulturmedium induziert wird. Der Nachweis erfolgte, genau wie bei *P. aeruginosa* PAO1, durch Transkriptnachweis von *pa14_45210* mittels *real-time* PCR und anschließender gelelektrophoretischer Analysen (Abb. 23).

3.2.10 Die β-Aminopeptidase wird für das Wachstum auf Carnosin von *P. aeruginosa* benötigt

Die phänotypische Charakterisierung der *P. aeruginosa* Wildtyp-Stämme PAO1 und PA14, sowie der Mutanten PAFU2 ($\Delta bapF$) und PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) zeigte, dass jeweils nur die *P. aeruginosa* Wildtypstämme in der Lage waren, in dem Kulturmedium zu wachsen, das als einzige C-Quelle Carnosin (4 % (w/v)) enthielt (Abb. 24; Abb. 25). Die *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) Kulturen zeigten nach 24-stündiger Kultivierung bei 37°C eine O.D.₅₈₀ von etwa 0,4. Nach 48-stündiger Bebrütung hatten sie die stationäre Phase bei einer O.D.₅₈₀ von etwa 1 erreicht (Abb. 24). Die Kulturen von *P. aeruginosa* PA14 (Wt) zeigten nach 24-stündiger Bebrütung schon eine O.D.₅₈₀ von etwa 1. Die folgenden zwei Stunden stieg die O.D.₅₈₀ noch an, bis sie dann auf dem Niveau stagnierte bzw. wieder abfiel (Abb. 25).



Abb. 24 Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) und der Δ*bapF*-Mutante PAFU2, sowie *P. aeruginosa* PAFU2 mit dem Leervektor pBBR1MCS-1 (PAFU2 LV) und *P. aeruginosa* PAFU2 mit dem Komplementationsplasmid pBBR1 MCS-1 *bapF* (PAFU2 ++*bapF*) in M9-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung der Stämme erfolgte über einen Zeitraum von 54 h. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen wieder



Abb. 25 Wachstum von *P. aeruginosa* PA14 (Wt) und der Δ*pa14_45210*-Mutante PA14FU3, sowie *P. aeruginosa* PA14FU3 mit dem Leervektor pBBR1MCS-3 (PA14FU3 LV) und *P. aeruginosa* PA14FU3 mit dem Komplementationsplasmid pBBR1 MCS-3 *bapF* (PA14FU3 ++*bapF*) in M9-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Carnosin als einzige Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung der Stämme erfolgte über einen Zeitraum von 30 h. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen wieder.

Im Gegensatz dazu konnte in den β -Aminopeptidase-negativen Mutanten *P. aeruginosa* PAFU2 ($\Delta bapF$) und PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) keine Veränderung der optischen Dichte und somit kein Wachstum über den jeweils beobachteten Zeitraum festgestellt werden (Abb. 24, 25). Auch über diesen Zeitraum hinaus konnte nach mehr als 7 Tagen kein Wachstum in beiden Mutantenstämmen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Erst durch das Einbringen einer plasmidkodierten Kopie von bapF in die Stämme P. aeruginosa PAF2 (PAFU2 ++bapF) und P. aeruginosa PA14FU3 (PA14FU3 ++bapF), konnte der vorher gezeigte Phänotyp aufgehoben werden, und die komplementierten Stämme zeigten ein sehr ähnliches Wuchsverhalten wie die dazugehörigen P. aeruginosa Wildtypstämme PAO1 und PA14 (Abb. 24; Abb. 25). In den so komplementierten Mutantenstämmen P. aeruginosa PAFU2 ++bapF und PA14FU3 ++bapF konnte während der Kultivierung in M9-Medium mit Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle das Transkript für das β-Aminopeptidasegen *bapF* in beiden Kulturen durch *real-time* PCR Analysen nachgewiesen werden. Die real-time PCR Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Für beide untersuchten Hilfe von komplementierten P. aeruginosa Stämme konnte gezeigt werden, dass sowohl deutlich das spezifische PCR-Produkt des bapF Gens, als auch das des housekeeping Gens rpoD akkumulierte. Eine Kontamination durch Plasmid-DNA konnte durch entsprechende Kontrollen ausgeschlossen werden (Abb. 26).



Abb. 26 Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen *real-time* PCR zum Nachweis der Transkripte für *bapF* und das *housekeeping* Gen *rpoD* in den komplementierten Stämmen *P. aeruginosa* PAFU2 ++*bapF* und PA14FU3 ++*bapF*. Anhand dieser Bilder konnte exemplarisch gezeigt werden, dass in beiden komplementierten *P. aeruginosa* Mutanten (PAFU2 ++*bapF* und PA14FU3 ++*bapF*) sowohl deutlich das PCR-Produkt des *bapF* Gens, als auch das des *housekeeping* Gens *rpoD* akkumulierte. Die hier dargestellten Ergebnisse stammen von *P. aeruginosa* Kulturen, die in M9-Medium mit Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert wurden. Die entstehenden PCR Produkte sollten eine Größe zwischen 100 und 150 bp aufweisen.

Um ausschließen zu können, dass die wiederhergestellten Phänotypen und das Wachstum auf Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle auf sekundäre Effekte durch die eingebrachten *bapF*-Plasmide zurückzuführen sind, wurde zusätzlich der entsprechende Leervektor pBBR1 MCS in die *P. aeruginosa* Stämme PAFU2 und PA14FU3 eingebracht. Die so erzeugten Stämme verhielten sich wie die Mutantenstämme PAFU2 ($\Delta bapF$) und PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) ohne Leervektor. In diesen Fällen konnte ebenfalls nach 48-stündiger Kultivierung in M9-Medium mit Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle kein Wachstum detektiert werden (Abb. 24; Abb. 25). Genau wie vorher beschrieben, zeigte sich bei diesen Stämmen auch hier nach weiteren sechs Tagen kein Wachstum (Daten nicht gezeigt).

Hiermit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Bakterium *P. aeruginosa* die β -Aminopeptidase BapF (bzw. das Protein PA14_45210) benötigt, um *in vivo* das Dipeptid Carnosin als Kohlenstoff- und Energiequelle im Kulturmedium verwerten zu können.

3.2.11 Die Mutanten P. aeruginosa PAFU2 (ΔbapF) und PA14FU3 (Δpa14_45210) verwerten die Einzelkomponenten des Carnosins – β-Alanin und L-Histidin – als Kohlenstoffquelle

Die beiden *P. aeruginosa* Wildtypstämme PAO1 und PA14 können auf Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle wachsen, da die β -Aminopeptidaseproteine der Wildtyp-Stämme in der Lage sind, das Carnosin zu hydrolysieren und diese Einzelkomponenten als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Den *P. aeruginosa* Mutanten PAFU2 und PA14FU3 fehlen zwar die β -Aminopeptidaseproteine, dennoch sollten sie in der Lage sein, auf den Einzelkomponenten des Carnosins zu wachsen. Um zu zeigen, ob die *P. aeruginosa* Mutanten PAFU2 ($\Delta bapF$) und PA14FU3 (Δpa_45210) die Aminosäuren β -Alanin und L-Histidin als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen können, und um mögliche negative Auswirkungen dieser Aminosäuren auf die Mutantenstämme auszuschließen, wurden sowohl die beiden *P. aeruginosa* Wildtypstämme als auch die β -Aminopeptidase-negativen Mutanten PAFU2 und PA14FU3 auf β -Alanin bzw. L-Histidin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle im Medium kultiviert. Die Konzentrationen der Aminosäuren β -Alanin und L-Histidin im verwendeten M9-Minimalmedium wurden entsprechend ihrem Mengenanteil im Carnosin für die Wachstumsversuche berechnet. Es wurden 1,6 % (w/v) β -Alanin und 2,7 % (w/v) L-Histidin in den jeweiligen Kulturmedien verwendet.



Abb. 27 Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) und den entsprechenden *P. aeruginosa* Mutanten PAFU2 ($\Delta bapF$) und PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) in M9-Minimalmedium mit 1,6 % (w/v) β -Alanin als einziger Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung und Dokumentation der Kulturen erfolgte über einen Zeitraum von 24 h. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen wieder.

Bei der Kultivierung der *P. aeruginosa* Wildtyp-Stämme und der β -Aminopeptidasenegativen Mutanten mit β -Alanin zeigt sich, dass alle Stämme ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten zeigen. Die O.D.₅₈₀ der Kulturen lagen bei allen nach 9-stündiger Bebrütung bei 37°C zwischen 0,8 und 0,9. Nach 24 Stunden fiel bei allen die O.D.₅₈₀ wieder ab (Abb. 27). Da alle *P. aeruginosa* Stämme ein gleich gutes Wachstum aufzeigten, konnte hier kein Hinweis darauf gefunden werden, dass β -Alanin einen negativen bzw. wachstumshemmenden Effekt auf die β -Aminopeptidase-negativen Mutanten PAFU2 und PA14FU3 haben könnte.

Ein vergleichbares Ergebnis wie bei dem Wachstum mit β -Alanin als einzige Kohlenstoffquelle im M9-Medium zeigte sich bei der Kultivierung der vier *P. aeruginosa* Stämme PA14, PAO1, PAFU2 und PA14FU3 mit L-Histidin als einzige Kohlenstoffquelle. Auch hier konnte für alle untersuchten *P. aeruginosa* Stämme Wachstum auf L-Histidin als einziger Kohlenstoffquelle nachgewiesen werden (Abb. 28).



Abb. 28 Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) und den entsprechenden *P. aeruginosa* Mutanten PAFU2 ($\Delta bapF$) und PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) in M9-Minimalmedium mit 2,7 % (w/v) L-Histidin als einzige Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung und Dokumentation der Kulturen erfolgte über einen Zeitraum von 30 h. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen wieder.

Während der ersten 9 Stunden der Kultivierung zeigt sich bei allen getesteten *P. aeruginosa* Stämmen ein sehr ähnliches Wachstum und die O.D.₅₈₀ Werte liegen bei etwa 0,5 bis 0,6. Nach 24-stündiger Bebrütung jedoch zeigen die Stämme *P. aeruginosa* PA14 (Wt) und PA14FU3 ($\Delta pa14_{45210}$) ein deutlich höheres Wachstum als die *P. aeruginosa* Stämme PAO1 (Wt) und PAFU2 ($\Delta bapF$). Hier liegen die O.D.₅₈₀ Werte bei etwa 1, im Vergleich zu etwa 0,7. Somit scheinen die Stämme *P. aeruginosa* PA14 (Wt) und PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) die Aminosäure L-Histidin aus bis jetzt noch nicht verstandenen Gründen besser im Energie- und Nahrungsstoffwechsel verwenden zu können.

Nach 24-stündiger Kultivierung sinkt die O.D.₅₈₀ bei allen *P. aeruginosa* Stämmen wieder (Abb. 28). Auch hier ergeben sich keine Hinweise auf eine mögliche wachstumshemmende Wirkung von L-Histidin auf die *P. aeruginosa* Mutanten PAFU2 und PA14FU3.

Somit liegen weitere Beweise vor, dass die β -Aminopeptidase (kodiert durch die Gene *bapF* und *pa14_45210*) aus *P. aeruginosa* für die Hydrolyse von Carnosin *in vivo* in den Bakterien verantwortlich ist, da die Wildtypstämme sowohl auf Carnosin, als auch auf den Einzelkomponenten wachsen können, die β -Aminopeptidase-negativen Stämme jedoch nur auf den Einzelaminosäuren, da ihnen das Carnosin-abbauende Enzym fehlt.

3.2.12 Carcinin und Anserin – zwei weitere β/α-Dipeptide im menschlichen Körper

Neben Carnosin kommen im menschlichen Körper noch zwei weitere β/α -Dipeptide mit ähnlicher Funktion und ähnlichem Aufbau vor: Carcinin (bestehend aus β -Alanin und Histamin) und Anserin (bestehend aus β -Alanin und N-Methylhistidin). Daher wurde getestet, ob die verschiedenen *P. aeruginosa* Stämme in der Lage sind, diese Dipeptide als Kohlenstoffquelle zu nutzen.

Beim Wachstum der verschiedenen *P. aeruginosa* Stämme auf Carcinin zeigte sich eine Situation ähnlich wie beim Wachstum mit Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle. Die *P. aeruginosa* Wildtyp-Stämme PA14 und PAO1 waren in der Lage das Carcinin zu hydrolysieren und die Einzelkomponenten als Kohlenstoffquelle zu verwerten (Abb. 29). Die *P. aeruginosa* Mutanten PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) und PAFU2 ($\Delta bapF$) waren dagegen nicht in der Lage das Carcinin als Kohlenstoffquelle zu nutzen.

Nach 9-stündiger Bebrütung erreicht der *P. aeruginosa* Stamm PAO1 (Wt) eine O.D.₅₈₀ von etwa 1 (Abb. 29), vergleichbar mit dem Wachstum auf Carnosin (Abb. 25). Der *P. aeruginosa* Stamm PA14 (Wt) erreicht nach dieser Kultivierungszeit eine O.D.₅₈₀ von etwa 0,8 (Abb. 29).



Abb. 29 Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) und den entsprechenden *P. aeruginosa* Mutanten PAFU2 ($\Delta bapF$) und PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) in M9-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Carcinin als einziger Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung und Dokumentation der Kulturen erfolgte über einen Zeitraum von 30 h. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen wieder.

Die Auswertungen der *real-time* PCR Ergebnisse ergaben, dass auch unter den hier gegebenen Bedingungen (Kultivierung mit Carcinin als einziger Kohlenstoffquelle im Medium) in beiden *P. aeruginosa* Wildtyp-Stämmen PAO1 und PA14 das Transkript der β -Aminopeptidasegene *bapF* bzw. *pa_45210* nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

Die β-Aminopeptidase-negativen Mutanten *P. aeruginosa* PAFU2 und PA14FU3 waren auch mit Carcinin als einziger Kohlenstoffquelle im Kulturmedium wiederum nicht in der Lage, das Dipeptid zu verstoffwechseln und somit war kein Wachstum detektierbar (Abb. 29).

Kultivierte man jedoch die *P. aeruginosa* Mutanten PAFU2 und PA14FU3 in M9-Medium, welches als einzige Kohlenstoffquelle das Histamin (Konzentration entsprechend des prozentualen Anteils im Carcinin) enthielt, so ließ sich hier Wachstum detektieren (Abb. 30; das Wachstum auf β -Alanin wurde bereits gezeigt (Abb. 27)).

Mit Histamin als Kohlenstoffquelle erreichen die *P. aeruginosa* Wildtyp-Stämme PAO1 und PA14 und die Mutante PAFU2 ($\Delta bapF$) nach 9-stündiger Kultivierung bei 37°C eine O.D.₅₈₀ von etwa 0,6 bis 0,7. Die *P. aeruginosa* Mutante PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$) zeigte die entsprechende O.D.₅₈₀ von 0,7 erst nach 24-stündiger Kultivierung (Abb. 30).



Abb. 30 Wachstum von *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) und PA14 (Wt) und den entsprechenden *P. aeruginosa* Mutanten PAFU2 und PA14FU3 in M9-Minimalmedium mit 2,4 % (w/v) Histamin als einziger Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung und Dokumentation der Kulturen erfolgte über einen Zeitraum von 26 h. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen wieder.

Ganz anders verhielt sich die Situation mit dem Carnosin-analogen Dipeptid Anserin. Mit Anserin als einzige Kohlenstoffquelle im Medium konnte sowohl in den *P. aeruginosa* Wildtyp-Stämmen PAO1 und PA14, als auch in den entsprechenden β -Aminopeptidasenegativen Mutanten PAFU2 und PA14FU3 kein Wachstum über einen Zeitraum von mehr als sieben Tagen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit scheint die β -Aminopeptidase aus *P. aeruginosa* das Anserin nicht oder nur in so geringem Maße hydrolysieren zu können, dass die Hydrolyse für kein detektierbares Wachstum ausreicht.

Anserin enthält, im Gegensatz zu Carnosin, eine zusätzliche Methylgruppe am Imidazolring. Durch diese Methylgruppe könnte es im katalytischen Zentrum des Enzyms zu sterischen Hinderungen beim Angriff an die Peptidbindung kommen, so dass das Enzym nicht in der Lage ist, Anserin zu spalten.

3.2.13 Ist die β-Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* an dessen Virulenz¹⁹ beteiligt?

Es wurde spekuliert, ob Carnosin für das humanpathogene Bakterium *O. anthropi* während der Infektion als Nahrungsquelle dienen könnte, da Carnosin in vielen menschlichen Geweben vorkommt (Geueke & Kohler, 2007).

Da das Enzym β -Aminopeptidase an der Hydrolyse des Carnosins beteiligt ist, war eine zentrale Frage der vorliegenden Arbeit, ob die Deletion der β -Aminopeptidase einen Einfluss auf die Virulenz von *P. aeruginosa* haben könnte, da bei den knappen Nährstoffressourcen im menschlichen Körper eine Nährstoffquelle nicht mehr zur Verfügung steht und die Bakterien sich eventuell nicht mehr gut vermehren können. Des Weiteren ist für Carnosin beschrieben, dass es an der Wundheilung beteiligt ist. Sollte das Bakterium nicht mehr in der Lage sein, das Carnosin aus Entzündungsstellen zu entfernen, könnte das zu einer schnelleren Wundheilung führen und das Bakterium hätte keine Chance mehr, sich schnell genug zu vermehren, um eine Infektion zu manifestieren.

Um die Hypothese, ob die β -Aminopeptidase von *P. aeruginosa* an der Pathogenität bzw. dem Infektionsvorgang beteiligt sein könnte, zu untersuchen, wurde die *P. aeruginosa* Mutante PA14FU3 (PA14 $\Delta pa14_45210$::Gm^R) in einem klinisch relevanten Lungeninfektionsmodell im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp *P. aeruginosa* PA14 untersucht (Abb. 31).



Abb. 31 Vergleich der Überlebensrate der infizierten Mäuse in einem Lungeninfektionsmodell mit dem *P. aeruginosa* PA14 (Wt) und der β -Aminopeptidase-negativen Mutante PA14FU3 ($\Delta pa14_45210$).

Pathogenität: die Fähigkeit eines Bakteriums bei einem Wirt als Krankheitserreger eine Erkrankung hervorzurufen. ¹⁹ Virulenz: Den Ausprägungsgrad (das Maß) der Pathogenität bezeichnet man als Virulenz.

Die Durchführung der Virulenzstudie erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. L. Rahme (Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital and Shriners Burns Institute, Boston, Massachusetts, USA).

Die Untersuchung der Virulenz des *P. aeruginosa* PA14 Wildtyp Stammes im Vergleich zur β -Aminopeptidase-negativen Mutante *P. aeruginosa* PA14FU3 wurde an sechs Wochen alten männlichen CD1 Mäusen durchgeführt. Als Inokulum wurden 1,3·10⁷ Bakterien verwendet. Die Mäuse, die mit dem *P. aeruginosa* PA14 Wildtypstamm infiziert worden waren, dienten als Kontrollgruppe, um den Verlauf der Wildtyp-Infektion aufzuzeichnen.

Nach der Infektion der Mäuse mit den jeweiligen Bakterienstämmen erfolgte die Betrachtung des Infektionsverlaufs über insgesamt fünf Tage. Die Aufzeichnung der Mortalität erfolgte nach 12 h, 24 h, 36 h, 48 h (2 Tagen), 60 h, 72 h (3 Tagen), 96 h (4 Tagen), 120 h (5 Tagen).

Die ermittelten Daten zeigen, dass innerhalb von 5 Tagen 90 % der Mäuse, die mit dem *P. aeruginosa* PA14 Wildtyp infiziert worden waren, gestorben sind. Von den Mäusen, die mit der *P. aeruginosa* PA14FU3 Mutante infiziert worden sind, starben 60 %. Jedoch sind die Werte von der *P. aeruginosa* Mutante PA14FU3 nicht signifikant gegenüber dem Wildtyp *P. aeruginosa* PA14 (Abb. 31). Die Ergebnisse aus dem ersten Experiment konnten nicht reproduziert werden, was wiederum zu den großen Standardabweichungen führt (Abb. 31). Aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen wurden die Experimente mit der *P. aeruginosa* Mutante PA14FU3 nur zweimal durchgeführt.

3.2.14 Das Gen *bapF* ist mit dem Gen *pa1485* in einem Operon lokalisiert

Für das Gen *bapF*, welches für die β-Aminopeptidase in *P. aeruginosa* PAO1 kodiert, wird postuliert, dass es mit dem Gen *pa1485* in einem Operon lokalisiert vorliegt (Abb. 32). Die gleiche Vorhersage wird für das putative β-Aminopeptidasegen *pa14_45210* aus *P. aeruginosa* PA14 getroffen. Dieses Gen soll mit dem Gen *pa14_45240* in einem Operon lokalisiert sein (Price *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 2009; Winsor *et al.*, 2009).

Die Gene *pa1485* und *pa14_45240* besitzen beide eine Länge von 1368 bp und kodieren für ein putatives Transporter-Protein mit 455 Aminosäuren. Für die Proteine sind 12 Transmembranhelices und die Lokalisation in der Cytoplasmamembran vorhergesagt (Winsor *et al.*, 2009).

Die Aminosäuresequenzen der putativen Aminosäuretransporter PA1485 und PA14_45240 aus den beiden *P. aeruginosa* Wildtyp-Stämmen PAO1 und PA14 zeigen 100 % Sequenz-identität.

Die Gene in einem Operon werden als polycistronische²⁰ mRNA transkribiert, und somit befinden sich mehrere offene Leserahmen auf einer mRNA. Die intergenische Region zwischen den Genen *pa1485* und *bap*F auf dem *P. aeruginosa* PAO1 Chromosom umfasst 13 bp. Um zu überprüfen, ob die Gene *pa1485* und *bapF* in einem Operon liegen, wurde aus *P. aeruginosa* Zellen Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde mit Hilfe von operonspezifischen Primern, die strangaufwärts im Gen *pa1485* (Primer RT 85_86 Operon up (P1); Tab. 3; Abb. 32) und strangabwärts im Gen *bapF* (RT 85_86 Operon dwn (P2); Tab. 3; Abb. 32) binden, durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.



Abb. 32 Lokalisation der Gene *pa1485* und *bapF* (*pa1486*) in einem vorhergesagten Operon im Chromosom von *P. aeruginosa* PAO1. Das Gen *pa1485* endet an Position 1612112 und das Gen *bapF* startet an Position 1612126 im *P. aeruginosa* Chromosom. Es liegen 13 bp zwischen den beiden Genen (Winsor *et al.*, 2009). Die Position der *real-time* PCR Primer ist mit P1 und P2 in der Abbildung eingetragen.

Sollten die Gene als Operon transkribiert werden, so müsste in der anschließenden *real-time* PCR mit den gewählten operonspezifischen Primern ein Produkt entstehen. Als Kontrolle wurden zusätzlich die genspezifischen Primer für die Transkripte von *bapF*, *pa1485* und *rpoD* in der RT-PCR verwendet.

In Abb. 33 ist das Ergebnis dieser RT-PCRs abgebildet. Es zeigt sich ein PCR-Produkt bei den Proben, die die genspezifischen Primer für die Gene *bapF*, *pa1485* und *rpoD* enthielten. Zusätzlich dazu erhielt man auch das genübergreifende Transkriptprodukt *pa1485/86*.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Gene *pa1485* und *bapF* in einem Operon lokalisiert sind und von einem gemeinsamen Promotor reguliert werden.

²⁰ Als polycistronisch wird eine mRNA bezeichnet, die von mehreren, hintereinander liegenden Cistrons (Genen) auf der DNA kodiert wird.



Abb. 33 Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte der quantitativen *real-time* PCR zum Nachweis, dass die Gene *pa1485* und *bapF* (*pa1486*) in einem Operon lokalisiert sind und als polycistronische mRNA in *P. aeruginosa* PAO1 transkribiert werden. Dazu wurden die *real-time* PCR Produkte auf ein 2% iges Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die PCR-Produkte des *bapF* Gens, des *pa1485* Gens und des *housekeeping* Gens *rpoD* akkumulierten. Zusätzlich dazu erhielt man noch Produkt bei der Probe, die die operonspezifischen Primer enthielten. Eine Verunreinigung durch genomische DNA konnte ausgeschlossen werden. Die entstehenden PCR Produkte sollten eine Größe zwischen 100 und 150 bp aufweisen.

Auch für die Gene *pa14_45210* und *pa14_45240* aus *P. aeruginosa* PA14 konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, dass sie als bicistronische mRNA transkribiert werden und somit in einem Operon lokalisiert vorliegen (Daten nicht gezeigt).

Sowohl bei der Auswertung der RT-PCR Ergebnisse für die Gene *pa1485* und *bapF*, sowie *pa14_45210* und *pa14_45240* fiel auf, dass die jeweiligen Transkripte nicht im gleichen Verhältnis in den Proben vorlagen (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptmengen von *pa1485* und *pa14_45240* waren immer höher als die Transkriptmengen von *bapF* und *pa14_45210*. Dies deutet auf eine posttranskriptionelle Regulation der bicistronischen mRNAs hin. Daraufhin wurde die bicistronische mRNA-Sequenz von *pa1485* und *bapF* genauer untersucht.

3.2.15 Die intergenische Region zwischen den Genen pa1485 und bapF

Die Gene *pa1485* und *bapF* werden im Genom von *P. aeruginosa* durch eine 13 bp lange intergenische Region (IR) verbunden. In dieser intergenischen Region konnte eine putative Ribosomenbindestelle (-AGGA-) 6 bp vor dem ATG Translationsinitiationskodon von *bapF* detektiert werden (Abb. 34).



Abb. 34 Darstellung der ausgebildeten Sekundärstruktur der mRNA in der intergenischen Region des Operons *pa1485/bapF* und in der Anfangssequenz von *bapF*. Die dargestellte Struktur wurde anhand des mfold-Programms berechnet. Berücksichtigt sind neben den 13 bp der intergenischen Region auch das *pa1485*-Translationsstopkodon und die ersten 13 bp von *bapF*, einschließlich des Startkodons. Die Nukleotide der putativen RBS und des Startkodons von *bapF* sind blau umrandet.

Des Weiteren scheint es so, dass unter Einbeziehung der intergenischen Region und der Startsequenz von *bapF* auf mRNA-Ebene eine doppelsträngige Haarnadelstruktur (*stem loop*) ausgebildet werden kann (Abb. 34). Solche Haarnadelstrukturen können als Bindestellen und Prozessierungssignale für verschiedene RNasen dienen (Ehretsmann *et al.*, 1992; Gamper & Haas, 1993) und somit über eine Veränderung der Stabilität polycistronischer Transkripte die Relation der Expressionsraten der einzelnen Leserahmen beeinflussen (Carrier & Keasling, 1997).

Die Gene in einem Operon sind oft funktionell miteinander verbunden. Um die mögliche funktionelle Beziehung zwischen *pa1485* und *bapF* herauszufinden, wurde das Protein PA1485 aus *P. aeruginosa* ebenfalls auf seine physiologische Funktion hin untersucht.

3.2.16 Physiologische Funktion des Proteins PA1485 in P. aeruginosa

Laut Vorhersage ist das Protein PA1485 als Membranprotein in der Cytoplasmamembran von *P. aeruginosa* lokalisiert; es sind 12 Transmembranhelices vorhergesagt. Die Funktion von PA1485 ist in der *Pseudomonas* Genom Datenbank (www.pseudomonas.com) als Aminosäure-Permease vorhergesagt. Das Protein zeigt 42 % Sequenzidentität mit einem putativen, kationischen Aminosäuretransporter aus *Streptomyces coelicolor* (Winsor *et al.*, 2009).

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Protein BapF für die Hydrolyse der β/α -Dipeptide Carnosin und Carcinin *in vivo* in dem Bakterium *P. aeruginosa* verantwortlich ist. Die vorhergesagte Lokalisation von BapF ist das Cytoplasma. Somit müssen die zu hydrolysierenden Dipeptide über die Cytoplasmamembran ins Cytoplasma transportiert werden, um dort dem Bakterium als Kohlenstoff- und Energiequelle zugänglich gemacht zu werden. Es wurde daher postuliert, dass der durch das Gen *pa1485* kodierte Aminosäuretransporter unter anderem für den Transport der Dipeptide Carnosin bzw. Carcinin verantwortlich sein könnte, da seine vorhergesagte Lokalisation in der Cytoplasmamembran ist und er im funktionellen Operon mit *bapF* lokalisiert ist.

3.2.17 Konstruktion einer *Apa1485*-Mutante PAFU1 in *P. aeruginosa*

Um das Postulat überprüfen zu können, wurde eine *pa1485*-negative Mutante in *P. aeruginosa* PAO1 konstruiert. Diese Mutante wird im Folgenden als *P. aeruginosa* PAFU1 bezeichnet.

Die Vorgehensweise der Herstellung der Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAFU1 (PAO1 $\Delta pa1485$::Gm^R) Mutante war weitgehend identisch mit der Herstellung der Insertionsmutante PAO1 $\Delta bapF$::Gm^R (Vergleich 2.12; 3.2.2).

Die jeweils etwa 700 bp großen, flankierenden, strangaufwärts und strangabwärts gelegenen Fragmente vom Gen *pa1485* wurden mit Hilfe der Oligonukleotide UR_*pa1485* up /UR_*pa1485* dwn und DR_ *pa148 5*up /DR_ *pa1485* dwn (Tab. 3) mittels PCR amplifiziert. An die 5'-Enden der amplifizierten Fragmente wurden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *NcoI* (UR_PA1485up) bzw. *Eco*RI (DR_PA1485up) inseriert, während an den 3'-Enden Erkennungssequenzen für die Enzyme *Eco*RI (UR_PA *pa1485* dwn) bzw. *PstI* (DR_ *pa1485* dwn) eingefügt wurden. Über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *PstI* wurden die Fragmente in den Vektor pSUP202 eingebracht. Die Insertion der Ω -Gm^R-Kassette erfolgte durch Restriktion mit *Eco*RI und anschließender Ligation. Der resultierende Mutagenesevektor pSUP202Δ*pa1485* (Δ*pa1485*::ΩGm^R in pSUP202; Abb. 55) wurde durch Konjugation mit Hilfe von *E. coli* S17-1 Zellen in *P. aeruginosa* PAO1 überführt. Die *P. aeruginosa* PAFU1 Mutanten wurden durch überpicken, jeweils auf Gentamycin-, bzw. Tetrazyklin-Platten, auf den Verlust des Vektoranteils hin untersucht. Die putativ positiven Mutanten wurden durch PCR- und Sequenzierreaktionen auf den Verlust des Gens *pa1485* hin untersucht und nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.2.18 Die *P. aeruginosa* PAFU1 (Δ*pa1485*) Mutante wächst nicht auf Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle

Wenn der putative Aminosäuretransporter PA1485 für den Transport der Dipeptide Carnosin und Carcinin in das Bakterium *P. aeruginosa* verantwortlich ist, dürfte die Mutante *P. aeruginosa* PAFU1 ($\Delta pa1485$) nicht mehr in Kulturmedien wachsen, die die β/α -Dipeptide als einzige Kohlenstoffquelle enthalten.

Es konnte tatsächlich gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* PAFU1 ($\Delta pa1485$) nicht in Kulturmedien mit Carnosin oder Carcinin als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnte (Abb. 35; Daten mit Carcinin nicht gezeigt). Somit könnte das Protein PA1485, das als putativer Aminosäuretransporter in *P. aeruginosa* beschrieben ist, der Transporter von Carnosin bzw. Carcinin sein.

Durch Komplementation der Mutante PAFU1 mit dem Plasmid pBBR1 MCS-1 *pa1485*, das eine Kopie des putativen Aminosäuretransportergens *pa1485* enthielt, konnte der gezeigte Phänotyp der Mutante jedoch nicht aufgehoben werden. Auch dieser Stamm (PAFU1 ++*pa1485*) zeigte auch nach mehr als sieben Tagen kein Wachstum (Abb. 35; Daten z. T. nicht gezeigt). Der in den Stamm *P. aeruginosa* PAFU1 durch Konjugation eingebrachte Leervektor pBBR1 MCS-1 (PAFU1 LV) zeigte keine Effekte und auch dieser Stamm war nicht in der Lage unter den gegebenen Bedingungen zu wachsen.

Es zeigte sich jedoch, dass der durch eine plasmidkodierte Kopie von *bapF* komplementierte Stamm *P. aeruginosa* PAFU1 ++*bapF* wieder auf Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnte und ein sehr ähnliches Wuchsverhalten wie der *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) Stamm zeigte (Abb. 35; Abb. 25). Somit hatte die Insertion der Ω -Gm^R-Kassette an die Stelle des Gens *pa1485*, in dem Stamm *P. aeruginosa* PAFU1 ($\Delta pa1485$) einen Einfluss auf die Transkription des Gens *bapF*. Dadurch konnte kein BapF-Protein mehr translatiert werden. Das bestätigt zusätzlich das Vorhandensein eines Operons. Durch das plasmidkodierte BapF wurde dieser Defekt ausgeglichen und die Bakterienzellen konnten wieder wachsen.

Der Aminosäuretransporter PA1485 ist daher nicht oder nicht einzig für den Import von den β/α -Dipeptiden Carnosin bzw. Carcinin in *P. aeruginosa* verantwortlich.



Abb. 35 Wachstumsverhalten der *P. aeruginosa* Stämme PAFU1 (*Apa1485*), *P. aeruginosa* PAFU1 mit den Komplementationsplasmiden pBBR1 MCS-1 *pa1485* (PAFU1 ++*pa1485*) bzw. *bapF* (PAFU1 ++*bapF*) und mit dem Leervektor pBBR1MCS-1 (PAFU1 LV) in M9-Minimalmedium mit 4 % (w/v) Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung der Stämme erfolgte über einen Zeitraum von 54 h. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen wieder.



Abb. 36 Wachstum von *P. aeruginosa* PAFU1 in M9-Minimalmedium mit 2,7 % (w/v) L-Histidin bzw. 1,6 % (w/v) β -Alanin als einzige Kohlenstoffquelle. Die Kultivierung und Dokumentation der Kulturen erfolgte über einen Zeitraum von 24 h bzw. 30 h. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen wieder.

Das Wachstum des *P. aeruginosa* Stammes PAFU1 ($\Delta pa1485$) war auf den Einzelkomponenten von Carnosin (β -Alanin und L-Histidin) als Kohlenstoffquellen nicht beeinträchtigt. Hier zeigte sich, genau wie in der *P. aeruginosa* PAFU2 ($\Delta bapF$) Mutante, ein Wachstum das vergleichbar mit dem des *P. aeruginosa* PAO1 (Wt) war (Abb. 36; Abb. 27; Abb. 28). Die Mutante PAFU1 ($\Delta pa1485$) erreicht in beiden Kohlenstoffquellen etwa eine O.D.₅₈₀ von 0,7 bis 0,8.

3.2.19 Wann wird das Gen für den putativen Aminosäuretransporter *pa1485* transkribiert?

Da die Gene pa1485 und bapF in einem Operon lokalisiert sind, werden sie als polycistronische mRNA transkribiert. Somit sollte das Transkript für pa1485 ebenfalls nur unter den Bedingungen nachweisbar sein, unter denen auch das Transkript für bapF in *P. aeruginosa* nachweisbar vorlag.

In den durchgeführten *real-time* PCRs zeigte sich jedoch, dass unter allen getesteten Bedingungen (Medien, Wuchsphase) das Transkript für *pa1485* in den *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 (Wt) und PAFU2 ($\Delta bapF$) nachweisbar war, auch wenn kein Transkript für *bapF* nachweisbar war (Tab. 15). Auch in den anderen getesteten Medien (NB-, PPGAS- und SW-Medium) konnte das Transkript für *pa1485* in den beiden *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 (Wt) und PAFU2 ($\Delta bapF$) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die *P. aeruginosa* PAFU1 ($\Delta pa1485$) Mutante diente in diesem Fall als Negativkontrolle, da durch die Insertion der Ω -Gm^R-Kassette in das Gen *pa1485* natürlicherweise kein Transkript mehr für *pa1485* nachgewiesen werden kann (Tab. 15).

Tab. 15 Nachweis der Transkripte von *pa1485* und *bapF* in verschiedenen Wuchsphasen und verschiedenen Medien durch *real-time* PCR in den *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 Wt, PAFU2 und PAFU1.

Medium/Wuchsphase/	P. aeruginosa	P. aeruginosa	P. aeruginosa
nachzuweisendes Transkript	PAO1 (Wt)	PAFU2 (ΔbapF)	PAFU1 (Δ <i>pa1485</i>)
$LB/\log/bapF$	-	-	-
LB/ log/ <i>pa1485</i>	+	+	-
LB/ stat/ bapF	-	-	-
LB/ stat/ pa1485	+	+	-
M9 Glc/ log/ bapF	-	-	-
M9 Glc/ log/ pa1485	+	+	-
M9 Glc/ stat/ bapF	-	-	-
M9 Glc/ stat/ pa1485	+	+	-
Medium/Wuchsphase/	P. aeruginosa	P. aeruginosa	P. aeruginosa
----------------------------	---------------	------------------------	--------------------------
nachzuweisendes Transkript	PAO1 (Wt)	PAFU2 (Δ <i>bapF</i>)	PAFU1 (Δ <i>pa1485</i>)
M9 Car/ <i>bapF</i>	+	k. W.	k. W.
M9 Car/ <i>pa1485</i>	+	k. W.	k. W.
M9 β-Ala/ <i>bapF</i>	-	-	-
M9 β-Ala/ <i>pa1485</i>	+	+	-
M9 L-His/ bapF	-	-	-
M9 L-His/ pa1485	+	+	-

Glc: Glucose; Car: Carnosin; β-Ala: β-Alanin; L-His: L-Histidin (jeweils als einzige C-Quelle im M9-Medium); log: logarithmische Phase; stat: stationäre Phase; k. W.: kein Wachstum

3.3 In vitro Charakterisierung der β-Aminopeptidase BapF aus P. aeruginosa

3.3.1 Die β-Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* lässt sich in dem heterologen Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) aktiv exprimieren

Um das Protein BapF *in vitro* weitergehend charakterisieren zu können, wurde das Gen *bapF* aus dem *P. aeruginosa* Genom mit den Primern *pa1486* up und *pa1486* dwn (Tab. 3) durch PCR amplifiziert. Durch die eingeführten Restriktionsendonukleasesequenzen *NdeI* und *Eco*RI konnte das PCR-Produkt und das Expressionsplasmid pET22b(+) restringiert und durch eine anschließende Ligationsreaktion zusammengeführt werden. Das resultierende Expressionsplasmid pET22b *bapF* (Tab. 2) wird im Folgenden als pEF (Abb. 53) bezeichnet. Dieses Plasmid trägt das β -Aminopeptidasegen unter Kontrolle des T7-Promotors und ermöglicht somit eine kontrollierte Expression in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3), der ein chromosomal kodiertes T7-Polymerasegen trägt.

Durch Transformation wurde das Expressionsplasmid pEF und der Leervektor pET22b in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) übertragen. Die Kultivierung der resultierenden *E. coli* BL21(DE3) Stämme (*E. coli* BL21(DE3) pEF und *E. coli* BL21(DE3) pET22b LV) erfolgte in LB-Medium bei 30°C. Die Induktion der Genexpression erfolgte in der logarithmischen Wuchsphase (O.D.₅₈₀ 0,4 - 0,6) durch Zugabe von 0,4 mM IPTG. Die *E. coli* Stämme wurden nach der Induktion weitere 4 h bei 30°C kultiviert. Danach erfolgte die Abnahme von Proben für den Standardaktivitätstest für β-Aminopeptidasen, sowie für die SDS-Gelelektrophorese.

Wie erwartet, konnte nur in der *E. coli* BL21(DE3) Überexpressionskultur, die das Expressionsplasmid pEF trug, Aktivität nachgewiesen werden. In der Kultur, die den Leervektor pET22b trug, zeigte sich unter Standardtestbedingungen (2.8.2) keine Aktivität.

Die β -Aminopeptidase BapF besteht aus mehreren Untereinheiten (α - und β -Untereinheit). Die errechneten Größen von 24,7 kDa für die α -Untereinheit und 13,8 kDa für die β -Untereinheit stimmen gut mit den Überexpressionsbanden auf dem SDS-Gelbild in Spur 2 überein (Abb. 37). MALDI-TOF Untersuchungen haben bestätigt, dass die als α - und β -Untereinheit deklarierten Banden auf dem SDS-Gel dem Protein BapF aus *P. aeruginosa* zuzuordnen sind. Diese Banden fehlen in Spur 1, wo Gesamtzellextrakt der *E. coli* BL21(DE3) Kultur aufgetragen wurde, die als Kontrolle den pET22b LV enthielt (Abb. 37).



Abb. 37 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese der heterolog exprimierten β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa*. Es wurden Proben von Kulturen aufgetragen, die 4 h nach IPTG Zugabe entnommen wurden. Die aufgetragenen Volumina der Proben wurden auf gleiche Zelldichten bezogen (O.D._{580nm}= 0,10). Zur Visualisierung der Banden wurden die 15% igen Trenngele mit Coomassie Brillant Blue gefärbt. S: Proteinmarker (BioRad, München); Spur 1 Gesamtzellextrakt von *E. coli* BL21(DE3) mit dem Leervektor pET22b; Spur 2 Gesamtzellextrakt von *E. coli* BL21(DE3) mit dem Expressionsplasmid pEF.

3.3.2 Reinigung der β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa*

Die Reinigung der heterolog im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) exprimierten β -Aminopeptidase BapF erfolgte aus etwa 4 g Zellmasse (Feuchtgewicht; entspricht 1,2 l Kulturvolumen) durch Säulenchromatographie, wie unter 2.7.4 beschrieben. Der Erfolg der Expression des β -Aminopeptidase-Enzyms BapF in *E. coli* BL21(DE3), sowie dessen Reinigung wurden mittels SDS-PAGE und Bestimmung der Aktivität verfolgt. Die während der Elutionsphase des Proteins BapF aufgenommenen Laufprofile der einzelnen Säulen sind in den Abb. 38 A und Abb. 39 A dargestellt.



Abb. 38 Reinigung der β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* PAO1 durch Verwendung der Anionenaustauscherchromatographiesäule Q-Sepharose FF. A Elutionsprofil von BapF. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0 auf 100 % NaCl (entspricht 0 bis 0,5 M NaCl). Der schwarze Balken im Diagramm gibt die Elutionsfraktionen wieder, in der aktives BapF-Protein durch den Standardaktivitätstest nachgewiesen werden konnte. B Zur Kontrolle wurden die Elutionsfraktionen, in denen aktives BapF-Protein nachweisbar war, auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Färbung des Trenngels mit Coomassie Brilliant Blue. Spur S: Proteinmarker "Precision Plus Dual Color" (BioRad, München). Spur 1: Lösliche Fraktion des GZE der Überexpressionskultur (1:10 verdünnt), die als Ausgangsprobe zur Aufreinigung auf die Q-Sepharose-Säule gepumpt wurde. Spur 2-13: Elutionsfraktionen, die aktives BapF-Protein enthielten.



Abb. 39 Weiterer Reinigungsschritt der β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* PAO1 durch Verwendung der hydrophoben Interaktionschromatographiesäule mit Butyl-Sepharose als Matrix. A Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem Ammoniumsulfat-Gradienten von 100 auf 0 % (entspricht 1 bis 0 M Ammoniumsulfat). Der schwarze Balken im Diagramm gibt die Elutionsfraktionen wieder, in der aktives BapF-Protein durch den Standardaktivitätstest nachgewiesen werden konnte. B Zur Kontrolle wurden die Elutionsfraktionen, in denen aktives BapF-Protein nachweisbar war, auf ein 15% iges SDS-Gel aufgetragen. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Färbung des Trenngels mit Coomassie Brilliant Blue. Spur S: Proteinmarker "Precision Plus Dual Color" (BioRad, München). Spur 1: Aufkonzentrierte Proteinprobe nach dem Lauf über die Q-Sepharose-Säule (1:10 verdünnt), die als Ausgangsprobe zur Aufreinigung auf die Butyl-Sepharose-Säule gepumpt wurde. Spur 2-12: Elutionsfraktionen, die aktives BapF-Protein enthielten.

Nach jedem Säulendurchlauf wurden die einzelnen Elutionsfraktionen auf das Vorhandensein des aktiven BapF-Proteins hin untersucht. Des Weiteren wurden die Fraktionen mit aktivem Protein auf 15% ige SDS-Gele aufgetragen, um zusätzliche Kontrollen der einzelnen Fraktionen zu haben (Abb. 38 B und Abb. 39 B). Wie erwartet, konnte man auf den SDS-Gelen die beiden Untereinheiten des Proteins BapF bei einer Größe von etwa 14 kDa und 25 kDa sehen. Die Abnahme der kontaminierenden Proteine lässt sich ebenfalls gut in den abgebildeten SDS-Gelen verfolgen.

Die Fraktionen, die aktives BapF-Protein aufwiesen, wurden zusammengeführt und für den nächsten Säulenaufreinigungsschritt bzw. für folgende Aktivitätstests aufbereitet.

Tab. 16 zeigt eine Übersicht über die gemessenen Aktivitäten der einzelnen Schritte der Aufreinigung von BapF. Aus etwa 4 g Bakterienzellmasse, die aus Überexpressionskulturen stammten, erhielt man nach dem letzten Reinigungsschritt unter Standardtestbedingungen mit dem chromogenen Substrat H- β hGly-pNA eine totale Aktivität von 8,3 U mit einer spezifischen Aktivität von 1,43 U/mg.

Tab.	16	Übersicht	über	die	Aufreinigungsschritte	der	β-Aminopeptidase	BapF	durch	Säulen-
chron	natog	graphie.								

Aufreinigungs-	Gesamt-	Gesamt-	Volumetrische	Spezifische	Ausbeute
schritte	protein	aktivität	Aktivität	Aktivität	
	[mg]	[U]	[U/ml]	[U/mg]	[%]
Lösliche	530,4	129	6,4	0,24	100
Fraktion					
Q-Sepharose	67,1	41,1	20,5	0,61	32
Butyl-Sepharose	5,8	8,3	4,1	1,43	6

Mit dem gereinigten Protein BapF (Abb. 40) wurden die weiteren biochemischen Charakterisierungen des Proteins durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden.



Abb. 40 SDS-Gel des aufgereinigten BapF-Proteins. Es wurden 10 μ g BapF-Proteinlösung auf das Gel aufgetragen (Spur 1). Zur Visualisierung der Banden wurde das SDS-Trenngel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Auch hier zeigen sich die α - und β -Untereinheit von BapF bei einer Größe von etwa 14 kDa und 25 kDa. Spur S: Proteinmarker "Precision Plus Dual Color" (BioRad, München).

3.3.3 Das native β-Aminopeptidaseprotein BapF aus *P. aeruginosa* ist ein (αβ)₄-Homotetramer

Für die bereits charakterisierten β -Aminopeptidasen aus den Stämmen *O. anthropi*, *Pseudomonas* sp. MCI3434, *Sphingosinicella xenopeptidilytica* 3-2W4 und *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2 konnte gezeigt werden, dass die nativen Proteine eine Größe von 130 bis 160 kDa aufwiesen, sich jeweils aus 4 α - und 4 β -Untereinheiten zusammensetzen und ein Homotetramer bilden (Komeda & Asano, 2005; Geueke *et al.*, 2006).

Um zu überprüfen, ob die β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* ebenfalls als $(\alpha\beta)_4$ -Homotetramer vorliegt, sollte die native molekulare Masse des Proteins mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt werden. Die Trennung der Proteine findet hier rein aufgrund der Größe statt.

Dazu wurde das Protein BapF zunächst wie oben beschrieben durch die Anionenaustauschchromatographie und die hydrophobe Interaktionschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurde die Protein-Lösung über eine Superdex 200 *p.g.*-Säule aufgetrennt. Die Eichung der Säule erfolgte mit den Standardproteinen Ribonuklease A (13,7 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), Albumin (67 kDa), Aldolase (158 kDa), Katalase (232 kDa) und Ferritin (440 kDa). Anhand der ermittelten Eichgerade (Abb. 41) konnte die molekulare Masse von BapF bestimmt werden.



Abb. 41 Eichgerade der Größenausschlusschromatographie zur Bestimmung der nativen molekularen Masse der β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa*. BapF und sechs Standardproteine wurden über eine *HiLoad* 16/60 Superdex 200 *p.g.*-Säule aufgetrennt. Als Elutionspuffer diente 50 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 6. Anhand des Verhaltens der Eichproteine konnte die native molekulare Masse von BapF bestimmt werden.

Die Größenausschlusschromatographie für die β-Aminopeptidase BapF wurde zwei Mal unabhängig durchgeführt. Die experimentell ermittelten nativen molekularen Massen von BapF wichen nur geringfügig mit 139,96 kDa und 141,37 kDa voneinander ab. Die errechnete molekulare Masse von 154 kDa korreliert sehr gut mit den experimentell ermittelten Daten.

Geht man von einer gleichmäßigen Verteilung der α - und β -Untereinheiten im Proteinkomplex aus, so ergibt sich, dass in dem Proteinkomplex, der das native BapF-Enzym bildet, vier α - und vier β -Untereinheiten vorliegen.

Das durchgeführte Experiment gibt den Hinweis, dass die β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* PAO1 im nativen, aktiven Zustand aus jeweils vier α - und vier β -Untereinheiten besteht und als Homotetramer vorliegt.

3.3.4 Das pH-Optimum der β-Aminopeptidase BapF liegt bei 5,5

Das pH-Optimum der gereinigten β -Aminopeptidase BapF wurde unter Verwendung eines Universalpuffers, anstatt des sonst üblichen Tris-HCl Puffers, durchgeführt (Teorell & Stenhagen, 1938). Die Aktivität von BapF bei den verschiedenen pH-Werten wurde unter Standardbedingungen gemessen. Es zeigt sich, dass die β -Aminopeptidase BapF ihr pH-Optimum im schwach sauren Bereich bei 5,5 hat (Abb. 42). Wird der pH-Wert jedoch weiter erniedrigt, fällt die Aktivität rapide ab und bei einem pH-Wert von 4 ist das Enzym vollständig inaktiv. Im neutralen bis leicht basischen Bereich (pH 7,5 bis 11) liegt die Aktivität nur noch zwischen 10 und 20 Prozent der Ausgangsaktivität. Im stark basischen Bereich bei pH 12 steigt die Aktivität von BapF wieder geringfügig an (Abb. 42).



Abb. 42 pH-Abhängigkeit der Aktivität der β-Aminopeptidase BapF.

3.3.5 Das Temperatur-Optimum der β-Aminopeptidase BapF liegt bei 37°C

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums der β -Aminopeptidase BapF wurde das Enzym bei verschiedenen Temperaturen (im Bereich von 20°C bis 60°C) für eine Stunde inkubiert und anschließend wurde die Aktivität unter Standardtestbedingungen durch Hydrolyse des chromogenen Substrats H- β hGly-*p*NA spektrophotometrisch bestimmt. Es zeigte sich, dass das Enzym BapF bei Temperaturen über 50°C direkt inaktiviert wird. Bei Temperaturen im moderaten Bereich (20°C bis 30°C) wies das Enzym eine maximale relative Aktivität von 40 % auf, verglichen mit der Aktivität, die bei der optimalen Temperatur von 37°C ermittelt werden konnte (Abb. 43).



Abb. 43 Bestimmung des Temperatur-Optimums der β -Aminopeptidase BapF in einem Temperaturbereich von 20°C bis 60°C.

3.3.6 Die β-Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* PAO1 wird nicht durch gängige Protease-Inhibitoren gehemmt

Zur Hemmung der breit gefächerten Gruppe der Proteasen wurden die verschiedensten Protease-Inhibitoren entwickelt.

Es wurde der Einfluss allgemein verwendeter Protease-Inhibitoren und des Chelatkomplexbildners EDTA auf die Aktivität der β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* PAO1 untersucht. Die Bestimmung der Aktivität von BapF erfolgte durch den photometrischen Standardtest wie er unter 2.8.2 beschrieben wurde. Die verwendeten Konzentrationen der ausgewählten Inhibitor-Substanzen wurden so gewählt, dass diese laut Herstellerangaben mindestens im Bereich der effektiven inhibitorischen Arbeitskonzentrationen dieser Inhibitor-Substanzen lagen. Effektive inhibitorische Arbeitskonzentrationen sind von: EDTA 0,5 - 1,5 mM; Bestatin 0,01 - 0,1 mM; PMSF 0,1 - 4 mM; Pefabloc SC 0,4 - 4 mM.

Keine der getesteten Substanzen verursachte eine signifikante Abnahme der Aktivität von BapF im Vergleich zur Aktivität von BapF ohne inhibierende Substanzen (Abb. 44). Durch die Substanzen Bestatin (1 mM) und PMSF (1 und 10 mM) und Pefabloc SC (4 mM) konnte die Aktivität von BapF im Vergleich zur Aktivität ohne Zusätze sogar noch gesteigert werden (Abb. 44). Es scheint, dass diese Substanzen eine stabilisierende Wirkung auf das BapF-Enzym oder auf den Enzymassay haben.



Abb. 44 Einfluss verschiedener Protease-Inhibitoren und dem Chelatkomplexbildner EDTA auf die Aktivität der β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* PAO1. Die Aktivität wurde durch die enzymkatalysierte Hydrolyse des Standardsubstrats H- β hGly-pNa in Anwesenheit der verschiedenen Substrate photometrisch verfolgt. Im Diagramm angegeben ist die Relative Aktivität [%] in Bezug auf die Aktivität der β -Aminopeptidase BapF ohne Zusatz von weiteren Substanzen.

3.3.7 Bestimmung des Substratspektrums von BapF

Bei der konventionellen Methode, Proteaseaktivität festzustellen, wird einer Protease ein Substrat, z. B. Casein, zur Verfügung gestellt und die Spaltung dieses Substrates wird nachgewiesen (Spencer *et al.*, 1975). Um zu untersuchen, ob BapF Standardproteaseaktivität zeigt, wurde das Enzym in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert und der GZE dieser Proben auf eine *Skim Milk*-Platte aufgebracht. Als Positivkontrolle diente *P. aeruginosa* PAO1 (Wt). Der GZE, der die heterolog überexprimierte β -Aminopeptidase BapF enthielt, zeigte keine Aktivität gegenüber dem Standardproteasesubstrat Casein, das in Magermilchpulver enthalten ist (Abb. 45).



Abb. 45 Untersuchung der Proteaseaktivität der β-Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* gegen das Standardproteasesubstrat Casein. Die Proteaseaktivität wird durch klare Höfe um die aufgetragenen Proben sichtbar.

Zur Aufklärung des Substratspektrums von BapF wurde gereinigtes Enzym in den Enzymtests verwendet. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten [U/mg] von BapF für die in Tab. 17 aufgeführten chromogenen Peptid-Analoga (H-L-Ala $\cdot p$ Na, H-D-Ala $\cdot p$ Na, H-BhGly $\cdot p$ Na, H-L- $\beta^{3}hAla \cdot p$ Na, H-D- $\beta^{3}hAla \cdot p$ Na, H-L- $\beta^{3}hAla \cdot p$ Na, H-L

Es zeigte sich, dass die β -Aminopeptidase BapF sowohl in der Lage ist, die Substrate mit α -Alanin (H-L-Ala $\cdot p$ Na und H-D-Ala $\cdot p$ Na), als auch die Substrate mit β -Alanin am N-terminalen Ende (H-L- β^3 hAla $\cdot p$ Na und H-L- β^3 hPhe $\cdot p$ Na) zu hydrolysieren. Bei den Substraten mit α -Aminosäuren am N-terminalen Ende wurden beide Enantiomere gleich gut von BapF hydrolysiert. Bei den Substraten mit β -Alanin wurde das L-Enantiomer von BapF präferiert. Die spezifische Aktivität für das L-Enantiomer lag hier bei 0,66 U/mg, im Gegensatz zu 0,02 U/mg beim D-Enantiomer (Tab. 17).

Bei den Substraten mit den β -Homoaminosäuren β -Phenylalanin oder β -Leucin am N-terminalen Ende des Dipeptids konnte keine Hydrolyse festgestellt werden (Tab. 17; n.m.: nicht messbar).

Substrat	Strukturformel	Aktivität BapF	
		Spez. Aktivität [U/mg]	
H-L-Ala∙ <i>p</i> Na	H ₂ N NO ₂	+ 0,70 U/mg	
H-D-Ala∙ <i>p</i> Na	H ₂ N NO ₂	+ 0,73 U/mg	
H-βhGly· <i>p</i> Na	H ₂ N H	+ 1,34 U/mg	
H-L-β ³ hAla∙ <i>p</i> Na	H ₂ N NO ₂	+ 0,66 U/mg	
H-D-β ³ hAla∙ <i>p</i> Na	H ₂ N NO ₂	+ 0,02 U/mg	
H-L-β ³ hPhe∙ <i>p</i> Na	NO ₂	- n.m.	

Tab. 17 Bestimmung der Aktivität von BapF gegenüber verschiedenen Substraten.

Substrat	Strukturformel	Aktivität BapF	
		Spez. Aktivität [U/mg]	
H-D-β ³ hPhe∙ <i>p</i> Na	H ₂ N H	- n.m.	
H-L-β ³ hLeu∙ <i>p</i> Na	NO ₂	- n.m.	
Carnosin	H ₂ N O O N N H	+	
Carcinin	H NH2 NH2	+	

n.m.: nicht messbar

Die Hydrolyse der β/α -Dipeptide Carnosin und Carcinin durch die β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* wurde mittels HPLC Analysen gezeigt. Dazu wurden die Substrate Carnosin und Carcinin (jeweils 5 mM Substratkonzentration) mit dem Enzym BapF (1 mg/ml) bei 37°C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte nach 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne Enzym inkubiert, um die Autoproteolyse der Dipeptide ausschließen zu können.

Das Dipeptid Carnosin wurde nach 60 min bei einer Inkubationstemperatur von 37°C nahezu vollständig durch die β -Aminopeptidase BapF hydrolysiert. Es zeigt sich eine deutliche Abnahme des Peaks für Carnosin, bei einer gleichzeitigen Zunahme der Peaks für die Hydrolyseprodukte des Carnosins, β -Alanin und L-Histidin (Abb. 46 A,B). Durch Kontrollansätze ohne Zusatz von BapF-Enzym konnte gezeigt werden, dass unter den verwendeten Testbedingungen keine Autohydrolyse des Carnosins stattfindet, da hier ebenfalls nach 60 min Inkubation nur das Carnosin detektierbar war (Daten nicht gezeigt).



Abb. 46 Nachweis der Hydrolyse des β/α -Dipeptids Carnosin durch die β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* mittels HPLC-Analysen nach 0 min (A) und 60 min (B) Inkubationszeit.

Die Hydrolyse des Dipeptids Carcinin durch die β -Aminopeptidase BapF erfolgt effizienter. Bei den gleichen Testbedingungen, wie beim Carnosin, findet die vollständige Hydrolyse des Carcinins bereits nach etwas mehr als 10 min statt (Abb. 47 A,B). Nach 10 min ist nur noch ein sehr kleiner Peak für das Carcinin zu sehen. Nach 20 min Inkubationszeit konnten nur noch die Hydrolyseprodukte des Carcinins, β -Alanin und Histamin, nachgewiesen werden. Dies zeigte sich anhand der aufgenommenen Diagramme (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Fall konnte durch die entsprechenden Kontrollansätze gezeigt werden, dass das Dipeptid unter den angewendeten Testbedingungen stabil ist und es zu keiner Autohydrolyse kommt (Daten nicht gezeigt).



Abb. 47 Nachweis der Hydrolyse des β/α -Dipeptids Carcinin durch die β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* mittels HPLC-Analysen nach 0 min (A) und 10 min (B) Inkubationszeit.

Somit konnte auch *in vitro* erstmals gezeigt werden, dass die β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* in der Lage ist, die beiden natürlich vorkommenden β/α -Dipeptide Carnosin und Carcinin zu hydrolysieren.

4 Diskussion

Die weiße oder industrielle Biotechnologie stellt den Zweig der Biotechnologie dar, der biotechnologische Methoden für industrielle Produktionsverfahren mit dem Ziel der nachhaltigen, umweltverträglichen und auch kostengünstigereren Herstellung und Verarbeitung von Feinchemikalien, Pharmavorstufen, Wirkstoffen, Nahrungs- und Futtermittelzusätzen und Biokraftstoffen einsetzt (Lorenz & Zinke, 2005). Durch den Einsatz von Enzymen und Ganzzellsystemen (z. B. Mikroorganismen) kann dabei der "Werkzeugkasten der Natur" genutzt werden. Somit können herkömmliche, chemische und meist ökologisch schädliche Produktionsprozesse zunehmend durch biotechnologische Verfahren ersetzt werden. Enzyme katalysieren Reaktionen besonders effizient und erzeugen oft weniger Nebenprodukte als chemische Synthesen. Beispielsweise wird dadurch die übermäßige CO₂-Produktion verhindert und es ist auch eine Reduktion der Produktionskosten um bis zu 90 % möglich (van Beilen & Li, 2002).

Dadurch besteht ein immer größer werdender Bedarf an neuen Enzymen, die weitere, besondere Reaktionen katalysieren können, um immer mehr industrielle Prozesse unter Verwendung biotechnologischer Verfahren durchführen zu können bzw. neue, bislang chemisch nicht herstellbare Produkte zu erzeugen.

4.1 Optimierung der Expression der Penicillin G Acylase aus E. coli ATCC11105

Die Penicillin G Acylase aus *E. coli* wurde als Modellenzym gewählt, da es sich um ein biotechnologisch relevantes Enzym handelt, das bereits für die industrielle Herstellung von β -Laktam-Antibiotika genutzt wird. Penicillin-Antibiotika werden mengenmäßig am meisten produziert und verschrieben (Rajendhran & Gunasekaran, 2004). Das zeigt die Bedeutung dieses industriellen Prozesses.

Penicillinacylasen sind sowohl in der Lage, die Vorstufe der semisynthetischen β -Laktam-Antibiotika, die 6-Aminopenicillansäure (6-APA) aus Penicillin G oder V, zu synthetisieren, als auch verschiedene Seitenketten an diese Vorstufe (6-APA) zu knüpfen (Abb. 1) (Maresová *et al.*, 2010).

Traditionell wird die Umwandlung von Penicillin G oder V in semisynthetische Antibiotika chemisch durchgeführt. Während der chemischen Prozesse entsteht mit 10-100 kg Abfall pro

kg Produkt eine erhebliche Menge an Abfallprodukten. Diese klassischen Prozesse verwenden unter anderem halogenierte organische Lösungsmittel (z. B. Dichlormethan, Phosphorpentachlorid) und Temperaturen unter dem Nullpunkt (Van de Sandt & De Vroom, 2000). Der biokatalytische Prozess dagegen findet hauptsächlich in wässrigen Lösungen oder in Wasser bei 0 bis 37°C statt. Der Anteil an Abfallprodukten bei Verwendung des biokatalytischen Prozesses ist im Vergleich zum chemischen Prozess bei der Hydrolyse von Penicillin G zu 6-Aminopenicillansäure (6-APA) um den Faktor 5, und um den Faktor 3 für die Verknüpfungsreaktion von 6-APA mit entsprechenden Seitenketten reduziert (Van de Sandt & De Vroom, 2000).

Der komplizierte Prozessierungsmechanismus (Abb. 2) behindert bis jetzt die Entwicklung von *high level* Überexpressionssystemen für Penicillinacylasen. Verschiedenste Veröffentlichungen sind erschienen, in welchen verbesserte Expressionen von Penicillinacylasen durch Veränderung der Kohlenstoffquelle (Chou *et al.*, 1999a); Koexpression von Penicillinacylasen mit dem Chaperon-Protein SecB oder dem Triggerfaktor Tig (Chou *et al.*, 1999b; Xu *et al.*, 2005; Bergeron *et al.*, 2009); Erhöhung der transkriptionellen und translationellen Effizienz (Chou *et al.*, 1999c) und durch Verwendung anderer Wirtssysteme (Gumpert *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 1999c; Maresová *et al.*, 2010) erzielt wurden. Durch die Verbesserung der Enzymproduktion ist demnach eine Steigerung der Effizienz von Prozessen mit Penicillinacylasen zu erwarten. Die Umweltbelastung durch die eigentliche Produktion des Enzyms würde umgekehrt proportional sinken mit der Steigerung der Ausbeute an aktivem Enzym.

Die Verwendung von Chaperonen und Faltungshelfern aus der im IMET erstellten Chaperon-Expressionsbank sollte helfen, die Penicillin G Acylase aus *E. coli* biotechnologisch unter moderaten Bedingungen aktiv und in großen Mengen zu produzieren. Die verwendete Chaperon-Expressionsbank beinhaltet Plasmide mit allen bekannten Genen von *P. aeruginosa*, die für Chaperone bzw. Faltungshelfer kodieren (Kreuz, 2006). Dadurch standen neben den klassischen Chaperonen wie DnaK/DnaJ oder GroEL/GroES auch ungewöhnliche und noch nie getestete Faltungshelfer/Chaperone zur Koexpression mit der Penicillin G Acylase aus *E. coli* zur Verfügung. Gerade diese ungewöhnlichen, z. T. kaum untersuchten Chaperone führen häufig zu einer stark verbesserten Ausbeute an aktivem Zielprotein (Kreuz, 2006). Die verwendeten Chaperonplasmide aus der Expressionsbank decken den ganzen Bereich bekannter Chaperonfunktionen ab: Hitzeschockproteine, Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen, Disulfidbrückenbildene (Dsb-) Proteine, cytoplasmatische und periplasmatische Chaperone und Faltungshelfer. In vielen durchgeführten Arbeiten zeigte sich, dass die Koexpression von Faltungshelfergenen nicht immer gleich gut auf die Produktion eines Zielproteins wirkt. Der Einfluss eines molekularen Chaperons auf ein Zielprotein ist bislang nicht vorhersagbar und muss daher für jedes Zielprotein und jede verwendete Bedingung neu empirisch getestet werden (Nishihara *et al.*, 2000). Deshalb ist es wichtig, neben den essentiellen Chaperonsystemen wie DnaKJ oder GroELS auch solche Chaperone auf ihren Einfluss auf das Zielprotein hin zu testen, die bisher kaum charakterisiert sind.

Neben den Chaperongenen aus *P. aeruginosa* wurde auch das *E. coli* eigene Chaperongen *degP* koexprimiert. Bei DegP handelt es sich um ein Protein, das temperaturabhängig sowohl Chaperon-, als auch Proteasefunktion besitzt (Krojer *et al.*, 2008).

Bei der Untersuchung der Aktivität der Penicillin G Acylase in den verschiedenen Expressionsstämmen zeigte sich, dass nur in den Stämmen, in denen die gleichzeitige Expression von *degP* stattfand, überhaupt gesteigerte Aktivitäten gegenüber den Kontrollen beobachtet werden konnte (Tab. 13). Das Protein DegP besitzt bei höheren Temperaturen Proteasefunktion. Als Hitzeschock-induziertes Protein baut es dann effizient ungefaltete Proteine ab (Chien *et al.*, 2009).

Die Expressionsversuche wurden bei 37°C durchgeführt. Diese Temperatur wurde dahingehend ausgewählt, um später in biotechnologischen Prozessen, wie z. B. der Fermentation, die Kühlung der Fermenter so gering wie möglich halten zu können, da Kühlungsprozesse immer energieintensiv sind.

Bei der Optimierung der Expression der Penicillinacylase zeigte sich, dass durch die Koexpression der Chaperongene *pa2725*, *csaA* und *hscB*, zusammen mit *degP*, die Aktivität der Penicillinacylase um den Faktor zwei gesteigert werden konnte (Tab. 13).

Das Protein PA2725 aus *P. aeruginosa* wurde in der *Pseudomonas* Datenbank als putatives cytoplasmatisches Chaperon annotiert (Winsor *et al.*, 2009). Es zeigt 51 % Sequenzähnlichkeit mit einem Hitzeschockprotein aus *Trypanosoma brucei*. In *Trypanosoma* sp. gehören diese Hitzeschockproteine (HSP) einer hochkonservierten Gruppe von molekularen Chaperonen an. Diese sind für die effiziente Faltung von vielen Proteinen, sowohl unter normalen, als auch unter Stressbedingungen, verantwortlich (Fernandes *et al.*, 2005).

Somit scheint das Chaperon PA2725 auf noch nicht bekannte Art und Weise die Penicillinacylase im Cytoplasma von *E. coli* besser zu falten als andere Chaperone.

Das in *P. aeruginosa* identifizierte CsaA-Protein weist 68 % Sequenzähnlichkeit zu dem molekularen Chaperon CsaA aus dem Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* auf

(Shapova & Paetzel, 2007; Winsor *et al.*, 2009). Auch in dem Organismus *Thermus thermophilus* konnte ein vergleichbares Protein beschrieben werden, das als Homodimer aktiv ist (Kawaguchi *et al.*, 2001). Die meisten Untersuchungen zur Charakterisierung des CsaA-Proteins wurden in *B. subtilis* durchgeführt. Hier ist es als Chaperon an der Sec-abhängigen Translokation von Proteinen beteiligt (Linde *et al.*, 2003; Shapova & Paetzel, 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression des *csaA*-Gens in verschiedenen *E. coli* Chaperonmutanten, beispielsweise mit Mutationen in den Genen *dnaK, groEL* oder *grpE*, Wuchsdefizite wiederherstellen und außerdem *in vitro* Hitze-denaturierte Luciferase aus Glühwürmchen reaktivieren konnte (Müller *et al.*, 2000). Weiter konnte festgestellt werden, dass das CsaA-Protein in der Lage ist, die Akkumulation der Luciferase *in vivo* zu unterbinden (Müller *et al.*, 2000), was die Funktion des CsaA-Proteins als molekulares Chaperon zusätzlich bestätigt hat.

Um Proteine in einem translokationskompetenten Zustand zu halten, müssen die Zielproteine von dem jeweiligen molekularen Chaperon gebunden werden. Dadurch werden die Zielproteine vor Akkumulationsprozessen oder proteolytischem Abbau geschützt. Das CsaA Chaperon aus *P. aeruginosa* könnte durch Bindung der unprozessierten Form der Penicillinacylase diese vor dem proteolytischen Abbau im Cytoplasma schützen und für eine verbesserte Sekretionseffizienz der Penicillinacylase ins Periplasma von *E. coli* sorgen. Hier erhält das Enzym durch autokatalytische Prozessierung seine endgültige, aktive Konformation.

Das *hscB* Gen liegt zusammen mit dem *hscA* Gen aus *P. aeruginosa* in einem Operon lokalisiert. Es zeigt Funktionshomologien zum DnaJ-Protein, einem Ko-Chaperon. In *Azotobacter vinelandii* ist das Chaperon HscA, zusammen mit seinem Ko-Chaperon HscB, an der Reifung Eisen-Schwefel-Cluster-haltiger Proteine beteiligt (Zheng *et al.*, 1998; Campos-García *et al.*, 2000). Jedoch rief nur die Koexpression von *hscB* (ohne *hscA*) eine Steigerung der Aktivität der Penicillinacylase hervor, die Koexpression beider *hsc*-Gene reprimierte die Aktivität der Penicillinacylase (Abb. 11). Penicillinacylasen besitzen keine Eisen-Schwefel-Cluster, daher bleibt es fraglich, auf welche Art und Weise eine Stabilisierung des Penicillinacylase Proteins stattgefunden haben könnte. Hier bestätigt sich wieder die Aussage, dass der Einfluss eines Chaperons oder Faltungshelfer auf ein Zielprotein bislang nicht vorhersagbar ist und daher für jedes Zielprotein neu empirisch getestet werden muss (Nishihara *et al.*, 2000).

Für alle drei Chaperongene aus *P. aeruginosa* konnte durch *real-time* PCR Analysen gezeigt werden, dass sie in dem heterologen Wirt *E. coli* exprimiert werden (Abb. 12).

Dadurch, dass die Bakterien bei einer Temperatur von 37°C schnell wachsen und daher auch eine schnellere Proteinbiosynthese haben, scheint es bei der Expression der Penicillin G Acylase zu vielen ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen in der *E. coli* Zelle zu kommen, da die Faltungshelfermaschinerie in dem Bakterium überfordert war. Das zeigt sich dadurch, dass die gemessenen Aktivitäten der Penicillin G Acylase Proben sehr gering waren. Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten Werte unter den verwendeten Bedingungen mit denen aus Literaturangaben, so zeigt sich, dass die ermittelten spezifischen Aktivitäten (etwa 0,06 U/mg in *E. coli*) unter den Werten lagen, die in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben sind (0,1 bis 0,5 U/mg) (Ramírez *et al.*, 1994; Ospina *et al.*, 1995). Jedoch sind die Werte untereinander schwierig zu vergleichen, da unterschiedliche Testbedingungen für den Nachweis der Aktivität der Penicillinacylase verwendet wurden.

Die Anhäufung von falsch oder gar nicht gefalteten Proteinen stört die normale Proteinbiosynthese der Zelle, da diese Anhäufungen mitunter toxische Eigenschaften zur Folge haben und somit die Produktion von richtig gefalteten Protein hemmen können. Durch die immens hohen Proteinmengen oder durch die ständige Expression des Zielgens können der Zelle wichtige Ressourcen und Energie entzogen werden, was wiederum die Funktion wichtiger Zellprozesse und somit auch die Proteinausbeute beeinflussen kann (Hoffmann & Rinas, 2001). Beim Wachstum bei 37°C reichten scheinbar die *E. coli* eigenen Chaperone und die koexprimierten Chaperone aus *P. aeruginosa* nicht aus, um alle neu synthetisierten Proteine in die richtige Konformation zu bringen, um sie so vor Fehlfaltungen und dem proteolytischen Abbau zu schützen. Die niedrigen ermittelten Werte können auch dadurch zustande gekommen sein, dass die Chaperongene zwar transkribiert, aber unter den gegebenen Bedingungen nicht translatiert worden sind und dadurch nicht als aktives Chaperon zur Verfügung standen. Das müsste in nachfolgenden, weiterführenden Arbeiten experimentell überprüft werden und gegebenenfalls die Versuchsbedingungen angepasst werden.

P. aeruginosa ist ein humanpathogenes Bakterium und daher könnte der Einsatz seiner Chaperongene *csaA*, *hscB* oder *pa2725* (Abb. 11) in biotechnologischen Prozessen für die Produktion von Penicillin G Acylase problematisch werden, obwohl Chaperone nicht zu den Virulenzfaktoren gehören und die kodierenden Sequenzen in verschiedenen Bakterien konserviert sind. Für diesen Fall könnten aber die benötigten Chaperongene aus einem nicht pathogenen Organismus (z. B. *Pseudomonas putida*) isoliert, kloniert und getestet werden. Führt die Koproduktion auch mit diesen Proteinen zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute, könnten diese in den industriellen Prozess eingebunden werden.

4.2 Das Gen *bapF* kodiert für eine β-Peptidyl Aminopeptidase in *P. aeruginosa*

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur vier Enzyme aus Gram-negativen Bakterien der neuen und ungewöhnlichen Proteasefamilie S58 bekannt und charakterisiert (Fanuel *et al.*, 1999a; Komeda & Asano, 2005; Geueke *et al.*, 2006). β -Peptidyl Aminopeptidasen zeichnen sich durch eine ungewöhnliche Faltung und ein ungewöhnliches Substratspektrum aus, da sie in der Lage sind, eine Reihe kurzer β -Peptide, bzw. β -peptidhaltiger Komponenten zu hydrolysieren (Geueke & Kohler, 2007). Die genaue physiologische Funktion dieser Enzymklasse ist noch nicht bekannt.

Das opportunistisch humanpathogene Bakterium *P. aeruginosa* besitzt eine Vielzahl von verschiedenen intra- und extrazellulären Proteasen (Bauman & Kuehn, 2009; Rawlings *et al.*, 2010). Diese gehören unter anderem zu dem breiten Spektrum von Virulenzfaktoren, die die Pathogenität von *P. aeruginosa* verursachen (Lyczak *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2006). Die Fähigkeit zum Transport und Verwertung einer großen Anzahl von Nährstoffen ermöglicht es dem Bakterium, eine Vielzahl von Nischen zu kolonisieren (Kiely *et al.*, 2008).

Durch BLAST Homologievergleiche mit dem bekannten β -Peptidyl Aminopeptidasegen *dmpA* aus *Ochrobactrum anthropi* konnte im *P. aeruginosa* Genom ein offener Leserahmen (*pa1486*) identifiziert werden. Das Protein PA1486 (BapF) ist in der *Pseudomonas* Datenbank als hypothetisches Protein eingetragen. Es zeigt Sequenzhomologien zu bekannten β -Peptidyl Aminopeptidasen und es könnte somit ein putatives Mitglied der Proteasefamilie S58 sein (Fuchs *et al.*, 2010). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und funktionelle Untersuchung dieses als BapF bezeichneten Proteins aus *P. aeruginosa*.

Durch die für *P. aeruginosa* bekannten und etablierten molekularen Techniken eignet sich dieses opportunistisch humanpathogene Bakterium optimal zur Untersuchung der Funktion von β -Peptidyl Aminopeptidasen.

 β -Peptidyl Aminopeptidasen werden als einzelnes Polypeptidvorläufer-Protein synthetisiert. Dieses Vorläufer-Protein wird bei dem DmpA Protein aus *O. anthropi* durch die katalytische Spaltung der Peptidbindung zwischen der Aminosäure Gly249 und Ser250 in zwei verschiedene Peptide gespalten (α - und β -Untereinheit). Beide Aminosäuren (Gly249 und Ser250) sind für die Proteinreifung und die Katalyse von entscheidender Bedeutung. Durch Gelfiltrationsanalysen konnte gezeigt werden, dass das aktive Protein aus einem Homotetramer (Monomer besteht aus α - und β -Untereinheit) besteht und eine Größe von 161 kDa aufweist (Bompard-Gilles *et al.*, 2000).

Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten wurde auch für die β -Aminopeptidase aus *P. aeruginosa* erwartet, dass das Protein ebenfalls als ein einzelner Polypeptidvorläufer synthetisiert wird und durch autohydrolytische Spaltung in die beiden Untereinheiten überführt wird. Die gelelektrophoretische Analyse nach der Expression der β -Aminopeptidase aus *P. aeruginosa* ergab zwei distinkte Banden, die einer molekularen Masse von etwa 14 und 24 kDa entsprechen (Abb. 37). Diese Resultate stimmen exakt mit den vorhergesagten molekularen Massen der resultierenden Untereinheiten (24,7 und 13,8 kDa) überein, wenn man von einer putativen Spaltungsstelle zwischen den Aminosäuren Gly236 und Ser237 ausgeht (Abb. 48). Das indiziert, dass BapF genauso wie andere N-terminale nukleophile Aminohydrolasen (Ntn) dieses Typs prozessiert wird (Fanuel *et al.*, 1999a; Komeda & Asano, 2005; Geueke *et al.*, 2006; Fuchs *et al.*, 2010). Durch Gelfiltrationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die experimentell ermittelte molekulare Masse 141 kDa betrug. Das korreliert gut mit der berechneten molekularen Masse von 154 kDa - vier α -Untereinheiten á 24,7 kDa und vier β -Untereinheiten á 13,8 kDa (Abb. 41). Das aktive BapF Enzym aus *P. aeruginosa* besteht vermutlich ebenfalls aus einem Homotetramer.

Im Gegensatz zu anderen Ntn-Hydrolasen besitzen β -Peptidyl Aminopeptidasen keine ionischen Kofaktoren, jedoch weisen sie die typische Faltung der Ntn-Hydrolasen auf. Dies sorgt für die Möglichkeit des nukleophilen Angriffs und die Fähigkeit bei der Prozessierung die autokatalytische Spaltung durchzuführen (Brannigan *et al.*, 1995; Bompard-Gilles *et al.*, 2000).

BapF besitzt funktionell die gleichen Aminosäuren im katalytischen Zentrum wie andere Ntn-Hydrolasen und verwendet daher wahrscheinlich den gleichen katalytischen Mechanismus. Das Alignment der verschiedenen β -Peptidyl Aminopeptidasen zeigt, dass die aktiven Aminosäuren innerhalb der Enzyme konserviert sind (Abb. 48). Einzig das Tyrosin (Tyr146) in DmpA, das an der Bildung des Oxyanions beteiligt ist, ist in BapF durch ein Phenylalanin (Phe130) ausgetauscht. Die Austausche in diesen Bereichen könnten für die unterschiedlichen Substratspektren der verschiedenen Enzyme verantwortlich sein (Abb. 48).

Die freie α-Aminogruppe des katalytisch aktiven Nukleophils Ser237 in BapF agiert als Base und verstärkt den nukleophilen Charakter der Hydroxylgruppe. Das Kohlenstoffatom des Substrates wird durch die Hydroxygruppe des Ser237 angegriffen und bildet dadurch einen kovalenten Enzym-Substrat-Komplex. Dieses Oxyanion-Intermediat wird durch die NH-Gruppen der Aminosäuren Phe130 und Asn202 stabilisiert. Die Aminosäuren Ser275 und Gly276 interagieren mit dem Ser237 und sind wahrscheinlich indirekt am katalytischen Mechanismus beteiligt. Die Aminosäure Glu128 ist die einzige saure Aminosäure, die nah genug am aktiven Zentrum liegt, sie scheint die N-terminale Aminogruppe des Substratmoleküls zu binden (Bompard-Gilles *et al.*, 2000; Geueke & Kohler, 2007; Fuchs *et al.*, 2010) (Abb. 48).



Abb. 48 Vergleich der Aminosäuresequenzen bekannter β -Peptidyl Aminopeptidasen, die am Prozess der Substratumsetzung beteiligt sind. Die beteiligten Aminosäuren sind in der Abbildung rot unterlegt. Weitere Informationen dazu finden sich im Text.

DmpA ist das einzige Enzym dieser Gruppe, das in der Lage ist, α-Peptide zu spalten, jedoch weist es höhere spezifische Aktivitäten gegenüber Peptiden mit βhGly und β^3 hAla am N-terminalen Ende von Peptiden auf (Heck *et al.*, 2006). Die Enzyme DmpA, Ps BapA und BapF sind in der Lage die Substrate H-L-Ala·*p*NA und H-D-Ala·*p*NA zu hydrolysieren, die Enzyme 3-2W4 BapA und Y2 BapA aus den *Sphingosinicella* Stämmen jedoch nicht. Die Enzyme 3-2W4 BapA und Y2 BapA hydrolysieren nur N-terminale β^3 -Homoaminosäuren, wohingegen sie keine Aktivität gegenüber der Hydrolyse von α-Aminosäuren von Peptiden zeigen (Geueke *et al.*, 2006). Vergleicht man die Substratspektren der einzelnen β-Peptidyl

Aminopeptidasen, so zeigt sich, dass die β -Aminopeptidasen Ps BapA und BapF aus den beiden *Pseudomonas* Stämmen spezifisch für die Hydrolyse von N-terminalen β -Alaninen von Dipeptiden sind (β -Ala-Xaa) (Tab. 18). Das Enzym Ps BapA ist ebenfalls nicht in der Lage, Peptide mit α -Aminosäuren am N-terminalen Ende zu hydrolysieren (Komeda & Asano, 2005).

Die Hydrolyse des natürlich vorkommenden β/α -Dipeptids Carnosin wurde von allen beschriebenen Enzymen durchgeführt (Tab. 18). Zusätzlich konnte noch gezeigt werden, dass BapF auch in der Lage ist, ein weiteres natürlich vorkommendes β/α -Dipeptid, das Carcinin, zu hydrolysieren.

Substrat	DmpA ^{a,b}	BapF	Ps BapA ^a	3-2W4 BapA ^b	Y2 BapA ^b
H-L-Ala• <i>p</i> NA	+	+	+	-	-
H-D-Ala· <i>p</i> NA	+	+	+	-	-
H-βhGly· <i>p</i> NA	+	+	+	+	+
H-L-β ³ hAla· <i>p</i> NA	+	+	k.A.	+	+
H-D-β ³ hAla∙ <i>p</i> NA	k.A.	+	k.A.	k.A.	k.A.
H-L-β ³ hPhe· <i>p</i> NA	+	-	k.A.	+	+
H-D-β ³ hPhe· <i>p</i> NA	+	-	k.A.	+	+
Carnosin	+	+	+	+	+
Carcinin	k.A.	+	k.A.	k.A.	k.A.

Tab. 18 Übersicht über die Substratspektren der bekannten β -Peptidyl Aminopeptidasen im Vergleich zu BapF.

Daten stammen aus ^a Komeda & Asano, 2005; ^b Heck, 2006; k.A.: keine Angaben

Als Standardsubstrat für Proteasen wird häufig Casein eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus mehreren Proteinen (α S1, α S2, β , κ), die in der Milch vorkommen. Es wird als universelles Proteasesubstrat beschrieben und durch die meisten Proteasen umgesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass das Standardproteasesubstrat Casein nicht durch die β -Aminopeptidase BapF umgesetzt wird (Abb. 45). Das impliziert zusätzlich zu dem aufgeführten Substratspektrum von BapF, dass die β -Aminopeptidase BapF spezifisch nur Peptide hydrolysieren kann, die am N-terminalen Ende β -Aminosäuren besitzen. Es scheint nicht in der Lage zu sein, α -Peptide zu hydrolysieren.

Proteasen können durch eine Vielzahl von unterschiedlichsten Inhibitorsubstanzen in ihrer Funktion gehemmt werden.

EDTA ist ein Komplexbildner und kann mit Metallionen einen stabilen Komplex bilden. Dadurch fehlen den Enzymen ihre Metallkofaktoren, welche für ihre Funktionalität von entscheidender Bedeutung sind. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe des Komplexbildners EDTA die Aktivität der β -Aminopeptidase BapF nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 44). Das gleiche gilt für die β -Aminopeptidasen DmpA, Ps BapA, 3-2W4 BapA und Y2 BapA (Fanuel *et al.*, 1999a; Komeda & Asano, 2005; Heck, 2006). Das beweist, dass die β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa*, ebenso wie die anderen bekannten β -Aminopeptidasen, keine ionischen Metallkofaktoren besitzt.

Ein weiterer beschriebener Inhibitor von Proteasen ist das niedermolekulare Dipeptid Bestatin. Es ist ein wirksamer Inhibitor von verschiedenen Aminopeptidasen (Jia *et al.*, 2010). Die inhibitorische Wirkung erfolgt durch Bindung des Bestatins im katalytischen Zentrum (Rich *et al.*, 1984). Für die Enzyme DmpA, 3-2W4 BapA und Y2 BapA konnte gezeigt werden, dass sie das Dipeptid Bestatin nicht hydrolysieren können, jedoch zeigt es auch keine inhibierende Wirkung auf diese Enzyme (Fanuel *et al.*, 1999a; Heck, 2006) (Tab. 19). Das gleiche Ergebnis zeigte sich für BapF. Auch hier konnte keine inhibierende Wirkung von Bestatin beobachtet werden (Abb. 44).

β-Peptidyl Aminopeptidasen und BapF.								
Inhibitorsubstanz			Inhibierung vo	n				
	DmpA ^a	BapF	Ps BapA ^b	3-2W4 BapA ^c	Y2 BapA ^c			
EDTA	-	-	-	-	-			
Bestatin	-	-	k.A.	-	-			
PMSF	k.A.	-	-	-	-			

k.A

+

+

Tab. 19 Auflistung der inhibitorischen Wirkung verschiedener Proteaseinhibitoren auf die bekannten β -Peptidyl Aminopeptidasen und BapF.

Daten stammen aus ^a Fanuel et al., 1999a; ^b Komeda & Asano, 2005; ^c Heck, 2006); k.A.: keine Angaben

AEBSF

PMSF inhibiert vor allem Serinproteasen (Chymotrypsin, Trypsin und Thrombin), indem es irreversibel an das aktive Serin im katalytischen Zentrum bindet. Es war jedoch auch in hohen Konzentrationen nicht in der Lage, BapF zu hemmen (Abb. 44).

Die Substanz AEBSF (Handelsname: Pefabloc SC[®]), besitzt ein ähnliches Wirkungsspektrum wie PMSF, ist jedoch weitaus stabiler in wässrigen Lösungen. Die β -Aminopeptidasen BapA 3-2W4 und Y2 wurden durch diese Inhibitorsubstanz komplett inaktiviert (Tab. 19). BapF konnte, genau wie DmpA, nicht durch AEBSF inhibiert werden.

Insgesamt zeigte sich, dass die β-Aminopeptidase BapF durch die gängigen Protease-Inhibitorsubstanzen in ihrer Aktivität nicht gehemmt werden kann. Bei Einsatz höherer Konzentrationen hatten die Inhibitoren z. T. sogar eine Erhöhung der Aktivität von BapF zur Folge. Diese Substanzen müssen demnach eine stabilisierende Wirkung auf die β -Aminopeptidase haben.

Vergleicht man das pH-Optimum der bereits beschriebenen β -Aminopeptidase mit dem von BapF, so zeigt sich, dass die meisten Enzyme im neutralen bis basischen Bereich ihr pH-Optimum haben (Geueke & Kohler, 2007), BapF jedoch im sauren Bereich bei einem pH-Wert von 5,5 (Abb. 42). Das pH-Optimum von DmpA liegt im schwach basischen Bereich (7,5 – 8,5).

Das Temperatur-Optimum von BapF liegt bei 37°C, bei Temperaturen über 50°C wird das Enzym komplett inaktiviert. Das Temperatur-Optimum von BapF bei 37°C korreliert gut mit der Hypothese, dass das Enzym bei dem Infektionsvorgang im Wirt (z. B. Menschen) eine Rolle spielen könnte. Die Körpertemperatur des Menschen beträgt etwa 37°C und so liegen für das Enzym in *P. aeruginosa* optimale Bedingungen vor.

Anhand der vorliegenden Daten aus dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Protein BapF (PA1486) aus *P. aeruginosa* um eine β -Peptidyl Aminopeptidase handelt.

4.3 Physiologische Funktion der β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa*

Das Bakterium *P. aeruginosa* ist eines der wichtigsten opportunistischen Bakterien, das an nosokomialen Infektionen beteiligt ist (Gaynes & Edwards, 2005; Kohlenberg *et al.*, 2008). Es ist sowohl verantwortlich für akute und chronische Lungenentzündungen bei Patienten, die künstlich beatmet werden (Chastre & Fagon, 2002) oder an Cystischer Fibrose leiden (Lyczak *et al.*, 2002), als auch für Septikämie in Patienten mit schweren Brandwunden (Peluso *et al.*, 2010).

Epithelzellen stellen eine initiale Barriere gegen Infektionen dar. Somit ist das Verständnis der Interaktion zwischen diesen Zellen und dem Bakterium von entscheidender Bedeutung. Es ist jedoch wenig bekannt über diesen initialen Schritt der Adaptierung von *P. aeruginosa* an das Wirtsgewebe und die Faktoren, die bestimmen, ob eine *P. aeruginosa*-Epithelzell-Interaktion zu einer akuten oder chronischen Infektion führt (Chugani & Greenberg, 2007; Kiely *et al.*, 2008). Die Infektion des Wirtes durch Bakterien stimuliert seine angeborene und adaptive Immunantwort. Dies führt wiederum zu einer systematischen Entzündungsantwort (Pène *et al.*, 2008). Das Verständnis für das genetische Programm, das dem Infektionsvorgang

zugrunde liegt, ist außerordentlich wichtig für die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention und Therapie von *P. aeruginosa* Infektionen (Bielecki *et al.*, 2008). Des Weiteren sind fundamentale Kenntnisse über die metabolischen Prozesse während des Infektions-vorganges von Bakterien ebenfalls von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der bakteriellen Pathogenese und der Entwicklung neuer Therapien. Das Eingreifen in den bakteriellen Metabolismus könnte eine wirksame Inhibierung der Pathogenität von unterschiedlichsten pathogenen Bakterien zur Folge haben (Boulette *et al.*, 2009).

Ein erster Hinweis auf eine Beteiligung der β -Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* am Infektionsvorgang könnte sein, dass die β -Aminopeptidase-negativen *P. aeruginosa* Stämme PA14FU3 und PAFU2 nicht mehr in der Lage sind, mit dem β/α -Dipeptid Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Abb. 25, Abb. 26). Der Grund liegt darin, dass die Carnosin-spaltende β -Aminopeptidase BapF (Abb. 46) in diesen Stämmen deletiert worden ist.

Carnosin konnte unter anderem in den Geweben von Ratten, Mäusen und Menschen in signifikanten Mengen nachgewiesen werden, in denen auch Histamin nachgewiesen werden konnte. Zu diesen Geweben zählen unter anderem das Herz, die Niere, die Leber, das olfaktorische nasale Gewebe und die Lunge (Flancbaum et al., 1990). Carnosin dient als Mastzell-unabhängiges, atoxisches Reservoir für Histidin, das die Vorläufersubstanz von Histamin darstellt. Die Synthese von Histamin durch die Decarboxylierung von Histidin wird während der Einwirkung von physiologischem Stress, so wie er bei Wunden oder Entzündungen auftritt, benötigt (Nagai et al., 1986; Flancbaum et al., 1990; Fitzpatrick et al., 1991). Des Weiteren spielt Histamin bei der metabolischen Antwort auf Stress, induziert durch Infektionen, eine Rolle, da es an der Immunantwort beteiligt ist (Fisher et al., 1978; Carlos et al., 2009). β-Alanin, ebenfalls ein Spaltprodukt von Carnosin, aktiviert die Synthese von Nukleinsäuren und stimuliert, zusammen mit Histamin, die Fibroblasten-Migration (Perel'man et al., 1989). Fibroblasten sind die Hauptquelle für die Bereitstellung von extrazellulärer Verbindungsmatrix (Kollagen). Die Migration und die Proliferation von Fibroblasten sind wichtige Prozesse in entzündlichen Geweben, da sie die Wundheilung beschleunigen (Kohyama et al., 2010).

Die Kohlenstoffquellen, die von *P. aeruginosa* während der Infektion des Wirtes als Nahrungs- und Energiequelle verstoffwechselt werden, sind bis jetzt noch unbekannt (Boulette *et al.*, 2009). Carnosin könnte ein Bestandteil der Nahrungsquelle von *P. aeruginosa* im Wirt sein. Zu Beginn der Infektion könnte die β -Aminopeptidase BapF durch Hydrolyse des Carnosins dem Bakterium helfen, eine Nahrungsnische im Lungengewebe des Wirtes zu etablieren, da hier die Nährstoffe begrenzt sind und sie dadurch in Konkurrenz mit weiteren Mikroorganismen stehen (Boulette *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das pathogene Bakterium *P. aeruginosa* in der Lage ist, Carnosin intrazellulär durch die β -Aminopeptidase BapF zu hydrolysieren und als Nahrungsquelle zu verwenden.

Die Infektion mit Bakterien führt immer zu (weiteren) entzündlichen Prozessen mit der Aktivierung von wirtseigenen Immunantworten. Durch die weitere Eliminierung des Carnosins durch *P. aeruginosa* in entzündlichen Prozessen würde dem Wirt an dieser Stelle ein Stimulator der Immunantwort, das Histamin, das nicht mehr aus Carnosin gebildet werden kann, fehlen. Durch die verzögerte Immunantwort könnte es dem Bakterium ermöglicht werden, weitere Virulenzfaktoren und Mechanismen zu aktivieren, die es ihm erlauben, sich besser an den Wirt zu adaptieren, sich dadurch zu vermehren und die Infektion zu verstärken (Abb. 49 A).



Abb. 49 Vereinfachte Darstellung der Situation im Wirt bei der Besiedlung durch *P. aeruginosa* Wildtyp (Wt) und der entsprechenden β -Aminopeptidase-negativen Mutante. A Zeigt die Situation im Wirt durch Besiedlung mit *P. aeruginosa* Wt. Das Carnosin wird durch das cytoplasmatische Enzym BapF hydrolysiert und die daraus resultierenden Aminosäuren werden anschließend vom Bakterium als Kohlenstoffquelle verwertet. B Zeigt die Situation im Wirt durch die Besiedlung mit der β -Aminopeptidase-negativen Mutante. Hier steht dem Wirt das Carnosin weiterhin zur Verfügung. Es kann durch wirtseigene Enzyme zum Histamin umgewandelt werden.

Fehlt P. aeruginosa allerdings die Carnosin-spaltende β-Aminopeptidase, so kann es im Lungengewebe keine nahrungsbedingte Nische besiedeln und dem Bakterium steht der oben beschriebene Mechanismus nicht mehr zur Verfügung. Das wirtseigene Immunsystem kann dadurch besser, schneller und effektiver auf das Eindringen des Pathogens reagieren und somit leichter eine Infektion verhindern bzw. abmildern (Abb. 49 B). Bei den Ergebnissen des durchgeführten Lungeninfektionsmodells der Maus zeigte sich, dass die Deletion des Gens, das für die β-Aminopeptidase kodiert, eine Abnahme der Sterblichkeit der infizierten Mäuse verursachte. Wenn die Mäuse mit dem P. aeruginosa PA14 Wt Stamm infiziert wurden, starben 90 % der Mäuse innerhalb der ersten fünf Tage nach der Infektion. Im Gegensatz dazu starben nur 60 % der Mäuse, die mit der β-Aminopeptidase-negativen Mutante infiziert worden sind (Abb. 31). Jedoch sind die gezeigten Ergebnisse zwischen dem P. aeruginosa Wt und der β -Aminopeptidase-negativen Mutante nicht signifikant. Aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen wurde das Virulenzmodell mit der β-Aminopeptidase-negative Mutante nur zweimal durchgeführt und aus diesen ermittelten Ergebnissen wurde der Mittelwert gebildet. Die hohen Standardabweichungen resultieren daraus, dass das Ergebnis des ersten Experiments im folgenden Experiment nicht reproduziert werden konnte. Die Versuche mit dem P. aeruginosa PA14 Wildtyp wurden für dieses Experiment nur einmal durchgeführt, da sich dieser Stamm in dem Lungen-Virulenzmodell immer sehr ähnlich verhält und viele Daten und Erfahrungswerte vorliegen. Um Klarheit zu bekommen, müsste das Experiment in folgenden Versuchen ein drittes Mal durchgeführt werden. Um die physiologische Funktion der β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus P. aeruginosa aufzuklären, bedarf es weiterer intensiver und aufwendiger Forschungsarbeit.

Die Ausprägung der Pathogenität hängt nie von einem Faktor allein ab, denn es hat sich gezeigt, dass die Pathogenität von *P. aeruginosa* multifaktoriell ist und die kumulative, koordinierte Aktion von vielen Virulenzfaktoren benötigt wird (Lee *et al.*, 2006). Wichtige Infektionsmechanismen findet man oft in ähnlicher oder gleicher Weise in den verschiedensten bakteriellen Pathogenen (An *et al.*, 2009). Vorhergesagte, putative β -Aminopeptidasen findet man in einer großen Anzahl von Bakterien durch BLAST-Analysen. Unter anderem findet man putative β -Peptidyl Aminopeptidasen in den humanpathogenen *Proteobacteria* Stämmen *Burkholderia*, *Bordetella* und *Brucella* (Rawlings *et al.*, 2010). Die β -Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* besitzt auf Proteinsequenzebene folgende Sequenzidentitäten zu den putative β -Peptidyl Aminopeptidasen aus den humanpathogenen Stämmen: *Burkholderia cepacia* 41,4 %, *Brucella*

abortus 40,2 % und Bordetella pertussis 43,9 % (Abb. 57).

In dem Stamm *P. aeruginosa* zeigte sich, dass die Deletion von *bapF* unter den getesteten Laborbedingungen keinen Einfluss auf verschiedene untersuchte virulenzassoziierte Phänotypen hatte. Es zeigten sich keine Veränderungen zwischen den *P. aeruginosa* Stämmen PAO1 Wt und der Mutante PAFU2 in Bezug auf die Rhamnolipidproduktion (Abb. 20), auf die *Quorum Sensing*-Systeme (AHL-Signalmoleküle) (Abb. 20), auf die drei Beweglichkeitsformen (Abb. 18), sowie auf die Biofilmbildung (Daten nicht gezeigt).

Die physiologische Funktion der β -Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

4.4 Physiologische Funktion des putativen Aminosäuretransporters PA1485 in *P. aeruginosa*

Es wurde postuliert, dass der putative Aminosäuretransporter PA1485 unter anderem für den Transport von Carnosin und strukturell ähnlichen Molekülen verantwortlich sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurde die *P. aeruginosa* PAFU1 Mutante hergestellt (*pa1485*::ΩGm^R). Wenn PA1485 tatsächlich der Transporter für Carnosin bzw. verwandte Dipeptide ist, dürfte die P. aeruginosa PAFU1 Mutante nicht mehr auf Carnosin oder anderen ß/a-Dipeptiden wachsen. Dieses Ergebnis konnte tatsächlich beobachtet werden (Abb. 35). Komplementierte man jedoch die Mutante mit einer plasmidkodierten Kopie von *pa1485*, so hätte man mit Carnosin als Kohlenstoffquelle wieder Wachstum beobachten müssen; dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 35). Die Mutante P. aeruginosa PAFU1 (*Apa1485*) war erst wieder in der Lage auf Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, wenn eine plasmidkodierte Kopie von *bapF* in die Bakterienzellen durch Konjugation übertragen wurde (Abb. 35). Die eingebrachte Omega-Resistenzkassette, die für die Konstruktion der Mutante PAFU1 eingesetzt wurde, verhinderte die Transkription von bapF. Omega-Resistenzkassetten zeichnen sich dadurch aus, dass sie an beiden Seiten durch kurze palindromische Sequenzen flankiert werden, die sowohl Transkriptions- als auch Translationsterminationssignale enthalten (Prentki & Krisch, 1984). Somit war nicht die Deletion des Transportergens pa1485 dafür verantwortlich, dass die Mutante nicht mehr wachsen konnte, sondern die fehlende Transkription von *bapF*. Daraus folgt, dass der putative Aminosäuretransporter PA1485 nicht, oder nicht der einzige Transporter für Carnosin ist. Er scheint auch nicht für den Transport der Aminosäuren β-Alanin und L-Histidin verantwortlich, denn auf diesen Kohlenstoffquellen zeigt die Mutante ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum (Abb. 36).

Die metabolische Vielseitigkeit von *P. aeruginosa* reflektiert sich darin, dass 10 % des *P. aeruginosa* Genoms für Membran-assoziierte Transporter kodieren, 8 % dieser Transporter sind am Metabolismus von kohlenstoffhaltigen Komponenten beteiligt (Stover *et al.*, 2000).

Bei BLAST-Untersuchungen zeigte sich, dass *P. aeruginosa* 15 annotierte Aminosäuretransporter besitzt, die zu dem putativen Transporter PA1485 auf Aminosäuresequenzebene Identitäten von 23 % bis zu 37 % aufwiesen (Winsor *et al.*, 2009). Somit könnte auch ein anderer Transporter die Aufgaben des Transporters PA1485 übernehmen. Die eben beschriebenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei PA1485 nicht um einen essentiellen Transporter von *P. aeruginos*a handelt.

Der putative Aminosäuretransporter PA1485 scheint konstitutiv in *P. aeruginosa* transkribiert zu werden, da sich bei *real-time* PCR Analysen gezeigt hat, dass das Transkript von *pa1485* unter allen getesteten Bedingungen detektierbar war (Tab. 15).

4.5 Das Operon *pa1485/pa1486* in *P. aeruginosa*

In Bakterien sind viele Gene in Operons lokalisiert. Das Operon zeichnet sich dadurch aus, dass die Gene als eine transkriptionelle Einheit organisiert sind und meist von einem Hauptpromoter aus reguliert werden (Yanofsky, 2007). Diese Anordnung gestattet eine simultane und koordinierte Regulation mehrerer, funktionell abhängiger Gene.

Ein prominentes Beispiel für ein gut untersuchtes Operon ist das *lac* Operon aus *E. coli*, dessen Regulation und Expression seit langem erforscht wird und gut verstanden ist. (Goeddel *et al.*, 1978; Miller & Reznikoff, 1978; Schumacher *et al.*, 1989; Noel & Reznikoff, 1998; Oehler *et al.*, 2006). Es gilt daher als wichtiges Bezugssystem für Überlegungen für die Beschreibung von Gen-Regulationen (Knippers, 2001).

Das 1368 bp umfassende Gen *pa1485* kodiert für einen putativen Aminosäuretransporter und das 1101 bp umfassende Gen *pa1486* (*bapF*) kodiert für eine β -Peptidyl Aminopeptidase (Winsor *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2010). Für diese Gene wurde eine Lokalisation im 2482 bp großen Operon vorhergesagt.

Der funktionelle Zusammenhang dieser beiden Gene könnte darin liegen, dass der putative Aminosäuretransporter PA1485 *in vivo* für den Transport der Substrate ins Cytoplasma von *P. aeruginosa* verantwortlich ist, die vom cytoplasmatischen Enzym BapF hydrolysiert werden.

Durch real-time PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass die Gene pa1485 und bapF als bicistronische mRNA transkribiert werden (Abb. 32). Ein weiterer Hinweis auf die Lokalisation der Gene in einem Operon unter Kontrolle eines gemeinsamen Promotors ergab sich bei der Untersuchung der *P. aeruginosa* Mutante PAFU1 (*pa1485*::ΩGm^R). Die Mutante wurde zur Untersuchung der physiologischen Funktion des putativen Aminosäuretransporters PA1485 hergestellt. Die Deletion des Gens pa1485 vom Start- bis zum Stopkodon erfolgte durch die Insertion einer Omega-Gentamycinresistenzkassette (ΩGm^R). Bei Untersuchungen des Wachstumsverhaltens der P. aeruginosa Mutante PAFU1 mit dem Dipeptid Carnosin als einziger Kohlenstoffquelle, zeigte sich, dass die Mutante nicht mehr in der Lage war auf diesem Substrat zu wachsen (Abb. 35). Wurde jedoch eine plasmidkodierte Kopie des Gens *bapF* in die *P. aeruginosa* Mutante PAFU1 ($\Delta pa1485$) durch Konjugation übertragen, so zeigte die Mutante ein vergleichbares Wachstum wie der P. aeruginosa PAO1 Wildtyp (Wt) (Abb. 25). Durch die Insertion der Omega-Resistenzkassette in das Gen pa1485 und der dadurch vorhandenen Terminationsbereiche konnte die Transkription des zweiten Gens (bapF) vom gemeinsamen Promotor aus nicht mehr erfolgen. Dadurch fehlte der P. aeruginosa Mutante PAFU1 (*Apa1485*) das Enzym, welches das Wachstum auf Carnosin ermöglicht – die B-Peptidyl Aminopeptidase BapF. Dieser polare Effekt konnte erst wieder durch die eingebrachte, plasmidkodierte Kopie von *bapF* rückgängig gemacht werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die Insertion der Omega-Resistenzkassette Promotorbereiche von *bapF*, die im Gen *pa1485* liegen, zerstört wurden, und so die Transkription verhindert wurde.

Oft werden die Gene eines Operons erst dann exprimiert, wenn ein bestimmtes Substrat zur Verfügung steht und die dazugehörigen Proteine benötigt werden (Stoebel *et al.*, 2008). Daher unterliegt die Transkription der Gene in einem Operon einer genauen Regulation, jedoch ist dies kein genereller Mechanismus, sondern variiert bei den verschiedenen Operons (Santillan & Mackey, 2001). Eine strikte Regulation ermöglicht es dem Bakterium, Ressourcen für die unnötige Proteinsynthese zu sparen. Denn die Kosten stecken nicht in den synthetisierten Proteinen selber, sondern in dem Prozess zur Herstellung dieser Proteine (Stoebel *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Expression des *lac* Operons in *E. coli* die Fitness des Bakteriums herabsetzte, wenn keine Laktose im Medium vorhanden war (Koch, 1983). Auch wenn Laktose im Medium vorhanden ist, hat sich gezeigt, dass nicht von allen Genen gleiche Transkriptmengen vorliegen, so wie man es von der Transkription einer polycistronischen mRNA vermuten würde. Es konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* die mRNA Menge von *lacZ* drei- bis viermal höher ist als die mRNA Menge von *lacA*. Dies führt

wiederum dazu, dass die korrespondierenden Proteine ebenfalls in verschiedenen molaren Mengen produziert werden (Zabin & Fowler, 1978; Li & Altman, 2004).

Die intergenischen, nicht kodierenden RNA-Bereiche in polycistronischen mRNAs von Operons in *E. coli* können Endonukleaseschnittstellen enthalten, die durch spezifische Endoribonukleasen (RNasen) erkannt werden. In dem Bakterium *E. coli* sind mehr als 20 verschiedene RNasen bekannt (Arraiano *et al.*, 2010). Die Spaltung der polycistronischen mRNA in der intergenischen Region zwischen zwei Genen kann für den raschen Abbau einer der mRNA Produkte durch RNasen verantwortlich sein (Li & Altman, 2003).

Die intergenische Region zwischen dem Gen *lacY* und *lacA* im *lac* Operon von *E. coli* beträgt 65 bp. Sie enthält eine solche Endonukleasesequenz. Der mRNA Teil, der das Transkript des Gens *lacA* enthält, wird rapide abgebaut (Li & Altman, 2004). Dieser endonukleolytische Abbau der polycistronischen mRNA könnte somit für die unterschiedlichen mRNA Mengen und daraus resultierenden Proteinmengen verantwortlich sein.

Die substratabhängige Regulation von Operons wurde ebenfalls für das Bakterium *P. aeruginosa* beschrieben (MacEachran *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Auch bei dem in dieser Arbeit untersuchten putativen Operon *pa1485/pa1486* aus *P. aeruginosa* konnte eine substratabhängige Regulation der Gene beobachtet werden. Das Transkript für *bapF* (*pa1486*) konnte nur nachgewiesen werden, wenn das Bakterium *P. aeruginosa* in Kulturmedien mit den β/α -Dipeptiden Carnosin oder Carcinin als einziger Kohlenstoffquelle wuchs (Abb. 23). Im Gegensatz dazu konnte jedoch erstaunlicherweise das Transkript für *pa1485* unter allen getesteten Wachstumsbedingungen (verschiedene Wuchsphasen, verschiedene Medien) nach-gewiesen werden (Tab. 15). Das Operon scheint somit konstitutiv exprimiert zu werden. Der Bereich, der auf der polycistronischen mRNA für BapF kodiert, muss jedoch relativ schnell degradiert werden, wenn nicht das entsprechende Substrat für die β -Aminopeptidase BapF in der Umgebung vorliegt. Fehlte Carnosin im Kulturmedium, konnte kein Transkript für *bapF* nachgewiesen werden.

Die Länge des intergenischen Bereichs zwischen den Genen *pa1485* und *bapF* im Chromosom von *P. aeruginosa* beträgt 13 bp (Winsor *et al.*, 2009). Die intergenische Region und der unmittelbare Stromaufwärtsbereich des *bapF*-Gens weist auf mRNA-Ebene vorhergesagte stabile Sekundärstrukturen auf (Abb. 34), die möglicherweise die Assemblierung von Ribosomen an der RBS behindern und damit die Effizienz der Translationsinitiation reduzieren. Des Weiteren können solche mRNA-Sekundärstrukturen als Binde- bzw. Prozessierungsstelle für RNasen dienen, die für die Destabilisierung von Transkripten verantwortlich ist (Cunningham & Guest, 1998).

Möglicherweise sorgt eine vorhandene Ribonukleasesequenzen zwischen den Genen *pa1485* und *bapF* für die Spaltung der polycistronischen mRNA. Durch spezifische Ribonukleasen findet anschließend die Degradation des 3'-Bereiches (eingeschlossen das Transkript von *bapF*) der polycistronischen mRNA statt. Entweder durch die die Aktivität von 3'-Exonukleasen oder 5'-Exonukleasen. Die 5'-3'Exoribonuklease Aktivität bei der Degradation von mRNA wurde kürzlich in *Bacillus subtilis* beschrieben (Mathy *et al.*, 2007; Daou-Chabo & Condon, 2009).

Es ist bekannt, dass intercistronische 3'-Sekundärstrukturen zwischen zwei Genen die strangaufwärts gelegene mRNA vor der Degradation durch 3'-5' Exonukleaseaktivität (PNPase und RNase II) schützen können (McLaren *et al.*, 1991). Beispiele dafür, dass das 5'-Segment in polycistronischen mRNAs stabiler ist als das 3'-Segment konnte bei dem *pufBALMX* Transkript von *Rhodobacter capsulatus* und dem *malEFG* Transkript des Maltose Operons von *E. coli* gezeigt werden. Hier konnten ebenfalls intercistronische Sekundärstrukturen (*stem loops*) im 3'-Bereich der intergenischen Region gefunden werden (Belasco & Higgins, 1988; Chen & Belasco, 1990).

Substrate wie Carnosin und Carcinin scheinen eine Art Substratinduktion der Expression von *bapF* auszulösen, und ermöglichen so die Translation von *bapF*. *P. aeruginosa* könnte sich so die unnötige Proteinsynthese und dadurch wichtige Ressourcen sparen.

Die identifizierte Sekundärstruktur der mRNA scheint die RBS und das Startkodon des Gens bapF zu "maskieren" (Abb. 34). Dies könnte zusätzlich zu einer Reprimierung der Translationsinitiation der β -Aminopeptidase BapF führen.

Ähnlich wie die Situation der Gene *lacY* und *lacA* im *lac* Operon von *E. coli*, lagen die Transkripte der Gene *pa1485* und *pa1486* von *P. aeruginosa* nicht in vergleichbaren Mengen im Gesamt-RNA Pool der Zelle vor, auch wenn sich die entsprechenden Substrate für BapF im Medium befanden. Die Menge der detektierten mRNA von *pa1486* war immer geringer als die mRNA-Transkriptmenge von *pa1485*. Der Ct-Wert von *pa1485* lag bei 19,71 \pm 0,70 und der Ct-Wert von *bapF* (*pa1486*) lag bei 25 \pm 1,01. Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Ein um eine Einheit geringerer Ct-Wert entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA; respektive mRNA Startmenge (Pfaffl, 2004). Das bedeutet, dass in *P. aeruginosa* die mRNA Menge von *pa1485* etwa 39-mal höher war als die mRNA Menge von *bapF* (*pa1486*).

P. aeruginosa ist ein metabolisch vielseitiges Bakterium und die Fähigkeit, sich an verschiedenste Wachstumsbedingungen anzupassen, bedingt eine strenge Regulation der

Genexpression. Der kontinuierliche Ab- und Aufbau von prokaryotischer mRNA ist ein Mechanismus der Regulation der Genexpression und ermöglicht es Bakterien, sich rasch an neue Nahrungs- und Umweltbedingungen anzupassen (Higgins *et al.*, 1992; Arraiano *et al.*, 2010).

Es wurden viele weitere regulatorische Mechanismen für die Regulation von Genen, der Transkription bzw. den Abbau von mRNA in Bakterien beschrieben. Hierzu gehören unter anderem die koordinierte Aktion von Exo- und Endonukleasen (Alifano *et al.*, 1994), die Ausbildung von sogenannten *hairpin*-Strukturen in der mRNA-Kette (Wilson & von Hippel, 1995), die regulierte RNA-Protein Interaktion (Yano *et al.*, 2010), die Beteiligung von *antisense*-RNA (Belasco & Higgins, 1988) und der Informationsaustausch zwischen der Transkription und der Translation (Yanofsky, 2007).

Um den Mechanismus der Regulation des Operons *pa1485/pa1486* in *P. aeruginosa* vollständig aufzuklären, bedarf es weiterer Forschung.

4.6 Biotechnologische Bedeutung von β-Peptidyl Aminopeptidasen

β-Peptide haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. β-Aminosäuren und deren Derivate findet man als *building blocks* in vielen natürlichen Produkten (Seebach *et al.*, 2004), wie z. B. in Bestatin, Nodularin, Microcystin und in der nichtpeptidischen, pharmazeutisch aktiven Substanz Paclitaxel (Taxol[®]).

1996 wurde zum ersten Mal die Synthese von β -Peptiden unter Verwendung von β -Aminosäuren mit proteinogenen Seitenketten beschrieben (Seebach *et al.*, 1996).

Einige β -Peptide besitzen antimikrobielle Aktivität (Porter *et al.*, 2002; Arvidsson *et al.*, 2003), sind in der Lage an den humanen Somatostatin-Rezeptor zu binden (\rightarrow Behandlung von Darmkrebs) (Gademann *et al.*, 2001), dienen als Inhibitor für die HIV-Replikation (Umezawa *et al.*, 2002) und inhibieren die p53-hDM2 Interaktion (\rightarrow Behandlung verschiedener Tumorarten) (Bautista *et al.*, 2010). Für kationische β -Peptide ist die Penetration über die bakterielle und Säugetierzellmembran beschrieben (Rueping *et al.*, 2002; Geueke *et al.*, 2005a).

Aufgrund ihrer hohen metabolischen Stabilität und der Fähigkeit, stabile Sekundärstrukturen einzunehmen, bilden β -Peptide interessante Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuer Pharmazeutika und Peptidmimetika. Die hohe metabolische Stabilität zeichnet sich dadurch

aus, dass β -Peptide kaum oder gar nicht von Peptidasen und Proteasen abgebaut werden können (Frackenpohl *et al.*, 2001; Hook *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Peptidbindung zwischen β -Aminosäuren, sondern auch zwischen α - und β -Aminosäuren resistent gegenüber hydrolytischer Spaltung ist (Seebach *et al.*, 1998).

Die steigende Nachfrage an enantiomerenreinen β -Aminosäuren für die pharmazeutische Industrie und die Feinchemie bedingt die Entwicklung neuer Strategien zur Herstellung dieser Substanzen. Neben den bereits gut etablierten chemischen Synthesewegen stellen die enzymkatalysierten Prozesse eine vielversprechende Alternative dar. Es konnte gezeigt werden, dass durch Verwendung der bekannten β -Aminopeptidasen BapA Y2 und 3-2W4 (aus *Sphingosinicella*-Stämmen) die chemische Synthese von β -Peptiden, gemischten α/β -Peptiden und enantiomerenreinen β -Aminosäuren ergänzt werden konnte. Dadurch war es möglich, milde Reaktionsbedingungen zu verwenden (Heck *et al.*, 2007; Heck *et al.*, 2009; Heyland *et al.*, 2010).

Die Verwendung von geeigneten Biokatalysatoren in Form von β -Aminopeptidasen könnte dafür sorgen, dass diese Prozesse unter ökologisch nachhaltigen Bedingungen ablaufen. Dieser Aspekt wurde in einem DBU-geförderten Projekt "Produktion und erstmaliger Einsatz von β -Aminopeptidasen zur umweltfreundlichen Biosynthese von β -Peptiden als Intermediate für die Herstellung innovativer Pharmaka (AZ 13176)" eingehend untersucht. Hier wurde die enzymatische Synthese des β/α -Dipeptids Carnosin untersucht.

Die intensive Charakterisierung und Verwendung neuer (z. B. BapF aus *P. aeruginosa*) und unbekannter β -Aminopeptidasen könnte das Potential zur Herstellung und Verwendung weiterer und neuartiger, β -aminosäurehaltiger Peptide vergrößern.

5 Literatur

Alexeyev, M.F., Shokolenko, I.N., and 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.

Alifano, P., Rivellini, F., Piscitelli, C., Arraiano, C.M., Bruni, C.B., and Carlomagno, M.S. (1994). Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease Pdependent processing of a polycistronic mRNA. *Genes Dev* 8, 3021-3031.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.

An, D., Apidianakis, Y., Boechat, A.L., Baldini, R.L., Goumnerov, B.C., and Rahme, L.G. (2009). The pathogenic properties of a novel and conserved gene product, KerV, in proteobacteria. *PLoS One* 4, e7167.

Antranikian, G. (2006). Technologieführer: Grundlagen-Anwendungen-Trends. Hans-Jörg Bullinger (Hrsg.): *Springer Verlag*, Berlin.

Arnould, J.M., and Frentz, R. (1975). Presence, isolation and chemical structure of a substance characteristic of cardiac tissue in *Carcinus maenas* (L.): beta-alanylhistamine. *Comp Biochem Physiol* C 50, 59-66.

Arora, S.K., Neely, A.N., Blair, B., Lory, S., and Ramphal, R. (2005). Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect Immun* **73**, 4395-4398.

Arraiano, C.M., Andrade, J.M., Domingues, S., Guinote, I.B., Malecki, M., Matos, R.G., Moreira, R.N., Pobre, V., Reis, F.P., Saramago, M., Silva, I.J., and Viegas, S.C. (2010). The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev* 34, 883-923. Arvidsson, P.I., Ryder, N.S., Weiss, H.M., Gross, G., Kretz, O., Woessner, R., and Seebach, D. (2003). Antibiotic and hemolytic activity of a β^2/β^3 peptide capable of folding into a 12/10-helical secondary structure. *Chembiochem* **4**, 1345-1347.

Ashiuchi, M., Yoshimura, T., Kitamura, T., Kawata, Y., Nagai, J., Gorlatov, S., Esaki, N., and Soda, K. (1995). *In vivo* effect of GroESL on the folding of glutamate racemase of *Escherichia coli*. *J Biochem* 117, 495-498.

Babizhayev, M.A., Seguin, M.C., Gueyne, J., Evstigneeva, R.P., Ageyeva, E.A., and Zheltukhina, G.A. (1994). L-carnosine (betaalanyl-L-histidine) and carcinine (betaalanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipidperoxidase activities. *Biochem J* **304**, 509-516.

Baneyx, F., and Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli. Nat Biotechnol* **22**, 1399-1408.

Bassler, B.L. (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**, 421-424.

Bauman, S.J., and Kuehn, M.J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. *BMC Microbiol* **9**, 26.

Bautista, A.D., Appelbaum, J.S., Craig, C.J., Michel, J., and Schepartz, A. (2010). Bridged β^3 -peptide inhibitors of p53-hDM2 complexation: correlation between affinity and cell permeability. *J Am Chem Soc* 132, 2904-2906.

Belasco, J.G., and Higgins, C.F. (1988). Mechanisms of mRNA decay in bacteria: a perspective. *Gene* 72, 15-23.

Bellia, F., Calabrese, V., Guarino, F., Cavallaro, M., Cornelius, C., De Pinto, V., and Rizzarelli, E. (2009). Carnosinase levels in aging brain: redox state induction and cellular stress response. *Antioxid Redox Signal* 11, 2759-2775. **Ben-Zvi, A.P., and Goloubinoff, P. (2001).** Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J Struct Biol* **135**, 84-93.

Bergeron, L.M., Tokatlian, T., Gomez, L., and Clark, D.S. (2009). Redirecting the inactivation pathway of penicillin amidase and increasing amoxicillin production *via* a thermophilic molecular chaperone. *Biotechnol Bioeng* 102, 417-424.

Berka, R.M., and Vasil, M.L. (1982). Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. *J Bacteriol* 152, 239-245.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli. J Bacteriol* **62**, 293-300.

Bielecki, P., Glik, J., Kawecki, M., and Martins dos Santos, V.A. (2008). Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* **30**, 777-790.

Bitter, W. (2003). Secretins of *Pseudomonas aeruginosa*: large holes in the outer membrane. *Arch Microbiol* **179**, 307-314.

Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Jakobsen, T.H., Phipps, R., Nielsen, A.K., Rybtke, M.T., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Høiby, N., and Ciofu, O. (2010). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One* 5, e10115.

Blum, P., Velligan, M., Lin, N., and Matin, A. (1992). DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Biotechnology (N Y)* 10, 301-304.

Boldyrev, A.A. (2000). Problems and perspectives in studying the biological role of carnosine. *Biochemistry (Mosc)* **65**, 751-756.

Boldyrev, A.A., and Severin, S.E. (1990). The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv Enzyme Regul* **30**, 175-194. Bompard-Gilles, C., Villeret, V., Davies, G.J., Fanuel, L., Joris, B., Frère, J.M., and Van Beeumen, J. (2000). A new variant of the Ntn hydrolase fold revealed by the crystal structure of L-aminopeptidase D-alaesterase/amidase from *Ochrobactrum anthropi*. *Structure* **8**, 153-162.

Boulette, M.L., Baynham, P.J., Jorth, P.A., Kukavica-Ibrulj, I., Longoria, A., Barrera, K., Levesque, R.C., and Whiteley, M. (2009). Characterization of alanine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and its importance for proliferation *in vivo*. *J Bacteriol* 191, 6329-6334.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371, 578-586.

Brandling-Bennett, H.A., and Morel, K.D. (2010). Common wound colonizers in patients with epidermolysis bullosa. *Pediatr Dermatol* 27, 25-28.

Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., and Murzin, A.G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378, 416-419.

Bukharin, O.V., Chernova, O.L., and Matiushina, S.B. (1999). Ability of *staphylococcus* to inactivate carnosine. *Biull Eksp Biol Med* 127, 545-546.

Campos-García, J., Ordónez, L.G., and Soberón-Chávez, G. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa hscA* gene encodes Hsc66, a DnaK homologue. *Microbiology* 146, 1429-1435.

Carlos, D., Fremond, C., Samarina, A., Vasseur, V., Maillet, I., Ramos, S.G., Erard, F., Quesniaux, V., Ohtsu, H., Silva, C.L., Faccioli, L.H., and Ryffel, B. (2009). Histamine plays an essential regulatory role in lung inflammation and protective immunity in the acute phase of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 77, 5359-5368.
Carrier, T.A., and Keasling, J.D. (1997). Controlling messenger RNA stability in bacteria: strategies for engineering gene expression. *Biotechnol Prog* **13**, 699-708.

Carrio, M.M., and Villaverde, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol* **96**, 3-12.

Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., and Farrand, S.K. (1998). Production of acylhomoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. Mol *Plant Microbe Interact* 11, 1119-1129.

Chastre, J., and Fagon, J.Y. (2002). Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 867-903.

Chen, C.Y., J.G. (1990). and Belasco, Degradation of pufLMX mRNA in Rhodobacter *capsulatus* is initiated by nonrandom endonucleolytic Jcleavage. Bacteriol 172, 4578-4586.

Chen, Z., Sakurai, E., Hu, W., Jin, C., Kiso, Y., Kato, M., Watanabe, T., Wei, E., and Yanai, K. (2004). Pharmacological effects of carcinine on histaminergic neurons in the brain. *Br J Pharmacol* 143, 573-580.

Chien, J., Ota, T., Aletti, G., Shridhar, R., Boccellino, M., Quagliuolo, L., Baldi, A., and Shridhar, V. (2009). Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration. *Mol Cell Biol* 29, 4177-4187.

Chilov, G.G., Sidorova, A.V., and Švedas, V.K. (2007). Quantum chemical studies of the catalytic mechanism of N-terminal nucleophile hydrolase. *Biochemistry (Mosc)* 72, 495-500.

Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1974). *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 71, 3672-3676.

Choi, J.Y., Sifri, C.D., Goumnerov, B.C., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., and Calderwood, S.B. (2002). Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *J Bacteriol* 184, 952-961. Chou, C.P., Kuo, B.Y., and Lin, W.J. (1999a). Optimization of the host/vector system and culture conditions for production of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* **88**, 160-167.

Chou, C.P., Tseng, J.H., Kuo, B.Y., Lai, K.M., Lin, M.I., and Lin, H.K. (1999b). Effect of SecB chaperone on production of periplasmic penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **15**, 439-445.

Chou, C.P., Yu, C.C., Tseng, J.H., Lin, M.I., and Lin, H.K. (1999c). Genetic manipulation to identify limiting steps and develop strategies for high-level expression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 63, 263-272.

Chugani, S., and Greenberg, E.P. (2007). The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression. *Microb Pathog* **42**, 29-35.

Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S., and Engel, J.N. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity *in vitro* and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* 67, 3625-3630.

Craig, E., Yan, W., and James, P. (1999). Genetic dissection of the Hsp70 chaperone system of yeast. In: Molecular chaperones and folding catalysts (Bukau, E. (Ed.)). *Harwood Academic Publisher* 7, 139-162.

Cunningham, L., and Guest, J.R. (1998). Transcription and transcript processing in the *sdhCDAB-sucABCD* operon of *Escherichia coli*. *Microbiology* 144, 2113-2123.

Daly, R., and Hearn, M.T. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* **18**, 119-138.

Daou-Chabo, R., and Condon, C. (2009). RNase J1 endonuclease activity as a probe of RNA secondary structure. *RNA* **15**, 1417-1425.

de Lorenzo, V., Eltis, L., Kessler, B., and Timmis, K.N. (1993). Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lac1^q/Ptrplac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**, 17-24. Depuydt, M., Leonard, S.E., Vertommen, D., Denoncin, K., Morsomme, P., Wahni, K., Messens, J., Carroll, K.S., and Collet, J.F. (2009). A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science* 326, 1109-1111.

Deuerling, E., Patzelt, H., Vorderwülbecke, S., Rauch, T., Kramer, G., Schaffitzel, E., Mogk, A., Schulze-Specking, A., Langen, H., and Bukau, B. (2003). Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities. *Mol Microbiol* 47, 1317-1328.

Döring, G., Obernesser, H.J., Botzenhart, K., Flehmig, B., Høiby, N., and Hofmann, A. (1983). Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 147, 744-750.

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

Ehretsmann, C.P., Carpousis, A.J., and Krisch, H.M. (1992). mRNA degradation in procaryotes. *FASEB J* 6, 3186-3192.

Elander, R.P. (2003). Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 385-392.

Fahnert, B., Lilie, H., and Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 89, 93-142.

Fanuel, L., Goffin, C., Cheggour, A., Devreese, B., Van Driessche, G., Joris, B., Van Beeumen, J., and Frére, J.M. (1999a). The DmpA aminopeptidase from *Ochrobactrum anthropi* LMG7991 is the prototype of a new terminal nucleophile hydrolase family. *Biochem J* 341, 147-155.

Fanuel, L., Thamm, I., Kostanjevecki, V., Samyn, B., Joris, B., Goffin, C., Brannigan, J., Van Beeumen, J., and Frére, J.M. (1999b). Two new aminopeptidases from *Ochrobactrum anthropi* active on D-alanyl-*p*nitroanilide. *Cell Mol Life Sci* 55, 812-818. Fernandes, M., Silva, R., Rössle, S.C., Bisch, P.M., Rondinelli, E., and Urményi, T.P. (2005). Gene characterization and predicted protein structure of the mitochondrial chaperonin HSP10 of *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 349, 135-142.

Fisher, D.E., Amend, J.F., Strumeyer, D.H., and Fisher, H. (1978). A role for carnosine and anserine in histamine metabolism of the traumatized rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 158, 402-405.

Fitzpatrick, J.C., Fisher, H., and Flancbaum, L. (1991). Mobilization of renal carnosine and histidine to histamine during compound-48/80-induced shock. *Nephron* 59, 299-303.

Flancbaum, L., Fitzpatrick, J.C., Brotman, D.N., Marcoux, A.M., Kasziba, E., and Fisher, H. (1990). The presence and significance of carnosine in histaminecontaining tissues of several mammalian species. *Agents Actions* **31**, 190-196.

Fleisher-Berkovich, S., Abramovitch-Dahan, C., Ben-Shabat, S., Apte, R., and Beit-Yannai, E. (2009). Inhibitory effect of carnosine and N-acetyl carnosine on LPSinduced microglial oxidative stress and inflammation. *Peptides* **30**, 1306-1312.

Frackenpohl, J., Arvidsson, P.I., Schreiber, J.V., and Seebach, D. (2001). The outstanding biological stability of β- and γ -peptides toward proteolytic enzymes: an *in vitro* investigation with fifteen peptidases. *Chembiochem* **2**, 445-455.

Fuchs, V., Jaeger, K.-E., Wilhelm, S., and Rosenau, F. (2010). The BapF protein from Pseudomonas aeruginosa is a β -peptidyl aminopeptidase. *World J Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s11274-11010-10484-11276.

Gademann, K., Kimmerlin, T., Hoyer, D., and Seebach, D. (2001). Peptide folding induces high and selective affinity of a linear and small β -peptide to the human somatostatin receptor 4. *J Med Chem* 44, 2460-2468.

Gambello, M.J., Kaye, S., and Iglewski, B.H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* 61, 1180-1184. Gamper, M., and Haas, D. (1993). Processing of the *Pseudomonas arcDABC* mRNA requires functional RNase E in *Escherichia coli. Gene* 129, 119-122.

Gaynes, R., and Edwards, J.R. (2005). Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* **41**, 848-854.

Georgiou, G., and Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 7, 190-197.

Geueke, B., Heck, T., Limbach, M., Nesatyy, V., Seebach, D., and Kohler, H.-P.E. (2006). Bacterial β -peptidyl aminopeptidases with unique substrate specificities for β -oligopeptides and mixed β , α -oligopeptides. *FEBS J* **273**, 5261-5272.

Geueke, B., and Kohler, H.-P.E. (2007). Bacterial β -peptidyl aminopeptidases: on the hydrolytic degradation of β -peptides. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 1197-1204.

Geueke, B., Namoto, K., Agarkova, I., Perriard, J.C., Kohler, H.-P.E., and Seebach, D. (2005a). Bacterial cell penetration by β^3 -Oligohomoarginines: indications for passive transfer through the lipid bilayer. *Chembiochem* **6**, 982-985.

Geueke, B., Namoto, K., Seebach, D., and Kohler, H.-P.E. (2005b). A novel β -peptidyl aminopeptidase (BapA) from strain 3-2W4 cleaves peptide bonds of synthetic β -tri- and β dipeptides. *J Bacteriol* **187**, 5910-5917.

Goeddel, D.V., Yansura, D.G., and Caruthers, M.H. (1978). How *lac* repressor recognizes *lac* operator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3578-3582.

Gomori, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol* 1, 138-146.

Gonzales, T., and Robert-Baudouy, J. (1996). Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol Rev* 18, 319-344.

Graumann, K., and Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* **1**, 164-186. **Gross, D.C., and Cody, Y.S. (1985).** Mechanism of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. *Can J Microbiol* **31**, 403-410.

Guerra-Santos, L., Käppeli, O., and Fiechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl Environ Microbiol* **48**, 301-305.

Guiotto, A., Calderan, A., Ruzza, P., and Borin, G. (2005). Carnosine and carnosinerelated antioxidants: a review. *Curr Med Chem* 12, 2293-2315.

Gumpert, J., Cron, H., Plapp, R., Niersbach, H., and Hoischen, C. (1996). Synthesis and secretion of recombinant penicillin G acylase in bacterial L-forms. *J Basic Microbiol* **36**, 89-98.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

Hancock, R.E. (1998). Resistance mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gramnegative bacteria. *Clin Infect Dis* 27, 93-99.

Hanson, H.T., and Smith, E.L. (1949). Carnosinase; an enzyme of swine kidney. J Biol Chem 179, 789-801.

Harris, R.C., Tallon, M.J., Dunnett, M., Boobis, L., Coakley, J., Kim, H.J., Fallowfield, J.L., Hill, C.A., Sale, C., and Wise, J.A. (2006). The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human *vastus lateralis*. *Amino Acids* **30**, 279-289.

Harrison, E.M., Carter, M.E., Luck, S., Ou, H.Y., He, X., Deng, Z., O'Callaghan, C., Kadioglu, A., and Rajakumar, K. (2010). Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect Immun* 78, 1437-1446.

Hartl, F.U., and Martin, J. (1995). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 5, 92-102.

Heck, T. (2006). Novel Aminopeptidases for biodegradation and synthesis of β -peptides. Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Diplomarbeit.

Heck, T., Kohler, H.-P.E., Limbach, M., Flögel, O., Seebach, D., and Geueke, B. (2007). Enzyme-catalyzed formation of β peptides: β -Peptidyl Aminopeptidases BapA and DmpA acting as β -peptide-synthesizing enzymes. *Chem Biodivers* **4**, 2016-2030.

Heck, T., Limbach, M., Geueke, B., Zacharias, M., Gardiner, J., Kohler, H.-P.E., and Seebach, D. (2006). Enzymatic degradation of β - and mixed α , β - oligopeptides. *Chem Biodivers* **3**, 1325-1348.

Heck, T., Seebach, D., Osswald, S., Ter Wiel, M.K., Kohler, H.-P.E., and Geueke, B. (2009). Kinetic resolution of aliphatic β -amino acid amides by β -aminopeptidases. *Chembiochem* **10**, 1558-1561.

Hendrickson, E.L., Plotnikova, J., Mahajan-Miklos, S., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (2001). Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 *rpoN* gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J Bacteriol* 183, 7126-7134.

Heras, B., Shouldice, S.R., Totsika, M., Scanlon, M.J., Schembri, M.A., and Martin, J.L. (2009). DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 7, 215-225.

Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R.J., Murshudov, G.N., Verma, C.S., Dodson, G.G., and Wilson, K.S. (2000). Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from *Escherichia coli* reveals the linker peptide blocking the activesite cleft. *J Mol Biol* **302**, 887-898.

Heyland, J., Antweiler, N., Lutz, J., Heck, T., Geueke, B., Kohler, H.-P.E., Blank, L.M., and Schmid, A. (2010). Simple enzymatic procedure for carnosine synthesis: whole-cell biocatalysis and efficient biocatalyst recycling. *Microbial Biotechnology* **3**, 74-83.

Higgins, C.F., Peltz, S.W., and Jacobson, A. (1992). Turnover of mRNA in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 2, 739-747.

Hipkiss, A.R. (1998). Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int J Biochem Cell Biol* 30, 863-868.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.

Hobart, L.J., Seibel, I., Yeargans, G.S., and Seidler, N.W. (2004). Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. *Life Sci* **75**, 1379-1389.

Hockney, R.C. (1994). Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 12, 456-463.

Hoffmann, F., and Rinas, U. (2001). On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation. *Biotechnol Bioeng* **76**, 333-340.

Holloway, B.W., Krishnapillai, V., and Morgan, A.F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol Rev* 43, 73-102.

Hook, D.F., Gessier, F., Noti, C., Kast, P., and Seebach, D. (2004). Probing the proteolytic stability of β -peptides containing α -fluoro- and α -hydroxy- β -amino acids. *Chembiochem* **5**, 691-706.

Houry, W.A. (2001). Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr Protein Pept Sci* **2**, 227-244.

Hsueh, P.R., Teng, L.J., Yang, P.C., Chen, Y.C., Ho, S.W., and Luh, K.T. (1998). Persistence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in an intensive care burn unit. *J Clin Microbiol* **36**, 1347-1351.

Iglewski, B.H., and Kabat, D. (1975). NADdependent 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., and Maxwell, E.S. (1978). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3211-3215.

Ignatova, Z., Hörnle, C., Nurk, A., and Kasche, V. (2002). Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 146-149.

Ignatova, Z., Wischnewski, F., Notbohm, H., and Kasche, V. (2005). Pro-sequence and Ca²⁺-binding: Implications for folding and maturation of Ntn-hydrolase Penicillin Amidase from *E. coli. J Mol Biol* **348**, 999-1014.

Ikura, K., Kokubu, T., Natsuka, S., Ichikawa, A., Adachi, M., Nishihara, K., Yanagi, H., and Utsumi, S. (2002). Cooverexpression of folding modulators improves the solubility of the recombinant guinea pig liver transglutaminase expressed in *Escherichia coli. Prep Biochem Biotechnol* 32, 189-205.

Jackson, M.C., Kucera, C.M., and Lenney, J.F. (1991). Purification and properties of human serum carnosinase. *Clinica Chimica Acta* 196, 193.

Jaeger, K.-E. (1994). Extracellular enzymes of *Pseudomonas aeruginosa* as virulence factors. *Immun Infekt* 22, 177-180.

Jager, S.A.W., Jekel, P.A., and Janssen, D.B. (2007). Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of β -lactam antibiotics. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1335-1344.

Jana, S., and Deb, J.K. (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol* 67, 289-298.

Jasin, M. (1996). Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet* **12**, 224-228.

Jia, M.R., Wei, T., and Xu, W.F. (2010). The analgesic activity of Bestatin as a potent APN inhibitor. *Front Neurosci* 4, 50.

Jomaa, A., Damjanovic, D., Leong, V., Ghirlando, R., Iwanczyk, J., and Ortega, J. (2007). The inner cavity of *Escherichia coli* DegP protein is not essential for molecular chaperone and proteolytic activity. *J Bacteriol* 189, 706-716.

Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.A., and Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* **35**, 91-105. Jürgen, B., Breitenstein, A., Urlacher, V., Büttner, K., Lin, H., Hecker, M., Schweder, T., and Neubauer, P. (2010). Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 9, 41.

Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (1995). Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* 177, 3998-4008.

Kang, J.H. (2009). Ferritin enhances salsolinol-mediated DNA strand breakage: protection by carnosine and related compounds. *Toxicol Lett* **188**, 20-25.

Kasche, V., Lummer, K., Nurk, A., Piotraschke, E., Rieks, A., Stoeva, S., and Voelter, W. (1999). Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1433, 76-86.

Kawaguchi, S., Müller, J., Linde, D., Kuramitsu, S., Shibata, T., Inoue, Y., Vassylyev, D.G., and Yokoyama, S. (2001). The crystal structure of the ttCsaA protein: an export-related chaperone from *Thermus thermophilus*. *Embo J* 20, 562-569.

Kessler, C., Neumaier, P.S., and Wolf, W. (1985). Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases - a review. *Gene* 33, 1-102.

Kessler, E., and Safrin, M. (1988). Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Bacteriol* 170, 5241-5247.

Kiely, P.D., O'Callaghan, J., Abbas, A., and O'Gara, F. (2008). Genetic analysis of genes involved in dipeptide metabolism and cytotoxicity in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 154, 2209-2218.

Kim, P.S., and Baldwin, R.L. (1982). Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu Rev Biochem* **51**, 459-489. Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C.F., Stanke, F., Larbig, K.D., Heeb, S., Schöck, U., Pohl, T.M., Wiehlmann, L., and Tümmler, B. (2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol* 192, 1113-1121.

Knippers, R. (2001). Molekulare Genetik. *Georg Thieme Verlag*; Stuttgart.

Koch, A.L. (1983). The protein burden of *lac* operon products. *J Mol Evol* 19, 455-462.

Kohlenberg, A., Schwab, F., Geffers, C., Behnke, M., Rüden, H., and Gastmeier, P. (2008). Time-trends for Gram-negative and multidrug-resistant Gram-positive bacteria associated with nosocomial infections in German intensive care units between 2000 and 2005. *Clin Microbiol Infect* 14, 93-96.

Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechère, J.C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182, 5990-5996.

Kohyama, T., Yamauchi, Y., Takizawa, H., Kamitani, S., Kawasaki, S., and Nagase, T. (2010). Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 337, 77-81.

Kolaj, O., Spada, S., Robin, S., and Wall, J.G. (2009). Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **8**, 9.

Komeda, H., and Asano, Y. (2005). A DmpA-homologous protein from *Pseudomonas* sp. is a dipeptidase specific for beta-alanyl dipeptides. *FEBS J* 272, 3075-3084.

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175-176.

Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop, R.M., 2nd, and Peterson, K.M. (1994). pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* 16, 800-802. **Kreuz, A. (2006).** Coexpression von Chaperonen und Faltungskatalysatoren aus *Pseudomonas aeruginosa*: Neue Strategien zur Optimierung mikrobieller Expressionssysteme: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation.

Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H.R., Ehrmann, M., and Clausen, T. (2008). Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature* **453**, 885-890.

Kukavica-Ibrulj, I., Bragonzi, A., Paroni, M., Winstanley, C., Sanschagrin, F., O'Toole, G.A., and Levesque, R.C. (2008). *In vivo* growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. *J Bacteriol* 190, 2804-2813.

Kulich, S.M., Frank, D.W., and Barbieri, J.T. (1993). Purification and characterization of exoenzyme S from *Pseudomonas* aeruginosa 388. Infect Immun **61**, 307-313.

Kutzbach, C., and Rauenbusch, E. (1974). Preparation and general properties of crystalline penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **355**, 45-53.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage *T4. Nature* **227**, 680-685.

Lasica, A.M., and Jagusztyn-Krynicka, E.K. (2007). The role of Dsb proteins of Gramnegative bacteria in the process of pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 626-636.

Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 7, R90.

Lee, S.C., and Olins, P.O. (1992). Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267, 2849-2852.

Lenney, J.F., Peppers, S.C., Kucera-Orallo, C.M., and George, R.P. (1985). Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem J* 228, 653-660.

Li, C., Yao, X., and Lu, C.D. (2010). Regulation of the *dauBAR* operon and characterization of D-amino acid dehydrogenase DauA in arginine and lysine catabolism of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **156**, 60-71.

Li, Y., and Altman, S. (2003). A specific endoribonuclease, RNase P, affects gene expression of polycistronic operon mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13213-13218.

Li, Y., and Altman, S. (2004). Polarity effects in the lactose operon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 339, 31-39.

Linde, D., Volkmer-Engert, R., Schreiber, S., and Müller, J.P. (2003). Interaction of the *Bacillus subtilis* chaperone CsaA with the secretory protein YvaY. *FEMS Microbiol Lett* 226, 93-100.

Lorenz, H. (1986). Theodor Escherich - a pediatrician and bacteriologist. Observations on the 100th anniversary of the discovery of the *Bacterium coli* commune. *Z Gesamte Hyg* **32**, 630-631.

Lorenz, P., and Zinke, H. (2005). White biotechnology: differences in US and EU approaches? *Trends Biotechnol* 23, 570-574.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**, 1051-1060.

Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194-222.

MacEachran, D.P., Stanton, B.A., and O'Toole, G.A. (2008). Cif is negatively regulated by the TetR family repressor CifR. *Infect Immun* 76, 3197-3206.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (2002). Brock Mikrobiologie. *Spektrum Verlag*: Heidelberg.

Maier, T., Ferbitz, L., Deuerling, E., and Ban, N. (2005). A cradle for new proteins: trigger factor at the ribosome. *Curr Opin Struct Biol* 15, 204-212.

Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**, 512-538.

Mao, F., Dam, P., Chou, J., Olman, V., and Xu, Y. (2009). DOOR: a database for prokaryotic operons. *Nucleic Acids Res* 37, D459-463.

Maresová, H., Marková, Z., Valesová, R., Sklenár, J., and Kyslík, P. (2010). Heterologous expression of leader-less *pga* gene in *Pichia pastoris*: intracellular production of prokaryotic enzyme. *BMC Biotechnol* 10, 7.

Martínez-Alonso, M., Toledo-Rubio, V., Noad, R., Unzueta, U., Ferrer-Miralles, N., Roy, P., and Villaverde, A. (2009). Rehosting of bacterial chaperones for high-quality protein production. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7850-7854.

Martínez, A., Ostrovsky, P., and 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.

Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M., and Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 288, 911-940.

Mathy, N., Bénard, L., Pellegrini, O., Daou, R., Wen, T., and Condon, C. (2007). 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* **129**, 681-692.

McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., and Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143, 3703-3711.

McLaren, R.S., Newbury, S.F., Dance, G.S., Causton, H.C., and Higgins, C.F. (1991). mRNA degradation by processive 3'-5' exoribonucleases *in vitro* and the implications for prokaryotic mRNA decay *in vivo*. J Mol Biol 221, 81-95. Medina, M.G., Carbonell, X., and Villaverde, A. (2002). Connection between gene dosage and protein stability revealed by a high-yield production of recombinant proteins in an *E. coli* LexA1(Ind⁻) background. *Biotechnol Bioeng* **78**, 722-730.

Meltzer, M., Hasenbein, S., Mamant, N., Merdanovic, M., Poepsel, S., Hauske, P., Kaiser, M., Huber, R., Krojer, T., Clausen, T., and Ehrmann, M. (2009). Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 160, 660-666.

Merril, C.R. (1990). Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* 182, 477-488.

Middelberg, A.P. (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 20, 437-443.

Miller, J.H. (1992). A short course in bacterial genetics. In: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria: Cold Spring Harbor, NY, USA: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Miller, J.H., and Reznikoff, W.S. (1978). The Operon. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Mogk, A., Mayer, M.P., and Deuerling, E. (2001). Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential: Mechanismen der Proteinfaltung. *Biologie in unserer Zeit* 31, 182-192.

Müller, J.P., Bron, S., Venema, G., and van Dijl, J.M. (2000). Chaperone-like activities of the CsaA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 146, 77-88.

Nagai, K., Suda, T., Kawasaki, K., and Mathuura, S. (1986). Action of carnosine and β -alanine on wound healing. *Surgery* 100, 815-821.

Narayanan, N., Xu, Y., and Chou, C.P. (2006). High-level gene expression for recombinant penicillin acylase production using the *araB* promoter system in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 22, 1518-1523.

Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T. (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 884-889. **Noel, R.J., Jr., and Reznikoff, W.S. (1998).** CAP, the -45 region, and RNA polymerase: three partners in transcription initiation at *lacP1* in *Escherichia coli. J Mol Biol* **282**, 495-504.

Numata, Y., Terui, T., Okuyama, R., Hirasawa, N., Sugiura, Y., Miyoshi, I., Watanabe, T., Kuramasu, A., Tagami, H., and Ohtsu, H. (2006). The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. *J Invest Dermatol* 126, 1403-1409.

O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**, 449-461.

Ochsner, U.A., and Reiser, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa. Proc Natl Acad Sci* USA 92, 6424-6428.

Ochsner, U.A., Reiser, J., Fiechter, A., and Witholt, B. (1995). Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl Environ Microbiol* 61, 3503-3506.

Oehler, S., Alberti, S., and Müller-Hill, B. (2006). Induction of the *lac* promoter in the absence of DNA loops and the stoichiometry of induction. *Nucleic Acids Res* **34**, 606-612.

Ogden, G., and Foldi, P. (1987). Amino acid analysis: An overview of current methods. *LC*-*GC* **5**, 28-38.

Olsen, G.J., Woese, C.R., and Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* 176, 1-6.

Ospina, S., Merinoa, E., Ramírez, O.T., and López-Munguia, A. (1995). Recombinant whole cell penicillin acylase biocatalyst: production, characterization and use in the synthesis and hydrolysis of antibiotics. *Biotechnol Lett* **17**, 615-620.

Ostroff, R.M., and Vasil, M.L. (1987). Identification of a new phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **169**, 4597-4601. **Palleroni, N.J. (1984).** *Pseudomonaceae*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.): Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Palleroni, N.J. (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**, 231-251.

Pan, K.L., Hsiao, H.C., Weng, C.L., Wu, M.S., and Chou, C.P. (2003). Roles of DegP in prevention of protein misfolding in the periplasm upon overexpression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185, 3020-3030.

Peluso, L., de Luca, C., Bozza, S., Leonardi, A., Giovannini, G., Lavorgna, A., De Rosa, G., Mascolo, M., De Luna, L.O., Catania, M.R., Romani, L., and Rossano, F. (2010). Protection against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice by recombinant OprFpulsed dendritic cell immunization. *BMC Microbiol* 10, 9-20.

Pène, F., Zuber, B., Courtine, E., Rousseau, C., Ouaaz, F., Toubiana, J., Tazi, A., Mira, J.P., and Chiche, J.D. (2008). Dendritic cells modulate lung response to *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of sepsisinduced immune dysfunction. *J Immunol* 181, 8513-8520.

Perel'man, M.I., Kornilova, Z., Paukov, V.S., Boikov, A.K., and Priimak, A.A. (1989). The effect of carnosine on the healing of a lung wound. *Biull Eksp Biol Med* 108, 352-356.

Perler, F.B., Davis, E.O., Dean, G.E., Gimble, F.S., Jack, W.E., Neff, N., Noren, C.J., Thorner, J., and Belfort, M. (1994). Protein splicing elements: inteins and exteins a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res* 22, 1125-1127.

Pesci, E.C., and Iglewski, B.H. (2003). Quorum sensing. In: Bacterial protein Toxins. Pesci, E. C., Iglewski, B. H, D. L. Burns, J. T. Barbieri, B. H. Iglewski, R. Rappuoli (eds.): *ASM Press*, Washington, D.C., USA. Peters, V., Kebbewar, M., Jansen, E.W., Jakobs, C., Riedl, E., Koeppel, H., Frey, D., Adelmann, K., Klingbeil, K., Mack, M., Hoffmann, G.F., Janssen, B., Zschocke, J., and Yard, B.A. (2009). Relevance of allosteric conformations and homocarnosine concentration on carnosinase activity. *Amino Acids* 38, 1607-1615.

Pfaffl, M.W. (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 1, 92-95.

Pinzon, N.M., and Ju, L.K. (2009a). Analysis of rhamnolipid biosurfactants by methylene blue complexation. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**, 975-981.

Pinzon, N.M., and Ju, L.K. (2009b). Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnol Lett* **31**, 1583-1588.

Polgár, L. (1989). Metalloproteases. In Mechanismus of Protease Action. *Boca Ratan, FL: CRC Press.*

Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol Life Sci* 62, 2161-2172.

Porter, E.A., Weisblum, B., and Gellman, S.H. (2002). Mimicry of host-defense peptides by unnatural oligomers: antimicrobial β -peptides. *J Am Chem Soc* **124**, 7324-7330.

Potvin, E., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2008). Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 38-55.

Powell, K.A., Ramer, S., del Cardayré, S.B., Stemmer, W.P.C., Tobin, M.B., Longchamp, P.F., and Huisman, G.W. (2001). Gerichtete Evolution und Biokatalyse. *Angew Chem* 113, 4068-4080.

Prentki, P., and Krisch, H.M. (1984). *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**, 303-313.

Price, M.N., Huang, K.H., Alm, E.J., and Arkin, A.P. (2005). A novel method for accurate operon predictions in all sequenced prokaryotes. *Nucl. Acids Res* 33, 880-892.

Quinn, J.P. (1992). Intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Galli, E., Silver, S., Witholt, B. (eds.). *American Soc Microbiol*, Washington D.C., USA, 154–160.

Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268, 1899-1902.

Rai, M., and Padh, H. (2001). Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr Science* **80**, 1121-1128.

Rajendhran, J., and Gunasekaran, P. (2004). Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases. *J Biosci Bioeng* 97, 1-13.

Ramírez, O.T., Zamora, R., Quintero, R., and López-Munguía, A. (1994). Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: the case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb Technol* **16**, 895-903.

Rashid, M.H., and Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4885-4890.

Rashid, M.H., Rao, N.N., and Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J Bacteriol* 182, 225-227.

Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290, 205-218.

Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1994). Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* 244, 19-61.

Rawlings, N.D., and Morton, F.R. (2008). The MEROPS batch BLAST: a tool to detect peptidases and their non-peptidase homologues in a genome. *Biochimie* **90**, 243-259.

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38, D227-233.

Renner, C., Zemitzsch, N., Fuchs, B., Geiger, K.D., Hermes, M., Hengstler, J., Gebhardt, R., Meixensberger, J., and Gaunitz, F. (2010). Carnosine retards tumor growth *in vivo* in an NIH3T3-HER2/neu mouse model. *Mol Cancer* 9, 2-9.

Rich, D.H., Moon, B.J., and Harbeson, S. (1984). Inhibition of aminopeptidases by amastatin and bestatin derivatives. Effect of inhibitor structure on slow-binding processes. *J Med Chem* 27, 417.

Roth, M. (1971). Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem* **43**, 880-882.

Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., and Bukau, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J* **16**, 1501-1507.

Rueping, M., Mahajan, Y., Sauer, M., and Seebach, D. (2002). Cellular uptake studies with β -peptides. *Chembiochem* 3, 257-259.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd edn. New York: *Cold Spring Habor Laboratory Press.*

Santillan, M., and Mackey, M.C. (2001). Dynamic regulation of the tryptophan operon: a modeling study and comparison with experimental data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1364-1369.

Satake, S., and Nakae, T. (1995). Outer membrane permeability of beta-lactamase inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 129, 251-254.

Sauerhöfer, S., Yuan, G., Braun, G.S., Deinzer, M., Neumaier, M., Gretz, N., Floege, J., Kriz, W., van der Woude, F., and Moeller, M.J. (2007). L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes* **56**, 2425-2432.

Schlieker, C., Bukau, B., and Mogk, A. (2002). Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* **96**, 13-21.

Schmid, F.X. (1993). Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22, 123-142.

Schmid, F.X. (2001). Prolyl isomerases. *Adv Protein Chem* **59**, 243-282.

Schmidt, F.R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 363-372.

Schoen, P., Everts, H., de Boer, T., and van Oeveren, W. (2003). Serum carnosinase activity in plasma and serum: validation of a method and values in cardiopulmonary bypass surgery. *Clin Chem* **49**, 1930-1932.

Schumacher, R., Buck, F., and Rüterjans, H. (1989). NMR study of the structural changes induced in the *E. coli lac* promoter by the specific binding of the CAP protein. *Nucleic Acids Res* 17, 5097-5105.

Seebach, D., Abele, S., Schreiber, J.V., Martinoni, B., Nussbaum, A.K., Schild, H., Schulz, H., Hennecke, H., Woessner, R., and Bitsch, F. (1998). Biological and pharmacokinetic studies with β -peptides. *Chimia* 52, 734-739.

Seebach, D., Beck, A.K., and Bierbaum, D.J. (2004). The world of β - and γ -peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components. *Chem Biodivers* **1**, 1111-1239.

Seebach, D., M., Overhand, M., Kühnle, F.N.M., Martinoni, B., Oberer, L., Hommel, U., and Widmer, H. (1996). β -Peptides: synthesis by *Arndt-Eistert* homologation with concomitant peptide coupling. Structure determination by NMR and CD spectroscopy and by X-ray crystallography. Helical secondary structure of a β -hexapeptide in solution and its stability towards pepsin. *Helv Chim Acta* **79**, 913-941.

Sewald, N. (2003). Synthetic routes towards enantiomerically pure β -amino acids. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 5794-5795.

Shapova, Y.A., and Paetzel, M. (2007). Crystallographic analysis of *Bacillus subtilis* CsaA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 478-485.

Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Jr., Rinehart, K.L., and Farrand, S.K. (1997). Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6036-6041.

Shen, Y., Zhang, S., Fu, L., Hu, W., and Chen, Z. (2008). Carnosine attenuates mast cell degranulation and histamine release induced by oxygen-glucose deprivation. *Cell Biochem Funct* 26, 334-338. Shewale, J.G., and Sivaraman, H. (1989). Penicillin acylase: Enzyme production and its application in the manufacture of 6-APA. *Process Biochem* 24, 146-154.

Shuman, S. (1991). Recombination mediated by *vaccinia* virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10104-10108.

Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269, 32678-32684.

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotech* **1**, 784-791.

Sio, C.F., and Quax, W.J. (2004). Improved beta-lactam acylases and their use as industrial biocatalysts. *Curr Opin Biotechnol* 15, 349-355.

Sizmann, D., Keilmann, C., and Böck, A. (1990). Primary structure requirements for the maturation *in vivo* of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Eur J Biochem* 192, 143-151.

Skórko-Glonek, J., Lipinska, B., Krzewski, K., Zolese, G., Bertoli, E., and Tanfani, F. (1997). HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem* 272, 8974-8982.

Skórko-Glonek, J., Sobiecka-Szkatula, A., Narkiewicz, J., and Lipinska, B. (2008). The proteolytic activity of the HtrA (DegP) protein from *Escherichia coli* at low temperatures. *Microbiology* **154**, 3649-3658.

Skulachev, V.P. (2000). Biological role of carnosine in the functioning of excitable tissues. Centenary of Gulewitsch's discovery. *Biochemistry (Mosc)* **65**, 749-750.

Smith, L., Rose, B., Tingpej, P., Zhu, H., Conibear, T., Manos, J., Bye, P., Elkins, M., Willcox, M., Bell, S., Wainwright, C., and Harbour, C. (2006). Protease IV production in *Pseudomonas aeruginosa* from the lungs of adults with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 55, 1641-1644.

Smith, R.S., and Iglewski, B.H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* **6**, 56-60.

Sørensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U., and Mortensen, K.K. (2003a). A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin. *Protein Expr Purif* 32, 252-259.

Sørensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U., and Mortensen, K.K. (2003b). Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli*: completion of protein synthesis is the bottleneck. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **786**, 207-214.

Spencer, P.W., Titus, J.S., and Spencer, R.D. (1975). Direct fluorimetric assay for proteolytic activity against intact proteins. *Anal Biochem* 64, 556-566.

Stewart, D.E., Sarkar, A., and Wampler, J.E. (1990). Occurrence and role of *cis* peptide bonds in protein structures. *J Mol Biol* 214, 253-260.

Stoebel, D.M., Dean, A.M., and Dykhuizen, D.E. (2008). The cost of expression of *Escherichia coli lac* operon proteins is in the process, not in the products. *Genetics* 178, 1653-1660.

Stonehouse, M.J., Cota-Gomez, A., Parker, S.K., Martin, W.E., Hankin, J.A., Murphy, R.C., Chen, W., Lim, K.B., Hackett, M., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* 46, 661-676.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., and Olson, M.V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.

Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**, 37-44.

Studier, F.W., and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.

Subrini, O., and Betton, J.M. (2009). Assemblies of DegP underlie its dual chaperone and protease function. *FEMS Microbiol Lett* **296**, 143-148.

Swift, S., Downie, J.A., Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Salmond, G.P., and Williams, P. (2001). Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microb Physiol* 45, 199-270.

Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, U., and Wagner, F. (1985). Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. *Z Naturforsch C* **40**, 61-67.

Szabo, A., Langer, T., Schröder, H., Flanagan, J., Bukau, B., and Hartl, F.U. (1994). The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10345-10349.

Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 715-720.

Tartoff K.D. and Hobbs C.A. (1987). Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones. *Bethesda Res Lab Focus*, **9**, 12.

Taylor, A. (1993). Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J* 7, 290-298.

Teorell, T., and Stenhagen, E. (1938). Ein Universalpuffer für den pH-Bereich 2, 0 bis 12, 0. *Biochem Z* 299, 416-419.

Teufel, M., Saudek, V., Ledig, J.P., Bernhardt, A., Boularand, S., Carreau, A., Cairns, N.J., Carter, C., Cowley, D.J., Duverger, D., Ganzhorn, A.J., Guenet, C., Heintzelmann, B., Laucher, V., Sauvage, C., and Smirnova, T. (2003). Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem* 278, 6521-6531.

Thomas, J.G., Ayling, A., and Baneyx, F. (1997). Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol* **66**, 197-238.

Tremblay, J., and Deziel, E. (2008). Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microbiol* **48**, 509-515.

Tyagi, N.K., Fenton, W.A., and Horwich, A.L. (2009). GroEL/GroES cycling: ATP binds to an open ring before substrate protein favoring protein binding and production of the native state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20264-20269.

Ullers, R.S., Ang, D., Schwager, F., Georgopoulos, C., and Genevaux, P. (2007). Trigger Factor can antagonize both SecB and DnaK/DnaJ chaperone functions in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3101-3106.

Umezawa, N., Gelman, M.A., Haigis, M.C., Raines, R.T., and Gellman, S.H. (2002). Translocation of a β -peptide across cell membranes. *J Am Chem Soc* **124**, 368-369.

van Beilen, J.B., and Li, Z. (2002). Enzyme technology: an overview. *Curr Opin Biotechnol* 13, 338-344.

Van de Sandt, E.J.A.X., and De Vroom, E. (2000). Innovation in cephalosporin and penicillin production: Painting the antibiotics industry green. Chimica Oggi *18*, 72-75.

van der Drift, C., and Ketelaars, H.C. (1974). Carnosinase: its presence in *Pseudomonas aeruginosa. Antonie Van Leeuwenhoek* 40, 377-384.

Villaverde, A., and Carrio, M.M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* 25, 1385-1395.

Wagner, V.E., Gillis, R.J., and Iglewski, B.H. (2004). Transcriptome analysis of quorum-sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 22, 15-20.

Walter, S., and Buchner, J. (2002). Molecular chaperones - cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 1098-1113.

Wild, M., Caro, A.D., Hernández, A.L., Miller, R.M., and Soberón-Chávez, G. (1997). Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* monorhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol Lett* 153, 279-285. Wilson, K.S., and von Hippel, P.H. (1995). Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8793-8797.

Winsor, G.L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M.D., Hancock, R.E., and Brinkman, F.S. (2009). *Pseudomonas* Genome Database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**, D483-488.

Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M., and Williams, P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* 182, 6401-6411.

Withers, H., Swift, S., and Williams, P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 186-193.

Wu, Z.L., Qiao, J., Zhang, Z.G., Guengerich, F.P., Liu, Y., and Pei, X.Q. (2009). Enhanced bacterial expression of several mammalian cytochrome P450s by codon optimization and chaperone coexpression. *Biotechnol Lett* **31**, 1589-1593.

Xu, Y., Weng, C.L., Narayanan, N., Hsieh, M.Y., Anderson, W.A., Scharer, J.M., Moo-Young, M., and Chou, C.P. (2005). Chaperone-mediated folding and maturation of the penicillin acylase precursor in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6247-6253.

Xu, Z., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**, 741-750.

Yamada, R., and Kera, Y. (1998). D-amino acid hydrolysing enzymes. *Exs* 85, 145-155.

Yan, H., Guo, Y., Zhang, J., Ding, Z., Ha, W., and Harding, J.J. (2008). Effect of carnosine, aminoguanidine, and aspirin drops on the prevention of cataracts in diabetic rats. *Mol Vis* 14, 2282-2291.

Yang, Y., Biedendieck, R., Wang, W., Gamer, M., Malten, M., Jahn, D., and Deckwer, W.D. (2006). High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. *Microb Cell Fact* 5, 36. Yano, A., Horiya, S., Minami, T., Haneda, E., Ikeda, M., and Harada, K. (2010). Identification of antisense RNA stem-loops that inhibit RNA-protein interactions using a bacterial reporter system. *Nucleic Acids Res* **38**, 3489-3501.

Yanofsky, C. (2007). RNA-based regulation of genes of tryptophan synthesis and degradation, in bacteria. *RNA* **13**, 1141-1154.

Yeum, K.J., Orioli, M., Regazzoni, L., Carini, M., Rasmussen, H., Russell, R.M., and Aldini, G. (2010). Profiling histidine dipeptides in plasma and urine after ingesting beef, chicken or chicken broth in humans. *Amino Acids* 38, 847-858.

Zabin, I., and Fowler, A.V. (1978). The Operon. In Miller, J. H., Reznikoff, W.S. (eds.). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Plainview, NY, USA.

Zakharova, E., Horvath, M.P., and Goldenberg, D.P. (2009). Structure of a serine protease poised to resynthesize a peptide bond. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11034-11039.

Zhang, Y., and Miller, R.M. (1994). Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2101-2106.

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., and Dean, D.R. (1998). Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. J Biol Chem 273, 13264-13272.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl Acids Res* **31**, 3406-3415.

6 Anhang



Abb. 50 Expressionsplasmid pET22b *pga* für die die Expression der Penicillin G Acylase aus *E. coli* ATCC1105. Die Insertion des *pga* Gens in den Vektor pET22b HRS 1/4 erfolgte über die *Homing* Endonukleaseschnittstellen I-*Sce*I und PI-*Sce*I.



Abb. 51 Expressionsplasmid pET22b *pga/degP* für die die Expression der Penicillin G Acylase aus *E. coli* ATCC1105, zusammen mit dem Chaperongen *degP*. Die Insertion des PCR Fragmentes *pga/degP* in den Vektor pET22b HRS 1/4 erfolgte über die *Homing* Endonukleaseschnittstellen I-*Sce*I und PI-*Sce*I.



Abb. 52 Expressionsplasmid pET22b *degP/pga* für die die Expression der Penicillin G Acylase aus *E. coli* ATCC1105, zusammen mit dem Chaperongen *degP*. Die Insertion des PCR Fragmentes *degP/pga* in den Vektor pET22b HRS 1/4 erfolgte über die *Homing* Endonukleaseschnittstellen I-*Sce*I und PI-*Sce*I.



Abb. 53 Expressionsplasmid pEF (pET22b *bapF*) zur heterologen Expression der β -Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *P. aeruginosa* in *E. coli* BL21(DE3). Die Insertion des 1,1 kb großen Fragments des Gens *bapF* in den Vektor pET22b(+) erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *Eco*RI.



Abb. 54 Mutagenesevektor pSUP202 $\Delta bapF$ zur Herstellung der Insertionsmutanten *P. aeruginosa* PAFU2 (PAO1 $\Delta bapF$:: Ω Gm^R) und PA14FU3 (PA14 $\Delta pa14_45210$:: Ω Gm^R).



Abb. 55 Mutagenesevektor pSUP202 $\Delta pa1485$ zur Herstellung der Insertionsmutante *P. aeruginosa* PAFU1 (PAO1 $\Delta pa1485::\Omega$ Gm^R).



Abb. 56 Schematische Darstellung der Genregion von *pa1486 (bapF)* und den flankierenden strangaufwärts (UR) und strangabwärts (DR) gelegenen Bereiche zur Erzeugung der $\Delta bapF$ -Mutante in *P. aeruginosa*. Diese Abbildung zeigt ein Schema zur Erzeugung des Mutagenesevektors pSUP202 $\Delta bapF$, der zur Herstellung der *P. aeruginosa PAFU2* Mutante verwendet wurde. Im unteren Teil der Abbildung ist gezeigt, wie die Interposonkassette kloniert wurde (Gm^R: Gentamycin-Resistenzkassette).



Abb. 57 Alignment der Proteinsequenz der putativen β -Peptidyl Aminopeptidasen aus den humanpathogenen Stämmen Burkholderia cepacia (B. c.), Brucella abortus (B. a.) und Bordetella pertussis (B. p.) mit der β -Peptidyl Aminopeptidase BapF aus P. aeruginosa PAO1. Identische Aminosäuren sind schwarz und ähnliche Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Sequenzdaten der putativen β -Peptidyl Aminopeptidasen wurden der MEROPS Datenbank entnommen (Rawlings *et al.*, 2010).

Lebenslauf

Viola Fuchs

Diplom-Biologin

*05. Mai 1982, in Köln ledig, keine Kinder

Schulbildung

08/1988 - 06/1992	Gemeinschaftsgrundschule Wahlscheid; Rhein-Sieg-Kreis
08/1992 - 06/2001	Paul-Klee-Gymnasium, Overath; Rheinisch-Bergischer Kreis
	Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

- 10/2001 02/2006 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- 02/2007Abschluss des Diplomstudiengangs BiologieAnfertigung der Diplomarbeit am Institut für Molekulare Enzymtechnologieim Forschungszentrum Jülich; Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.Gutachter: Frau apl. Prof. Dr. Christiane Dahl (Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn); Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger.

<u>Thema der Diplomarbeit</u>: "Untersuchungen zu "Quorum Sensing"-Systemen in *Pseudomonas aeruginosa*".

02/2007 – 07/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Zentrum für Mikrobielle Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich.
Mitarbeit am DBU-geförderten Projekt: "Förderschwerpunkt Biotechnologie: ChemBioTec: Produktion und erstmaliger Einsatz von β-Aminopeptidasen zur umweltfreundlichen Biosynthese von β-Peptiden als Intermediate für die Herstellung innovativer Pharmaka".

Seit 07/2007 Promotionsstudium

07/2007 – 06/2010 Promotionsstipendium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU), Schwerpunkt: "Nachhaltige Bioprozesse"; durchgeführt am Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Zentrum für Mikrobielle Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich.

<u>Thema der Dissertation</u>: "Optimierung der Penicillinacylase Produktion und Charakterisierung einer neuen, biotechnologisch relevanten β-Peptidyl Aminopeptidase BapF aus *Pseudomonas aeruginosa*."

<u>Sprachkenntnisse</u>

Englisch (fließend), Lateinisch (Latinum)

09/2009Sonstige QualifikationenManagement-Seminar des Northern Institute of Technology Management
(NIT); im Rahmen der ChemBioTec Graduiertenschule der DBU.

Private Interessen

Tauchen, ferne Länder, Reisen, Lesen

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 18. Oktober 2010

Viola Fuchs

"Was immer Du tun kannst oder erträumst zu können, beginne es jetzt."

Johann Wolfgang Goethe (1749-1832)